

REPUBLIQUE DU TCHAD

\*\*\*\*\*

MINISTERE DE L'ELEVAGE ET DE LA PRODUCTION  
ANIMALE

\*\*\*\*\*

SECRETARIAT GENERAL

\*\*\*\*\*

ECOLE NATIONALE DES TECHNIQUES DE  
L'ELEVAGE

\*\*\*\*\*

DIRECTION DE LA FORMATION INITIALE

\*\*\*\*\*

DEPARTEMENT DES TECNICIENS SUPERIEURS

UNITE - TRAVAIL - PROGRES

\*\*\*\*\*

وحدة - عمل - تقدم



جمهورية تشاد

\*\*\*\*\*

المجلس العسكري الانتقالي

\*\*\*\*\*

رئاسة الوزراء

\*\*\*\*\*

وزارة الثروة الحيوانية والإنتاج الحيواني

\*\*\*\*\*

الإدارة العامة للمدرسة الوطنية لتقنيات

الثروة الحيوانية

\*\*\*\*\*

قسم شؤون الطلاب والامتحانات

## BIOTECHNOLOGIE DE LA REPRODUCTION ANIMALE (TSE-LPE)

Chargé de cours : KONDIGUEL KOULATOLOUM (Martial)

Master en productions Animales

Master en Biologie des Organismes Animaux

ANNEE ACADEMIQUE : 2025-2026

## GENERALITES

### A.Définitions et historique

Ce sont l'ensemble des méthodes ou techniques utilisant des éléments du vivant (organismes, cellules, éléments subcellulaires ou moléculaires) pour rechercher, produire ou modifier des éléments ou organismes d'origine végétale ou animale (ou non). Elles concernent donc des procédures qui peuvent contribuer au développement de nouveaux produits ou de services et des produits déterminés. Elles regroupent les méthodes traditionnelles, les biotechnologies modernes fondées sur la génétique moléculaire et le génie génétique. Les **Biotechnologies de la Reproduction** sont réparties en quatre générations :

- ✓ L'insémination artificielle ou biotechnologie de la première génération ;
- ✓ Le transfert embryonnaire ou biotechnologie de la deuxième génération ;
- ✓ La fécondation *in vitro* et nucléaire ou biotechnologie de la troisième génération ;
- ✓ La transgénèse ou biotechnologie de la quatrième génération.

Elles se rapportent aux espèces de mammifères, oiseaux et poissons.

La biotechnologie est un processus multidisciplinaire mis en place par l'humanité, de manière empirique, depuis plus de 5 000 ans. Dès le début de la domestication des plantes et des animaux, période correspondante à l'apparition de l'agriculture et de l'élevage ; l'homme s'est intéressé à la transformation des produits, de sa production « agricole » en transformant par exemple le lait en lait caillé en l'exposant aux bactéries, la farine en pain en ajoutant de la levure.

Les transformations, par fermentation, constituent les prémices de la biotechnologie au sens large. Les applications liées à la fermentation ont évoluées progressivement au gré des découvertes de concepts biologiques et de la maîtrise de nouvelles techniques.

L'évolution de la biotechnologie et l'élargissement de ces champs d'application sont fortement liés. Le transfert embryonnaire ou biotechnologie de la deuxième génération comme le rappelle Thibier (1990), est apparu sur le terrain quelques trente ans plus tard, autour des années 1975. IL connaît aussi un développement mondial.

La production d'embryons par fécondation *in vitro* est une technique qui n'a été maîtrisée qu'à partir du début des années 90. Elle a connu, depuis cette date, une évolution très rapide en raison des avantages qu'elle présente pour la gestion du progrès génétique, du facteur économique, majeur de productivité dans tous les grands pays d'élevage à travers le monde.

La fécondation *in vitro* a fait l'objet de recherches très actives dans le but d'évaluer les risques sanitaires en particulier les risques de transmission et de dissémination des maladies animales.

Dès le début des années 1980, de techniques de reconstitution d'embryons par introduction d'un noyau dans le cytoplasme d'un ovule ou d'un œuf préalablement énucléé (McGrath et Solter, 1983) ont ouvert la voie à des études fondamentales sur la régulation de l'expression des génomes parentaux issus de cellules embryonnaires.

Cette étape décisive a ouvert la voie à l'utilisation de noyaux de cellules somatiques prélevées sur des animaux adultes et à la naissance de jeunes, chez le mouton (Wilmut et al., 1997), la

vache (Vignon et al., 1998) puis la souris (Wakayama et al., 1998). Ces résultats ont considérablement renouvelé l'intérêt de la technique de transfert de noyau ou «clonage ».

## Chapitre I: RAPELS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE L'APPAREIL GENITAL FEMELLE

### I. RAPELS ANATOMIQUES

L'appareil génital femelle comprend deux **ovaires** qui assurent les fonctions germinales (production d'ovocytes) et endocrines (sécrétions d'œstrogènes, progestérone), **deux trompes utérines** qui constituent la partie initiale des voies génitales de la femelle. Chaque oviducte comprend le **pavillon ou infundibulum** (qui coiffe l'ovaire et capte les ovocytes émis au moment de l'ovulation), **l'ampoule** (site de la fécondation) et **l'isthme** (long conduit étroit aux parois musculeuses assurant le transfert des œufs vers l'utérus). Il y'a un **utérus** qui est l'organe de la gestation.

Deux **cornes utérines** s'unissent caudalement sur le plan médian pour se poursuivre par un corps impair qui se raccorde au vagin par l'intermédiaire d'un col. Ces cornes constituent deux formations tubaires dont les deux faces sont réunies par deux bords et qui se terminent par deux extrémités (proximale et distale). Le bord **mésométrial** donne insertion au ligament large correspondant. Le bord **libre** est opposé au précédent. L'extrémité proximale constitue le **sommet** ou **apex**, voisin de l'ovaire qui reçoit la trompe utérine. L'extrémité distale forme la base qui se rattache au corps utérin. Le corps est un peu aplati dorso-ventralement, on lui reconnaît donc deux faces (dorsale et ventrale), deux bords (mésométrial et libre) et deux extrémités (crâniale et caudale). L'extrémité caudale se rétrécit pour se continuer par le col. L'apex des cornes de l'utérus est voisin des ovaires.

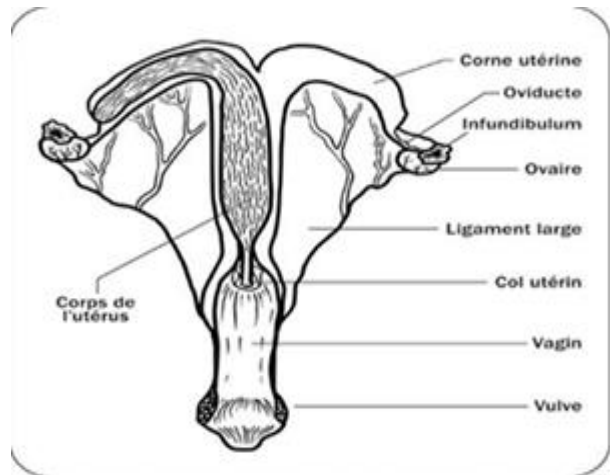
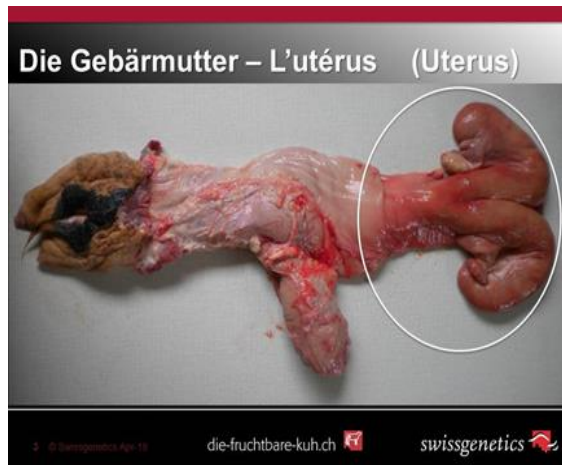
Suivant l'espèce, il sera donc placé plus ou moins caudalement dans la cavité abdominale. Pour des espèces dont les ovaires sont crâniens (carnivores, rongeurs), les cornes et le corps de l'utérus seront étirés suivant l'axe longitudinal de l'organisme. Pour les espèces dont les ovaires sont caudaux (ongulés), l'utérus va s'enrouler sur lui-même en dessinant des spires à axe transversal. Aussi, la séparation entre l'utérus gauche et droit est plus ou moins marquée. Par exemple, chez la lapine, la ratte et le cobaye, la division est complète (deux cornes, deux corps, deux cols utérins) ; Chez le Hamster les deux corps débouchent dans un col commun. Dans ces trois espèces l'utérus est dit "**duplex**". Chez la souris, les Carnivores, la truie, la chèvre et la jument, les deux cornes débouchent dans un corps puis dans un col commun. Les cornes et le corps sont d'une longueur équivalente chez la jument où l'utérus est qualifié de "**bicorne**". Les cornes sont beaucoup plus longues que le corps dans les autres espèces où l'utérus est qualifié de "**bipartite**", Chez les Primates, on ne trouve qu'une corne, un corps et un col avec deux trompes : l'utérus est dit "**simplex**".

Un **col utérin ou cervix** sépare l'utérus du vagin. Le **vagin** : est la partie des voies génitales femelles qui va recevoir l'organe copulateur du mâle. Il est séparé du vestibule du vagin par une membrane appelée **l'hymen**, qui est très développée chez les primates et le porc. Le vagin est logé dans la cavité pelvienne entre le rectum et la vessie. Le vestibule du vagin, qui correspond au trajet terminal commun des voies génitales et urinaires, est plus ou moins long suivant les espèces. Chez la truie, la chèvre et les Carnivores, le vestibule est long.

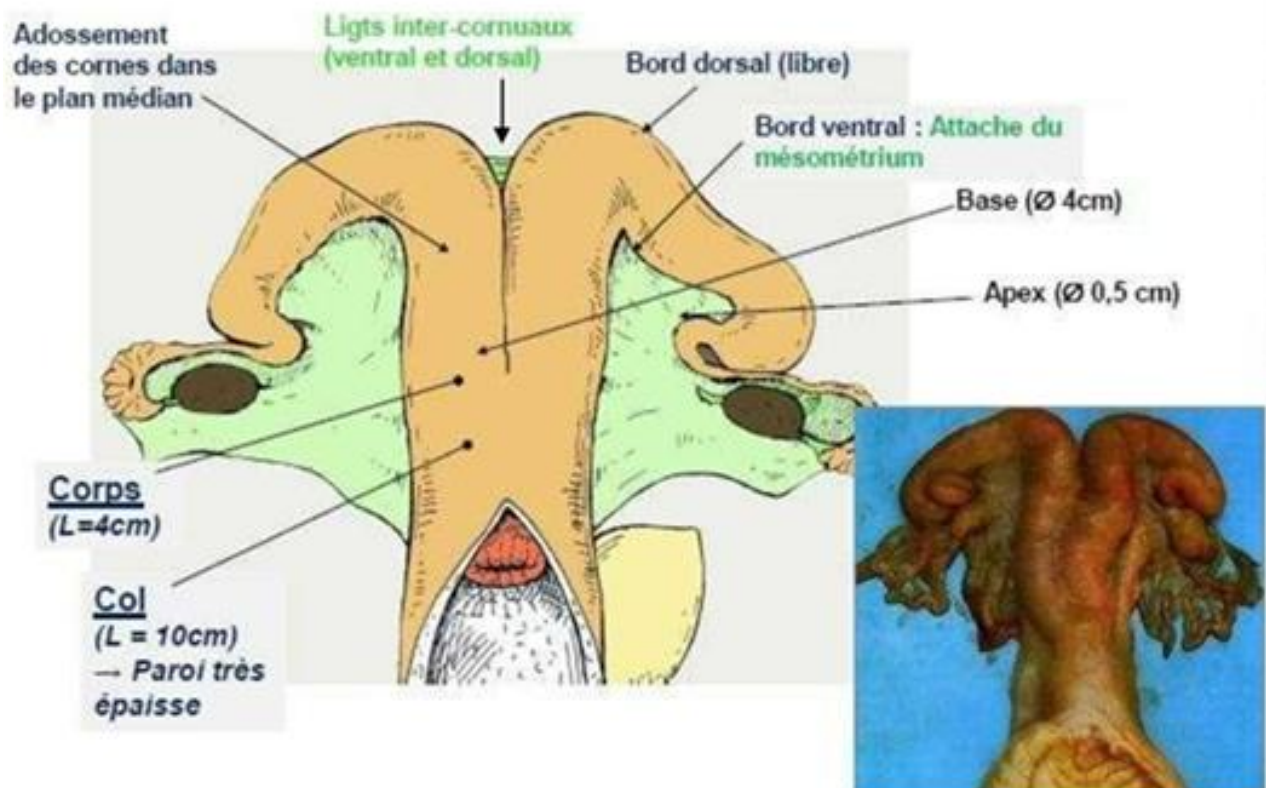
Les glandes vestibulaires qui déposent leur produit de sécrétion lubrifiant dans le vestibule du vagin sont conglomérées (glandes majeures) ou disséminées dans la paroi (glandes mineures). Les glandes vestibulaires majeures (glandes de Bartholin ou glandes bulbo-vestibulaires) existent chez la chatte, la lapine et les Primates, elles sont absentes chez la chienne, la chèvre,

la truie et le hamster. Les glandes vestibulaires mineures (glandes urétrales ou glandes de Littre) sont présentes dans toutes les espèces.

L'appareil génital est appendu dans la cavité abdominale par le ligament suspenseur qui se divise en 3 parties : le **mesovarium** retient les ovaires, le **mesosalpynx** entoure les oviductes et le **mesometrium** ou **ligament large** auquel sont rattachées les cornes utérines et le cervix



Appareil de la Jument

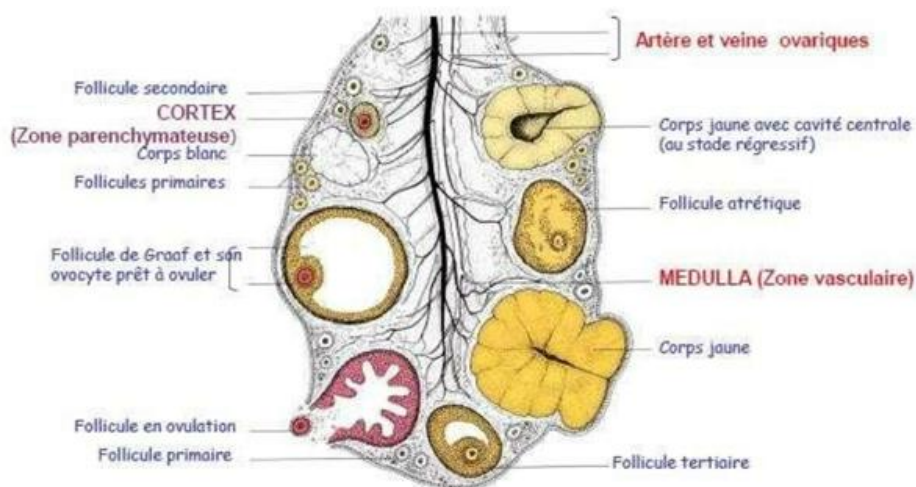
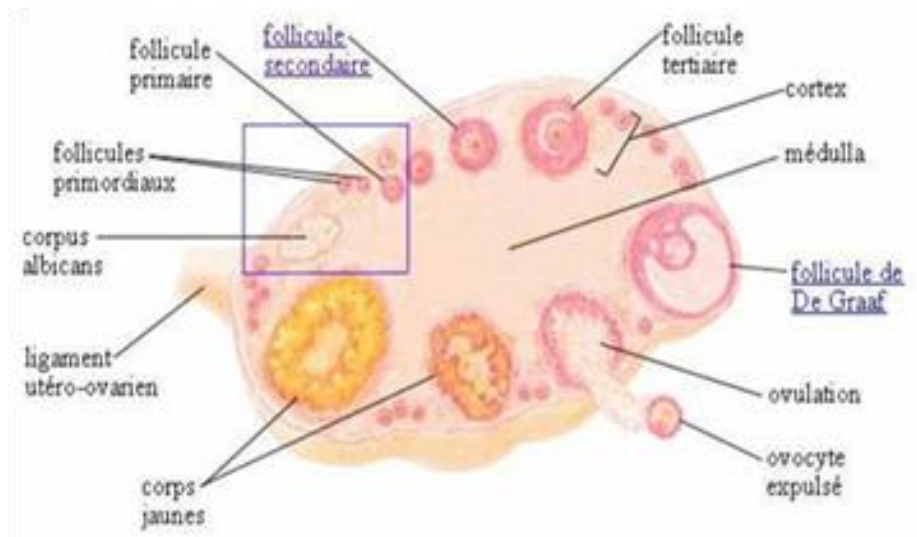


## 1.1. Anatomie et structure interne des ovaires

Les ovaires sont des glandes de forme et de dimension variable. Ils sont au nombre de deux et occupent des positions différentes selon les espèces. Par exemple, chez le chien et chat, les ovaires de forme ovale, sont situés caudalement au rein et dans la partie dorsale de l'abdomen. Chez la femme, les ovaires de forme ovale ou en forme d'amande sont situés dans la cavité pelvienne.... Chez presque toutes les espèces, l'ovulation peut avoir lieu sur toute la surface de l'ovaire à l'exception de la jument qui ovule dans une fosse ovulatoire centrale.

IL est constitué d'une **medulla centrale** par où pénètre l'innervation et la vascularisation sanguine et lymphatique et d'un cortex périphérique qui est le siège de l'activité folliculaire. Contrairement aux autres espèces, chez la jument, le cortex est au centre et la médulla vers l'extérieur.

Au cours d'une grande partie de son développement, le gamète femelle (ovocyte) se trouve au sein d'un follicule ovarien et son évolution ne peut être distinguée de celle du follicule.



## II. RAPELS PHYSIOLOGIQUES : Cycle sexuel et fonction ovarienne

On distingue deux types de cycles : le cycle œstral et le cycle menstruel.

Le cycle œstral se caractérise par l'apparition périodique d'un comportement d'œstrus qui est l'acceptation du mâle pendant la période qui précède l'ovulation.

Le cycle menstruel, est caractérisé par une activité cyclique des ovaires se manifestant par l'apparition périodique d'un saignement utérin ou menstruation.

L'œstrus et la menstruation caractérisent respectivement le début de ces deux cycles. Au cours du cycle œstral l'ovulation a lieu au début et au milieu au cycle menstruel.

### 1.1. Le cycle oestral

Quatre phases déterminent le cycle oestral :

- ✓ Le proœstrus : période qui précède l'œstrus et qui correspond à la croissance folliculaire terminale ;
- ✓ L'œstrus : période d'acceptation du mâle, du chevauchement et celle de l'ovulation ;
- ✓ Le metœstrus ; phase de la formation des corps jaunes à partir des follicules qui ont ovulé ;
- ✓ Le diœstrus est caractérisé par la présence d'un ou plusieurs corps jaunes. En l'absence de fécondation, le corps jaune régresse. C'est le retour à la phase proœstrus et le début d'un nouveau cycle.

Espèces	Pro-œstrus (j)	œstrus	Metœstrus (j)	Diœstrus (j)	Durée cycle (j)	Moment de l'ovulation/œstrus
Vache	2-3	12-18h	2	15	21	10-12h post-œstrus
Brebis	2-3	24-36 h	2	10-12	17	36-40h après début œstrus
Chèvre	3	24-40 h	16	16	20-21	30-36h après début œstrus
Truie	2	24-72 h	2	14	21	24-45 après début œstrus
Jument	2-5	6 (3-10)j	2	12-13	21	6 <sup>ème</sup> j œstrus

**Tableau :** Durée des différentes phases du cycle sexuel des femelles des mammifères et moment de l'ovulation par rapport à l'œstrus

### 2.2. Types d'ovulation chez les mammifères

- ❖ **Ovulation spontanée :** C'est une ovulation qui se déclenche au cours de la période d'œstrus que la femelle soit en présence d'un mâle ou non.
- ❖ **Ovulation provoquée :** C'est une ovulation qui intervient que lorsque la femelle s'accouple avec le mâle.

### 2.3. Cycle ovarien

Le cycle ovarien correspond à un ensemble d'événements cellulaires. Il est caractérisé par la phase folliculaire qui constituée par la croissance terminale et la maturation des follicules aboutissant à l'ovulation suivie de la formation des corps jaunes qui caractérise la phase lutéale du cycle. La régression du ou des corps jaunes à la fin de la phase lutéale est suivie d'un nouveau cycle ovarien. Ces transformations morphologiques sont accompagnées de modifications des sécrétions endocrines et de manifestations comportementales.

### 2.3.1. Phase folliculaire

La phase folliculaire correspond à la période qui s'étend de la fin de la croissance folliculaire à l'ovulation (phases de proœstrus et œstrus). Elle comporte une phase d'accroissement de la taille de l'ovocyte, tandis que les cellules somatiques qui l'entourent entrent en prolifération, constituant un tissu avasculaire particulier appelé **granulosa**.

Le plus petit follicule est le follicule **primordial**. IL est constitué de l'ovocyte entouré d'une couche de cellules de la granulosa. Le follicule primordial se transforme en follicule **primaire**. La granulosa se creuse ensuite d'une cavité appelée **antrum** dans laquelle s'accumulent les produits de sécrétion des cellules folliculaires, le follicule prend le nom de follicule **secondaire ou antral**. A ce stade, les cellules périfolliculaires du stroma ovarien se différencient pour constituer les thèques folliculaires. La thèque interne, séparée de la granulosa par la membrane basale, est caractérisée par la présence d'une vascularisation propre.

Au cours des stades terminaux du développement folliculaire, la vascularisation de la thèque se développe, le volume de l'antrum augmente de façon très importante, tandis que les cellules de la granulosa perdent progressivement leur aptitude à proliférer. L'ovocyte entouré de sa zone pellucide et de quelques assises de cellules folliculeuses fait saillie dans l'antrum.

L'étape finale de la croissance folliculaire est le follicule préovulatoire ou follicule de **de Graaf** caractérisé par : la thèque externe, la thèque interne séparée de la granulosa par la lame basale, l'ovocyte et son noyau ou vésicule germinative au sein d'un massif de cellules de la granulosa appelé **cumulus oophorus**.

### 2.3.2. Ovulation

L'ovulation est la libération d'un ou plusieurs ovocytes fécondables après rupture du ou des follicules ovulatoires.

L'expulsion de l'ovocyte est suivie d'une reprise de la méiose. Aussitôt que le globule polaire est émis, l'ovulation a lieu. L'ovocyte haploïde est retrouvé dans le tiers supérieur de l'oviducte. La deuxième division a lieu si l'ovocyte est fécondé. En l'absence de fécondation, il dégénère.

### 2.3.3. Evolution morphologique du corps jaune

Le corps jaune est la résultante d'une transformation morphologique (lutéinisation) des cellules de la thèque interne et de la granulosa du follicule ovulant. Cette formation est marquée par trois phases qui peuvent être distinguées dans cette évolution :

- ✓ une phase de croissance ou lutéogénèse ;



- ✓ une phase de maintien ou lutéotrophie ;
- ✓ une phase de régression ou lutéolyse.

La mise en place progressive d'un corps jaune fonctionnel dans les jours qui suivent l'ovulation (metœstrus) implique d'importants remaniements morphologiques. La désorganisation de la lame basale qui sépare les cellules de la thèque de celles de la granulosa au cours de la période périovulatoire est suivie de la vascularisation rapide des couches cellulaires de la granulosa à partir des vaisseaux qui irriguaient la thèque. Après l'ovulation, la cavité folliculaire se remplit d'un caillot de sang. Les cellules de la granulosa encerclent le caillot, s'hypertrophient, leur noyau devient polyplœide tandis que le tissu formé se vascularise rapidement.

La présence d'un ou de plusieurs corps jaunes fonctionnels caractérise le diœstrus. En l'absence de fécondation, cette phase s'achève et la régression rapide du corps jaune ou lutéolyse a lieu. Les femelles concernées entrent en præstrus et débute un nouveau cycle. Le corps jaune régresse rapidement et reste présent pendant plusieurs semaines sous la forme d'un organe de petite taille.

#### **2.3.4. Evolution cyclique des voies génitales**

Au cours des cycles, l'épithélium des trompes et de l'endomètre, le stroma et les glandes utérines, l'activité sécrétoire du col utérin et la cytologie de la muqueuse vaginale évoluent et aboutissent à deux finalités :

- ✓ permettre le transport et la survie des spermatozoïdes et des œufs fécondés ;
- ✓ permettre leur développement et leur implantation.

Pendant la période périovulatoire, le col utérin sécrète en abondance un mucus, libéré dans le vagin mais aussi dans l'utérus qui joue un rôle important dans le transport des spermatozoïdes chez la vache, la brebis et la femme.

Au niveau de l'utérus, au cours de la phase lutéale, l'endomètre connaît une différenciation fonctionnelle concernant l'épithélium, les glandes et leur sécrétion et le système vasculaire. Un nouveau cycle commence avec un remodelage tissulaire, notamment par la multiplication des cellules de l'épithélium et des glandes de l'endomètre en absence d'une fécondation.

##### **❖ Phase folliculaire**

L'endomètre est formé d'une lame basale (basalis) contenant ses cellules souches qui se multiplient, d'un stroma (zone functionalis= stroma +cellules déciduales en phase lutéale) et d'un épithélium composé de cellules sécrétrices et de cellules ciliées. Les mitoses sont stimulées pendant la première partie du cycle : phase proliférative ; l'endomètre s'épaissit (3-5 mm d'épaisseur), les tubes glandulaires s'élargissent, les vaisseaux sanguins se développent.

##### **❖ Phase lutéale (phase sécrétoire chez la femme) :**

Les mitoses sont peu nombreuses. L'endomètre ne s'épaissit plus, les glandes s'allongent encore et deviennent tortueuses ; les vaisseaux sanguins se spiralisent (artérioles spiralées);

des vésicules de glycogène apparaissent autour du noyau des cellules sécrétrices. Elles migrent vers l'apex cellulaire et déversent leur contenu dans la lumière glandulaire par exocytose.

### 2.3.5. La menstruation

Chez tous les mammifères à l'exception des primates, l'élimination des couches externes de l'endomètre n'entraîne pas de phénomènes vasculaires visibles, donc pas d'hémorragies bien que les cellules de l'endomètre se vacuolisent conduisant au remodelage cellulaire et vasculaire. Chez les primates de l'ancien monde (macaque, babouin) et la femme, la régression de la muqueuse utérine s'accompagne d'un saignement utérin ou menstruation.

En l'absence de fécondation, on assiste à une déshydratation et une compaction endométriales. Les artérioles spiralisées ont des contractions vasomotrices intenses (spasmes de plus en plus intenses et prolongés). La surface endométriale blanchit. L'ischémie entraîne la désintégration du stroma. A l'occasion des relâchements des spasmes vasculaires, une hémorragie interstitielle se produit. Toutes les couches superficielles de l'endomètre sont ainsi éliminées. L'épaisseur totale de l'endomètre est alors de 1-2 mm. Le flux menstruel s'arrête sous l'influence de l'hémostase physiologique, d'une vasoconstriction prolongée et de la réparation de l'endomètre qui commence dès le premier jour de la période menstruelle. Ces modifications se reproduisent de façon cyclique.

## III. Hormones sexuelles

Les **hormones** sont des molécules produites par un organe, libérées dans le sang et qui modifient le fonctionnement d'un ou plusieurs autre(s) organe(s). certaines hormones sont dites sexuelles et agissent sur les appareils reproducteurs mâle ou femelle.

**La GnRH** (Gonadotropin Releasing Hormone): Comme son nom l'indique, elle stimule le relargage des hormones gonadotropes c'est une hormone sécrétée par l'hypothalamus qui agit sur l'antéhypophyse pour induire la sécrétion pulsatile de LH et de la FSH. Cette sécrétion est faible avant la puberté et l'enfance

Les hormones hypophysaires sont la LH (*luteinizing hormone*) et la FSH (*follicle stimulating hormone*). Ce sont deux hormones protidiques sécrétées par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse. On parle de gonadotropines car elles vont agir directement sur les ovaires. Comme leur nom l'indique, la FSH est une hormone folliculostimulante alors que la LH est une hormone lutéinisante

**La FSH a pour** rôle la stimulation de la maturation de l'ovule chez la femelle et la spermatogenèse chez le mâle. Elle a encore d'autres rôles qui sont aussi la préparation de l'action de la LH.

**La LH**, de même que la FSH, quand à elle, stimule la production d'œstrogènes chez la femelle et de progestérone testostérone et chez le mâle. C'est elle qui déclenche l'ovulation et induit alors la formation du corps jaune et la synthèse de progestérone.

Chez la femelle, les deux principales hormones stéroïdiennes que l'on trouve sont les **œstrogènes** et la **progestérone**. Ce sont des hormones lipidiques, fabriquées à partir d'un précurseur commun qui est le cholestérol. Elles sont sécrétées par les ovaires, mais aussi par

le placenta et les glandes surrénales. **L'oestrogènes** et la **progestérone** sont des hormones sexuelles qui sont nécessaires au développement normal cyclique de la muqueuse de l'utérus.

En effet, à forte dose **Les oestrogènes** exercent un rétrocontrôle positif sur la production de GnRH, LH et FSH, alors qu'ils ont un rétrocontrôle négatif sur ces mêmes hormones à faible Dose.

La **progestérone** est sécrétée par le corps jaune de l'ovaire, et comme son nom l'indique, elle permet le maintien de la gestation. Tout comme les œstrogènes, la progestérone a également un rôle sur le complexe hypothalamo-hypophysaire en inhibant la sécrétion de GnRH, de LH et de FSH.

### **Les prostaglandines**

C'est un groupe d'hormones lipidiques dont la plus importante pour la reproduction est la  $\text{PGF}_2\alpha$ . Cette hormone a plusieurs rôles en reproduction, dont le principal est le déclenchement de la régression du corps jaune. Ce rôle de lutéolyse est assuré par l'utérus qui produit la  $\text{PGF}_2\alpha$ .

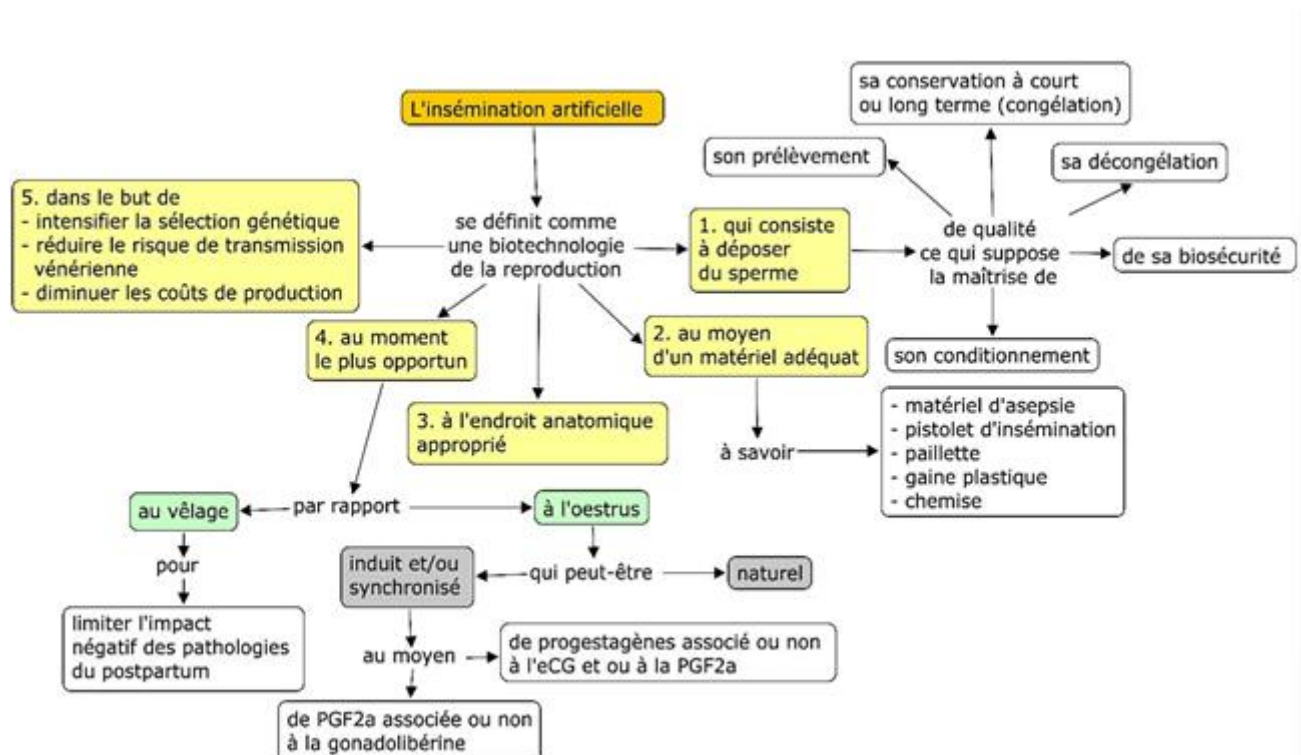
## Chapitre II: INSEMINATION ARTIFICIELLE

### I. Définition et historique

L'insémination artificielle est une technique qui consiste à déposer le sperme au moyen d'un instrument, au moment le plus opportun et à l'endroit le plus approprié du tractus génital femelle. Elle présente plusieurs avantages:

- ✓ Multiplication de la capacité de reproduction des mâles (augmentation du nombre de femelles pouvant être inséminées par un seul éjaculat d'un mâle) et donc d'accélérer le progrès génétique ;
- ✓ Moyen préventif de lutte contre les maladies sexuellement transmissibles.
- ✓ Diminution du coût d'élevage et d'entretien des mâles reproducteurs.

Cette technique est utilisée par les arabes au 14<sup>ème</sup> siècle. En 1779, le physiologiste italien Lauro Spallanzani injecta du sperme dans le vagin d'une chienne en chaleur et l'animal accoucha 62 jours plus tard de 3 chiots. Puis, au début du 20<sup>ème</sup> siècle, Ivanov et ses collaborateurs développent la méthode en mettant au point le vagin artificiel. Elle prit réellement de l'ampleur quand Poldge et Rowson en 1952, ont mis au point la congélation du sperme. Actuellement, elle s'est généralisée et concerne non seulement l'espèce bovine, mais les autres espèces tels qu'équine, ovine, caprine, porcine, les volailles et les abeilles.



### II. Prélèvement du sperme

Le prélèvement du sperme constitue la première phase de l'IA. C'est une phase au cours de laquelle l'on récolte et examine le sperme.

#### 2.1. Vagin artificiel

Quel que soit l'espèce animale, c'est avec cet instrument que se fait la recolte du speme. Il

comporte deux parties:

Un cylindre extérieur en matériel rigide le plus souvent en caoutchouc dur et épais (isolation thermique) ou en plastique muni d'une ouverture fermée par un bouchon. Ses dimensions (longueur et diamètre externe) varient selon l'espèce et l'âge de l'animal.

Le manchon (chemise intérieure en latex ou en caoutchouc artificiel) est introduite dans le cylindre externe et ses extrémités rabattues et maintenues par un élastique. La cavité ainsi formée par le cylindre externe et la chemise interne est remplie d'eau à température qui varie selon l'espèce et en quantité suffisante pour obtenir une pression équivalente à celle du vagin de la femelle.

Une extrémité du vagin artificiel est lubrifiée: elle servira à introduire le pénis. Sur l'autre extrémité, un cône en caoutchouc est fixé, au bout duquel un tube en verre ou en plastic gradué est adapté pour recueillir le sperme. L'ensemble sera fixé au moyen de deux lanières en caoutchouc.

Si le vagin choisi n'est pas adapté, il risque de le blesser l'animal, souillant ainsi le prélèvement ou entraînant un risque de refus de l'animal pour les prélèvements ultérieurs.

### **2.1.1. Types de vagin artificiel et espèces animales**

#### **❖ Taureau**

Chez le taureau, la température de l'eau de remplissage qui est de 40°C est plus importante que la pression. Le maintien du vagin dans une étuve à 45°C et son remplissage dans les minutes précédant le prélèvement est recommandé.

La surpression est un risque majeur. Elle réduit l'espace réservé au pénis lors de l'éjaculation et cause l'éclatement de la paroi interne qui est une possibilité de contamination du prélèvement par de l'eau. Un remplissage correct se traduit lorsque l'ouverture du vagin en position verticale simule une fente vaginale.

La récolte se fera autant que possible dans un endroit calme permettant d'éviter le stress. Elle se fait dans un lieu non glissant et non pulvérulent afin d'éviter la contamination du prélèvement. Le recours à un animal bête en train est préférable mais non indispensable.

Les conditions d'hygiène suivantes doivent être respectées:

- ✓ lavage de l'extrémité du fourreau;
- ✓ désinfection du vagin artificiel.

Deux à trois fausses montes sont à réaliser avant le prélèvement: (augmenter l'état d'excitation du taureau, améliorer les principales caractéristiques du sperme (volume, nombre de spermatozoïdes vivants)).

Au moment idéal, le pénis est dirigé à l'aide de la main appliquée sur le fourreau vers l'ouverture du vagin artificiel (de bas en haut selon un angle de 45° et légèrement vers l'extérieur en évitant toute déviation excessive du pénis).

L'éjaculation est le plus souvent immédiate, rapide (parfois brutale). Le vagin est retourné de manière à recueillir le sperme dans le tube de récolte (le protégé d'un choc thermique éventuel par une enveloppe isothermique (de l'ouate, du tissu)).

IL est possible de réaliser deux prélèvements au cours de la même séance.

#### ❖ **Bélier**

C'est le même type de vagin comme chez le taureau mais avec de dimensions plus réduites. Sa température doit osciller entre 41 et 44°C. L'animal de monte peut être une brebis en chaleurs ou non, un bélier ou une brebis traitée aux œstrogènes. IL faut entraîner les béliers à donner du sperme en-dehors de la période de reproduction. Les animaux peuvent éjaculer trois à huit fois espacés de 15 minutes en une journée.

#### ❖ **Étalon**

Avant de pouvoir récolter la semence, la première étape est d'accoutumer le cheval. Chez les étalons, il lui faut donc une séance d'échauffement. Son groom lui fait faire des tours de manège à la longe pendant une quinzaine de minutes.

Ensuite, IL faut exciter l'étalon, en présence d'une jument en chaleur. Une fois qu'il l'a senti et qu'il est prêt, on fait grimper le cheval sur le mannequin en faisant dévier son pénis dans le vagin artificiel. Le sperme est recueilli dans l'éprouvette. Cela dure quelques secondes, l'étalon est ensuite mis au repos au box.

#### ❖ **Bouc**

La température du vagin artificiel sera de 44-45°C. Le temps nécessaire à l'obtention d'un éjaculat varie avec les individus. Les mâles de bonne ardeur sexuelle peuvent donner deux éjaculats au cours de la même séance.

### **2.2. Electro-éjaculation**

L'électro-éjaculation est applicable chez les bovins, ovins, canidés et les volailles. Elle consiste à provoquer l'émission de sperme par l'excitation électrique des nerfs érecteurs et éjaculateurs.

Que ça soit sur animal debout ou couché, la méthode est le plus souvent appliquée aux animaux qui ne peuvent être récoltés au moyen d'un vagin artificiel.

Elle est utilisée pour la première fois en 1863 par Eckart chez le chien et connait une amélioration par Laplaudet Cassou en 1945.

L'appareillage comporte une sonde rectale de forme ogivale munie d'électrodes bipolaires parcourues d'un courant d'intensité moyenne mais de bas voltage, alimentées par batterie ou par secteur au moyen d'un transformateur. Ce dernier permettant d'avoir une tension constante. Le rhéostat permet de faire varier les caractéristiques du courant de manière à obtenir le cycle nécessaire à l'obtention de l'écoulement du sperme.

### **2.3. Autres méthodes**

Chez le taureau, le massage transrectal du tractus génital interne (vésicules séminales) a été proposé comme méthode. Elle est indiquée pour des animaux présentant des lésions de l'appareil locomoteur.

Au bout de 2 à 3 minutes, si l'animal n'éjacule pas, il faut envisager une autre méthode. Le massage mécanique du fourreau et du pénis est applicable chez le chien.

### III. Examens du prélèvement

#### 3.1. Examen macroscopiques

##### 3.1.1. Volume

La quantité de sperme varie selon les espèces. Cette variation dépend de l'état physiologique, l'âge, la saison, les méthodes de récolte, la race ou les conditions sanitaires et alimentaires.

On distingue les espèces à insémination de type utérin (cheval, porc, chien) chez lesquelles le sperme est abondant et peu concentré tandis que l'inverse est vrai pour les espèces de type vaginal (ruminants, lapin).

	Taureau	Bélier	Bouc	Verrat	Etalon	Chien	Homme
Durée éjaculation	1-2s	1-2s	1-2s	10min	5s	15-30min	1-2s
Volume(ml)	3-8	0,8-1,2	0,5-1,5	50-250	60-100	5-20	2-6
Concentration(x1000/mm <sup>3</sup> )	500-2500	1500-6000	3000-6000	150-300	50-100	500-1000	50-150
Nbre total en spz (milliards)	4-8	1,6-3,6	1,5-6	30-60	5-15	2-5	0,3-1

##### 3.1.2. Aspect et consistance

Le sperme normal est un liquide crémeux, épais, légèrement jaunâtre ou grisâtre selon les espèces consistant en une suspension de spermatozoïdes dans le plasma séminal. IL devient plus clair au fur et à mesure que la concentration en spermatozoïdes diminue.

Le sperme du taureau et du bélier est de consistance laiteuse et de coloration blanchâtre. Le sperme de bélier est blanc crémeux, plus dense et plus opaque que celui du taureau.

##### 3.1.3. Couleur

Le sperme est blanchâtre. Les causes physiologiques (concentration) et pathologiques peuvent être à l'origine de la modification de cette couleur.

Ainsi, la couleur jaunâtre chez certains taureaux est imputable à la présence d'un lipochrome provenant des vésicules séminales qui n'est pas liée à l'alimentation. Elle peut résulter de la présence de pus ou d'urine pouvant compromettre le pouvoir fécondant du sperme.

La coloration rose ou rougeâtre résulte de la présence de sang ou peut faire suite à l'administration prolongée de phénothiazine. Quelques gouttes ou ml de sang peuvent parfois apparaître à la fin de l'éjaculation et disparaissent le plus souvent spontanément et n'interfère pas la fécondation.

La coloration brunâtre est synonyme de la présence d'éléments sanguins dégénérés. Enfin, celle bleuâtre résulte d'une faible concentration ou de l'administration de bleu de méthylène.

##### 3.1.4. Viscosité

La viscosité est fonction de la concentration en spermatozoïdes. Comparée à l'eau distillée, la viscosité du sperme de taureau est de 3,7 et dépend également de sa conductibilité électrique

(concentration en ions).

### **3.1.5. PH**

La mesure du pH est immédiate. La valeur normale est comprise entre 6,5 et 6,8. Les spermatozoïdes fortement concentrés et riches en fructose accusent une diminution plus rapide du pH que les autres du fait de l'accumulation plus rapide d'acide lactique due à une glycogénolyse plus intense. Ce qui témoigne indirectement leur meilleure qualité.

## **3.2. Examen microscopique**

IL se réalise aussitôt après le prélèvement, selon la nature des examens microscopiques en respectant les conditions thermiques optimales. Il est également possible de conserver à plus long terme (1 mois) un échantillon de sperme en diluant 0,5 à 1 ml dans une solution saline (Solution de Hancock) et formolée avant son stockage au réfrigérateur.

### **3.2.1. Détermination de la motilité massale**

Chez le taureau, l'intensité et le nombre des mouvements se traduisent par de véritables vagues observables après dépôt d'une goutte de sperme sur une lame préchauffée et son examen au faible grossissement (40 à 125) si possible au moyen d'un microscope à contraste de phase. Sur une échelle d'évaluation de 1 à 4:

- ✓ Un sperme de très bonne qualité (4) montre des tourbillons noirs et rapides;
- ✓ Un sperme de bonne qualité (3), présente des tourbillons moindres et plus clairs;
- ✓ Pour un sperme de qualité correcte (2), les tourbillons ne sont plus visibles et on devine la présence d'une mobilité individuelle;
- ✓ Un sperme de mauvaise qualité (1), pratiquement pas de mobilité individuelle.

### **3.2.2. Détermination de la motilité individuelle**

Les analyseurs d'image de type CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) permettent de quantifier de manière plus précise la nature et la vitesse des déplacements de chaque spermatozoïde.

- ✓ Un sperme de très bonne qualité (4): au moins 80-100 % de spermatozoïdes mobiles;
- ✓ Un sperme de bonne qualité (3): 60 à 79 % de spermatozoïdes mobiles;
- ✓ Un sperme de qualité correcte (2): 40 à 59 % de spermatozoïdes mobiles;
- ✓ Un sperme de mauvaise qualité (1) : moins de 40 % de spermatozoïdes mobiles.

### **3.2.3. Détermination de la concentration**

La concentration détermine le nombre de spermatozoïdes par  $\text{mm}^3$ . Sa détermination se fait:

- ✓ Directement par comptage des spermatozoïdes au moyen d'une cellule hématimétrique;
- ✓ Par comptage électronique;
- ✓ Par néphélométrie (néphélémétrie) qui consiste à apprécier la concentration en spermatozoïdes, en évaluant l'opacité de la suspension au moyen d'un spectrophotomètre (colorimètre). Cette opacité peut être indirectement augmentée suite à la présence de débris cellulaires. Cette méthode est moins exacte



chez les espèces dont le plasma séminal présente de grandes variations d'opacité (verrat, étalon);

- ✓ La détermination du volume cellulaire par centrifugation.

Pour calculer la concentration, on utilise la formule suivante:

$$\text{Concentration} = N \times 4 \times 10 \times D$$

**N:** est le nombre de spermatozoïdes comptés dans 4 grands carrés (pour le verrot les spermatozoïdes sont le plus souvent dénombrés sur 10 grands carrés et la règle de trois est appliquée pour compter les spermatozoïdes sur l'ensemble des carrés).

**4:** p l'hématimètre comporte 16 grands carrés d'une surface totale égale à 1 mm<sup>2</sup>.

**10:** hauteur de la chambre de numération est égale à 0.1 mm.

**D:** degré de dilution.

#### **IV. Examen morphologique**

Le spermatozoïde peut être considéré comme une biopsie du tissu testiculaire. Son examen morphologique permet de mieux identifier le caractère normal ou non de la spermatogenèse. Cette situation est surtout influencée par deux groupes de facteurs dont l'un est lié à la température et l'autre au stress. Il existe d'autres facteurs moins communs qui sont parfois impliqués: facteurs génétiques, facteurs nutritionnels et l'âge.

##### **4.1. Principes généraux**

L'examen morphologique se à base de la coloration du sperme. Une goutte de sperme est déposée à l'extrémité d'une lame et étendue en couche mince au moyen d'une autre lame inclinée à 45° puis séchée à l'air libre en quelques minutes. Le frottis est ensuite fixé par immersion dans une solution d'alcool méthylique ou dans une solution de formaline à 5 %. La fixation à l'air libre est également possible comme celle consistant à passer rapidement le frottis au-dessus d'une lampe à alcool. Tout choc thermique sera néanmoins évité pendant ces préparations. Les éjaculats trop concentrés seront avantageusement dilués.

Les colorations totales ont pour objectif de mieux faire apparaître la morphologie du spermatozoïde. Les colorations vitales permettent de différencier les spermatozoïdes morts et vivants.

IL y'a les colorations totales dites simples (encre de Chine, bleu de méthylène, bleu de toluidine, violet de gentiane, fuschine, etc.) qui donnent une coloration uniforme des spermatozoïdes et les colorations doubles (Giemsa, Williams) qui font mieux apparaître les différences structurales au niveau de la tête, de l'acrosome ou de la pièce intermédiaire.

##### **4.2. Anomalies morphologiques**

Les anomalies morphologiques peuvent être:

- ✓ Primaires (1) si elles trouvent leur origine pendant la phase de spermatogenèse (testicule) ;
- ✓ Secondaires (2) si elles surviennent pendant leur phase de maturation (épididyme) ;
- ✓ Certaines peuvent être à la fois primaires et secondaires comme la présence de

gouttelettes, les têtes sans queue.

Les lésions du spermatozoïde peuvent également être qualifiées de majeures ou de mineures selon qu'elles exercent ou non un effet négatif sur la fertilité.

Lésions majeures	
Tête	Queue
Lésion en bouton de l'acrosome	Gouttelette cytoplasmique proximale
Aspect piriforme	Enroulement total
Vacuoles nucléaires (lésions en diadème)	Aspect en tire-boucon
Absence de queue	
Lésions mineures	
Micro et macrocéphalique	Gouttelette cytoplasmique distale
	Extrémité de la queue recourbée
	Implantation abaxiale

## V. Examens bactériologiques

IL se fait lorsque l'on suspecte une infection du tractus génital et plus spécialement lorsque le sperme est pollué par des polynucléaires. Normalement le sperme est stérile mais il peut être contaminé par les conditions de la récolte. IL doit être accompagné avec les autres examens macroscopiques et microscopiques.

## VI. Examens complémentaires

D'autres tests complémentaires peuvent être réalisés en vue d'évaluer l'intégrité de la membrane plasmique (coloration à l'éosine-nigrosine, au moyen de fluorochromes, test hypo-osmotique), de l'acrosome (examen direct ou indirect après induction de la réaction acrosomiale), du noyau (test de décondensation de la chromatine).

L'examen microscopique permet de poser le diagnostic de l'une ou l'autre anomalie dont il est important de rapporter les définitions. On parlera de:

- ✓ **asthénospermie** ou **d'asthénozoospermie**: si la motilité individuelle est inférieure à 30 % ou si la note de motilité massale est inférieure à 2;
- ✓ **Azoospermie**: cas d'absence de spermatozoïdes dans l'éjaculat;
- ✓ **Nécrospermie**: si l'on observe une proportion élevée de spermatozoïdes morts;
- ✓ **Oligospermie**: traduit une concentration faible en spermatozoïdes ( $< 300.000 / \text{mm}^3$ );
- ✓ **Teratospermie** ou **teratozoospermie**: traduit la présence d'une proportion élevée en

Spermatozoïdes anormaux ( $> 30 \%$ ).

## **VII. Dillution du sperme**

Chez les ruminants, l'étape préliminaire permettant de séparer la fraction spermatique de la fraction constituée des sécrétions des glandes annexes n'est pas indispensable. La semence est constituée pour l'essentiel des sécrétions testiculaires.

Pour conditionner le sperme, quelques précautions telles que l'utilisation de recipients stériles, de produits chimiques purs, l'eau distillée, l'absence de chocs thermiques et la mise du sperme à l'abri de l'air et de la lumière sont à respecter.

### **7.1. Milieu de dilution**

C'est un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes in vitro et de réaliser à partir d'un seul éjaculat l'insémination d'un grand nombre de femelles. La dilution du sperme a pour but d'accroître le volume total de la masse spermatique.

### **7.2. Qualité d'un milieu de dilution**

Il doit répondre aux conditions suivantes:

- ✓ Leur pression osmotique doit être isotonique avec le sperme pour l'espèce en cause et être capable de la maintenir pendant la durée de stockage;
- ✓ Ils doivent renfermer des substances colloïdales (jaune d'œuf, lipoprotéines, lécithines) susceptibles de protéger les spermatozoïdes;
- ✓ Les substances tampons permettent de maintenir un pH favorable aux spermatozoïdes (6, 2 à 6, 8). Leur présence est plus importante pour le sperme de taureau et de bélier que celui d'étalon et du verrat. Etant donné que la concentration élevée en spermatozoïdes et donc la glycogénolyse élevée du sperme de ces deux espèces est responsable d'une diminution rapide du pH;
- ✓ Les substances nutritives sont sensées favoriser le métabolisme, la vitalité et la longévité des spermatozoïdes;
- ✓ Le milieu de dilution doit être dépourvu d'agents infectieux (préjudiciables à la survie des spermatozoïdes, à la fertilisation et au développement de l'embryon).

Toutes ces conditions permettront aux spermatozoïdes de remplir leurs quatre fonctions préalables à la fécondation qui sont:

- ✓ Activité métabolique productrice d'énergie ;
- ✓ Mobilité pour progresser dans les voies génitales femelles ;
- ✓ Enzymes de protection sur l'acrosome pour en faciliter la pénétration dans l'ovocyte;
- ✓ Présence de protéines sur la membrane plasmique pour assurer leur survie optimale dans le tractus génital femelle et leur fixation sur la pellucide de l'ovocyte.

### **7.3. Nature du milieu de dilution**

Plusieurs variétés de dilueurs existent selon les espèces animales. Ils se différencient par la nature et la concentration d'utilisation de leurs composants. On distingue:

- ✓ Les dilueurs à base de jaune d'œuf phosphaté (Milieu de Lardy et Philips) ou citrate (Milieu de Salisbury), à bases de sucres (glucose, fructose : milieux de Kampschmidt, de Chominat, de Dimitropoulos, de Foote), à base de glyocolle et de glycérol (milieu de Roy), de CO<sub>2</sub> (milieu de Van Demark ou IVT : Illinois Variable Temperature) ou et plus classiquement maintenant à base de lait dont certains sont commercialisés (Laiciphos IMT);

- ✓ Le lait peut être considéré comme un constituant de base apportant aux spermatozoïdes phosphates, citrates et sucres. Son pH est voisin de celui du sperme. Il est simple à préparer et peu cher. Le plus utilisé est préparé à partir de poudre de lait écrémé de vache additionné de cholestérol ou de lécithine, de sels, de glucose, d'acides aminés (glycocolle, tryptophane, tyrosine) et d'antibiotiques.
- ✓ Le jaune d'œuf est habituellement utilisé à des concentrations comprises chez le taureau entre 5 et 15%. IL protège le sperme grâce aux lécithines qu'il renferme de l'effet néfaste des brusques variations de température. Source de nutriments, il agit aussi favorablement vis à vis des variations de pH et de pression osmotique.
- ✓ Les antibiotiques s'opposent au développement des micro-organismes. Classiquement, la pénicilline et la streptomycine sont employées à la dose respectivement de 1000 UI et d'un mg par ml de dilueur. On se souviendra que certains antibiotiques peuvent être toxiques pour le spermatozoïde. Ainsi, l'oxytétracycline à la dose de 500 mg/ml, de la chlorotétracycline à la dose de 50 mg/ml sont toxiques. Dans l'espèce équine, la ticarcilline, l'amikacine la polymixine et la gentamycine ont également été recommandées.

#### **7.4. Taux de dilution**

Le taux de dilution est calculé pour le taureau à base de l'obtention de doses d'insémination renfermant une concentration en spermatozoïdes zootechniquement acceptable soit 10 à 12 millions de spermatozoïdes par paillette. Estimant à 40 % les pertes imputables aux processus de congélation- décongélation, il faut donc obtenir au terme de la dilution une concentration moyenne de 20 millions de spermatozoïdes par paillette de 0, 25 ml. Cette valeur peut être revue à la baisse ou à la hausse en fonction de la qualité du sperme récolté.

### **VIII. Conservation du sperme**

#### **8.1. Conservation à court terme**

L'utilisation directe du sperme dilué de taureau suppose une conservation à une température voisine de 5°C. Celle-ci doit cependant pour éviter les chocs thermiques, être atteinte progressivement au rythme moyen de refroidissement de 0,5°C par minute entre 37 et 22°C et de 1°C par minute entre 22 et 5°C. Bien diluée et convenablement refroidie, la semence peut conserver son pouvoir de fécondation pendant 2 à 3 jours.

#### **8.2. Conservation à long terme**

La congélation du sperme de taureau: La congélation requiert l'utilisation d'agents cryoprotecteurs. Le glycérol est utilisé pour congeler le sperme. Il est important de préciser qu'étant donné les effets délétères potentiels des agents cryoprotecteurs sur le spermatozoïde, ils doivent être utilisés à une dilution optimale. Ainsi, à la concentration de 4%, le glycérol offre la plus grande mobilité massale des spermatozoïdes du verrot mais c'est après congélation dans une solution à 1 % que les lésions de leurs acrosomes sont les moins nombreuses.

Deux solutions de dilueurs (Laiciphos 10 %, jaune d'œuf 10 %, eau distillée) sont requises. Elles se distinguent par la présence du glycérol à une concentration de 14 % dans le jaune d'œuf. Le dilueur A est maintenu à 32°C et le dilueur B à 4°C.

##### **8.2.1. Phase de refroidissement**

Le sperme est ajouté à la fraction A en deux temps. Dans un premier temps on mélange une quantité égale de sperme et de dilueur A. Ce mélange est après 2 à 3 minutes ajouté au reste du dilueur A. Ce milieu predilué est alors amené progressivement à la température de 4°C. Une fois cette température atteinte, le dilueur B est ajouté au dilueur A en 4 étapes de 15 minutes. Il est important en effet de laisser au glycérol le temps de pénétrer dans les spermatozoïdes, ce processus étant d'autant plus long qu'il s'effectue à basse température. L'équilibration prend donc deux heures environ et la dilution finale de glycérol sera de 7 %.

### **8.2.2. Conditionnement**

Une fois refroidi, le sperme sera conditionné le plus souvent en paillettes voire en ampoules de verre ou de plastique ou en pellets. Trois types de paillette de longueur de 133mm sont utilisés.

- ✓ La paillette grosse a un diamètre compris entre 3,8 et 4,2 mm et un volume de 1,2 ml;
- ✓ La paillette moyenne a un diamètre compris entre 2,5 et 2,8 mm et un volume de 0,5 ml;
- ✓ La paillette fine (la plus utilisée) a un diamètre compris entre 1,7 et 2,2 mm et un volume utile de 0,25 ml.

Ces paillettes sont constituées d'un cylindre de chlorure de polyvinyle dont une extrémité est obturée au moyen de deux étoupes de gaze entourant un bouchon de matière pulvérulente: l'alcool polyvinylique. Ce dispositif servira de piston lors de l'insémination. L'autre bout est libre et servira au remplissage de la paillette. Les paillettes sont de couleurs différentes pour en faciliter l'identification. Celle-ci se trouve complétée par l'impression sur le corps de la paillette du nom du taureau, de son numéro d'identification, de la date de récolte et de l'identification du centre d'insémination.

Pour leur remplissage, une vingtaine de paillettes sont fixées à un peigne relié à une pompe d'aspiration. Une fois remplies, une légère agitation des paillettes permettra de ménager une place pour l'obturation et la bulle d'air nécessaire pour permettre la dilution du sperme lors de la congélation. Le bouchage s'effectue manuellement ou est plus souvent actuellement automatisée. Il est réalisé au moyen de poudre d'alcool polyvinylique qui une fois humide se transforme en gel ou par sertissage.

Une fois le sperme conditionné, les paillettes sont plongées dans de l'eau à 4°C pour permettre l'action du glycérol (phase de glycerolisation) et des autres constituants du dilueur. Cette phase contribue également à rendre plus hermétique l'obturation de la paillette.

Les paillettes sont alors disposées sur une rampe de refroidissement en vue de leur congélation. Elles sont dans un premier temps disposées dans les vapeurs d'azote à quelques cm au-dessus du niveau d'azote liquide de la cuve. Le refroidissement est obtenu selon une courbe classique à savoir entre 4°C et -10°C un refroidissement de 4°C par minute et entre -10°C et -130°C un refroidissement de 40°C par minute. Biologiquement, la phase critique est celle comprise entre -10°C et -50°C. C'est entre ces températures en effet que se produisent les phénomènes de cristallisation extra puis intracellulaire et les mouvements d'ions qui en résultent.

Au bout de 7 à 9 minutes, la congélation est obtenue et les paillettes sont plongées dans l'azote liquide à -196°C. Il est intéressant de noter que ce type de congélation n'altère en rien le caractère pathogène de germes tels que *Brucella abortus*, *Campylobacter foetus*,

Actinomyces pyogenes ou Listeria monocytogenes.

Les paillettes sont stockées dans des visotubes, cylindres hexagonaux de couleur variable pour en faciliter le repérage, eux-mêmes placés dans des gobelets plus gros appelés canisters rangés dans des tanks pouvant contenir plusieurs centaines de litres.

Le transport des paillettes se fera dans des containers cryogéniques ou cuves d'azote dont il existe différents modèles de capacité et de propriétés thermiques différentes. Une vérification régulière du niveau d'azote de ces cuves s'impose. Par ailleurs, la température doit toujours y être inférieure à -120°C. Il est indispensable pour ce faire d'y maintenir un niveau minimal de 5 cm d'azote liquide.

L'évaporation sera fonction de la fréquence d'ouverture de la cuve et du temps nécessaire au choix d'une paillette (5 à 8 secondes).

## **IX. Technique d'insémination artificielle**

### **9.1. Décongélation**

Le réchauffement du sperme de taureau doit être aussi rapide que possible. Classiquement, la paillette sera tout d'abord secouée pour en faire tomber le reste d'azote liquide puis plongée et agitée dans de l'eau à 34-37°C (décongélation in vitro). La décongélation s'observe au bout d'une trentaine de secondes. Pendant ce temps, il est conseillé de frotter le pistolet d'insémination pour le réchauffer. Cependant, si la température ambiante est inférieure à 20°C, il est préférable de maintenir la paillette dans l'eau de réchauffement jusqu'à son utilisation pour éviter tout choc thermique au sperme. L'intervalle décongélation-insémination peut être prolongé jusque 60 minutes, si la paillette peut être maintenue à une température de 35°C.

Certains auteurs ont préconisé la décongélation dite in vivo c'est à dire dans le col utérin lors de l'insémination. Il semble bien en fait qu'en raison des 60 secondes en moyenne qui s'écoulent entre la charge de la paillette et l'insémination proprement dite, la décongélation s'opère en fait à la température du pistolet. En l'absence d'eau tiède, on peut également décongeler la paillette à la bouche.

Une fois décongelée secouée et essuyée (l'exposition du sperme à une goutte d'eau peut induire des lésions cellulaires irréversibles), la paillette est introduite dans le pistolet d'insémination par son extrémité comportant le double bouchon (rôle de piston). L'autre extrémité sera coupée perpendiculairement pour assurer un maximum d'étanchéité avec le bouchon de la gaine d'insémination. Idéalement, l'insémination de l'animal doit être réalisée dans les 15 minutes suivant la sortie de la paillette de l'azote liquide. Le pistolet et la gaine d'insémination seront éventuellement recouverts d'une gaine protectrice en plastique (chemise sanitaire) qui sera perforée lors de l'introduction du pistolet dans le col utérin.

## **X. Insémination proprement dite**

### **10.1. Espèce bovine**

Le matériel se compose d'un pistolet d'insémination d'une longueur de 40 à 45 cm et d'un diamètre de 5 à 6 mm comportant un corps externe et un mandrin interne. Il se complète d'une gaine en matière plastique externe fixée au pistolet d'insémination au moyen d'une petite rondelle. Deux méthodes d'insémination peuvent être utilisées chez les bovins.

La première ou voie vaginale repose sur l'emploi d'un spéculum et d'une source lumineuse permettant le dépôt du sperme dans la partie postérieure du canal cervical. Elle est

pratiquement abandonnée voire réservée à des cas individuels. La seconde ou voie rectale est classiquement utilisée parce que plus rapide et plus hygiénique mais aussi parce qu'elle offre la possibilité d'un examen préalable du tractus génital visant à confirmer l'état œstral de l'animal (présence de follicule, tonicité des cornes...) mais aussi favorable à la libération d'ocytocine et donc à la remontée des spermatozoïdes à la jonction utéro-tubaire. Le col est saisi manuellement au travers de la paroi rectale. Sa tension vers l'avant permet d'éviter la formation de replis vaginaux, susceptibles d'entraver la progression du pistolet d'insémination dans la cavité vaginale. L'introduction de l'extrémité du pistolet d'insémination dans le col peut être facilitée en plaçant le pouce dans l'ouverture postérieure du col tout en maintenant ce dernier au moyen de l'index et du majeur. La traversée du col sera facilitée en imprimant à ce dernier des mouvements latéraux et verticaux. Une fois le col franchi, le pistolet sera aisément le cas échéant guidé vers l'une ou l'autre corne.

Classiquement, le dépôt de la semence se fait au niveau du corps utérin. Les auteurs ne sont pas unanimes pour reconnaître le bénéfice d'une insémination dans une voire les deux cornes utérines. Quelque soit l'endroit anatomique d'insémination, il en résulte un reflux de sperme vers la cavité vaginale, celui-ci étant moindre si l'insémination a été réalisée au niveau du corps ou des cornes utérines que si elle a été faite au niveau du col.

Classiquement dans l'espèce bovine, l'insémination artificielle est réalisée 12 heures environ après le début des chaleurs. Elle obéit ce faisant à la règle classique AM/PM, PM/AM : chaleurs le matin, insémination le soir, chaleurs le soir, insémination le matin. Des modalités plus spécifiques peuvent être adoptées si l'insémination fait suite à un traitement hormonal.

### **10.2. Particularité anatomique et physiologique**

L'insémination artificielle présente chez les petits ruminants quelques particularités anatomiques.

Chez la brebis, l'endocol dessine de nombreux replis qui rendent le canal cervical très sinueux et empêche comme chez les bovins une insémination intra-utérine.

Chez la chèvre par contre, le col s'entrouvrant légèrement pendant les chaleurs, il est possible de le franchir dans 10 à 30 % des cas. L'insémination par laparoscopie constitue une méthode alternative mais elle est peu employée.

Les espèces caprine et ovine sont essentiellement des espèces à activité sexuelle saisonnière le plus souvent élevées en troupeaux de grande taille et donc réparties en lots. L'insémination artificielle ne s'y pratique qu'une fois induites et synchronisées les chaleurs au moyen d'un progestagène (l'acétate de fluorogestone employé chez la chèvre et la brebis), d'une prostaglandine (employée uniquement chez la chèvre) et d'une gonadotrophine, la PMSG.

### **10.3. Réalisation pratique de l'insémination artificielle**

L'insémination nécessite un minimum de contention individuelle, manuelle, au moyen de cornadis ou d'une salle de traite afin d'éviter les stress aux animaux. Dans l'espèce caprine, un examen échographique préalable a été conseillé de manière à écarter les animaux présentant un début de gestation.

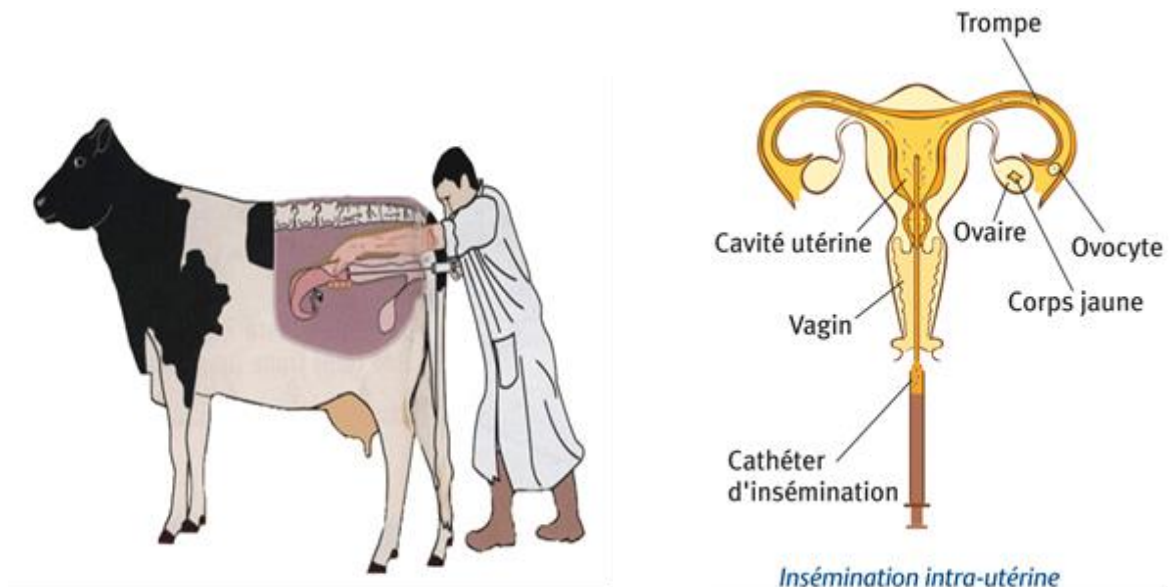
Chez la brebis, la semence est conservée non congelée et conditionnée en paillettes de 0,2 ml renfermant 400 millions de spermatozoïdes. La durée de conservation à + 15°C n'excède jamais 10 heures. L'insémination est réalisée en une seule intervention à 55 heures après le retrait de l'éponge pour les adultes et à 52 heures après pour les agnelles.

Chez la chèvre, les semences sont également conditionnées en paillettes de 0,2 ml contenant 100 millions de spermatozoïdes. On insémine une seule fois à 43 heures environ après le retrait de l'éponge pour les chèvres alpines et 45 heures plus tard pour les chèvres Saanen. Plus rarement, l'insémination est effectuée sur œstrus observé 24 heures après son début.

La paillette congelée est plongée dans de l'eau à 37°C pendant au moins 15 secondes après avoir la retirée de l'azote liquide. Elle est essuyée au moyen d'un mouchoir papier et introduite dans le pistolet d'insémination préalablement réchauffé. L'extrémité de la paillette est coupée et recouverte d'une gaine protectrice puis bloquée avec un anneau le tout protégé au moyen de la chemise sanitaire (cas d'une insemination par fouille rectale. La paillette de semence fraîche est plongée dans de l'eau à 4°C (chèvre) ou à 15°C (brebis).

L'arrière-train de l'animal est soulevé et la vulve au besoin nettoyée. Le spéculum est introduit et le col de couleur rose ou rouge repéré sur le plancher du vagin. L'extrémité du pistolet est guidée vers le col dans lequel il est introduit le plus loin possible par des mouvements de rotation. Le sperme est déposé et le pistolet retiré. Le spéculum est désinfecté entre les animaux. La réussite de l'insémination tient davantage au choix du moment par rapport à l'ovulation qu'à une manipulation particulière du col.

L'insémination intra-utérine par endoscopie est surtout utilisée chez les ovins. Elle offre le double avantage d'augmenter la fertilité lors d'utilisation de sperme congelé et d'utiliser beaucoup moins de spermatozoïdes (environ 10 fois moins que pour une insémination excervicale). Pour ce faire, une mise à jeun préalable de 12 heures est nécessaire. L'animal est placé en décubitus dorsal et ses 4 membres immobilisés. Après anesthésie locale, deux ouvertures sont pratiquées dans la paroi de l'abdomen au moyen d'un trocard. Le sperme est déposé (volume d'une demi-paillette) au moyen d'un pistolet spécial appelé transcap au sommet de chaque corne utérine. La technique est lourde et ne permet d'inséminer moyennant un entraînement spécial que 25 brebis à l'heure.





## **Chapitre III : LA TRANSPLANTATION OU TRANSFERT EMBRYONNAIRE**

### **I. Définition et historique**

La transplantation embryonnaire est une technique de reproduction consiste à faire produire des embryons à une femelle appelée « donneuse » après un traitement de superovulation, de les collecter puis de les transférer à des femelles appelées « receveuses » dont le cycle sexuel a été synchronisé avec la « donneuse » à l'état frais ou congelés.

Lorsque les embryons sont transférés à l'état frais, il est indispensable que les femelles, donneuses et receveuses, soient synchrones au niveau de leur cycle pour augmenter la réussite du TE et la probabilité d'une gestation. Il en résulte que les produits issus de ces croisements sont en moyenne de haute valeur génétique. De plus la gestation s'effectue sur les femelles les moins productives qui sont donc valorisées en tant que porteuse.

Le premier transfert embryonnaire réussi avec succès sur des animaux ont été réalisés par Walter Heape dans l'espèce lapine en 1890 à l'Université de Cambridge. Cet acte constitua le début d'une nouvelle ère dans le monde de la reproduction animale.

Le premier veau issu d'un transfert embryonnaire fut né en 1951 dans le Wisconsin. A cette époque, le transfert était réalisé de manière chirurgicale. C'est dans les années 1970 que d'autres méthodes ont commencé à se développer.

Des chercheurs français ont contribué à l'élaboration d'une méthode de transfert embryonnaire non chirurgicale au milieu des années 1970. Ils ont proposé une méthode trans-vaginale dite cervicale pour réaliser les transferts embryonnaires bovins. Elle consiste à déposer l'embryon au-delà du col de l'utérus par voie vaginale.

Le transfert embryonnaire est aussi utilisé aujourd'hui dans les schémas de sélection donnant la possibilité d'augmenter et d'accélérer la diffusion génétique des meilleures femelles, au même titre que l'IA (diffusion génétique des meilleurs taureaux) au début des années 1980. C'est la période qui a vu développer de nouveaux protocoles pour la congélation des embryons produits in vivo, ainsi que la mise au point de méthodes de sexage des embryons.

### **II. Avantages**

#### **2.1. Sanitaires**

La transplantation embryonnaire constitue un moyen sanitaire qui empêche la transmission des germes pathogènes lorsque les conditions technologiques de lavages des embryons et l'intégrité de la zone péllucide sont respectées. Pour certaines maladies telles que la leucose, la fièvre aphteuse..., il n'y a pas de transmission par le blastocyste même si la donneuse est cliniquement atteinte. Cependant, compte tenu du fait que le virus peut affecter l'embryon en dehors de la zone péllucide, il faut éviter de faire saigner et laver correctement les embryons avec des bains successifs de PBS pour élimner toute trace de sang.

## 2.2. Zootechniques

Le transfert d'embryon produit précocement par une femelle permet de réduire l'intervalle de génération (on peut obtenir 8 filles ou 8 fils par donneuse en un an au lieu de 16 ans en moyenne).

### III. Rappels

La pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde donne lieu à un œuf fécondé ou zygote. Chez les mammifères, le zygote entreprend ses divisions (2, 4, 8 et 16 blastomères) en même temps que sa descente vers l'utérus le long de l'oviducte. Le devenir du développement embryonnaire dépend de l'établissement de relations intimes entre l'endomètre et l'embryon par l'intermédiaire du placenta. Pendant la phase de vie libre dans la lumière utérine, la taille de l'embryon augmente considérablement avec parallèlement une différenciation remarquable des blastomères. Ainsi, à partir du stade de 32-64 cellules, les divisions donnent naissance à deux types de cellules : des cellules internes apolaires et des cellules externes polaires. La lignée cellulaire interne est à l'origine du bouton embryonnaire ou masse cellulaire interne, qui donnera essentiellement origine au futur fœtus. La lignée externe génère le trophoblaste, qui apparaîtra comme un épithélium aplati dont les cellules sont réunies entre elles par divers complexes jonctionnels bien développés.

Chez la vache, l'embryon au stade morula, arrive dans la cavité utérine 4 jours après la fécondation, et mesure alors un dixième de millimètre. Au 9<sup>ème</sup> jour, il perd sa forme sphéroïde (0,2 mm de diamètre) et sa croissance s'effectue en longueur : le diamètre de la vésicule embryonnaire reste constant, de 2 mm en moyenne, entre le 12<sup>ème</sup> et le 20<sup>ème</sup> jour. Le blastocyste de forme filamenteuse envahit totalement la corne ipsilatérale au corps jaune au 17<sup>ème</sup> jour et la corne controlatérale entre le 20<sup>ème</sup> et le 32<sup>ème</sup> jour de gestation, cette phase correspond à l'élongation. L'implantation du conceptus commence au 19<sup>ème</sup> jour de gestation. Le terme d'embryon est utilisé dans les 42-45 premiers jours de gestation, et de fœtus au-delà de cette date.

Etant donné que chez une femelle soumise à superovulation, les ovulations s'étalent sur plusieurs heures, que chaque fécondation ne se produit pas au même moment. On pourra récupérer de la même femelle des embryons à différents stades dans lesquels il faudra évaluer ceux qui auront les meilleures chances de s'implanter correctement dans les receveuses.

En se basant sur les études de la morphologie des embryons et en fonction de la blastographie, on distingue actuellement :

- ✓ Jeune morula : 16-32 cellules clairement visibles qui correspondent au 5<sup>ème</sup> jour ;
- ✓ Morula : C'est une masse compacte de cellules dont les blastomères sont indiscernables les uns les autres. Elles correspondent au 6<sup>ème</sup> jour ;
- ✓ Morula compacte : Ce sont des cellules qui sont analogues à la morula mais qui occupent 70% de l'espace vitelin. Elle correspond au 6<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> jour ;

- ✓ Jeune blastocyste : C'est un embryon avec cavité (blastocèle) et densification cellulaire à un pôle (bouton embryonnaire) qui occupe 60-80% de l'espace vitelin. Il est relatif au 7<sup>ème</sup> jour ;
- ✓ Blastocyste : Analogue au précédent mais avec différenciation plus marquée. Il occupe la quasi-totalité de l'espace vitelin et est relatif au 7-8<sup>ème</sup> jour ;
- ✓ Blastocyste épanoui : A zone péllucide amincie, d'un diamètre de 1,5 fois que celle du blastocyste normal. Il correspond au 7-8<sup>ème</sup> jour et demi. Souvent il peut être affaissé à l'intérieur de la zone péllucide.

#### **IV. Techniques du transfert d'embryon**

##### **4.1. Choix de la donneuse**

C'est un choix qui est toujours porté sur une génisse ou une vache de haute production laitière ou de bonne conformation en viande. IL convient d'en analyser les performances de fertilité et de fécondité des animaux choisis. De même, il est indispensable d'identifier la présence éventuelle de lésions du tractus génital. L'animal superovulé aura autant que faire peut mettre-bas normalement, n'aura pas présenté de complications du post-partum telles qu'une rétention placentaire..., l'acétonémie. Il doit avoir mis-bas autour de 60 à 90 jours et sera en phase de bilan énergétique positif. IL doit exprimer deux ou trois la chaleurs avec des intervalles réguliers. A l'exploration manuelle, le col et les cornes utérines seront de diamètre normal (< 5 cm). Un corps jaune sera présent sur l'ovaire. L'examen vaginal au moyen d'un speculum éliminera la possibilité d'une infection utérine ou d'un urovagin. Certains examens complémentaires (tests de perméabilité tubaire, examen échographique), des traitements antiparasitaires et vaccinations peuvent être effectués au moins 30 jours avant le traitement de superovulation.

##### **4.2. Production des embryons**

La production des embryons représente une phase très importante car elle permet d'augmenter le nombre d'embryons chez cette espèce qui ne produit en moyenne que un par cycle de reproduction.

La production d'embryons par fécondation in vitro est une technique qui consiste à féconder des ovocytes par des spermatozoïdes en dehors du tractus génital. Elle n'a été maîtrisée qu'à partir du début des années 90. Elle a connu, depuis cette date, une évolution très rapide en raison des avantages qu'elle présente pour la gestion, du progrès génétique, du facteur économique majeur de productivité dans tous les grands pays d'élevage à travers le monde.

##### **4.3. Qualités de l'embryon**

Le classement se fait en fonction de la qualité de l'embryon. C'est une question pratique plus ou moins subjective et permet généralement d'établir quatre catégories d'embryon : excellent, bon, moyen et mauvais.

- ✓ Classe 1(excellent) : Embryon au stade normal de développement au moment de l'observation : aspect symétrique, blastomères polygonaux formant une masse compacte au stade morula ;

- ✓ Classe 2 (bon) : aspect semblable aux embryons de classe 1 mais de forme asymétrique pouvant contenir des blastomères séparés de l'amas compact de cellules formant la morula. Ils peuvent également présenter un retard de développement par rapport aux autres embryons recoltés sur la même donneuse ;
- ✓ Classe 3 (moyen) : Embryons en retard de développement de 1 à 2 jours. Les blastomères sont sphériques et de taille variable au stade morula. On constate la présence des vésicules dans les blastomères. L'aspect de l'embryon est plus sombre ou plus clair que la normale ;
- ✓ Classe 4 (mauvais) : Embryon en retard de développement de 2 jours. Les limites cellulaires ne sont pas distinguables ;
- ✓ Classe 5 (dégénéré) : La dégénérescence peut parfois être à ce point évidente qu'il n'est plus possible de reconnaître le stade de développement.

Il importe évidemment de différencier et ne pas transférer les œufs non fécondés qui peuvent se trouver dans le liquide de récolte.

La meilleure connaissance de ces processus de développement notamment la maturation folliculaire et les 1<sup>ers</sup> stades de développement embryonnaire ont permis de mettre au point des technologies de manipulation des embryons.

Les embryons sont conservés dans des incubateurs à 37°C au laboratoire. Une première lecture est faite à 24 heures pour déterminer le nombre d'ovocytes qui ont été fécondés. Le jour du transfert (J<sub>2</sub>-J<sub>3</sub> ou J<sub>5</sub>) une relecture des embryons et une évaluation morphologique permettront de choisir l'embryon en fonction de son nombre de cellules attendu, du degré de fragmentation, de leur régularité. Le temps permettra à l'embryon d'être sélectionné naturellement et aura plus de chances de s'implanter (J<sub>5</sub>). A ce stade le nombre d'embryon diminue mais ces embryons auront plus de chances de s'implanter.

#### **4.4. Traitement de superovulation**

##### **4.4.1. Nature des traitements hormonaux**

###### **a. La gonadolibérine (GnRH)**

La GnRH s'est révélée inefficace pour provoquer une superovulation. Cependant, elle peut être utilisée en association à d'autres schémas de superovulation. Une absence de libération ou une libération anormale de la LH lors de l'œstrus suivant un traitement de superovulation à base de PMSG causent des échecs d'ovulation et de fécondation chez les animaux donneurs d'embryons. Aussi, le recours à des traitements de synchronisation des ovulations tels que l'hormone LH, l'hCG ou la GnRH a-t-il été envisagé pour pallier à certains échecs de traitements de superovulation.

Les échecs observés ont été imputés à un manque de sensibilité de l'hypophyse chez certains animaux traités à la PMSG. Le cortisol, la prolactine et la PMSG n'en seraient pas responsables. L'hypothèse du rôle d'un facteur inhibiteur de la libération de l'hormone LH a été proposée chez la truie.

### **b. La Pregnant Mare Serum Gonadotrophin**

La PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) extraite du sérum de jument gravide entre le 42<sup>ème</sup> et le 100<sup>ème</sup> jour de gestation possède une activité biologique correspondant classiquement à un mélange de 2/3 de FSH et de 1/3 de LH. Ce rapport dépend du stade de gestation de la jument. La concentration de la PMSG est maximale dans l'organisme 15 à 32 heures après son injection. La PMSG est douée d'une double activité à la fois de type FSH et LH avec un rapport constant FSH/LH égal à 0, 2.

Elle est injectée par voie IM à une dose comprise entre 2.000 et 3.000 UI. La réponse au traitement augmente avec la dose injectée. De même, on observe une augmentation du risque d'anovulations et d'embryons de moins bonne qualité avec la dose administrée.

La PMSG a une demi-vie particulièrement longue (120 heures) imputable à sa richesse en acide sialique (13 %) qui la protège de la dégradation hépatique et rénale. Aussi est-il indispensable de lui adjoindre l'injection de 1800 UI d'anticorps antiPMSG (obtenus sur moutons) au moment des chaleurs. Ces anticorps ont pour objet d'inhiber l'action de la PMSG et ce faisant le développement d'une seconde vague de croissance folliculaire et d'éviter la formation de follicules kystiques.

La répétition des injections de PMSG à 1 voire deux mois d'intervalle est susceptible de réduire l'efficacité du traitement étant donné que la réaction antigénique est possible.

### **c. La Human Menopausal Gonadotrophin**

L'hMG (Human Menopausal Gonadotrophin) fournit des résultats comparables à ceux de la PMSG mais son coût est plus élevé.

### **d. Les extraits hypophysaires**

Les extraits hypophysaires (d'origine porcine le plus souvent, pFSH, mais aussi bovine, bFSH, ou ovine: la FSH bovine est moins active que la FSH porcine) sont de plus en plus largement utilisés. Possédant une demi-vie plus courte (5 à 6 heures) que la PMSG, étant donné leur moindre richesse en acide sialique (5 %) ils doivent faire l'objet d'injections répétées. Leur concentration atteint une valeur maximale de 3 heures après leur injection et ne sont plus décelables 12 heures après l'injection.

Leur utilisation répétée n'entraîne pas la formation d'anticorps contrairement à la PMSG.

Les doses sont comprises entre 32 et 50 UA (Unité Armour) administrées de manière fractionnée et décroissante en doses bijournalières (matin et soir) pendant 4 jours, la dose de 32 UA (6 UA, 5 UA, 3 UA, 2 UA) étant le plus souvent recommandée chez la vache laitière et celle de 40 UA chez la vache viandeuse. Les doses de FSH sont exprimées en µg Armour (une unite Armour est équivalente à 10 mcg de FSH pure).

Les FSH sont présentées sous forme lyophilisées et reconditionnées avant l'emploi au moyen de sérum physiologique. Une fois les dilutions réalisées, les flacons préparés sont congelés. La FSH décongelée se conserve sans dommage au réfrigérateur (4°C) pendant le traitement. Une fois décongelée, la solution ne peut être recongelée. Comme la BST, la FSH compte tenu de sa dégradation rapide dans l'intestin de l'homme ne présente aucun risque pour la santé humaine.

#### 4.4.2. Schéma des traitements inducteurs

##### ❖ Chaleur de référence

Un traitement de superovulation peut être mis en place lors du pro œstrus (16<sup>ème</sup> -17<sup>ème</sup> jour du cycle). Comme il est difficile de prévoir le moment exact de retour en chaleurs de l'animal, il est plus important de mettre en place le traitement de superovulation 9 à 15 jours après une chaleur de référence (chaleur observée par l'éleveur ou induite), deux injections de prostaglandines à 14 jours d'intervalle). Une solution alternative consiste chez les femelles non-cyclées à réaliser un traitement de superovulation au cours de la phase d'induction d'une chaleur au moyen d'un progestagène (spirale ou implant).

##### ❖ Chaleur de « superovulation »

Elle sera le plus souvent obtenue par l'injection unique ou répétée (2 à 3 injections) d'une prostaglandine naturelle ou synthétique 48 heures en général après le début du traitement au moyen de PMSG ou de pFSH. En général, les doses de prostaglandins en IM sont doublées par rapport aux doses recommandées par le fabricant. Les prostaglandines naturelles et de synthèse ne présentent de différences en terme de résultats.

Une chaleur de superovulation peut également être obtenue par le retrait d'un corps jaune artificiel. Ces traitements sont généralement associés à une ou deux injections de prostaglandines permettant la lyse du corps jaune naturel en place ou en développement au cours du traitement avec la progestagène. La mise en place de l'implant ou la spirale peut se faire à tout moment du cycle éventuellement présent. La chaleur référence n'est pas importante. L'implant de norgestomet est laissé en place pendant 9 à 10 jours et la spirale pendant 7 à 12 jours. Le traitement de superovulation débute entre le 4<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour après le début du traitement par un progestagène.

En cas de recours à la PMSG, l'injection de PGF2 $\alpha$  est réalisée en même temps que l'injection de PMSG soit 48 heures avant le retrait du progestagène. Si le traitement de superovulation utilise de la FSH, l'injection de PGF2 $\alpha$  est réalisée à la troisième injection ou le plus souvent à la 5<sup>ème</sup> injection de FSH soit 12 à 48 heures avant l'arrêt du traitement par le progestagène.

En cas d'injection répétée de PGF2 $\alpha$ , les injections sont réalisées simultanément à la 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> injection ou à la 7<sup>ème</sup> et 8<sup>ème</sup> injection de FSH. Les doses totales de PGF2 $\alpha$  injectées sont respectivement de 0,5 mg à 1 mg de cloprostenol, de 22,5 mg de dinoprost ou de 15 mg de luprostiol.

Une autre alternative a été plus récemment décrite. Elle consiste en un traitement dit court mis en place entre le 7<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour suivant la chaleur de « référence », et laissé pendant 5 jours. Le traitement de superovulation débiterait 1 à 3 jours après le début du traitement au moyen du progestagène de manière à arrêter le traitement du progestagène à la 6<sup>ème</sup> voire 7<sup>ème</sup> injection de FSH.

##### ❖ Chaleur de «récolte »

Après une récolte d'embryons, il est indispensable de s'assurer de la lyse des corps jaunes induits pour éviter une gestation gémellaire et induire aussi rapidement que possible le retour à une cyclicité normale. En l'absence d'injection d'une prostaglandine et de gestation, le cycle

suivant a une durée comprise entre 22 et plus de 30 jours. Ce délai dépend du nombre de corps jaunes présents et donc indirectement de l'importance du retrocontrôle négatif exercé sur l'hormone LH par la progestérone endogène. Deux stratégies sont possibles:

- ✓ La première est l'injection d'une PGF2a le jour de la récolte;
- ✓ La seconde est de différer cette injection d'une ou de deux semaine.

Dans les deux cas, il y'a une augmentation de l'intervalle entre l'injection et l'oestrus (4, 3 à 8,8 jours et parfois plus de 11 jours). Ce retard est imputable à la reduction du nombre de petits follicules (< 5 mm) lors de l'injection. C'est un phénomène qui résulte d'une progestéronémie élevée. Ni la dose injectée ni le nombre d'injections ne semblent influencer les résultats. Le cycle faisant suite à cette chaleur de « récolte » ayant une durée normale, il peut être utilisé pour induire un nouveau traitement de superovulation

## **4.5. Fécondation des ovocytes**

### **4.5.1. Recolte des embryons**

Les cornes utérines de la donneuse sont flushées 7 jours après son insémination. Puis, les embryons sont récupérés dans un filtre. Ils sont recherchés au microscope et sélectionnés sur leur qualité (viabilité). Les "bons" embryons passent ensuite dans 10 lavages successifs pour éliminer tout risque de transmission de maladie. Ils sont alors prêts à être implantés sur une receveuse le jour même, ou à être congelés et stockés en vue d'une utilisation ultérieure.

Une génisse peut être collectée dès qu'elle est bien cyclée (en général entre 10 et 14 mois). C'est sans danger pour sa croissance, sa mamelle et sa reproduction ultérieure dans la mesure où les règles de base du rationnement sont respectées.

#### **4.5.1.1. Matériel**

Il se composera des éléments suivants:

- ❖ **Sondes dilatatrice** : d'une longueur de 60cm, possédant une extrémité conique de 4 mm au sommet et de 7 mm à la base, elle permet de préparer le cas échéant le col à la pénétration de la sonde de récolte.
- ❖ **Sonde de récolte**: deux types de sonde sont disponibles pour la récolte:
  - ✓ Une sonde à trois voies ou sonde IMV (Cassou) qui assure un circuit continu du milieu de collecte. Elle est dotée d'une voie permettant de gonfler le ballonnet. Une autre permet l'injection du liquide de récolte et une troisième qui assure la récupération du liquide injecté dans la corne. Elle est composée d'un corps rigide longue de 56 cm et de 6 mm de diamètre muni d'un bouchon d'étanchéité postérieur et d'un ballonnet en caoutchouc à son extrémité antérieure. Le tuyau de récupération a une longueur de 160 cm et un diamètre de 3 mm et muni à son extrémité d'une bille métallique destinée à en faciliter la progression dans la corne utérine. Il présente à son extrémité proximale des graduations qui permettent de juger le degré de pénétration dans la corne utérine et est percé dans sa partie terminale d'orifices.
  - ✓ Une sonde à deux voies (sonde de Han; modèle allemand): Une voie permet de gonfler le ballonnet, tandis que la seconde permet l'injection et la récupération en alternance

le liquide de récolte des embryons. Cette sonde a une longueur de 70 cm et un diamètre de 6 à 7 mm. Elle est munie d'un mandrin interne pour la rendre plus rigide et faciliter ainsi sa mise en place dans l'utérus.

- ❖ **Seringues:** Une seringue de 20 ml pour gonfler le ballonnet et une autre de 50 ml pour injecter le liquide de récolte.
- ❖ **Liquides de récolte:** Il faut prévoir par récolte 1 litre environ (250 à 500 ml par corne utérine) de Phosphate Buffered Saline (PBS). Certains auteurs utilisent une solution de Bovine Serum Albumine (BSA) à 0,4 % ou du PBS additionné de sérum de veau fœtal (FCS) à 2%. Ces liquides seront placés dans un flacon stérile et maintenu à température de 37 °C.

#### 4.5.1.2. Méthodes

##### 4.5.1.2.1. Méthode chirurgicale

Au départ, la récolte des embryons se faisait par voie chirurgicale sous anesthésie générale au niveau de la ligne blanche en avant du pis. Une fois l'utérus extériorisé, une incision d'un cm de long était pratiquée à la base de la corne utérine pour permettre l'introduction d'un cathéter à deux voies: **la sonde de Folley**. Le ballonnet était ensuite gonflé. Le liquide de récolte était injecté au moyen d'une seringue et d'une aiguille à bout mousse au sommet de la corne utérine et récupéré par l'orifice situé à la base du ballonnet. Après récolte, le ballonnet était dégonflé, l'utérus suturé. La même procédure sur l'autre corne utérine. Elle a pour avantage un taux de récupération élevé des embryons (70 à 80 %). Elle fut pratiquement abandonnée pour sa pratique difficile sa répétition sur le même animal.

##### 4.5.1.2.2. Collecte transcervicale

###### ❖ **Principes de base: sonde de Cassou à trois voies**

- ✓ L'animal est contentionné ou anesthésié (animaux rétifs mais risque de décubitus), d'une épidurale (3ml de xylocaïne à 2 % : manipulation plus aisée du tractus génital mais risque accru de pneumo-rectum, à éviter si l'utérus est abdominal) et d'un spasmolytique (Buscopan 20 mg en IV);
- ✓ Le rectum est vidé et la région vulvaire désinfectée;
- ✓ Le col est dilaté mécaniquement préalable (chez la génisse). IL convient dans un premier temps d'insérer le dilateur dans un anneau cervical et de maintenir une pression constante mais contrôlée. Le plus souvent, la résistance s'efface brutalement une fois le 3<sup>ème</sup> anneau franchi;
- ✓ Placer le flacon de récupération en contrebas de l'utérus pour favoriser la récolte du liquide de perfusion;
- ✓ La sonde de récolte sera rincée au moyen de sérum physiologique, recouverte d'une chemise sanitaire, est introduite dans le vagin en longeant le plafond pour éviter le méat urinaire. Une fois arrivée au col, la chemise sanitaire sera rompue. Le col est alors manuellement ramené vers l'arrière et vient coiffer l'extrémité de la sonde. La progression de la sonde dans le col est assurée en prenant le col en avant de la sonde et en le manipulant de bas en haut et de gauche à droite. Une fois le col franchi, la sonde



est alors introduite dans l'une ou l'autre corne. La corne est alignée sur la sonde en la prenant par en-dessous et en la faisant progressivement glisser sur la sonde.

- ✓ Le ballonnet sera placé trois Travers de doigts environ en avant de la bifurcation des cornes. Le but du gonflement du ballonnet est de fixer la sonde dans la lumière de la corne et d'éviter que le liquide de perfusion ne reflue vers l'arrière. Un ballonnet trop gonflé risque d'endommager la muqueuse utérine et d'entraîner la présence de sang dans le liquide de récolte. Le volume d'air nécessaire sera de 10 à 12 cm<sup>3</sup> pour une génisse et de 14 à 18 cm<sup>3</sup> pour une vache.
- ✓ Une fois le ballonnet est mis en place, le bouchon étanche est dévissé en arrière du corps de sonde pour permettre la progression du flexible. En général, la corne utérine forme un coude juste en avant du ballonnet. Il faut la relever légèrement pour faciliter la progression du flexible qui sera introduit jusqu'à l'obtention d'une résistance signant la position de la bille terminale au niveau de la région utéro-tubaire soit après 30 à 40 cm chez une génisse et 40 à 50 cm chez une vache. Une fois le flexible positionné, le bouchon proximal sera revissé.
- ✓ La voie de retour est ouverte après l'injection de 20 à 30 ml de liquide de perfusion. Le liquide commence à s'écouler instantanément. Une surpression risque de faire reculer le ballonnet ou de créer une lésion de l'oviducte. Inversement, si l'injection est trop lente, la corne risque de se vider et d'aspirer la muqueuse utérine contre les orifices du flexible. L'arrêt du retour est souvent observé lors du changement de seringue. Pendant la perfusion (200 ml par corne), l'opérateur agite et déplie la corne utérine tout en évitant de la manipuler pendant les phases de contractions du rectum.
- ✓ Après la perfusion de la corne, on injecte dans la sonde un volume d'air suffisant pour chasser le liquide et on récupère entièrement les embryons. Le bouchon d'étanchéité est dévissé et on ramène le flexible en continuant de récupérer le liquide. Après le retrait du flexible, on ferme la voie de retour et on dégonfle le ballonnet. Le corps de sonde est retiré de manière à éviter le voile inter-cornual avant d'introduire la sonde dans l'autre corne.
- ✓ Après toute intervention on applique une solution d'antibiotiques dans l'utérus accompagnée de l'injection d'une prostaglandine afin d'éviter le développement d'une gestation multiple qui s'accompagne fréquemment d'avortement.

#### **4.6. Particularités de la sonde à deux voies (sonde de Han)**

La sonde à trois voies doit être placée le plus loin que possible tout en retirant le mandrin. Le ballonnet un fois gonflé, on retire complètement le mandrin et on banche les voies d'injection et de récupération. On fait l'injection par simple pesanteur ou par injection de 50 ml. Les voies d'injection et de sortie seront clampées et ouvertes en alternance jusqu'au passage dans chaque corne de 350 à 400 ml. on réintroduit le mandrin dans la sonde. Une seconde est nécessaire pour la perfusion de l'autre corne. Il persiste au niveau du tuyau un volume mort dans lequel les embryons peuvent être aspirés et refoulés. Ceci explique peut-être la diminution relative du nombre d'embryons récupérés au moyen de cette sonde.

## **4.7. Manipulation et conservations d'embryons**

### **4.7.1. Nature des agents cryoprotecteurs**

En l'absence d'agent cryoprotecteur, les cellules de mammifères ne survivent pas à une température inférieure à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les agents cryoprotecteurs ont la propriété de fixer les molécules d'eau et abaissent le point de cristallisation des cellules. En même temps, ils réduisent la quantité de glace qui se forme au cours de la congélation mais contribuent également à en modifier la forme de ses cristaux. Ils disposent des effets délétères d'ordre biochimique, osmotique ou cellulaire (lésions de l'acrosome dans le cas des spermatozoïdes). Il en est de trois types:

- ✓ Le 1<sup>er</sup> groupe est constitué de ceux qui pénètrent dans la cellule (diméthylsulfoxyde (DMSO), glycérol, propanediol, méthanol, éthylène glycol). Il est couramment utilisé et semblerait garantir de meilleurs résultats à cause de son poids moléculaire plus faible et par conséquent sa perméabilité plus élevée: ils contribuent à déshydrater et à réduire la taille des cristaux lors du refroidissement;
- ✓ Le 2<sup>ème</sup> groupe dispose le sucrose (saccharose), la galactose ou encore le saccharose. Non perméables, ils augmentent la pression osmotique extracellulaire et déshydratent la cellule sans y pénétrer;
- ✓ Le troisième groupe comporte des substances de poids moléculaire plus élevé (polyvinylpyrrolidone, dextran, serum, serum albumine, lipoprotéines présentes dans le jaune d'œuf) qui ne pénètrent pas dans la cellule. Ils agissent essentiellement au niveau membranaire (protection et réparation).

La congélation des embryons nécessite les cryoprotecteurs de type pénétrant. Le degré de pénétration de l'agent cryoprotecteur dépend de divers facteurs parmi lesquels:

- ✓ Le coefficient de perméabilité de l'embryon qui dépend du stade de développement de l'embryon (les morulas résistent davantage à la congélation que les jeunes blastocystes ou les blastocystes expansés, et de l'espèce au cryoprotecteur);
- ✓ Le gradient existant entre les concentrations intracellulaires et extracellulaires de l'agent cryoprotecteur et la température de surface de l'embryon. Leur addition en plusieurs ou une seule étapes (temps d'équilibration) semble donner les mêmes résultats.

### **4.7.2. Congélation et décongélation**

#### **4.7.2.1. Méthodes**

##### **4.7.2.1.1. Phase de congélation**

La congélation comprend une série d'étapes classiques ou parfois spécifiques des laboratoires qui les utilisent. De même, elle nécessite un appareillage de nature diverse. Certains fonctionnent à l'éthanol pur ou à l'azote liquide.

### ❖ Etapes classiques

- ✓ La 1<sup>ère</sup> étape consiste à équilibrer l'embryon dans sa solution de PBS (renfermant 10 % de serum fœtal bovin) avec une solution de glycérol 1,4 M(molaire) soit 10 % pendant 20 minutes à la température ambiante (20°C);
- ✓ La 2<sup>ème</sup> étape consste à conditionner la solution PBS-glycérol renfermant l'embryon dans une paillette de 0,25 ml. Pour cela, on aspire la solution et on sépare la partie qui renferme l'embryon par deux bulles d'air;
- ✓ La 3<sup>ème</sup> étape est l'étape du transfert de la paillette dans l'appareil à congélation et refroidie jusque -7°C à la vitesse de 1 à 3°C par minute. La paillette est maintenue pendant 5 à 7 minutes à cette température pour son stabilisation;
- ✓ La 4<sup>ème</sup> étape consistera à provoquer la cristallisation par seeding. On heurtera la ou les paillettes ou le liquide de refroidissement au moyen d'une pince par exemple;
- ✓ A l' étape 5, la paillette est refroidie de -7°C à -35°C à raison de 0,3 à 0,6°C par minute. Cette température semble être optimale pour obtenir un compromis entre la déshydratation et la formation de glace intracellulaire;
- ✓ La 6<sup>ème</sup> étape est l'étape à laquelle la paillette est plongée dans l'azote liquide (-196°C).

### ❖ La vitrification

C'est une méthode alternative intéressante et se base sur la concept de solidification directe. L'élévation extrême de la viscosité du milieu permet de créer un état amorphe ou vitreux sans formation de glace intra ou extra cellulaire. La solution de vitrification renferme de très fortes concentrations d'un ou de plusieurs agents cryoprotecteurs de type pénétrant (25 % de glycérol et 25 % de propanediol). La vitesse de congélation est extrêmement élevée et obtenue par immersion directe dans de l'azote liquide (250°C par minute). Compte tenu de la toxicité pour l'embryon des agents cryoprotecteurs utilisés à ces concentrations, l'équilibration constitue une étape critique de la méthode. Enfin, l'état vitreux étant instable à des températures supérieures à -100°C, la vitesse de décongélation doit être très rapide (250°C /min) pour minimiser les risques de lésions cellulaires due à la réformation de cristaux lors de la décongélation.

Une nouvelle méthode de vitrification appelée OPS (Open Pulled Straw) a été proposée. Les minipaillettes de 0,25 ml sont traitées à la chaleur pour réduire de moitié le diamètre externe (0,8 mm à 1,7 mm) et l'épaisseur de leur paroi (0,07 vs 0,15 mm). Les embryons sont incubés successivement dans deux solutions de concentrations croissantes d'éthylène glycol, de DMSO (diméthylsulfoxyde) et de sucrose 0,5M puis aspirés (1 à 2 microlitres) dans la paillette par simple capillarité. Une fois conditionnées, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide. Leur décongélation s'opère en plongeant les paillettes dans un milieu à 37°C. Ce système s'avère applicable pour congeler des ovocytes ou des embryons de J3 à J7 mais pas aux embryons de J1 ou J2.

### ❖ La congélation ultrarapide

Elle se différencie de la vitrification par une induction de la formation de glace intra et extracellulaire et implique le recours à un cryoprotecteur de type pénétrant (glycérol) et d'un cryoprotecteur non pénétrant (sucrose). Le morula et le blastocyste sont refroidis jusqu'à -30°C à la vitesse de 12°C par minute puis plongés dans l'azote liquide. Elle est appliquée aux embryons de souris, rates et lapines.

#### 4.7.2.1.2. Phase de décongélation

Il existe deux types de décongélation: décongélation lente et de décongélation rapide.

Dans les deux cas, l'objectif est le retrait de l'embryon de l'action de l'agent cryoprotecteur utilisé pour la congélation et de le réhydrater.

Lors de la décongélation lente (or multistep thawing) le contenu de la paillette est passé dans trois bains (5 minutes par bain) renfermant des concentrations décroissantes de glycérol (6,6 %, 3,3 % et 0 %) et constantes de sucrose (0,3 M). Le quatrième bain ne renferme que du PBS et assure la réhydratation de l'embryon. Cette méthode nécessite du temps (1 à 2 heures) et un minimum d'équipement de laboratoire (microscope pour l'observation de la qualité de l'embryon décongelé).

La décongélation rapide (or one-step thawing): la paillette se fait à une température ambiante (20°C). Elle implique l'utilisation du sucrose lors du montage de la paillette (congelation). L'embryon est équilibré pendant une vingtaine de minutes dans une solution de glycérol, 1,36 M et de sucrose 0,25 M. Lors du montage de la paillette, on aspire successivement le sucrose 0,5M (4 cm), une bulle d'air, le mélange glycérol, 1,36M et sucrose 0,25M renfermant l'embryon (1 cm), une bulle d'air et le sucrose 0,5M (6cm). La décongélation de la paillette assure le mélange des solutions et donc soustrait l'embryon au glycérol, la réhydratation de l'embryon étant assuré lors de sa mise en place dans l'utérus. Cette méthode offre de réels avantages sur le terrain puisqu'elle dispense le praticien d'avoir du matériel de laboratoire, le transfert ressemblant dans ce cas à une insémination classique.

### V. Choix de la receveuse et transfert d'embryon

#### 5.1. Préparation: Synchronisation de la donneuse et des receveuses

Une parfaite synchronisation entre l'âge de l'embryon et de la donneuse, l'état physiologique de l'utérus de la receveuse sont des éléments essentiels pour une bonne réussite du transfert d'un embryon. Le taux de réussite d'un transfert fait sur des receveuses qui sont en chaleur 48h, 24 h avant la donneuse, en même temps et 24h et 48 h après la donneuse sont respectivement de 24, 52, 58, 50 et 44 % de gestation.

Un écart de 24 heures maximum entre le jour des chaleurs de la donneuse et de la receveuse sera donc accepté. Il est vrai qu'in vitro le développement des blastocystes peut être retardé. Il est connu cependant que ceux qui atteignent le stade blastocytaire au 7ème jour de développement sont de meilleure qualité que les autres. Aussi il est recommandé d'adopter une stratégie différente de synchronisation et donc de transfert des embryons obtenus in vivo et in vitro.

Il y'a diverses traitements hormonaux de synchronisation de la donneuse et des receveuses qui peuvent être utilisés seuls ou en association. Leur mode d'emploi dépend d'une part du degré de synchronisation qu'ils permettent et d'autre part de la possibilité qu'ils offrent de ne pas nécessairement détecter l'oestrus.

Par ailleurs, le résultat du transfert va également dépendre du degré d'exactitude du corps jaune éventuellement présent au moment du transfert. En fonction de ce degré, en moyenne 25 à 35 % des receveuses sont éliminées. On peut faire :

Une injection unique au 2<sup>ème</sup> jour du traitement de superovulation de la donneuse (4<sup>ème</sup> injection de FSH/LH) d'une prostaglandine F2 $\alpha$  naturelle ou de synthèse en IM après avoir confirmé manuellement ou par échographie la présence d'un corps jaune de diamètre supérieur à 2 cm.

Une double injection d'une PGF2 $\alpha$  naturelle ou de synthèse à 11 jours (génisses) ou 14 jours (vaches) d'intervalle, la deuxième injection ayant lieu au 2<sup>ème</sup> jour du traitement de superovulation de la donneuse (4<sup>ème</sup> injection de FSH/LH): Ce traitement offre l'avantage d'assurer un plus grand degré de synchronisation des receveuses.

Un retrait au 2<sup>ème</sup> jour du traitement de superovulation de la donneuse (4<sup>ème</sup> injection de FSH/LH) d'un implant de norgestomet ou d'une spirale de progestérone après respectivement 9 et 12 jours de mise en place.

Un retrait au 2<sup>ème</sup> jour du traitement de superovulation de la donneuse (4<sup>ème</sup> injection de FSH/LH) d'un implant de norgestomet ou d'une spirale de progestérone et une injection simultanée d'une PGF2 $\alpha$  naturelle ou de synthèse après respectivement 7 et 9 jours de mise en place.

## **5.2. Mise en place des embryons**

### **5.2.1. Matériel et technique**

Au début, les transferts d'embryons furent réalisés par voie chirurgicale au niveau du flanc ipsilatéral à l'ovaire porteur du corps jaune. La peau et la tunique abdominale sont incisées au moyen d'un bistoury et les couches musculaires dilacérées sur une longueur de 10 cm environ au moyen des doigts. Le péritoine est ponctionné au moyen de l'index. L'extrémité de la corne est amenée au niveau du site opératoire et l'embryon mis en place dans son tiers supérieur après ponction de la corne au moyen d'une aiguille mousse.

Plus classiquement, le transfert d'embryon est réalisé à l'heure actuelle par voie transcervicale au moyen de pistolet de transfert « inovulateur de Cassou » de diamètre de 3 mm pour les génisses ou de 4 mm plus rigide pour les vaches.

## **5.3. Facteurs de variation**

### **❖ Etat hormonal de l'animal receveur**

La progestérone joue un rôle majeur sur le statut physiologique de l'utérus le jour du transfert. Sa concentration minimale est indispensable. Un dosage de progestérone réalisé à la veille ou

un examen échographique effectué le jour même sont de nature à augmenter le degré d'exactitude de cette structure ovarienne.

#### ❖ Effet de la saison

Les résultats des transferts d'embryons réalisés sont importants en saison humides qu'en saison sèche. Exemple: Au cours d'une période de 24 mois (novembre 1995-novembre 1997), il s'avère que quelque soit l'année, le pourcentage de réussite de gestation est supérieur en juin (64 et 76 %).

#### ❖ Effet de la race de la receveuse

Les embryons sont transférés en proportion pratiquement égale sur des receveuses de race Blanc Bleu Belge et Pie Noire. Le taux de réussite chez les receveuses de race Pie Noire est supérieur (48 %) à celui de la race Blanc Bleu Belge (40 %). Le choix de certaines races doit prendre en compte la conformation afin d'éviter le risque de césarienne.

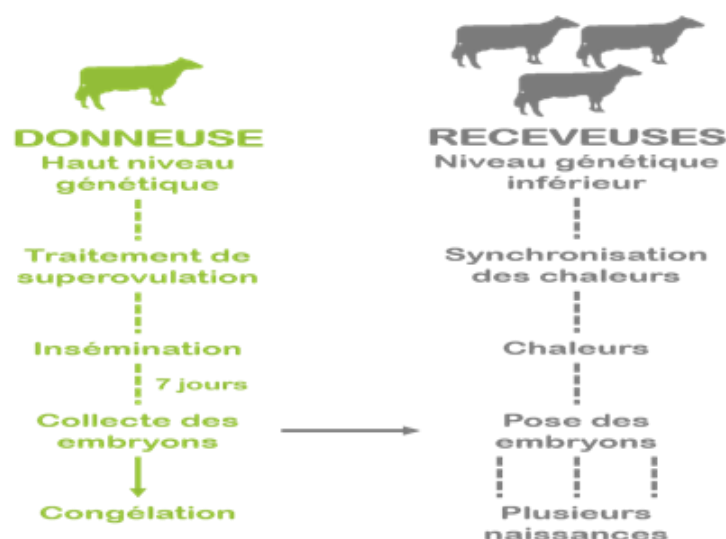
#### ❖ Effet de l'âge de la receveuse

Les génisses sont moins exposées au risque d'infections utérines et leur tractus genital est plus facile à manipuler. Par contre, leurs besoins sont limités à leur croissance. Les vaches ont un col plus facile à cathétériser. Les pluripares doivent être préférées au detriment des primipares. Ainsi, l'âge moyen des receveuses est de 32 mois.

#### ❖ Facteurs de stress

Les préventifs (vaccinations, traitements antiparasitaires...) au cours des trois semaines qui précèdent le transfert ne sont pas conseillés ainsi que tout changement brutal de la ration au cours du mois précédant et suivant le transfert.

Une manipulation prudente est recommandée le jour du transfert (recourir à une anesthésie loco- régionale).



## Chapitre IV : LE CLONAGE

### I. Définition et historique.

Un clone est un organisme qui est considéré comme génétiquement identique à un autre ou un ensemble d'organisme tous issus d'un organe unique. En biotechnologie, le clonage a trait au processus de reproduction de matériel biologique de manière non sexé. IL a pour but de produire des copies génétiquement identiques d'un animal.

L'histoire de l'ADN a commencé lorsque des chercheurs ont découvert la composition chimique de l'ADN, par J. Watson et F. Crick en 1953. Ils ont découvert la structure moléculaire de l'ADN. Ils ont proposé que l'ADN soit composé de trois composants principaux : le phosphate, le sucre et les bases azotées et se trouve dans presque tous les êtres vivants. Elle constitue une molécule de vie pour chaque être vivant sur Terre.

Différentes techniques ont été développées au fil du temps de son analyse, mais la période exacte de qui a été le premier à cloner l'ADN n'était pas claire. L'année 1903 a été la première fois que Webber J. a utilisé le terme "Clone". En 1973, le premier gène animal a été copié dans le laboratoire de Morrow et Cohen avec la collaboration des universités de Stanford et l'UCFS.

Un biochimiste de l'Université de Stanford, Berg P, a été la première personne à développer l'ADN recombinant en 1972. Il est important de noter que l'ADN recombinant peut être décrit comme de l'ADN préparé synthétiquement avec deux sources distinctes.

#### 4.1. Principe du clonage

Le développement d'un organisme vivant sexué passe par une série d'étapes dont le premier est la fécondation. L'œuf issu de cette fécondation contient une seule cellule qui renferme deux copies de chromosomes.

La formation de l'embryon est due à une division successive pour donner deux puis quatre cellules etc. Au quatrième stade, toutes les cellules sont totipotentes. Au-delà du stade de développement, les cellules de l'embryon deviennent pluripotentes. En continuant leurs divisions, les cellules se spécialisent progressivement : c'est la différenciation.

Après la différenciation, Elles deviennent multipotentes ou différenciées (exemple : les cellules de la moelle osseuse qui donnent naissance à l'ensemble des cellules sanguines, les globules rouges et les globules blancs). Le dernier stade consiste, pour les cellules, à se spécialiser complètement pour remplir, dans chaque organe ou tissu où elles se trouvent, les fonctions qui leur sont dévolues. Ce processus de différenciation est considéré comme irréversible dans la mesure où une cellule différenciée, multipotente ou pluripotente ne redevient pas spontanément totipotente.

Les cellules souches d'organes amplifiées *in vitro* peuvent également contribuer à la régénération d'organes. Dans certaines situations, des cellules souches d'un organe peuvent se transformer en cellules souche d'un autre organe, selon un processus appelé transdifférenciation.

#### 4.2. Techniques du clonage

Elle concerne le transfert d'un noyau d'une cellule somatique (TNCS). Elle consiste à prélever une cellule de l'animal qui va être cloné appelée « cellule du donneur » et de prélever un ovocyte sur un autre animal. L'ovocyte est énucléé, c'est-à-dire débarrassé de son propre

noyau contenant son matériel génétique. Le noyau de la cellule du donneur et l'ovocyte sont ensuite fusionnés grâce à une impulsion électrique et à partir de cet instant, un embryon cloné se développe. Alors, il est implanté dans l'utérus d'une mère porteuse.

Chez les moutons et les porcs, le transfert de l'embryon dans l'utérus de la mère porteuse s'effectue chirurgicalement. Chez les bovins, le transfert d'embryon est suffisamment stressant d'où une exigence d'une anesthésie générale ou péridurale est obligatoire.

#### **4.2.1. Enucléation de l'ovocyte**

On retire premièrement le noyau de l'ovocyte de manière mécanique par aspiration pour pouvoir bénéficier des propriétés de programmation génétique de son cytoplasme. Pour pouvoir bénéficier des propriétés de programmation génétique du cytoplasme de l'ovocyte, le noyau est tout d'abord retiré mécaniquement de ce dernier par aspiration

Au même moment, Le globule polaire qui se trouve entre la zone pellucide et la membrane et contenant le jeu de chromosomes éjectés de la cellule pour former le gamète haploïde est aspiré.

C'est une opération traumatisante (violence mécanique qu'elle comporte mais aussi parce qu'elle s'accompagne du retrait d'environ un tiers du cytoplasme). Ceci abaisse d'autant les capacités de programmation de l'ovocyte. Des additions compensatoires de cytoplasme d'ovocyte atténuent quelque peu l'amplitude de ce phénomène. L'addition de cytoplasme d'ovocyte exogène ne paraît plus nécessaire lorsque le noyau du cytoplasme n'est pas retiré par aspiration mais par un clivage de la cellule à l'aide d'une lame tranchante qui sépare le noyau du reste de l'ovocyte.

#### **4.2.2. Choix des cellules donneuses de noyau**

L'origine des cellules donneuses de noyau est importante pour l'efficacité du clonage. Les cellules pluripotentes des embryons non cultivées donnent les meilleurs rendements de clonage que celles cultivées pendant plusieurs semaines. D'après Wilmut, Hiiragi et Solter, l'efficacité du clonage baisse encore plus lorsque les cellules donneuses sont prélevées chez un fœtus ou d'un adulte.

La différenciation rend difficile le retour à la totipotence la cellule donneuse de noyau. Il est important de noter que l'utilisation de noyaux de lymphocytes B et T ont permis le clonage de souris. Le rendement de l'opération était particulièrement faible mais ces résultats ont levé une ambiguïté.

Les cellules souches d'organes incomplètement différenciées sont plus aptes à retrouver l'état de totipotence. C'est la cause du faible succès du clonage à partir de cellules primaires.

Le type cellulaire de la cellule donneuse de noyau est également important. Les cellules du cumulus chez l'adulte et les fibroblastes de la peau chez le fœtus sont parmi les meilleures donneuses de noyau (raisons non déterminées). Les données actuelles indiquent que le type de cellules utilisées comme donneuses de noyau a une influence sur le rendement du clonage mais non sur les caractéristiques physiologiques des animaux nés après transfert de noyau.

La situation physiologique des cellules donneuses et receveuses de noyau est également très importante. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne la phase du cycle de division cellulaire des deux cellules. Plusieurs stratégies sont possibles sans qu'il ait pu être prouvé que l'une d'entre elles soit incontestablement la meilleure



La santé de l'animal cloné dépendra étroitement de l'état sanitaire de l'animal donneur et de celui de la femelle receveuse. Toute pathologie se produisant au cours de la gestation pourra avoir un impact sur la santé du fœtus et du jeune animal cloné. Par exemple, la présence d'un virus dans les noyaux des cellules utilisées pour le clonage (Herpès virus) peut avoir un impact direct sur le développement cellulaire, le fœtus ou le jeune clone après la naissance.

Tous ces éléments devront donc être pris en compte dans le choix des cellules donneuses et donc de l'animal donneur ou receveur.

#### **4.2.3. Transfert de noyau**

La cellule donneuse de noyau est introduite mécaniquement par micromanipulation entre la zone pellucide et la membrane de l'ovocyte. Cette opération est suivie d'un traitement répété par un champ électrique qui a pour but d'induire la fusion des membranes plasmiques de l'ovocyte énucléé et de la cellule donneuse. Le noyau diploïde de la cellule se retrouve ainsi au contact du cytoplasme de l'ovocyte. Le nouvel édifice ainsi construit s'apparente fortement à un zygote. Le traitement par le champ électrique a également comme effet d'activer le nouvel embryon pour qu'il commence son développement. En effet, ce champ électrique induit la formation de pores dans la membrane de l'embryon ce qui permet au calcium ambiant de pénétrer dans le compartiment intracellulaire. Cet artifice mime en partie l'induction de flux de calcium qui est normalement déclenchée par des signaux provenant du spermatozoïde lors de la fécondation.

L'activation de l'embryon issu d'un transfert de noyau peut être également être induite par l'action d'ionophores à calcium (ionomycine ou A23187), par l'addition de DMAP (6-diméthylaminopurine) qui est un inhibiteur de kinase capable de provoquer l'inactivation du MPF (M-phase promoting factor) de l'ovocyte (Hwang *et al.*, 2004) ou par l'addition d'inhibiteurs de la synthèse protéique (cycloheximide) et d'inhibiteur du cytosquelette (cytochalasine).

Les effets de ces traitements ne sont pas tous connus. Il vient ainsi d'être mentionné que le DMAP, classiquement utilisé par les biologistes cellulaires pour inhiber la phosphorylation de certaines protéines, a des propriétés mutagènes très significatives.

La phase d'activation de l'ovocyte après le transfert de noyau est un point capital dans le succès du clonage. Les techniques ne sont pas les mêmes dans tous les laboratoires sans que les raisons qui ont amené les expérimentateurs à faire ces choix, soient toujours bien claires. Par exemple, chez le porc, un groupe procède ainsi à un double transfert de noyau. Le premier se fait dans l'ovocyte énucléé. Le second consiste à extraire le noyau du zygote et à l'introduire dans un embryon au stade une cellule préalablement énucléé. Ce protocole repose sur l'idée que la reprogrammation se fait essentiellement en présence du cytoplasme de l'ovocyte tandis que le cytoplasme d'un embryon doit, selon les auteurs, être le mieux à même d'assurer le développement précoce de l'embryon.

