

# Conduite de la reproduction des mammifères domestiques : présent et futur\*

Le principal objectif de la reproduction des animaux domestiques est d'assurer le renouvellement des générations dans un but économique déterminé : la production de viande, de lait ou de laine selon les espèces ou les races et, dans certains cas particuliers, la fourniture d'animaux de haute valeur individuelle comme les chevaux de course. Les éleveurs cherchent donc à maîtriser au mieux la reproduction à la fois chez le mâle et chez la femelle pour fournir le plus grand nombre de jeunes de la qualité potentielle voulue au meilleur moment et au moindre coût. Au cours des dernières décennies, de nombreuses techniques ont été mises au point et développées dans ce but.

Chez le mâle, des méthodes assurant une disponibilité continue de semence, comme l'insémination artificielle avec de la semence congelée, sont maintenant utilisables dans toutes les espèces domestiques. La production permanente de semence chez les espèces dont la reproduction est saisonnée, comme les ovins et

les caprins, peut aussi être obtenue par une maîtrise appropriée des conditions de l'environnement.

Chez la femelle, les méthodes développées permettent de maîtriser le moment de la reproduction et d'augmenter le nombre de descendants par femelle grâce au contrôle du moment et du taux d'ovulation, associé ou non aux techniques de fécondation *in vitro* et/ou de transfert d'embryons.

De nouveaux développements dans la maîtrise de la reproduction vont être apportés avec la manipulation des embryons. Parmi ces techniques nouvelles, certaines sont déjà disponibles, comme la section des blastocystes, alors que d'autres, comme le clonage ou le transfert de gènes, sont encore du domaine du futur, au moins en ce qui concerne leur utilisation courante.

## Résumé

Les techniques modernes de reproduction appliquées aux mammifères domestiques ont pour but d'accroître l'efficacité de la production de jeunes dans les conditions choisies par les éleveurs. Cette revue présente les différentes techniques disponibles pour atteindre un tel objectif. Pour les mâles, en plus de l'utilisation de semence par insémination artificielle désormais possible chez toutes les espèces domestiques, l'accent est mis sur deux stratégies : d'une part, distribuer par insémination intra-utérine un petit nombre de spermatozoïdes des meilleurs reproducteurs (sur un plan génétique) à un maximum de femelles avec les plus grandes chances de fécondation, d'autre part, maintenir en permanence les mâles d'espèces saisonnées au maximum de leurs capacités de production spermatique par un régime photopériodique approprié. Pour les femelles, des techniques efficaces de contrôle de l'oestrus et de l'ovulation étant maintenant disponibles pour toutes les espèces domestiques, la reproduction peut être conduite au moment choisi par l'éleveur. Des techniques de reproduction plus complexes ont été développées avec la manipulation des embryons dans le but de diffuser plus largement le haut potentiel génétique des meilleurs reproducteurs. Si le transfert d'embryons est parvenu à un stade de développement commercial, la fécondation *in vitro* et les techniques de sexage ou de clonage des embryons sont encore au stade des études de laboratoire. Ces techniques sont néanmoins présentées car elles modifieront certainement la pratique de l'élevage dans l'avenir. En vue d'objectifs peut-être plus lointains, la transgénèse est aussi abordée chez les animaux domestiques. Enfin, une brève réflexion prospective évoque plusieurs aspects qui font déjà l'objet de recherches afin de mieux maîtriser ou rendre plus efficace la reproduction animale.

## 1 / Technologie du sperme : insémination artificielle

L'insémination artificielle est devenue une technique de routine largement répandue pour la reproduction animale, mais dans des condi-

\* Texte français d'une conférence donnée lors du Symposium sur « Les Production Animales à l'orée du 3<sup>e</sup> millénaire », réunion FEZ Toulouse, Juillet 1990. A paraître en anglais chez PUDOC, Hollande (1991) ; les lecteurs pourront s'y reporter pour une bibliographie plus complète.

tions particulières propres à chaque espèce. L'utilisation de sperme congelé est couramment pratiquée chez les bovins dans les pays où l'azote liquide est facilement disponible; elle se développe chez les caprins pour lesquels une technique efficace de congélation de la semence a été récemment mise au point (Corteel *et al* 1988), mais elle reste encore assez limitée chez les ovins et les porcins où le sperme est plus difficile à congeler (Bélier: Colas 1975; Verrat: Paquignon *et al* 1980). Cependant, pour ces dernières espèces, l'insémination artificielle s'est développée dans certains pays grâce à l'usage de la semence fraîche diluée: elle est utilisée immédiatement (moins d'une demi-journée après la récolte) chez des brebis synchronisées ou pendant une période un peu plus longue chez les porcins, dans des conditions particulières d'élevage (conduite en bandes); dans cette espèce, la semence ainsi préparée donne, en effet, de bons taux de fertilité jusqu'à 3 jours après la récolte.

Chez les ovins, la nécessité d'inséminer les femelles avec un grand nombre de spermatozoïdes est une limite importante au développement de l'insémination artificielle. Pour cette espèce, plusieurs chercheurs ont tenté d'inséminer les brebis directement dans la cavité utérine en réduisant de manière importante le nombre de spermatozoïdes déposés, tout en maintenant un niveau élevé de fécondation. Diverses expériences ont permis de préciser le meilleur moment d'insémination (48 ou même 60 h après l'enlèvement de l'éponge) et la dose optimale de semence congelée (au moins  $20 \cdot 10^6$  spermatozoïdes dans chaque corne utérine), les deux facteurs dépendant d'ailleurs l'un de l'autre. L'insémination intra-utérine sous endoscopie au travers de la paroi abdominale (laparoscopie) avec de la semence congelée est devenue efficace chez les ovins (55 à 60 % d'agnelage). Elle peut maintenant être considérée comme une technique de reproduction utilisable en élevage, mais dans des conditions bien précises. Des résultats prometteurs ont été obtenus récemment chez les caprins par insémination laparoscopique de petits nombres de spermatozoïdes.

## 2 / Production permanente de semence chez les espèces à reproduction saisonnière : contrôle photopériodique

Sous les latitudes moyennes et élevées, les ovins et les caprins sont des espèces saisonnières, dont la période principale d'activité sexuelle se situe en automne. Leur reproduction est contrôlée par l'amplitude de la variation de la durée du jour au long de l'année (Revue: Ortavant *et al* 1985). Les effets de la photopériode s'exercent par le relais du système nerveux central qui module la sécrétion des hormones gonadotropes (pulsatilité de LH, niveau de FSH). Chez le mâle, ces changements hormonaux contrôlent la production de spermatozoïdes par les testicules, avec un maxi-

mum en automne et un minimum au printemps.

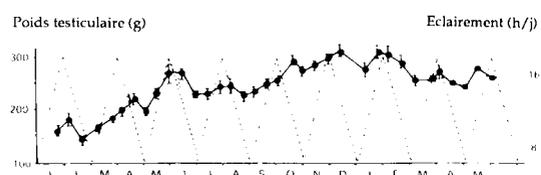
La durée du jour et la photopériode sont les principaux facteurs d'entraînement de l'activité testiculaire. Ceci est très bien montré dans les expériences où les variations annuelles de la photopériode sont contractées en cycles de 8, 6 ou même 4 mois. Dans ces conditions, béliers et boucs présentent une stimulation de l'activité gonadotrope et de la croissance testiculaire à chaque période « automnale », suivie d'une régression à chaque période de jours « longs ». Lorsque le rythme de changement photopériodique est encore plus accéléré, pour atteindre 3 ou 2 mois, la cyclicité testiculaire est alors supprimée: le poids des testicules est constamment élevé et la production spermatique atteint un niveau comparable à celle normalement observée en saison sexuelle (figure 1). L'effet de la lumière ne dépend pas du type des changements photopériodiques, progressifs ou abrupts, mais de la période du cycle lumineux. Des béliers et des boucs peuvent donc ainsi être transformés en reproducteurs capables de produire en grande quantité de la semence de bonne qualité et de s'accoupler tout au long de l'année (Pelletier et Almeida 1987).

## 3 / Contrôle du cycle œstrien, induction de l'ovulation et superovulation

Pour une meilleure conduite de la reproduction, le cycle ovarien des femelles doit être maîtrisé et l'ovulation induite aux périodes souhaitées. Plusieurs techniques, telles que certains traitements hormonaux, le contrôle photopériodique ou « l'effet mâle », sont couramment utilisées dans des programmes modernes de reproduction. Leur objectif principal est une meilleure gestion du travail et une répartition des parturitions mieux adaptée aux conditions technico-économiques.

Les développements récents des techniques de fécondation *in vitro*, de transfert d'embryons et de manipulations d'oeufs ou d'embryons ont créé des besoins nouveaux dans ce domaine de la maîtrise de la reproduction. En effet, le succès de ces techniques dépend non seulement d'un excellent contrôle de l'oestrus et de l'ovu-

Figure 1. Contrôle de la taille des testicules par la photopériode chez le bélier. Une alternance mensuelle de jours « courts » (8 h) et de jours « longs » (16 h) permet le maintien des testicules de bélier au maximum de leurs capacités de taille et donc de production spermatique (adapté de Pelletier et Almeida 1987, avec permission des éditeurs).



lation mais aussi d'une production accrue d'ovocytes. De ce fait, l'induction de la superovulation chez les meilleures femelles devient un nouvel objectif pratique pour les éleveurs.

### 3.1 / Contrôle du cycle oestrien, induction de l'ovulation

Certaines techniques décrites ci-dessous sont couramment utilisées en élevage alors que d'autres sont encore à l'essai mais elles seront bientôt disponibles.

#### a / Traitements hormonaux

Les progestagènes et/ou les prostaglandines sont largement utilisés pour l'induction ou la synchronisation des cycles oestriens chez les animaux domestiques. De nombreux produits sont à la disposition des éleveurs, avec indication précise de leur mode d'emploi pour chaque espèce.

Les **progestagènes** peuvent être administrés par différentes voies : éponges intravaginales, implants sous-cutanés, injection ou addition dans les aliments. On peut aussi utiliser la progestérone déposée sur des supports en élastomère tels le CIDR (Controlled Internal Drug Release) chez les ovins ou le PRID (Progesterone Releasing Intravaginal Device) chez les bovins.

Les analogues des **prostaglandines F2 $\alpha$** , en tant qu'agents lutéolytiques, sont administrés par injection intramusculaire mais avec une limite très importante à leur utilisation, à savoir qu'elle n'est possible que chez les femelles cycliques.

Les **gonadotropines** (PMSG ou hCG) ou l'hormone de libération des gonadotropines (GnRH) sont aussi très largement utilisées pour induire l'ovulation chez les mammifères domestiques (voir Short *et al* 1988, pour une revue générale).

#### b / Photopériode et mélatonine

Les ovins, les caprins et les équins sont des espèces domestiques à reproduction saisonnière chez qui la photopériode est le principal facteur de l'environnement qui contrôle la reproduction (Revue : Ortavant *et al* 1985). L'utilisation de lumière artificielle supplémentaire pour induire l'oestrus chez les brebis, les chèvres et les juments a été largement étudiée durant ces dernières années. Toutefois, ce procédé nécessite des bâtiments étanches à la lumière, donc coûteux.

Une alternative a été proposée récemment en traitant les animaux avec de la mélatonine, l'hormone « donneur de temps », qui transmet le message photopériodique au système hypothalamo-hypophysaire (Revue : Collin *et al* 1986). La sécrétion nocturne de cette hormone par la glande pinéale indique la durée du jour à l'animal. Un traitement par la mélatonine est interprété comme un « jour court », stimulant l'ovaire. Chez la brebis, la mélatonine permet d'avancer l'activité ovarienne saisonnière sans provoquer d'effets secondaires indésirables sur la fertilité. De ce fait, cette hormone peut jouer un rôle essentiel dans les programmes de ma-

trise de la reproduction dans les pays producteurs d'ovins (Poulton 1988). La mélatonine peut être donnée de différentes manières : dans la nourriture, par injection, par infusion ou encore par implants.

L'efficacité des diverses voies d'administration de la mélatonine a été démontrée chez la chèvre où elle peut aussi devenir un nouveau moyen de maîtrise de la reproduction (Chemineau *et al* 1988). Chez la jument, la mélatonine exogène corrige les effets des jours longs sur le moment de l'ovulation au terme de l'inactivité ovarienne et pourrait aussi devenir un outil de contrôle de la reproduction.

#### c / L'effet mâle

La relation entre l'introduction d'un mâle dans un groupe de femelles préalablement séparées des mâles, et le moment de leur ovulation a d'abord été observée chez les ovins. Depuis, « l'effet bélier » a été très étudié (Revue : Martin *et al* 1986). C'est par l'intermédiaire de phéromones que les béliers stimulent l'activité de reproduction des brebis en augmentant la fréquence des décharges de LH et, par voie de conséquence, la croissance de follicules ovariens aboutissant à l'ovulation. L'effet mâle est un moyen efficace et peu onéreux dans la conduite de la reproduction ovine mais il présente des limites car les capacités de réponse des femelles varient avec la race, la saison et leur état nutritionnel.

Des mécanismes analogues ont été décrits chez les caprins, les bovins et les porcins.

### 3.2 / Superovulation

Le taux d'ovulation des femelles peut être légèrement augmenté pour améliorer leur prolificité naturelle, ou fortement stimulé (c'est la superovulation) pour produire soit un grand nombre d'ovocytes en vue de la fécondation *in vitro*, soit plusieurs embryons pour les programmes de transfert d'embryons.

La superovulation est provoquée par un traitement hormonal à base de gonadotropines (FSH, PMSG, hMG) ou de GnRH (figure 2). La réponse obtenue présente une grande variabilité qui dépend des individus, de leur activité ovarienne au moment du traitement, de la race, de la saison et de l'origine des hormones.

- **Bovins** : Divers traitements avec des préparations de FSH contenant un taux connu de LH, des analogues de GnRH ou du liquide folliculaire bovin ont été essayés pour déterminer celui qui provoquerait la superovulation mais avec le moins possible d'effets secondaires sur les profils endocriniens des animaux. PMSG, maintenant appelée eCG (equine Chorionic Gonadotropin), n'induit qu'une superovulation limitée chez les bovins. Cependant, lorsqu'un anticorps anti-PMSG spécifique est utilisé pour limiter la durée d'action de PMSG, le nombre d'embryons de bonne qualité produits par vache donneuse est comparable à celui obtenu avec FSH (Revue : Chupin 1988).

- **Ovins** : La réponse ovulatoire à FSH dépend de la population des follicules ovariens au début du traitement. Un prétraitement avec un

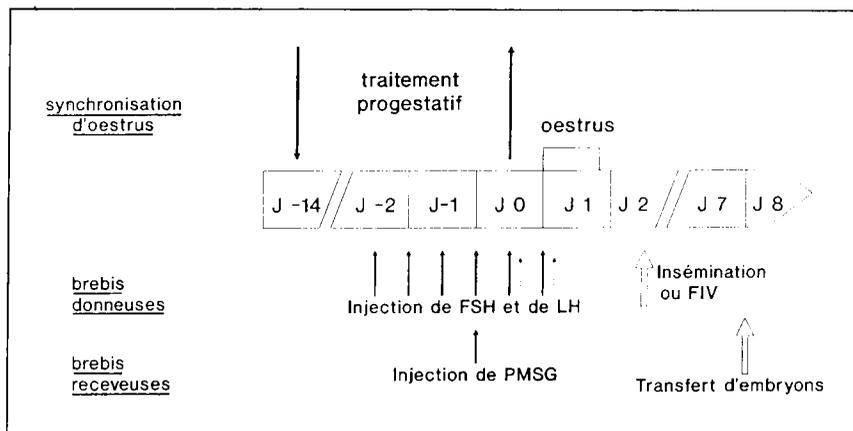
**Les traitements hormonaux provoquant la superovulation sont utilisés pour obtenir soit un grand nombre d'ovocytes, destinés à la fécondation *in vitro*, soit plusieurs embryons qui seront ensuite transplantés.**

**Figure 2. Ovulation multiple en vue de la fécondation *in vitro* ou du transfert d'embryons. Exemple des ovins.**

Chronologie de traitement des femelles donneuses et receveuses. Les événements sont centrés autour du jour d'arrêt du traitement progestatif (J 0 : retrait d'éponge vaginale ou d'implant sous-cutané chez les brebis donneuses).

- Brebis donneuses d'ovocytes ou d'embryons : elles sont traitées avec FSH 2 fois par jour de J - 2 à J 0 avec une dose décroissante de FSH (↑) à laquelle est ajoutée une dose croissante de LH en fin de traitement (↑, 2 dernières injections).

- Brebis receveuses : la fin du traitement progestatif, associé à une injection de PMSG, est avancée de 12 h afin de mieux les synchroniser avec les donneuses. En cas de FIV, le transfert d'œufs fécondés se fait au stade pronucléaire soit le lendemain de la FIV.



analogue de GnRH, en supprimant les grands follicules, augmente le taux d'ovulation et réduit la variabilité de la réponse (Brébion et Cognié 1989). L'addition de LH aux dernières injections de FSH augmente aussi le taux d'ovulation des brebis. Une combinaison de PMSG et FSH est également efficace pour augmenter le nombre des ovulations chez la brebis.

- **Caprins** : Les préparations hormonales les plus utilisées chez la chèvre sont PMSG en une seule injection et FSH en injections multiples (Revue : Amoah et Gelaye 1990) mais, comme chez les bovins, FSH tend à modifier de manière défavorable les profils endocriniens des animaux.

- **Equins** : Il est très difficile d'obtenir des ovulations multiples chez la jument. Les extraits hypophysaires équins semblent les plus appropriés pour stimuler la croissance d'un petit nombre de follicules ovariens (Squires *et al* 1986).

La superovulation peut donc être obtenue chez les animaux domestiques avec des traitements adaptés à chaque espèce. Ils peuvent être répétés à intervalle régulier toutes les 6 à 10 semaines augmentant ainsi la production d'œufs ou d'embryons par donneuse. Toutefois, il existe une importante variabilité individuelle dans la réponse aux traitements hormonaux, réponse qui tend à diminuer avec leur répétition, peut-être à cause de la formation d'anticorps contre les hormones exogènes injectées.

#### 4 / Fécondation *in vitro*

La fécondation *in vitro* (FIV) est un très bon outil d'étude des mécanismes biologiques mis en jeu dans la fécondation et le développement embryonnaire précoce des mammifères. Son

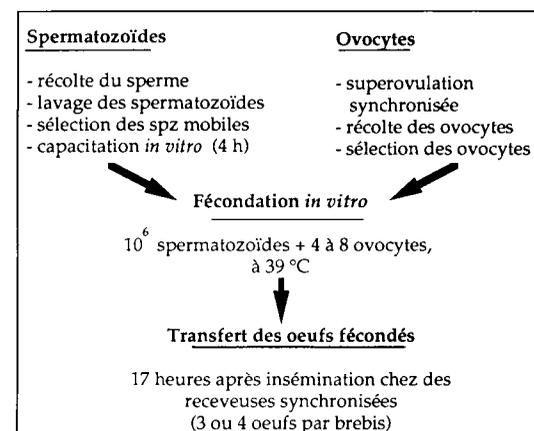
application en élevage doit permettre la multiplication intensive des lignées les plus intéressantes, la production d'animaux transgéniques et le pronostic de la fertilité des mâles. La fécondation *in vitro* n'a été réussie que récemment chez les mammifères domestiques et les premiers jeunes nés après FIV sont âgés de moins de 10 ans chez les bovins (Brackett *et al* 1982), 5 ans chez les ovins (Cheng *et al* 1986), les caprins (Hanada 1985) et les porcins (Cheng *et al* 1986), et 1 an chez les équins (Palmer *et al* 1990). Pour la réussite de la FIV, il faut préparer convenablement à la fois les ovules (ovocytes) et les spermatozoïdes (figure 3).

Les ovocytes doivent être récoltés soit par chirurgie, directe ou sous endoscopie, soit à l'abattage. Ils le sont au moment de l'ovulation après maturation *in vivo* ou bien ils peuvent être prélevés directement dans les follicules ovariens avant l'ovulation et maturés *in vitro* dans un milieu approprié.

Les spermatozoïdes doivent provenir de mâles donnant des éjaculats de très bonne qualité avec un pouvoir fécondant élevé (Fukui *et al* 1988). Ils sont préparés spécialement pour la FIV (Thibault et Crozet 1988). Leur ultime maturation, ou « capacitation », qui intervient après l'éjaculation, a longtemps représenté une difficulté majeure qui n'a pu être surmontée *in vitro* qu'après l'essai de nombreux milieux et de conditions techniques variées (Revue : First et Parrish 1988). En bref, des milieux efficaces pour la capacitation doivent préserver une motilité élevée, faciliter la maturation membranaire et augmenter le pourcentage de spermatozoïdes qui entreprennent spontanément la réaction acrosomique (fusion de la membrane cellulaire et de la membrane externe de l'acro-some). De fortes concentrations de spermatozoïdes sont nécessaires pour obtenir la capacitation *in vitro*. C'est un processus long (6 heures ou plus pour le sperme de taureau ou de bélier) mais, lorsqu'il est accompli, les spermatozoïdes pénètrent dans l'œuf dans les minutes qui suivent le mélange des gamètes (Crozet *et al* 1987). Avec des conditions convenables de température, de milieu, de concentration en spermatozoïdes et un rapport numérique spermatozoïdes/ovocytes correct, des taux

**La fécondation *in vitro* n'a été réussie que récemment chez les mammifères domestiques. Elle a nécessité de très nombreux essais afin de définir les conditions précises de récolte et de maturation des gamètes.**

**Figure 3. Fécondation *in vitro* chez les mammifères domestiques. Exemple des ovins.**



élevés de fécondation peuvent maintenant être obtenus chez la plupart des animaux domestiques.

## 5 / Transfert et manipulation des embryons

Les embryons obtenus à partir d'ovocytes superovulés et fécondés *in vivo* ou *in vitro* sont transplantés dans des femelles receveuses pour se développer normalement jusqu'à la naissance. Grâce à cette technique, il devient possible d'utiliser des femelles d'un haut niveau génétique comme donneuses d'ovocytes ou d'embryons. Ces « mères génétiques » peuvent ainsi produire un grand nombre de descendants par des traitements répétés de superovulation ; les gestations sont ensuite poursuivies chez des « mères biologiques » receveuses.

### 5.1 / Transfert d'embryons

Le transfert est pratiqué avec des embryons de 5-8 jours, soit chirurgicalement par laparotomie chez toutes les espèces domestiques, soit de manière non chirurgicale par les voies naturelles (vagin, col utérin) chez les bovins et les équins. Des techniques de laparoscopie ont été proposées récemment chez les petits ruminants avec des embryons de 5 à 7 jours (Revue : Kraemer 1989). Elles ont été améliorées pour être utilisables avec des embryons de 1 ou 2 jours chez les ovins (Vallet *et al* 1989). Les programmes commerciaux de transfert d'embryons, mis en place chez les bovins, les ovins et les caprins, montrent que la technique est disponible en élevage même si des améliorations sont encore nécessaires. Le taux de réussite de l'implantation des embryons transférés devrait pouvoir être augmenté par co-transfert d'embryons et de vésicules trophoblastiques (obtenues à partir d'annexe (trophoblaste) de jeunes embryons en voie d'allongement) comme cela a été fait chez les bovins. Cette amélioration est probablement due à une meilleure « communication » entre la femelle receveuse et le matériel embryonnaire grâce à un signal plus efficace de ce dernier (Thatcher *et al* 1985).

### 5.2 / Traitement des embryons

En respectant des conditions techniques précises, les embryons peuvent être stockés avant leur transfert. Ils peuvent aussi être traités pour des objectifs spécifiques entrant dans le cadre de programmes d'amélioration génétique.

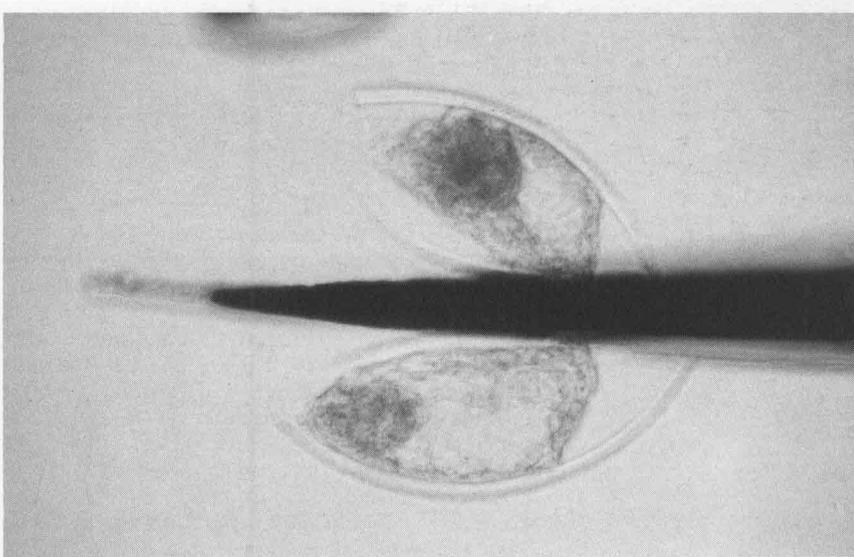
- **Congélation** : La congélation d'embryons de 6-8 jours est d'usage courant chez les bovins depuis plusieurs années. Elle est possible chez les ovins et les caprins et des jeunes sont nés du transfert d'embryons congelés-décongelés, mais très peu d'articles ont rapporté des taux de mise-bas supérieurs à 50 % chez les petits ruminants (Heyman *et al* 1987, Baril *et al* 1989). Pour les équins et les porcins, la congélation des embryons est encore au stade du laboratoire. La congélation d'embryons plus jeunes n'est pas encore faisable mais il est possible d'obtenir le développement *in vitro* d'œufs

fécondés jusqu'au stade morula ou blastocystes par culture sur des cellules de l'épithélium des trompes ou des cornes utérines (Revue : Rexroad 1989). Ces blastocystes pourraient alors être congelés mais ceci n'a pas encore été publié.

- **Culture des embryons** : La mise au point de méthodes de culture des embryons donne non seulement une information appréciable sur la biologie du développement embryonnaire précoce des mammifères, mais elle apporte aussi les moyens d'un tri *in vitro* des embryons en fonction de leur qualité. Avec la culture *in vitro*, on pourra évaluer l'aptitude des embryons à survivre à la congélation et à la décongélation, aux divers traitements de section ou de clonage, ainsi que leurs capacités à se développer après transfert dans des femelles receveuses. Des tests efficaces de tri des embryons après l'utilisation de ces techniques ne sont cependant pas encore disponibles (Revue : Butler et Biggers 1989). La culture *in vitro* des embryons sera aussi très utile dans les programmes de transgénèse pour trier les embryons et ne transférer que ceux qui auront effectivement incorporé des gènes étrangers (cf. infra).

- **Section des embryons** : Toutes les cellules qui proviennent des premières segmentations après la fécondation, depuis les stades les plus précoces jusqu'au stade morula, sont capables de redonner des embryons normaux. Aussi, la section des très jeunes embryons a été pratiquée chez la plupart des espèces domestiques (figure 4) afin d'augmenter le nombre de descendants grâce à un plus grand nombre de demi-embryons disponibles pour le transfert soit isolément, soit par paires. En effet, lorsque des paires de demi-embryons sont transférées dans une receveuse, la production totale de nouveau-nés augmente et, dans les meilleures conditions, elle peut même dépasser 100 % (Bovins : Seike *et al* 1989 ; Ovins : Chesné *et al* 1987), sans entraîner de free-martins chez les bovins puisque les demi-embryons d'une paire donnée sont du même sexe.

Figure 4. Section d'un embryon bovin. L'expérimentateur a pris soin de couper l'embryon en répartissant le bouton embryonnaire (masse sombre) et le trophoblaste (masse plus claire) de manière équivalente dans chaque demi-embryon.



Cliché INRA/F. Chesné

- **Sexage** : Il est possible aussi de prélever quelques cellules des embryons pour connaître le sexe des futurs produits. Les éleveurs apprécieront certainement de pouvoir transférer des embryons de sexe connu. Bien des méthodes ont été proposées pour déterminer le sexe des embryons. La plus prometteuse est celle qui fait appel à des sondes d'ADN spécifiques du chromosome Y (Vaiman *et al* 1988). La méthode permet de n'utiliser qu'un tout petit nombre de cellules embryonnaires sur lesquelles est appliquée la technique dite de « PCR » (Polymerase Chain Reaction) qui amplifie l'ADN (multiplication *in vitro* de la fraction intéressante d'ADN). On regarde si les cellules lient la sonde spécifique du chromosome Y : une réaction positive n'est obtenue que chez les embryons mâles. Cette méthode est fiable et rapide. Elle devrait se développer pour être largement utilisée dans un proche avenir.

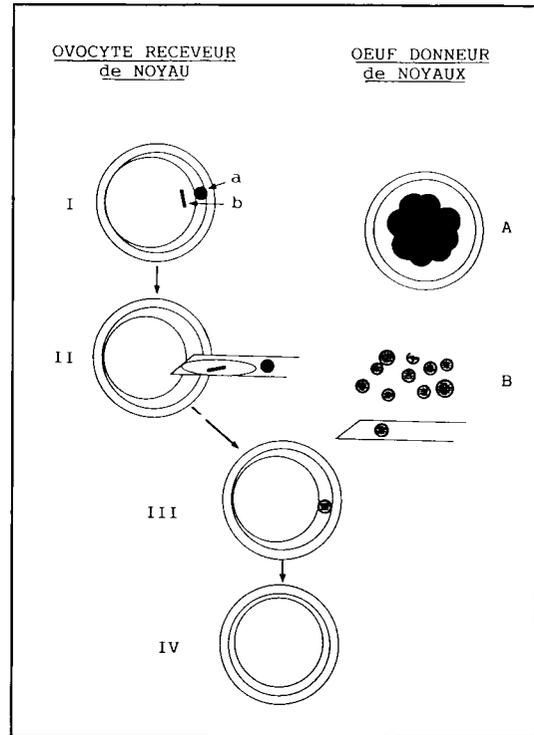
La technique de « sexage » peut aussi être appliquée aux spermatozoïdes, non pour séparer ceux qui sont porteurs du chromosome X ou du chromosome Y mais pour vérifier l'efficacité des méthodes destinées à les séparer. Jusqu'à présent, celles-ci se sont toutes avérées inefficaces chez les animaux domestiques (Amann 1989). Toutefois, le sexage des spermatozoïdes devrait devenir une réalité lorsque la technique de tri réussie par Johnson *et al* (1989) chez le lapin à l'aide de la cytométrie en flux (cellules circulant dans une veine liquide, séparées selon leur contenu individuel en ADN) sera adaptée au sperme des autres espèces domestiques, ou lorsque les techniques immunologiques (Booman *et al* 1989) seront rendues plus performantes.

## 6 / Clonage animal par transplantation embryonnaire

La multiplication des meilleurs animaux d'une population est essentielle pour la diffusion rapide du progrès génétique. Toutefois, le transfert d'embryons n'est pas encore assez efficace pour atteindre ce but, même associé à la superovulation répétée des meilleures femelles et à la section de leurs embryons pour augmenter le nombre de descendants. Le développement récent des connaissances sur l'embryologie des mammifères a permis de proposer de nouvelles techniques qui devraient permettre la replication d'un grand nombre d'animaux par la voie du clonage.

Il a été montré que les noyaux des cellules résultants des premières divisions de l'œuf ou même de celles de la masse cellulaire interne des jeunes blastocystes peuvent redonner un embryon normal lorsqu'ils sont transplantés dans un ovocyte fraîchement ovulé dont le propre noyau a été retiré (figure 5). Des nouveaux nés issus de transplantation nucléaire embryonnaire ont été obtenus récemment chez les bovins (Prather *et al* 1987), les ovins (Wilsen 1986) et les porcins (Prather *et al* 1989). C'est l'aboutissement d'une série de techniques complexes de micromanipulation de cellules. Leur efficacité est, pour le moment, très limitée

Figure 5. Clonage animal par transfert de noyaux de cellules embryonnaires totipotentes (d'après Wooliams et Wilmot 1989).



Un ovocyte « receveur » fraîchement ovulé est prélevé (I). Il est débarrassé de ses chromosomes, 1<sup>er</sup> globule polaire (a) et plaque métaphasique (b), par aspiration dans une micropipette (II). Les cellules d'un œuf « donneur » de noyaux (A), au stade 8 à 32 cellules, sont séparées (B). Une de ces cellules est placée sous la zone pellucide du cytoplasme receveur (III). Sa fusion avec le cytoplasme receveur (IV), sous l'effet d'un champ électrique, donne un nouvel embryon qui se développera comme un œuf normalement fécondé.

et doit être considérablement améliorée. En outre, il faut souligner que le clonage animal n'est possible qu'à partir des cellules embryonnaires qui ont conservé toutes leurs capacités de différenciation, cellules dites « totipotentes ». Il ne l'est pas avec des cellules d'animaux adultes.

Des améliorations ont déjà été apportées à la technologie du clonage pour en augmenter l'efficacité globale et il est permis de penser que cette technique va prendre sa place dans l'économie des productions animales. Le clonage contribuera largement au gain génétique, même s'il ne crée pas lui-même de nouvelles combinaisons de gènes mais produit des séries d'animaux génétiquement identiques. Il permettra, en effet, (i) de réduire le temps de passage du noyau central de sélection vers les troupeaux d'utilisation, (ii) d'augmenter l'efficacité de l'évaluation des caractères génétiques intéressants comme ceux qui touchent à la production laitière, et (iii) d'étudier les interactions entre la génétique et les facteurs de l'environnement, tels que la nutrition ou les conditions d'élevage. Ainsi, le clonage animal devrait contribuer sans limite théorique à un plus

**Le transfert est pratiqué avec des embryons de 5 à 8 jours. Différents procédés peuvent être utilisés pour sélectionner les embryons à transplanter, sexage par exemple, ou pour les modifier, mais ces techniques sont encore au stade des études de laboratoire.**

grand développement du progrès génétique. Il est même possible de cloner des embryons eux-mêmes produits de clonage (Bondioli *et al* 1990). Par contre, il faudra être particulièrement attentif dans le choix des animaux qui seront à l'origine des clones et avoir le maximum de moyens pour en vérifier la qualité afin d'éviter tout risque de diffusion de gènes dont les effets seraient défavorables.

## 7 / Animaux transgéniques

Le transfert de gènes ne peut pas être considéré comme une technique de reproduction en soi puisqu'il consiste à manipuler des oeufs au moment de la fécondation ou très peu de temps après (microinjection d'ADN dans l'un des pronoyaux des oeufs fécondés ou dans les noyaux d'embryons au stade 2 cellules). Il semble toutefois normal d'en discuter dans cet article car les progrès de la technologie de l'ADN recombinant rendent possible l'insertion de gènes étrangers dans le génome d'animaux domestiques pour modifier leur potentiel génétique. L'objectif est d'introduire des gènes nouveaux qui amélioreraient certaines caractéristiques importantes au plan économique, telles que la résistance aux maladies, la production de viande, de lait ou de laine... Chacun a en mémoire les souris géantes obtenues par l'insertion du gène de l'hormone de croissance d'une autre espèce au moment de la fécondation (Palmiter *et al* 1982). Certains ont pensé que des changements comparables pourraient être obtenus chez les mammifères domestiques. Plusieurs expériences ont été conduites chez les ovins et les porcins pour produire des animaux de plus grande taille et pour améliorer la qualité des carcasses. C'était une vue optimiste des choses dans la mesure où le taux de succès est extrêmement faible, environ 1/100, et que très peu d'animaux transgéniques ont pu être produits jusqu'à présent chez les espèces intéressantes sous l'angle économique. Plus important, l'ingénierie moléculaire mal adaptée de ces gènes a eu des conséquences physiologiques défavorables sur les animaux chez qui ils ont été introduits (Pursel *et al* 1990). En effet, les gènes étrangers doivent être convenablement placés et leur expression correctement contrôlée pour donner les résultats attendus. Jusqu'à présent, ceci est extrêmement difficile et la maîtrise de l'ingénierie moléculaire des gènes devra être beaucoup plus avancée pour que des changements significatifs des performances animales puissent être obtenus de manière régulière (Pursel *et al* 1990, Wilmut *et al* 1990). Cependant, des succès notoires ont été obtenus récemment avec l'obtention de brebis transgéniques dont le lait contenait des composants qui normalement ne s'y trouvent pas, comme des protéines humaines d'intérêt thérapeutique qui peuvent ainsi être produites en grande quantité (Wilmut *et al* 1990).

## 8 / Perspectives

Cette revue a présenté les progrès d'intérêt fondamental ou appliqué réalisés en reproduc-

tion animale au cours des dernières décennies. De nouvelles techniques sont régulièrement mises en œuvres dans les programmes d'amélioration génétique du bétail de nombreux pays, même si certaines ne sont encore que modérément efficaces au titre de la reproduction comme l'insémination artificielle des bovins où les taux de réussite en première insémination artificielle restent voisins de 50-55 % en dépit des nombreux travaux réalisés pour les améliorer. Certaines techniques nécessitent encore d'importants progrès avant d'être largement utilisées en production animale, comme le sexage ou le clonage des embryons, et leur coût par rapport au profit attendu conditionnera leur utilisation.

Chez le mâle, la congélation de la semence nécessite des recherches complémentaires pour la plupart des espèces et la réduction du nombre des spermatozoïdes par dose est un objectif pratique important. Dans l'avenir, le sexage des spermatozoïdes sera demandé chez tous les animaux domestiques, après les premiers résultats prometteurs qui viennent d'être obtenus chez le lapin (Johnson *et al* 1989). Une meilleure conservation du pouvoir fécondant des spermatozoïdes après leur dépôt dans les voies génitales femelles permettrait de pratiquer l'insémination artificielle indépendamment de la période d'œstrus (une fois en début de saison de reproduction, ou une fois au hasard à chaque cycle œstrien). Cela rendrait possible l'amélioration génétique par le recours à l'insémination artificielle en conditions d'élevage extensif. Tout progrès dans l'appréciation précoce de l'aptitude à la reproduction des mâles ou de leurs éjaculats aurait aussi des répercussions considérables. Une vue plus futuriste encore de l'insémination artificielle serait l'utilisation de sperme déshydraté, évitant la technologie lourde et onéreuse de la congélation dans les pays où l'azote liquide n'est pas facilement disponible. Toutefois, le seul résultat positif obtenu il y a de nombreuses années avec cette technique n'a jamais pu être répété, même par ses auteurs (Meryman et Kafig 1963), et aucune percée réelle n'a été enregistrée sur ce sujet.

Chez la femelle, en plus d'une bonne maîtrise de l'œstrus qui demeure un objectif pratique important, la faible efficacité de la production d'ovocytes pour le transfert d'embryons, la fécondation *in vitro* ou le clonage animal, est un facteur limitant de l'amélioration génétique par la voie femelle. Des progrès dans la connaissance de la biologie de l'ovaire (follicules ovariens et ovocytes) seront déterminants. Il est permis de penser qu'au siècle prochain les meilleures femelles seront régulièrement traitées pour donner un grand nombre d'ovocytes congelables et de bonne qualité en vue du transfert d'embryons après fécondation avec des spermatozoïdes sexés, ou pour produire des séries d'embryons clonés... Pour accroître leurs chances d'implantation chez les femelles receveuses, les embryons seront transférés par paires, avec des vésicules trophoblastiques additionnelles obtenues *in vitro* par culture de cellules du trophoblaste, afin d'augmenter le signal embryonnaire nécessaire à l'établissement de la gestation. Les mères pourraient

recevoir des injections d' $\alpha$  interferon recombinant, analogue à la protéine trophoblastique 1, pour améliorer le taux de gestation. Par ailleurs, certains des clones pourront aussi être stockés sous la forme d'embryons congelés jusqu'à ce que les résultats des tests de performances de leurs propres jumeaux soient connus. Seuls, les meilleurs d'entre eux seraient alors utilisés pour créer les générations futures...

## Conclusion

Si l'on revient à des situations plus concrètes et moins futuristes, les différents aspects des techniques de reproduction animale considérés dans cette revue montrent l'étendue des possibilités mises à la disposition, des éleveurs et de leurs techniciens. Ceux-ci peuvent décider comment et quand commencer ou organiser la reproduction de leurs troupeaux. L'énorme pression économique et technique qui pèse sur les productions animales donne l'assurance que les meilleurs mâles et les meilleures femelles seront utilisés dans les conditions les plus propices pour créer et diffuser le progrès génétique. La plupart des technologies de la reproduction exigent une conduite plus intensive que le simple « élevage de cueillette ». Elles sont onéreuses mais toutes peuvent être adaptées aux conditions économiques locales et à l'environnement technologique dans lequel elles seront utilisées. L'objectif ultime est d'améliorer les productions animales pour fournir les produits de l'élevage indispensables à l'alimentation d'une population humaine mondiale toujours croissante.

## Références bibliographiques

Cette liste a été volontairement limitée à des articles de synthèse et aux premières références des résultats les plus nouveaux.

AMANN R.P., 1989. Treatment of sperm to predetermine sex. *Theriogenology*, 31, 49-60.

AMOAH E.A., GELAYE S., 1990. Superovulation, synchronization and breeding of does. *Small Ruminant Res.*, 3, 63-72.

BARIL B., CASAMITJANA P., PERRIN J., VALLET J.C., 1989. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthygiene*, 24, 101-115.

BONDIOLI K.R., WESTHUSIN M.E., LOONEY C.R., 1990. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 33, 165-174.

BOOMAN P., KRUIJT L., VEERHUIS R., HENGST A.M., TIEMAN M., RUCH F.E., 1989. Sexing bovine embryos with monoclonal antibodies against the H-Y antigen. *Livest. Prod. Sci.*, 23, 1-16.

BRACKETT B.G., BOUSQUET D., BOICE M.L., DONAWICK W.J., EVANS J.F., DRESSEL M.A., 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, 27, 147-158.

BREBION P., COGNIE Y., 1989. Increased superovulation in the ewe following 14 days of Gn-RH agonist pre-treatment. 5<sup>e</sup> Réunion de l'Association Européenne de Transfert Embryonnaire, 8-9 Septembre 1989, Lyon (France). Abstract p.106.

BUTLER J.E., BIGGERS J.D., 1989. Assessing the viability of preimplantation embryos in vitro. *Theriogenology*, 31, 115-126.

CHEMINEAU P., PELLETIER J., GUERIN Y., COLAS G., RAVAUULT J.P., TOURE G., ALMEIDA G., THIMONIER J., ORTAVANT R., 1988. Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. *Reprod. Nutr. Dév.*, 28, 409-422.

CHENG W.T.K., MOOR R.M., POLGE C., 1986. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 25, 146.

CHESNE P., COLAS G., COGNIE Y., GUERIN Y., SEVELLEC C., 1987. Lamb production using superovulation, embryo bisection, and transfer. *Theriogenology*, 27, 751-757.

CHUPIN D., 1988. Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. In: Les hormones et leurs analogues dans la reproduction. Pharmacologie et pharmacocinétique. Masson, Paris. Colloque de la Société Française pour l'Etude de la Fertilité, 26, 213-232.

COLAS G., 1975. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fert.*, 42, 277-285.

COLLIN J.P., ARENDT J., GERN W.A., 1988. Le « troisième oeil ». *La Recherche*, 203, 1154-1165.

CORTEEL J.M., LEBOEUF B., BARIL G., 1988. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Ruminant Res.*, 1, 19-35.

CROZET N., HUNEAU D., DESMEDT V., THERON M.C., SZOLLOSI D., TORRES S., SEVELLEC C., 1987. In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Res.*, 16, 159-170.

FIRST N.L., PARRISH J.J., 1988. Sperm maturation and in vitro fertilization. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 26-30 June 1988, Dublin (Ireland). Vol. 5, p. 161-168.

FUKUI Y., GLEW A.M., GANDOLFI F., MOOR R.M., 1988. Ram-specific effects on in-vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 82, 337-340.

HANADA A., 1985. In vitro fertilization in goats (in Japanese). *Jap. J. Anim. Reprod.*, 31, 21-26.

HEYMAN Y., VINCENT C., GARNIER V., COGNIE Y., 1987. Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. *Vet. Rec.*, 120, 83-85.

JOHNSON L.A., FLOOK J.P., HAWK H.W., 1989. Sex preselection in rabbits: Live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol. Reprod.*, 41, 199-203.

KRAEMER D.C., 1989. Embryo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology*, 31, 141-148.

MARTIN G.B., OLDHAM C.M., COGNIE Y., PEARCE D.T., 1986. The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams. A review. *Livest. Prod. Sci.*, 15, 219-247.

MERYMAN H.T., KAFIG E., 1963. Freeze-drying of bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, 5, 87-94.

ORTAVANT R., PELLETIER J., RAVAUULT J.P., THIMONIER J., VOLLAND-NAIL P., 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxford Rev. Reprod. Biol.*, 7, 305-345.

PALMER E., BEZARD J., MAGISTRINI M., DUCHAMP G., 1990. In vitro fertilisation in the horse: a retrospective study. Vth International Symposium on Equine Reproduction, 1-7 July 1990, Deauville (France). *J. Reprod. Fert., Suppl.* 44, In press.

PALMITER R.D., BRINSTER R.L., HAMMER R.E., TRUMBUE M.E., ROSENFELD M.G., BIRNBERG N.C., EVANS R.M., 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metalloproteinase-growth hormone fusion genes. *Nature*, 300, 611-615.

PAQUIGNON M., BUSSIERE J., BARITEAU F., COUROT M., 1980. Effect of frozen boar semen under practical conditions of artificial insemination. *Theriogenology*, 14, 217-226.

PELLETIER J., ALMEIDA G., 1987. Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 34, 215-226.

POULTON A.L., 1988. The proposed use of melatonin in controlled sheep breeding. *Aust. J. Biol. Sci.*, 41, 87-96.

- PRATHER R.S., BARNES F.L., SIMS M.M., ROBL J.M., EYESTONE W.H., FIRST N.L., 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod.*, 37, 859-866.
- PRATHER R.S., SIMS M.M., FIRST N.L., 1989. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol. Reprod.*, 41, 414-418.
- PURSEL V.G., BOLT D.J., MILLER K.F., PINKERT C.A., HAMMER R.E., PALMITER R.D., BRINSTER R.L., 1990. Expression and performance in transgenic pigs. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 40, 235-245.
- REXROAD C.E., 1989. Co-culture of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 31, 105-114.
- SEIKE N., SAEKI K., UTAKA K., SAKAI M., TAKAKURA R., NAGAO Y., KANAGAWA H., 1989. Production of bovine identical twins via transfer of demi-embryos without zonae pellucidae. *Theriogenology*, 32, 211-220.
- SHORT R.E., STAIGMILLER R.B., BELLOWS R.A., 1988. Hormonal treatments to induce ovulation. 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, 26-30 June 1988, Dublin (Ireland). Vol. 5, p. 146-154.
- SQUIRES E.L., GARCIA R.H., GINTHER O.J., VOSS J.L., SEIDEL G.E., 1986. Comparison of equine pituitary extract and follicle stimulating hormone for superovulating mares. *Theriogenology*, 26, 661-670.
- THATCHER W.W., KNICKERBOCKER J.J., BARTOL F.F., BAZER F.W., ROBERTS R.M., DROST M., 1985. Maternal recognition of pregnancy in relation to the survival of transferred embryos: endocrine aspects. *Theriogenology*, 23, 129-143.
- THIBAUT C., CROZET N., 1988. La fécondation in vitro des ovocytes de brebis et de vache peut-elle entrer dans la pratique de l'élevage? 3rd World Congress on Sheep and Beef Cattle Breeding, 19-23 Juin 1988, Paris (France). Vol. 1, p.79-91.
- VAIMAN M., COTINOT C., KIRSZENBAUM M., LEONARD M., CHESNE P., HEYMAN Y., STINNAKRE M.G., BISHOP C., FELLOUS M., 1988. Sexing of bovine embryos using male-specific nucleic acid probes. 3rd World Congress on Sheep and Beef Cattle Breeding, 19-23 Juin 1988, Paris (France). Vol. 1, p. 93-105.
- VALLET J.C., FOLCH J., POULIN N., COGNIE Y., 1989. Surgical or laparoscopic embryo transfer in sheep before or after the first cleavages. 5<sup>e</sup> Réunion de l'Association Européenne de Transfert Embryonnaire, 8-9 Septembre 1989, Lyon (France). Abstract p. 188.
- WILLADSEN S.M., 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320, 63-65.
- WILMUT I., ARCHIBALD A.L., HARRIS S., Mc CLENA-GHAN M., SIMONS J.P., WHITELAW C.B.A., CLARK A.J., 1990. Methods of gene transfer and their potential use to modify milk composition. *Theriogenology*, 33, 113-123.
- WOOLIAMS J.A., WILMUT I., 1989. Embryo manipulation in cattle breeding and production. *Anim. Prod.*, 48, 3-30.

## Summary

### *Management of reproduction in farm animals: present and future.*

Modern techniques applied to reproduction of domestic mammals aim at increasing the efficiency of production of offspring under the conditions of management best suited to the farmers. This report presents the different techniques now available to achieve this objective. For the male, in addition to the use of semen in artificial insemination now possible in all species of farm animals, emphasis will first be on the possibility to deliver a small number of spermatozoa from the best pedigree sires to a maximum number of females with the best chance of fertilization and, second, to keep the males of seasonal breeders (like sheep and goats) permanently at the top of their potential sperm production. For the female, as oestrus and ovulation can now be

efficiently controlled, reproduction may be managed in the different species of farm animals at any chosen period of the year. Sophisticated methods of reproductive technology have also been developed with embryo manipulation in order to further improve the rate of genetic gain. If embryo transfer is now at the stage of commercial development, techniques for in vitro fertilization, sexing and cloning of embryos, as well as gene transfer, are still being developed in research laboratories. These techniques will also be considered in this report as they will certainly change the future of the farm animal industry.

COUROT M., VOLLAND-NAIL Patricia, 1991. Conduite de la reproduction des mammifères domestiques: présent et futur. *INRA Prod. Anim.*, 4 (1) 21 - 29.