



HAL
open science

Cryoconservation des ressources génétiques chez le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*): production et congélation des embryons

Anne Gregoire

► **To cite this version:**

Anne Gregoire. Cryoconservation des ressources génétiques chez le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*): production et congélation des embryons. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT: 2012LYO10168 . tel-00981743

HAL Id: tel-00981743

<https://theses.hal.science/tel-00981743v1>

Submitted on 22 Apr 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES – SANTE

Pour l'obtention du

DIPLÔME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 aout 2006)

Présentée et soutenue publiquement le 25 septembre 2012

par

Anne GRÉGOIRE

**Cryoconservation des ressources génétiques chez le cochon d'Inde
(*Cavia porcellus*) :
production et congélation des embryons**

Membres du jury

M. le Professeur Bruno Salle, Président

Mme la Professeure Anne Meddahi-Pellé, Rapporteur

M. le Professeur José Salvador Vicente Antón, Rapporteur

M. le Docteur Pascal Mermillod, Rapporteur

Mlle la Docteure Marion Bérard, Examineur

M. le Professeur Pierre Guérin, Examineur

M. le Docteur Thierry JOLY, Directeur de Thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration
 Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie
 Universitaire
 Vice-président du Conseil Scientifique
 Secrétaire Général

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID
 M. le Professeur Philippe LALLE
 M. le Professeur Germain GILLET
 M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard
 Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud –
 Charles Mérieux
 UFR d'Odontologie
 Institut des Sciences Pharmaceutiques et
 Biologiques
 Institut des Sciences et Techniques de la
 Réadaptation
 Département de formation et Centre de Recherche
 en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
 Administrateur provisoire : M. le Professeur G.
 KIRKORIAN
 Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
 Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.
 Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
 Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies
 Département Biologie
 Département Chimie Biochimie
 Département GEP
 Département Informatique
 Département Mathématiques
 Département Mécanique
 Département Physique
 Département Sciences de la Terre
 UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques
 et Sportives
 Observatoire de Lyon
 Polytech Lyon
 Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique
 Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
 Institut Universitaire de Formation des Maîtres
 Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
 Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
 Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
 Directeur : M. N. SIAUVE
 Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
 Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
 Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
 Directeur : Mme S. FLECK
 Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
 Directeur : M. C. COLLIGNON

 Directeur : M. B. GUIDERDONI
 Directeur : M. P. FOURNIER
 Directeur : M. G. PIGNAULT
 Directeur : M. C. VITON
 Directeur : M. R. BERNARD
 Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-
 DESCHAMPS

Cryoconservation des ressources génétiques chez le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) : production et congélation des embryons

La conservation de la biodiversité génétique du cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) est importante en tant qu'animal de consommation endémique de la région andine ainsi qu'en tant qu'animal modèle précieux pour la recherche biomédicale. L'objectif de ce travail était la mise en place de protocoles qui permettront une conservation *ex situ* des ressources génétiques de cette espèce par la voie femelle. Les étapes nécessaires sont la maîtrise de la production d'embryons, leur cryoconservation dans l'azote liquide et leur transfert dans des femelles receveuses. Une méthode standardisée de synchronisation des chaleurs basée sur l'administration d'altrenogest *per os* pendant 15 jours a été définie. Les chaleurs des apparaissent dans les 4 à 5 jours qui suivent l'arrêt du traitement de ce progestagène. Des traitements de superovulation basés sur 3 injections à 24 heures d'intervalle d'hMG, ou 6 injections à 12 heures d'intervalle de FSH-recombinante humaine, permettent une augmentation du taux d'ovulation de l'ordre de 3 à 4 fois par rapport au témoin. Toutefois les réponses au traitement restent variables et il faudra réitérer l'expérience sur de plus grands lots d'animaux afin d'ajuster les doses et les moments d'application. La méthode de congélation lente, avec l'éthylène glycol comme cryoprotecteur, a permis d'obtenir des taux de survie embryonnaire *in vitro* satisfaisants (70,3%). La méthode de vitrification a également donné de bons résultats, avec un taux de survie embryonnaire *in vitro* de 41,7%. Le premier transfert au monde d'embryons frais réalisé avec succès dans une femelle receveuse préalablement synchronisée a été obtenu lors de ce travail.

Mots clés

Cochon d'Inde ; synchronisation des chaleurs ; superovulation ; cryoconservation des embryons ; congélation lente ; vitrification ; transfert embryonnaire

Discipline

Physiologie et Biotechnologies de la reproduction

UPSP 2011-03-101 I.C.E.

VETAGRO SUP - Campus Vétérinaire de Lyon
1 Avenue Bourgelat
F-69280 Marcy l'Etoile FRANCE

Cryopreservation of guinea pig (*Cavia porcellus*) genetic resources: embryos production and freezing

The preservation of the guinea pig (*Cavia porcellus*) genetic biodiversity is important as a native source of protein for many highlanders in the Andean region and as a precious laboratory animal for biomedical research. The aim of this work was to establish the protocols that will enable an *ex situ* preservation of the genetic resources of this species by the female way. The necessary steps for the achievement of a cryobank project are: the control of the embryo production and the cryopreservation in liquid nitrogen of the obtained embryos and their transfer into recipient females.

A standard method for synchronization of heat periods based on the *per os* administration of altrenogest during 15 days has been defined. The heat periods of donors and recipients of embryos, appear 4 to 5 days after the end of the treatment. Superovulation treatments, based on 3 injections at 24-hour intervals of hMG or 6 injections at 12-hour intervals of human recombinant-FSH, lead to an increase of the ovulation rate of about 3 to 4 times when compared to untreated females. However, the responses to the treatments remain variable and further studies involving a larger number of animals should be carried out in order to adjust the dose and the moment of application of the treatment. The slow-freezing method, using ethylene glycol as cryoprotectant, enables the attainment of a satisfactory *in vitro* embryo survival rate (70,3%). The vitrification method also gives good results, with a 41,7% *in vitro* embryo survival rate. The first successful transfer of fresh embryos into a synchronized recipient female has been achieved in this study.

Keywords

Guinea pig ; heat period synchronization ; superovulation ; embryo cryopreservation ; slow freezing ; vitrification ; embryo transfer

Academic iscipline

Reproductive Physiology and Biotechnology

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury et particulièrement à Monsieur Bruno Salle pour m'avoir fait l'honneur d'en assurer la présidence. Je veux assurer Madame Anne Meddahi-Pellé, Monsieur José Salvador Vicente Antón et Monsieur Pascal Mermillod de ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de rapporter sur ce travail de thèse et de m'avoir fait bénéficier de leur expertise. Je souhaite remercier Monsieur Pierre Guérin de m'avoir accueillie dans son Unité de Recherche et Mademoiselle Marion Bérard dont la présence au sein du jury est un immense honneur.

Enfin, je veux exprimer toute ma gratitude à Monsieur Thierry Joly pour avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse. Je le remercie de m'avoir fait confiance depuis le début et de m'avoir soutenue avec patience durant ces quatre années. Je le remercie infiniment d'être venu suivre mes travaux au Pérou et de s'être si bien adapté aux conditions de travail à l'autre bout du monde. Merci de m'avoir appris à faire preuve de rigueur lorsque cela est nécessaire mais aussi de savoir laisser une place à l'imprévu lorsque cela est possible. Je le remercie surtout pour toute l'empathie, la bonne humeur, l'optimisme et l'entrain qui le caractérisent. Il était impossible de ne pas finir ma thèse avec un directeur aussi investi et encourageant! Du fond du cœur merci.

Je veux également adresser mes remerciements à tous mes collègues de travail, qu'ils aient participé de près ou de loin à ces travaux :

- Merci à mes collègues de l'IFEA de Lima pour votre accueil chaleureux lors de mon arrivée au Pérou. Je remercie le directeur, Monsieur Georges Lomné, d'avoir soutenu ma candidature pour l'obtention d'une bourse, Nora, Anne-Marie, Véronique, Alina, Cecilia, Maria, Javier et Pepe pour tous les moments passés ensemble les deux premières années au sein de l'Institut. Je tiens à remercier particulièrement Monsieur Jean-Joinville Vacher pour son aide et l'intérêt qu'il a toujours montré pour mon travail.

- Merci à mes collègues de l'UPSP Cryobio de Lyon et en particulier à Mademoiselle Aurélie Allard. Merci pour ton aide, ta bonne humeur et ton amitié. Grâce à toi les manips fastidieuses de synchronisation des chaleurs sont un très bon souvenir ainsi que tous les moments de travail et de détente passés ensemble, sans parler du road-trip arizonien !

- Merci aux responsables de la faculté de zootechnie de la Universidad Nacional Agraria de La Molina, Messieurs Enrique Alvarado Malca et Jose Sarria Bardales, pour la mise à disposition des infrastructures d'élevage et de laboratoire nécessaires au déroulement de mes travaux. Je remercie également Monsieur William Vivanco Mackie pour ses multiples recommandations et encouragements.

- Un merci spécial pour mes collègues du CIETE, Mesdemoiselles Ethel Huaman Fuertes, Silvia Leon Trinidad et Rosa-Maria Silva Arce, qui m'ont accueilli à bras ouverts et m'ont tellement aidée que je ne sais pas par où commencer. Muchisimas gracias chicas por el apoyo incondicional, por acogerme tan naturalmente entre ustedes y hacerme sentir parte del laboratorio cuando nada les obligaba a eso. Encuentre verdaderas amigas y espero poder devolverles algun dia toda la ayuda que me brindaron !

- Merci à ceux qui m'ont aidé et appris tous les trucs et astuces pour élever les cochons d'Inde : Grillo, el mejor criador de cuyes del Peru y por lo tanto...del mundo, et Pavel, por su gentil ayuda en la tarea que menos me gustaba.

- Merci à Catherine, Louise et Pierre Joly pour avoir laissé Thierry s'absenter parfois longtemps pour venir au Pérou, et aussi pour leur visite et le voyage que nous avons partagé comme en famille.

Je remercie évidemment mes amis qui ont été présents chacun à leur façon. Certains sont venus me voir au Pérou: Gégé, Benny, Frede, No, Yann, vos visites de si loin ont été d'immenses joies pour moi et j'en garde d'excellents souvenirs ! À tous ceux qui n'ont malheureusement pas pu me rejoindre de l'autre côté de l'équateur, merci d'avoir pris du temps pour me voir et m'avoir souvent accueillie à chacune de mes visites en France : Stéphane, Milou, Julien, Charline, Alex, Annabelle, Titine, Anne-Caro, les retrouvailles à Nancy, Paris, Lyon ou en Bretagne m'ont toujours permis de repartir avec les batteries rechargées au Pérou ! Et bien sûr un grand merci à ceux rencontrés sur la route et qui ont partagé ma vie à La Mansion de Barranco : parmi les premiers à avoir investi les lieux Lulu, Marqui et Céline ont une place toute particulière dans mon cœur pour avoir été là quand j'en avais le plus besoin, merci les amis ! Et tous les suivants : Carole et Camille pour les soirées papotes de filles, Momo et Stacey pour être toujours aussi cools et disponibles, Lobo et Arturito, les colocs-de-toit-idéaux, Marie et Sarah, le duo de choc pour coloc au top et Francho... pour tout !

Je remercie toute ma famille et particulièrement mes parents et mes frères. Merci à nos parents d'avoir réuni toutes les conditions pour notre bonheur personnel et de nous avoir élevés pour former une famille unie et heureuse. Merci de ne jamais me juger même lorsque mes choix ne sont pas les meilleurs et de toujours être présents et de bons conseils. L'éloignement me permet souvent de mesurer la force de nos liens et la chance que j'ai de vous avoir. Merci à Sev et Caro d'être toujours partantes pour les réunions de famille et d'être de formidables belle-sœurs, à Tantine d'être la meilleure des marraines et Des le plus irish des relecteurs, à Anne-Cécile la plus toquée des cousines, et évidemment des milliers de merci à mon filleul Louis, mes neveux Paul et Victor et tous ceux qui suivront : Tatanne aura toujours de nouvelles aventures à vous raconter !

Je dédie ma thèse à celui qui m'a accompagné de façon indéfectible et sous toutes les latitudes depuis que j'ai commencé mes études il y a 13 ans, mon fidèle compagnon : Pluton.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	5
SOMMAIRE	8
INTRODUCTION.....	12
1ERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	18
I. DIVERSITE GENETIQUE DE <i>CAVIA PORCELLUS</i>.....	19
I.1. CLASSIFICATION DES COCHONS D'INDE DE CHAIR DANS LES ANDES	19
I.2. CLASSIFICATION DES COCHONS D'INDE DE LABORATOIRE	25
I.3. CLASSIFICATION DES COCHONS D'INDE ORNEMENTAUX.....	27
II. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION DE LA FEMELLE <i>CAVIA PORCELLUS</i>	28
II.1. ANATOMIE DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR	28
II.2. PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION	32
III. MAITRISE DE LA REPRODUCTION CHEZ <i>CAVIA PORCELLUS</i>	40
III.1. OBSERVATION DU CYCLE ŒSTRAL	40
III.2. PRODUCTION D'EMBRYONS CHEZ <i>CAVIA PORCELLUS</i>	42
IV. CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS ET SOLUTIONS CRYOPROTECTRICES.....	45
IV.1. PRINCIPES DE LA CRYOCONSERVATION D'EMBRYONS	45
IV.2. LES DIFFERENTES TECHNIQUES DE CRYOCONSERVATION	50
IV.3. CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS DE <i>CAVIA PORCELLUS</i>	53
2EME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.....	54
I. OPTIMISATION DU PROTOCOLE DE SYNCHRONISATION DES CHALEURS DE <i>CAVIA PORCELLUS</i>	56
I.1. OBJECTIFS.....	56
I.2. MATERIEL ET METHODES	57
I.3. RESULTATS.....	60
I.4. DISCUSSION ET CONCLUSION	62
II. PROTOCOLE DE PRODUCTION D'EMBRYONS DE <i>CAVIA PORCELLUS</i>.....	65
II.1. OBJECTIFS	65
II.2. MATERIELS ET METHODES	65
II.3. RESULTATS	69
II.4. DISCUSSION –CONCLUSION	70
III. CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS DE <i>CAVIA PORCELLUS</i>	72
III.1. OBJECTIFS.....	72
III.2. ESSAIS PRELIMINAIRES RELATIFS AU MILIEU DE CULTURE D'EMBRYONS FRAIS	72
III.3. CONGELATION LENTE ET VITRIFICATION D'EMBRYONS.....	74
IV. TRANSFERTS D'EMBRYONS FRAIS ET DECONGELES DE <i>CAVIA PORCELLUS</i>.....	79
IV.1. TRANSFERT D'EMBRYONS FRAIS	79
IV.2. ESSAIS PRELIMINAIRES DE TRANSFERTS D'EMBRYONS DECONGELES	84
V. DISCUSSION GENERALE.....	86
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	90
BIBLIOGRAPHIE	96
ANNEXES	105
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	111

LISTE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES :

Figure 1 : Cochon d'Inde de Type A.....	20
Figure 2 : Cochon d'Inde de Type B.....	20
Figure 3 : Cochon d'Inde de Type I.....	21
Figure 4 : Cochon d'Inde de Type II.....	21
Figure 5 : Cochon d'Inde de Type III.....	22
Figure 6 : Cochon d'Inde de Type IV.....	22
Figure 7 : Cochon d'Inde noir utilisé dans le médecine traditionnelle.....	23
Figure 8 : Cochon d'Inde de la lignée Peru.....	24
Figure 9 : Cochon d'Inde de la lignée Andina.....	24
Figure 10 : Cochon d'Inde de la lignée Inti.....	24
Figure 11 : Cochon d'Inde de la lignée Dunkin-Hartley.....	25
Figure 12 : Lignées de cochons d'Inde consanguins développées au Japon dans les années 1970.....	25
Figure 13 : Cochon d'Inde IAF.....	26
Figure 14 : Nomenclature officielle des standards de cochons d'Inde ornementaux de l'ANEC.....	27
Figure 15 : Cochon d'Inde à poils longs Sheltly.....	27
Figure 16 : Vue dorsale de l'appareil reproducteur femelle de <i>Cavia porcellus</i> , d'après (Popesko et al., 1992).....	28
Figure 17 : Disposition d'ensemble de l'appareil génital femelle de <i>Cavia porcellus</i>	29
Figure 18 : Anatomie de l'oviducte de <i>Cavia porcellus</i> d'après (Nilsson et Reinius, 1969).....	30
Figure 19 : Cornes utérines complètement séparées de <i>Cavia porcellus</i> d'après (Hafez, 1970).....	30
Figure 20 : Cervix de <i>Cavia porcellus</i>	31
Figure 21 : Membrane épithéliale vaginale de <i>Cavia porcellus</i>	31
Figure 22 : Comparaison du déroulement de l'ovogenèse chez les mammifères d'après (Mauléon, 1967).....	33
Figure 23 : Représentation du cycle œstral de <i>Cavia porcellus</i> : Corps Jaune fonctionnel 12-13 jours, d'après (Hilliard, 1973).....	34
Figure 24 : Chronologie du développement embryonnaire chez <i>Cavia porcellus</i>	37
Figure 25 : Développement prénatal de <i>Cavia porcellus</i> , d'après (Evans et Sack, 1973).....	38
Figure 26 : Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement, d'après (Ogadescu, 2005).....	47
Figure 27 : Propriétés physico-chimiques de certains cryoprotecteurs pénétrants, d'après (Claudel, 2007).....	48
Figure 28 : Représentation schématique des protocoles de congélation lente et de vitrification d'après (Ménézo, 2004).....	50
Figure 29 : Dispositif expérimental des traitements de synchronisation des chaleurs.....	58
Figure 30 : Observation de la membrane épithéliale et réalisation du frottis.....	59
Figure 31 : Interprétation des frottis vaginaux.....	59
Figure 32 : Effets des analogues de PGF2 α et du progestagène sur le durée du cycle œstral.....	60
Figure 33 : Distribution des femelles ayant ovulé suite à la dernière administration d'altrenogest.....	61
Figure 34 : Administration d'altrenogest par voie orale.....	63
Figure 35 : Protocole de superovulation avec de l'hMG (G2).....	66
Figure 36 : Protocole de superovulation avec de la FSH-r (G3).....	67
Figure 37 : Stades et qualités d'embryons de <i>Cavia porcellus</i>	73
Figure 38 : Schéma du montage des embryons en paillettes avant congélation lente:.....	74
Figure 39 : Congélateur programmable :.....	75
Figure 40 : Schéma du montage des embryons en paillettes avant vitrification:.....	76

Figure 41 : Deux types de pipettes de transfert utilisées dans l'expérience	81
Figure 42 : Transfert d'embryons de <i>Cavia porcellus</i> par laparotomie ventrale.....	81
Figure 43 : Ressources zoogénétiques andines	90

LISTE DES TABLEAUX :

Tableau 1 : Effets des traitements de superovulation sur la réponse ovarienne et la qualité des embryons collectés	70
Tableau 2 : Taux de développement des embryons de <i>Cavia porcellus</i> après 48h de culture <i>in vitro</i>	73
Tableau 3 : Influence des solutions cryoprotectrices sur le taux de survie embryonnaire des embryons cryopréservés	77
Tableau 4 : Résultats des transferts embryonnaires d'embryons décongelés	84

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
ANEC : Association Nationale des Eleveurs de Cochons d'Inde
C4D : *Complement-4-Deficient*
CDB : Convention sur la Diversité Biologique
CIETE : *Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones*
CITES : Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacées d'extinction
CJ : Corps jaune
DMSO : diméthylsulfoxyde
eCG : *equine chorionic gonadotropin*
EG : éthylène glycol
FAO : Food and Agriculture Organization
FDA : fluorescéine de diacétate
FSH : *Follicle-Stimulating Hormone*
FHS-r : *Follicle-Stimulating Hormone* -recombinante humaine
hCG : *human chorionic gonadotropin*
hMG : *human menopausal gonadotropin*
IAF : Institut Armand Frappier
IETS : *International Embryo Transfer Society*
INIA : *Insituto Nacional de Investigación Agraria*
IPS : *Induced Pluripotent Stem cells*
KM : Milieu Kane
KSOM : *potassium simplex optimization medium*
LH : luteinizing *hormone*
MINAG : *Ministerio de Agricultura*
ONG : Organisation Non Gouvernementale
PBS : *Phosphate Buffered Saline*
p.c. : *post-coitum*
PGF_{2α} : Prostaglandine F_{2α}
PMSG : *pregnant mare's serum gonadotropin*
p.p. : *post-partum*
PROH : 1,2-propanediol
SUDIRGEB : *Sub Dirección de recursos Genéticos y Biotecnología*
UI : Unité Internationale
WM : Milieu Whitten

INTRODUCTION

Vingt années se sont écoulées depuis l'adoption de la *Convention sur la Diversité Biologique* (CDB) lors du Sommet de la Terre de Rio de Janeiro en 1992. Ratifiée par 193 Etats, cette convention a pour but « d'assurer la conservation de la diversité biologique, l'utilisation durable de ses éléments et le juste partage des avantages découlant de l'exploitation des ressources génétiques » (PNUE, 1992). La CDB couvre l'ensemble des écosystèmes, des espèces et des ressources génétiques. Outre une définition précise de la biodiversité au sens large, de son utilisation et de sa conservation, la CDB a introduit deux notions nouvelles : la souveraineté des États sur leurs ressources d'une part, le partage juste et équitable du fruit de leur valorisation selon certaines modalités d'autre part. Les États parties se sont engagés à mettre en place les moyens juridiques nécessaires à l'application des principes et orientations de la CDB. Lors de la Conférence des Parties (instance décisionnaire qui se réunit tous les deux ans) de Nagoya en 2010 aucun des pays présents n'avait rempli l'objectif fixé en 2002 à Johannesburg « d'assurer d'ici 2010 une forte réduction du rythme actuel de perte de diversité biologique aux niveaux mondial, national et régional ». Le rapport *Perspectives mondiales de la diversité biologique 3* (PNUE, 2010a) publié à cette occasion indiquait que, globalement, les pertes en biodiversité s'accroissent faute d'un manque d'engagement des États parties dans la mise en place de politiques concrètes de lutte contre la perte de biodiversité. L'appauvrissement de la diversité génétique est constaté tant dans les écosystèmes naturels que dans les systèmes de production de cultures et d'animaux d'élevage.

Dès son adoption, la CDB a reconnu la spécificité des domaines agricoles et alimentaires, très utilisateurs et pourvoyeurs de ressources génétiques qu'il est nécessaire de conserver. L'Objectif 13 du *Plan stratégique pour la diversité biologique 2011-2020* (PNUE, 2010b), adopté lors de la réunion des États parties de 2010, recommande que « d'ici à 2020, la diversité génétique des plantes cultivées, des animaux d'élevage et domestiques et des parents pauvres, y compris celle d'autres espèces qui ont une valeur socio-économique ou culturelle, soit préservée, et des stratégies soient élaborées et mises en œuvre pour réduire au minimum l'érosion génétique et sauvegarder leur diversité génétique ». La FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - Organisation des Nations Unies pour l'Agriculture et l'Alimentation) constitue l'organisation internationale mandatée pour faire adopter des plans d'action de conservation de la diversité génétique pour l'agriculture et l'alimentation, en cohérence avec les

principes et orientations de la CDB. Pour cela, la Commission des Ressources Génétiques pour l'alimentation et l'agriculture de la FAO, s'est dotée de deux groupes de travail techniques intergouvernementaux, en charge respectivement des ressources phytogénétiques et des ressources zoogénétiques (Annexe 1). Des progrès importants ont été accomplis pour assurer la conservation de la diversité génétique des plantes cultivées, notamment grâce à l'utilisation des banques de semences *ex situ* instaurées par le *Plan d'Action Mondial pour la conservation et l'utilisation durable des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture* (FAO, 1996) adopté à Leipzig en 1996. En ce qui concerne les animaux domestiques, le rapport de la FAO présenté en 2007 sur l'état des ressources zoogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture est la première évaluation faisant autorité sur la question (FAO, 2007a). Ce rapport a été élaboré à partir des informations en provenance de 169 pays et indique que les systèmes d'élevage normalisés et à haut rendement ont entraîné une érosion de la diversité génétique du bétail. Ce premier état des lieux indique qu'au moins un cinquième des races d'animaux d'élevage sont actuellement confrontées à un risque d'extinction et que ceci peut compromettre l'accessibilité future à des ressources génétiques issues de l'élevage et capables d'assurer les moyens d'existence de nombreuses populations. Face à l'ampleur du problème, un accord a été conclu à Interlaken, le 9 septembre 2007, sur la mise en œuvre et le financement du *Plan d'action mondial pour les ressources génétiques animales* (FAO, 2007b). Les délégués de 108 pays ont alors adopté ce premier plan dont l'ambition est de stopper l'érosion de la diversité des animaux d'élevage et de soutenir l'utilisation durable, la mise en valeur et la conservation des ressources génétiques. Ce plan définit la conservation des ressources génétiques des animaux domestiques comme essentielle pour la sécurité alimentaire et la garantie des moyens de subsistance des populations, en particulier dans les pays en voie de développement.

En signant la Déclaration d'Interlaken, le Pérou a donc engagé sa responsabilité quant à la conservation de ses espèces domestiques. La *Sub Dirección de recursos Genéticos y Biotecnología* (SUDIRGEB), de l'*Instituto Nacional de Investigación Agraria* (INIA), est à ce titre l'entité étatique chargée de préserver et conserver les ressources génétiques des animaux domestiques, en particulier les espèces locales, aussi bien de façon *in situ* que *ex situ*. La création d'une cryobanque des espèces domestiques andines s'inscrit ainsi dans le schéma de conservation *ex situ* prévu par la SUDIRGEB. Le but prioritaire de cette cryobanque sera de conserver en l'état les potentialités évolutives des populations, constituant ainsi un outil complémentaire à la conservation *in situ* réalisée par les éleveurs et diverses organisations professionnelles (par exemple les associations et coopératives d'éleveurs d'alpagas et de cochons d'Inde, les

entreprises industrielles de la fibre, ou encore le Kennel Club péruvien). La cryobanque devra être une structure qui rassemble et conserve un stock suffisant de cellules (germinales, embryonnaires ou somatiques), à long terme et avec un maximum de garanties sur le plan sanitaire, pour représenter à l'état congelé les populations identifiées comme importantes pour chacune des espèces considérées.

Dans les Andes, trois espèces de mammifères ont été domestiquées : deux camélidés (l'alpaga et le lama) et le cochon d'Inde (Gade, 1967). Les biotechnologies reproductives qui permettent de conserver les cellules germinales et embryonnaires de ces trois espèces doivent à ce jour être développées et standardisées avant de pouvoir envisager concrètement la création d'une cryobanque des ressources zoogénétiques andines. Parmi les espèces domestiquées dans les Andes, nous avons choisi le cochon d'Inde comme espèce modèle d'études pour illustrer la problématique lors de la mise en œuvre de cette cryobanque. Plusieurs raisons justifient notre choix. Tout d'abord, le cochon d'Inde est un petit animal placide, sociable et d'une manipulation très facile qui se satisfait de conditions d'élevage rudimentaires et d'un régime alimentaire simple. Ces caractéristiques d'élevage permettent d'obtenir des coûts d'expérimentation faibles. De plus, l'intervalle générationnel court et la prolificité de cette espèce permettent d'obtenir rapidement des données concrètes, contrairement aux camélidés qui n'ont qu'un descendant par an. Enfin, le cochon d'Inde est à la fois un animal domestique, de laboratoire et de compagnie. La grande diversité de populations, bien qu'il n'existe pas à ce jour de classification standardisée de races, montre que l'on peut accéder par cette espèce à des populations constituées de façon très différentes.

Depuis l'époque précolombienne, le cochon d'Inde fait partie de nombreuses traditions folkloriques, est échangé comme cadeau et est utilisé dans la médecine traditionnelle andine (Morales, 1995). Mais c'est surtout en tant que source de protéines pour de nombreuses familles montagnardes à faible revenu qu'il joue encore un rôle important (Bolton, 1979). Au Pérou par exemple, pays qui possède la plus grande population de cochons d'Inde au monde, environ 22 millions d'animaux élevés majoritairement au sein d'unités familiales fournissent quelques 16 500 tonnes de viande chaque année (Chauca de Zaldívar, 1997). Les programmes de sélection menés depuis les années 1970 par les instituts de recherche agraire des pays andins ont donné lieu à une nouvelle diversité génétique, orientée vers la formation d'animaux plus productifs. La diffusion des animaux sélectionnés dans les élevages conduit à une érosion génétique des lignées non-sélectionnées moins productives mais plus rustiques et donc susceptibles d'être plus

résistantes face à de nouveaux aléas (maladies émergentes, changement climatique, etc.). Un plan de conservation de l'ensemble des lignées existantes en élevage permettra de maintenir un pool génétique suffisant pour envisager un schéma de sélection de l'espèce sur le long terme.

D'autre part, le cochon d'Inde a été très largement utilisé depuis le 18^{ème} siècle comme animal de laboratoire, alors plus connu sous le nom de cobaye (Terril et al., 1998). Il a joué un rôle essentiel dans l'établissement de la théorie des germes à la fin du 19^{ème} siècle, en particulier lors des travaux de Robert Koch sur la tuberculose (Guerrini, 2003). Son utilisation a diminué significativement depuis la moitié du 20^{ème} siècle. Supplanté aujourd'hui par d'autres rongeurs (souris, rats) il ne représentait plus que 2% des animaux de laboratoire en 2007 (Gad, 2003). Toutefois, le cochon d'Inde est toujours un modèle de référence pour des recherches très spécifiques, notamment car son système immunitaire possède des interactions antigènes-macrophages similaires à celles des humains (Hoff et al., 2011; Sugawara et al., 2009). La gestation relativement longue (68 jours), comparée à d'autres rongeurs, avec un placenta hémochorial ainsi que la présence d'un système nerveux central abouti à la naissance en font un excellent modèle pour les recherches sur la procréation humaine médicalement assistée et permettent de l'utiliser pour mener des recherches sur les produits tératogènes. Ces caractéristiques sont particulièrement intéressantes pour étudier la nocivité de certains facteurs qui agissent différemment en fonction du stade de gestation (Wagner et Manning, 1976). La plupart des cochons d'Inde communément utilisés pour la recherche scientifique ne sont pas consanguins, comme par exemple le cochon d'Inde Albino short-haired Duncan-Hartley. Par ailleurs, quelques lignées de cochons d'Inde consanguins sont disponibles (les strain2 et strain13 étant les plus communes) et de nouvelles lignées sont régulièrement créées pour les besoins spécifiques d'une recherche. Ainsi, la standardisation des protocoles de conservation d'embryons de cochon d'Inde intéresse particulièrement des structures de recherche françaises, notamment l'Institut Pasteur de Paris. Celui-ci souhaite conserver des lignées de cochons d'Inde expérimentales pour l'étude des nouvelles souches de germes de tuberculose multirésistants aux antibiotiques, qui posent actuellement un sérieux problème pour la santé publique.

Parmi les cellules germinales, embryonnaires et somatiques qui peuvent être conservées dans l'azote liquide à -196°C, nous avons choisi de développer la congélation des embryons car ces cellules présentent l'avantage de contenir l'information génétique sous forme diploïde. Ainsi conservée, l'intégralité de l'information génétique serait obtenue à nouveau dès la première génération issue de transfert embryonnaire. La mise en place d'une cryobanque d'embryons permettrait de conserver le pool génétique des lignées de cochons d'Inde natives, conformément

aux engagements pris à Interlaken en 2007, ainsi que les lignées précieuses d'un point de vue scientifique tout en minimisant les coûts de maintenance des colonies dans les laboratoires.

Cette voie de gestion *ex situ* des ressources génétiques du cochon d'Inde requiert de s'affranchir des obstacles techniques qui permettent la mise en place d'une cryobanque d'embryons. L'objectif de cette étude est d'essayer de mettre en place des méthodes standardisées de production et de conservation d'embryons de cochon d'Inde compatibles avec des conditions d'élevage, afin que le projet de cryobanque soit un outil efficace de gestion des ressources génétiques de cette espèce au Pérou.

Ainsi, nous réaliserons dans un premier temps une étude bibliographique sur la diversité génétique, les particularités anatomiques et physiologiques de la reproduction des femelles cochon d'Inde ainsi qu'un état des connaissances actuelles concernant les méthodes de production et de congélation d'embryons pour cette espèce, et sur les principes de la cryoconservation d'embryons en général. Cette partie sera l'occasion de mettre en évidence les difficultés à surmonter pour produire et conserver des embryons de cochons d'Inde. Malgré une grande quantité de travaux menés sur cet animal comme modèle pour comprendre la physiologie de la reproduction des mammifères dans les années 1960-1970, très peu de résultats sur la maîtrise de la reproduction ont été publiés et aucune méthode standardisée utilisable dans des conditions d'élevage n'a été proposée jusqu'à maintenant.

Dans un second temps, nous présenterons notre travail expérimental dont l'objectif est de proposer des méthodes standardisées pour les différentes étapes inhérentes à la conservation d'embryons pour cette espèce. Une série d'expériences a pu être menée pendant 3 ans sur plus d'une centaine d'animaux maintenus en conditions d'élevage agricole grâce à la mise à disposition de locaux et d'infrastructures de laboratoire par l'Université Agraire de La Molina (Lima, Pérou). Des essais ont également pu être menés au sein de l'animalerie de l'Institut Pasteur (Paris, France) dont l'intérêt pour la conservation de ses lignées de cochons d'Inde expérimentaux a donné lieu à cette collaboration.

Les résultats obtenus seront présentés suivant la chronologie de leur réalisation :

- l'expérience qui a permis de définir une méthode standard de synchronisation des chaleurs d'un lot de femelles maintenues en conditions d'élevage,
- les résultats de production d'embryons obtenus avec différents traitements de superovulation réalisés sur des femelles synchronisées

- nos essais sur les techniques de cryoconservation (congélation lente et vitrification) des embryons de cochons d'Inde.
- une méthode de transfert des embryons (frais et décongelés) dans des femelles receveuses synchronisées.

Pour conclure, nous essaierons de mettre en évidence les perspectives qui se présentent en matière de cryoconservation de la diversité génétique chez le cochon d'Inde et pour les espèces domestiques andines en général à partir du bilan de notre travail et de nos collaborations.

1ÈRE PARTIE : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DE *CAVIA PORCELLUS*

D'un point de vue zootechnique la notion de race désigne au sein d'une espèce, depuis la reconnaissance officielle des standards, un groupe d'individus morphologiquement homogène, aux caractéristiques héréditairement transmissibles, adaptés aux conditions du milieu tant humain que naturel. Il est alors possible de décrire précisément une race par des caractéristiques fixées qui permettent de l'identifier sans équivoque. En Europe, la plupart des races d'animaux domestiques étaient déjà fixées et leurs caractères morphologiques gravés dans les livres généalogiques au début du 20^{ème} siècle (Bougler, 1981). Ce type de classification n'existe pas pour les animaux domestiqués dans les Andes, notamment pour le cochon d'Inde. Toutefois plusieurs classifications basées sur des caractères phénotypiques cohabitent et rendent compte de la diversité génétique de cette espèce dans les Andes. Les types de cochons d'Inde ainsi définis peuvent être associés à des performances zootechniques, bien qu'il n'existe pas de caractéristiques objectives fixées hormis pour les animaux sélectionnés depuis les années 1970. Les cochons d'Inde de laboratoire sont pour leur part classés en fonction de leur consanguinité et des usages qui leur sont donnés. Enfin, une classification phénotypique utilisée par les collectionneurs de cochons d'Inde d'ornement illustre cette autre diversité.

I.1. CLASSIFICATION DES COCHONS D'INDE DE CHAIR DANS LES ANDES

La diversité des cochons d'Inde de chair des Andes a donné lieu à plusieurs systèmes de classification complémentaires permettant aux producteurs ainsi qu'aux différents acteurs du secteur (ministères de l'agriculture, centres de recherche et de sélection agricole, universités, ONG) de désigner l'ensemble des animaux élevés sur ces territoires. Pour l'étude des types disponibles, les cochons d'Inde sont classés en fonction de leur conformation corporelle, de la forme et de la longueur de leurs poils et suivant les tonalités de leur pelage (Chauca de Zaldívar, 1997). D'autre part, les efforts de sélection menés depuis les années 1970 par les instituts de recherche agraire ont donné lieu à la définition de lignées sélectionnées.

- **Selon la conformation**

En ce qui concerne la conformation du corps, les cochons d'Inde de chair se classent suivant deux types bien différenciés et désignés par des lettres.

- Type A

Il s'agit de cochons d'Inde possédant une tête large, un museau court, des oreilles tombantes et un corps rectangulaire. C'est le type de cochon d'Inde qui présente les meilleures caractéristiques en tant que producteur de viande. Parmi les cochons d'Inde, ce type présente le meilleur développement musculaire ainsi qu'une bonne assise osseuse. Leur tempérament est plutôt tranquille et ils présentent de bons taux de conversion alimentaire. Ils sont également connus comme les « cochons d'Inde améliorés » (*cuyes mejorados*)(Figure 1).



Figure 1 : Cochon d'Inde de Type A

- Type B

Il s'agit de cochons d'Inde à la tête fine, au corps allongé et anguleux, présentant un moindre développement musculaire et une grande variabilité au niveau de la taille des oreilles. Leur tempérament assez nerveux rend leur conduite difficile. Ils sont également connus comme les « cochons d'Inde créoles » (*cuyes criollos*) (Figure 2).



Figure 2 : Cochon d'Inde de Type B

- **Selon le type de pelage**

Il existe quatre textures de pelages différenciées chez les cochons d'Inde de chair et désignés par des chiffres.

- Type I

Il regroupe les animaux au poil court et lisse qui suit la ligne du corps. Le pelage peut présenter un épi sur le haut de la tête. C'est le type le plus amplement répandu au Pérou parmi les producteurs de viande (Figure 3).



Figure 3 : Cochon d'Inde de Type I

- Type II

Ce sont des animaux au poil court, lisse et formant des épis à la manière de rosettes distribuées sur l'intégralité du corps. Ils sont moins précoces que le Type I et présentent généralement une conformation de Type B. Ce type de pelage se perd facilement lorsqu'il est croisé avec d'autres types. Il présente de bonnes aptitudes pour la production de viande (Figure 4).



Figure 4 : Cochon d'Inde de Type II

- Type III

Les cochons d'Inde appartenant à ce type ont des poils très longs (10 cm ou plus). Il existe deux sous-types qui correspondent aux Type I et II : le sous-type III-I qui présente un pelage lisse et long, et le sous-type III-II qui possèdent des poils longs, lisses et des épis en forme de rosette. Ils sont peu répandus dans les élevages en raison d'une production assez faible de viande mais font toutefois l'objet d'intérêt pour leur beauté (Figure 5).



Figure 5 : Cochon d'Inde d Type III

- Type IV

Ce type de cochons d'Inde possède un pelage bouclé, surtout observable à la naissance, qui devient hérissé à l'âge adulte. La forme de la tête et du corps est ronde et la taille moyenne. Ils possèdent de la graisse infiltrée dans les muscles qui rend la saveur de leur viande particulière (Figure 6).



Figure 6 : Cochon d'Inde de Type IV

- **Selon la couleur du pelage**

La couleur du pelage des cochons d'Inde ainsi que les combinaisons de celle-ci offre un autre critère pratique pour leur classification et une infinité de noms vernaculaires existe dans les Andes en fonction de la répartition des couleurs sur le corps. Deux groupes principaux peuvent être identifiés.

- **Cochons d'Inde de couleurs claires**

Ce groupe comprend les animaux dont les tonalités de pelage vont du blanc au châtain clair (blanc, beige clair, beige foncé, châtain clair). La couleur de leur pelage est fortement liée à la couleur de la peau qui est généralement claire.

- **Cochons d'Inde sombres**

Ce groupe comprend les animaux dont les tonalités de pelage vont du châtain foncé au noir (châtain foncé, roux, marron, gris, noir). Sous les poils de couleur grise et noire, la peau est pigmentée, diminuant ainsi leur attrait auprès des consommateurs qui préfèrent des animaux à la peau claire. Les cochons d'Inde noirs sont utilisés dans la médecine traditionnelle (Figure 7).



Figure 7 : Cochon d'Inde noir utilisé dans le médecine traditionnelle

- **Lignées sélectionnées**

L'effort de sélection mené en particulier par l'INIA (*Instituto Nacional de Investigacion Agraria*) du Pérou depuis les années 1970 a permis l'élaboration de lignées de cochons d'Inde présentant des caractéristiques fixées. Elles sont actuellement élevées au sein des stations

expérimentales de l'INIA et sont commercialisées dans le but d'améliorer la génétique des élevages tant commerciaux que familiaux (Chauca et al., 2005).

- Lignée Peru

Cette lignée possède un pelage châtain et blanc et a été sélectionnée sur la précocité. Elle atteint ainsi son poids de commercialisation (800 g) en neuf semaines. Sa prolificité moyenne est de 2,8 jeunes par portée (Figure 8).



Figure 8 : Cochon d'Inde de la lignée Peru

- Lignée Andina

Cette lignée, de couleur entièrement blanche, a été sélectionnée sur la prolificité. Les portées sont composées en moyennes de 3,5 jeunes (Figure 9).



Figure 9 : Cochon d'Inde de la lignée Andina

- Lignée Inti

Cette lignée, de couleur beige et front blanc, a été sélectionnée sur la précocité et sur sa capacité d'adaptation à des étages écologiques élevés (Figure 10).



Figure 10 : Cochon d'Inde de la lignée Inti

I.2. CLASSIFICATION DES COCHONS D'INDE DE LABORATOIRE

Les lignées de cochons d'Inde utilisées dans les laboratoires de recherche ont été développées pour répondre à des besoins spécifiques ou sont apparues spontanément suite à une mutation. Dans les années 1920, Dunkin et Hartley ont développé la lignée non-consanguine albinos qui deviendra l'un des piliers de la recherche biomédicale jusque dans les années 1960 (Wagner et Manning, 1976). La lignée Dunkin-Hartley à poil court est encore la plus fréquemment utilisée de nos jours dans les laboratoires de recherche et de toxicologie (Figure 11). Plusieurs de ses sous-lignées et quelques souches consanguines qui possèdent des caractéristiques spéciales sont disponibles sur le marché.



Figure 11 : Cochon d'Inde de la lignée Dunkin-Hartley

Les lignées consanguines les plus répandues sont les lignées 2 et 13 et sont utilisées pour des recherches sur des maladies infectieuses ou des allergies. Plusieurs lignées consanguines ont été créées au Japon à la fin des années 1970 en se basant sur la couleur du pelage (Chiba et Egashira, 1978). Seules les lignées JY-1 et JY-2 sont encore disponibles aujourd'hui et sont utilisées dans le cadre de recherche sur la superovulation et la culture d'embryons (Suzuki et al., 2003; Suzuki et al., 1993) (Figure 12). La lignée consanguine Weiser-Maples a été développée aux États-Unis en 1977 par la *Buckshire Corporation* avant d'être introduite au Japon où elle est utilisée pour les recherches sur la tuberculose et les mélanomes cutanés (Maeda et Naganuma, 1998).

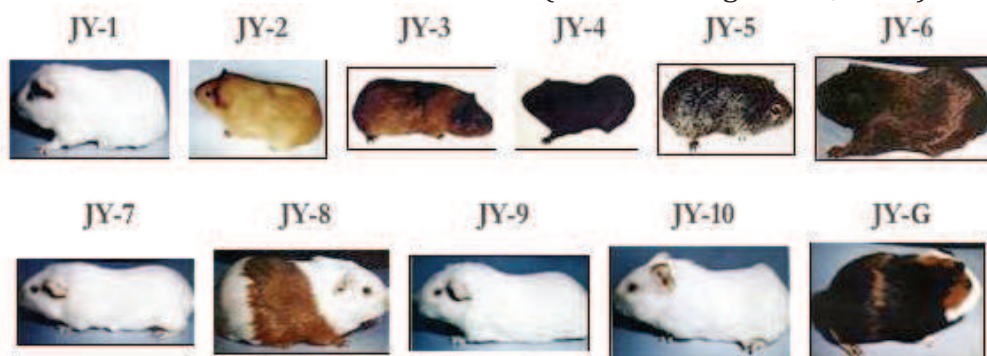


Figure 12 : Lignées de cochons d'Inde consanguins développées au Japon dans les années 1970

Parmi les lignées apparues suite à des mutations, la lignée C4D (*Complement-4-Deficient*) a été découverte au *National Institute of Health* des États-Unis en 1977. Immunodéprimée, elle est utilisée pour étudier les virus auxquels elle est la plus sensible, notamment la syphilis (Zhao et al., 1992). Les cochons d'Inde Wz (*waltzing* = « valsant ») sont apparus en 1953 dans une colonie du *National Institute of Health* des États-Unis suite à une mutation qui provoque une atrophie de l'organe de Corti rapidement après la naissance. Ils deviennent sourds et se déplacent en faisant des cercles. Une variante allemande de cochons d'Inde Wz est apparue suite à une mutation dans un élevage de Bayreuth en 1996 puis a été transférée au *Karolinska Institute* de Solna, en Suède. Les cochons d'Inde Wz sont de bons modèles pour étudier les dysfonctionnements vestibulaires de l'oreille humaine (Kawaguchi et al., 2010). Un cochon d'Inde nu immunodéprimé a été découvert suite à une mutation dans une colonie fermée de cochons d'Inde Dunkin-Hartley de la *Eastman Kodak Company* de New-York en 1979. Un autre cochon d'Inde nu immunodéprimé et albinos a été identifié en 1978 à l'Institut Armand Frappier de Montréal. Connue comme la lignée IAF, elle est commercialisée par les laboratoires Charles River depuis 1982 en particulier pour réaliser des recherches en dermatologie (CRL, 2009; Kawaguchi et al., 2010) (Figure 13).



Figure 13 : Cochon d'Inde IAF

En plus de toutes ces lignées de cochons d'Inde expérimentaux disponibles commercialement, il existe une multitude de lignées développées par des équipes de recherche ou des institutions qui les conservent sous forme de colonies à effectifs parfois réduits. Ces colonies peuvent être amenées à disparaître en raison de leur taille et/ou du manque d'intérêt qu'elles représentent à un moment donné. C'est le cas notamment de la lignée BioAD de l'Institut Pasteur, qui n'existe plus en-dehors de leurs laboratoires (Annexe 4).

I.3. CLASSIFICATION DES COCHONS D'INDE ORNEMENTAUX

Vers 1950, le cochon d'Inde sort des laboratoires et devient un animal de compagnie apprécié pour sa docilité et sa facilité d'élevage. La sélection menée depuis par les amateurs de cochons d'Inde a donné lieu à une grande variété d'animaux qui font l'objet de concours de beauté, très en vogue en Allemagne et dans les pays anglo-saxons (Figure 14). En France, l'Association Nationale des Éleveurs de Cochons d'Inde (ANEC) définit les standards phénotypiques reconnus lors des concours et donnant lieu à une nomenclature officielle des variétés de cochons d'Inde ornementaux (Figure 15). Cette liste s'enrichit régulièrement de nouveaux standards au gré des homologations. Des grilles de notation basées sur des critères morphologiques précis permettent d'homologuer les cochons d'Inde : oreilles tombantes, nez arrondi, cou de bison, couleur de la peau, couleur des ongles, qualité du marquage, etc.

<u>Poils courts</u>	1 - Unicolores à Poils Lisses (Blanc aux yeux noirs, Blanc aux yeux roses, Blanc aux yeux bleus, Blanc aux yeux foncés, Noir, Ardoise, Lilas, Havane, Beige, Rouge, Fauve, Crème, Doré aux yeux roses, Doré aux yeux noirs) 2- Agouti (Gris, Doré, Saumon, Argenté, Cannelle, Autres agoutis); Solids . 3- Feu Noir (Ardoise, Lilas, Havane, Beige); Noir (Ardoise, Lilas, Havane, Beige) et Blanc ; Noir (Ardoise, Lilas, Havane, Beige) et Crème . 4- Dessins : Himalayen (Noir, Havane); Hollandais (toutes couleurs reconnues); Ecaille de Tortue (Noir, Havane ou Lilas); Ecaille de Tortue (Noir, Havane ou Lilas), Arlequin ; Dalmatien (toutes couleurs reconnues), Rouan (Rouge, Bleu, Tricolore). 5- Couronnés anglais non satinés (toutes couleurs reconnues); Couronnés américain non satinés (toutes couleurs reconnues)
<u>Poils durs ou dressés</u>	6 - Abyssiniens (toutes couleurs admises, même non reconnues) 7- Rex - Teddy américain (toutes couleurs admises, même non reconnues) 8- Teddy Suisse (toutes couleurs admises, même non reconnues)
<u>Poils longs</u>	9- Shelties et shelties couronnés (toutes couleurs admises, même non reconnues) 10- Péruviens (toutes couleurs admises, même non reconnues) 11- Texels et Texels couronnés (toutes couleurs admises, même non reconnues); Alpagas (toutes couleurs admises, même non reconnues) 12- Lunkarya (toutes couleurs admises, même non reconnues)
<u>Poils satinés</u>	13 - Satins (toutes couleurs reconnues) 14- Satins couronnés (toutes couleurs reconnues) 15- Shelties et Péruviens satins (toutes couleurs admises, même non reconnues)

Figure 14 : Nomenclature officielle des standards de cochons d'inde ornementaux de l'ANEC



Figure 15 : Cochon d'inde à poils longs Shelty

II. ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION DE LA FEMELLE *CAVIA PORCELLUS*

Le cochon d'Inde domestique (*Cavia porcellus*) fait partie du sous-ordre des rongeurs Hystricomorphes, caractérisés notamment par la présence d'une membrane épithéliale qui recouvre l'orifice vaginal excepté au moment de l'œstrus et de la parturition, ainsi que par une période de gestation relativement longue avec un état de développement précoce des jeunes à la naissance (Annexe 2). Contrairement à la souris et à la rate, la femelle cochon d'Inde présente un cycle œstral long et complet, constitué d'une phase folliculaire et d'une phase lutéale et qui se manifeste par un contrôle endocrinien différent. L'étude des particularités anatomiques et physiologiques de son système reproducteur constitue un prérequis nécessaire à l'élaboration des protocoles permettant la production et la congélation d'embryons.

II. 1. ANATOMIE DE L'APPAREIL REPRODUCTEUR

L'appareil reproducteur de la femelle cochon d'Inde se compose de deux ovaires, deux oviductes, un utérus bifide, un cervix en Y et un vagin. L'étude de leur position et de leurs spécificités est primordiale pour envisager la réalisation des étapes de collecte puis de transfert des embryons (Figures 16 et Figure 17).

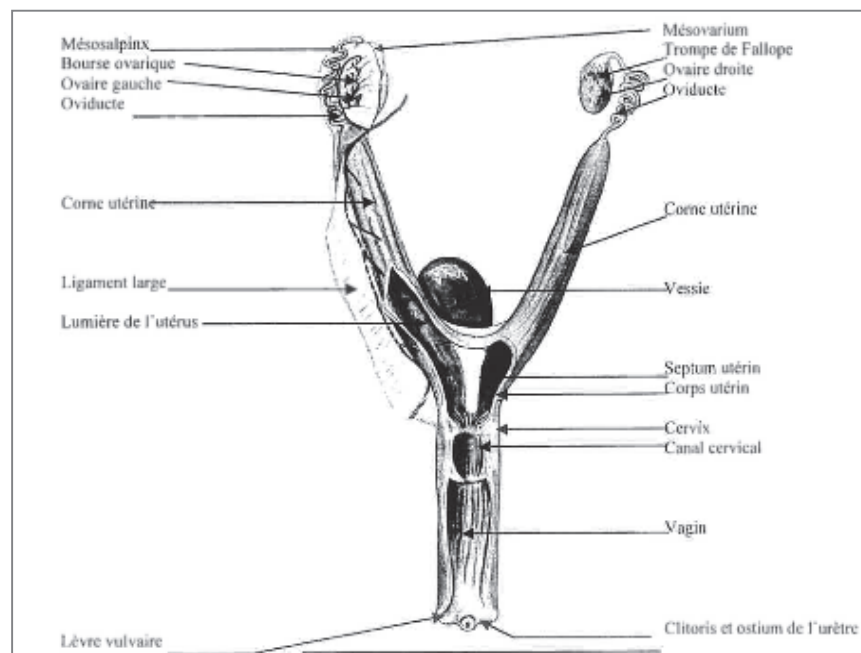


Figure 16 : Vue dorsale de l'appareil reproducteur femelle de *Cavia porcellus*, d'après (Popesko et al., 1992)

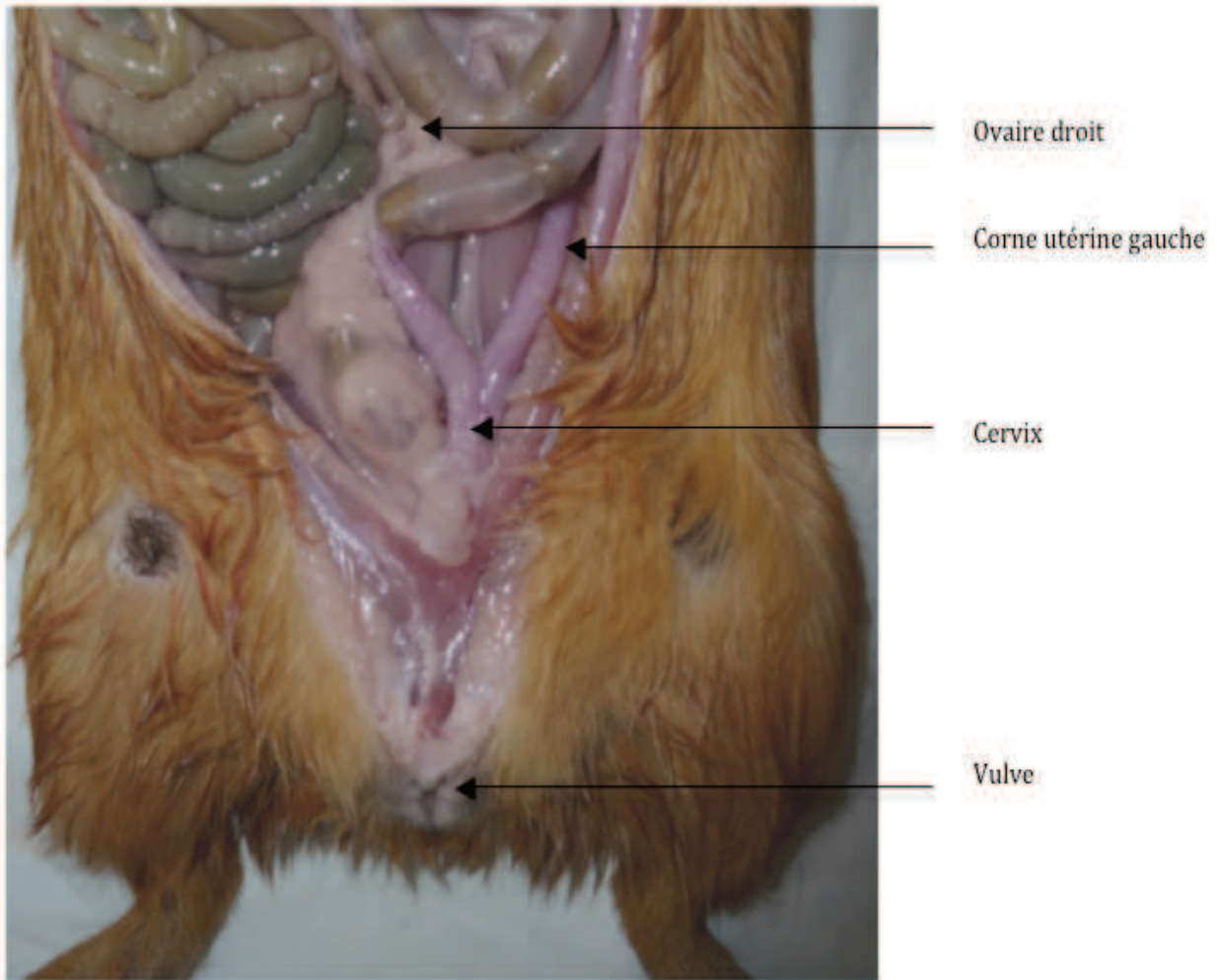


Figure 17 : Disposition d'ensemble de l'appareil génital femelle de *Cavia porcellus*

- **Les ovaires**

Ils sont localisés dans la cavité abdominale caudale et sont en position latérale par rapport aux reins. Ils sont reliés à ces derniers par un mésovarium court. Chaque ovaire est de forme ovoïde et mesure 6 à 8 millimètres de long pour 4 à 5 millimètres de diamètre.

- **Les oviductes**

Ils sont en contact étroit avec la surface dorso-latérale de l'ovaire, à l'intérieur de la paroi de la bourse ovarique. Ils relient les cornes utérines à l'ovaire en passant obliquement au travers de la paroi utérine. L'oviducte peut être divisé en quatre portions, représentées dans la Figure 18.

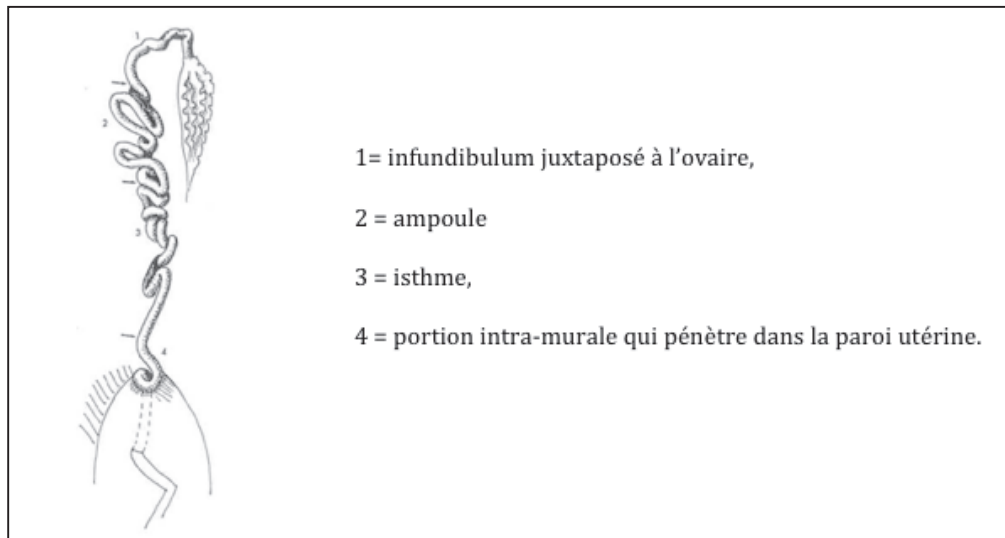


Figure 18 : Anatomie de l'oviducte de *Cavia porcellus* d'après (Nilsson et Reinius, 1969)

- **L'utérus**

Il présente deux cornes utérines suspendues par de gros ligaments à la paroi dorso-latérale de l'abdomen. Le corps utérin mesure environ 12 millimètres de long et à peu près 10 millimètres de diamètre. Son diamètre diminue dans le sens cranio-caudal. Le corps utérin possède un fort développement du ligament intercornual. Les cornes utérines sont reliées au cervix (Figure 19).

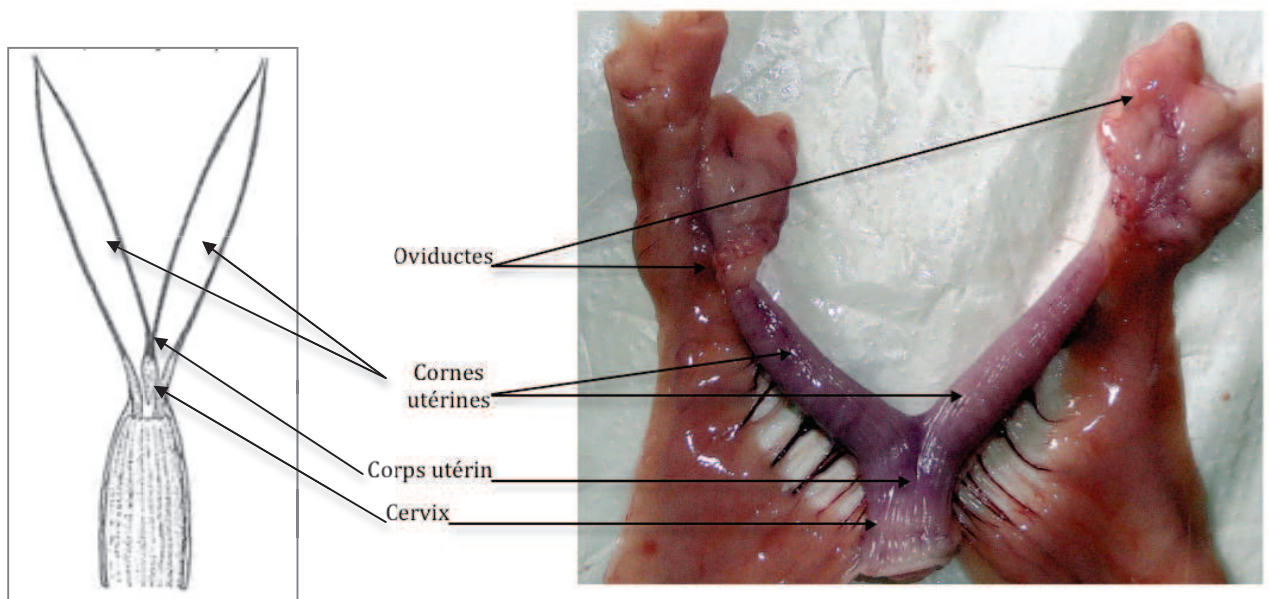


Figure 19 : Cornes utérines complètement séparées de *Cavia porcellus* d'après (Hafez, 1970)

- **Le cervix**

En forme de Y, il possède deux orifices côté utérus et débouche par un seul orifice dans le vagin (Figure 20). Il est constitué d'une série de petits épaissements de muqueuse qui s'étendent caudo-médialement dans les parois latérales pour converger, ventralement, en son centre. Sa longueur est approximativement de 25 millimètres. Au niveau de l'extrémité crâniale, le diamètre initial est d'environ 14 millimètres puis ce dernier diminue progressivement pour atteindre au niveau de sa partie caudale une valeur avoisinant les 5 millimètres.

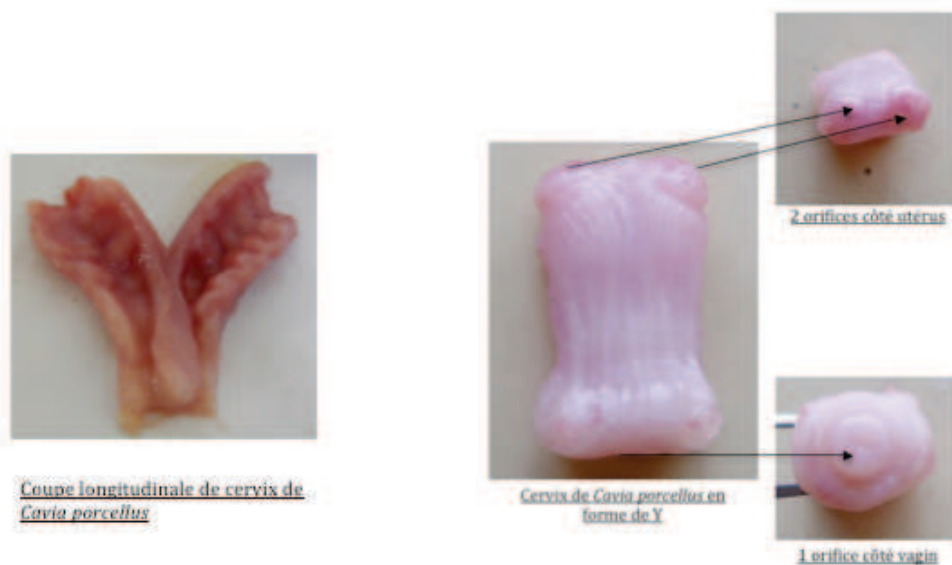


Figure 20 : Cervix de *Cavia porcellus*

- **Le vagin**

Il a un diamètre extérieur inférieur à celui du cervix et possède une paroi mince. Il rejoint la partie caudale du plancher pelvien et s'incurve ventralement vers la zone de l'arc ischiatique où il s'ouvre à l'extérieur par l'orifice vaginal. Une membrane épithéliale obture le vagin en-dehors des périodes d'œstrus et de parturition (Figure 21).

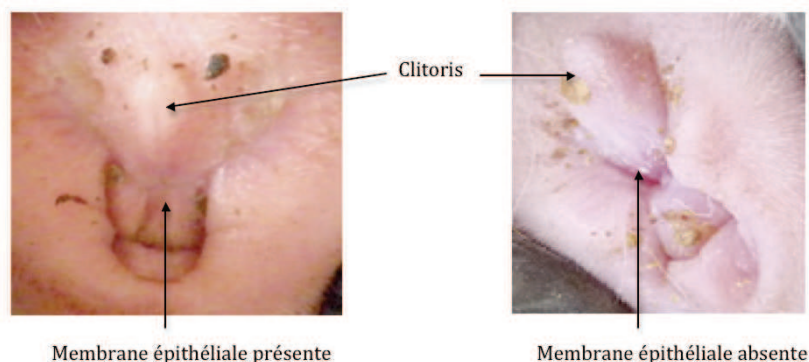


Figure 21 : Membrane épithéliale vaginale de *Cavia porcellus*

II.2. PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Le cochon d'Inde a été utilisé dans de très nombreux travaux comme modèle animal pour comprendre l'activité des hormones chez les mammifères et a été soumis à toutes sortes d'expériences, en particulier dans les années 1960. Une synthèse de l'ensemble des connaissances de la physiologie de la reproduction de *Cavia porcellus*, en particulier celles pertinentes par rapport à l'objectif de production d'embryons, est indispensable à l'élaboration de protocoles destinés à synchroniser les chaleurs des femelles puis à induire une superovulation. Le choix des animaux, des hormones, du stade de leur cycle œstral au moment d'appliquer les traitements ou de collecter les embryons sont autant de critères qui découleront de cette synthèse.

- **De l'ovogenèse à la puberté**

- Mise en place de la réserve folliculaire chez *Cavia porcellus*

Au cours du développement embryonnaire, les cellules germinales primordiales colonisent les crêtes génitales, ébauches de gonades femelles d'origine mésodermique qui deviendront les ovaires, où elles prennent le nom d'ovogonies (Mauléon, 1967). Une fois la gonade formée, les ovogonies subissent une phase de multiplication mitotique intense et s'entourent de couches de cellules somatiques pour former les follicules primordiaux. Ioannou (1964) a évalué le nombre de cellules germinales dans l'ovaire de *Cavia porcellus* à partir des stades embryonnaires jusqu'à la maturité sexuelle. Le nombre de cellules germinales par ovaire augmente d'environ 27 000 à 30 jours *p.c.* jusqu'au maximum de presque 105 000 à 41 jours *p.c.* Par la suite, le stock initial de cellules germinales subit une lourde déplétion pour atteindre le nombre de 13 000 à 12 mois *p.p.* Cette diminution est due au processus continu d'atrésie qui affecte les cellules germinales dès les stades du développement les plus précoces. Le processus d'ovogenèse prend fin vers le 50^{ème} jour *p.c.* On observe un grand nombre d'ovocytes au stade leptotène à 35 jours *p.c.*, au zygotène à environ 40 jours *p.c.*, et au pachytène à 50 jours *p.c.* Quelques jours après la naissance, tous les ovocytes se trouvent au stade diplotène. Cette phase de la méiose est bloquée jusqu'à la puberté. La période de division goniale et l'entrée en méiose se déroulent avant la parturition chez *Cavia porcellus*, phénomène comparable à la femme (Figure 22).

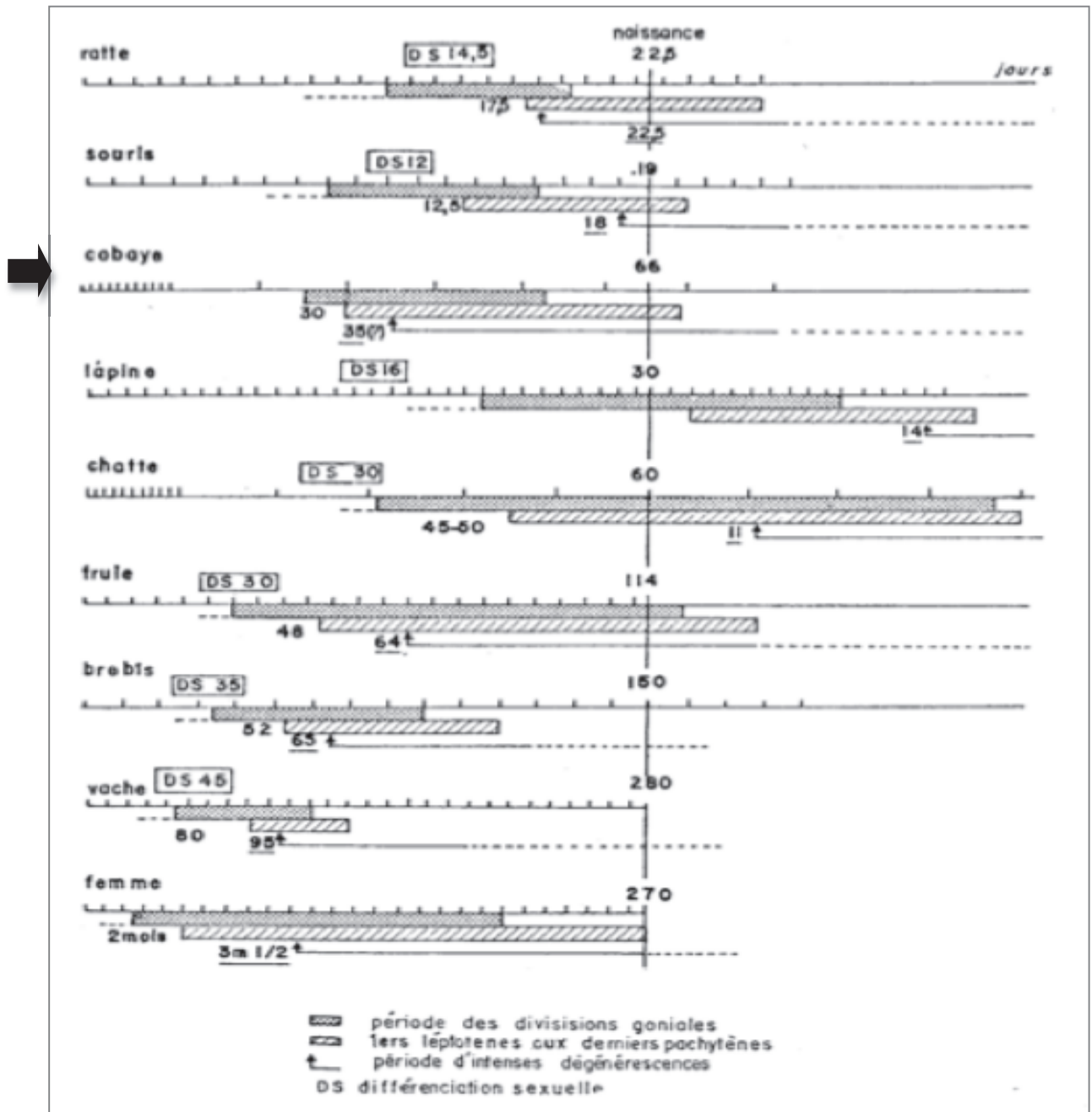


Figure 22 : Comparaison du déroulement de l'ovogenèse chez les mammifères d'après (Mauléon, 1967)

- La puberté

Chez la femelle *Cavia porcellus*, les premières chaleurs ne se manifestent pas avant l'âge de 30 jours. L'équipe de Young (Young W.C. et al., 1939) a observé 2102 cycles de 617 femelles pendant 2 ans et a enregistré un âge moyen d'apparition des premières chaleurs de 68 jours (écart = 33 à 134 jours). Le mode d'ouverture et de fermeture de la membrane vaginale, quant à lui, est établi vers le 5^{ème} œstrus. L'équipe de Mills (Mills et Reed, 1971) a rapporté que le poids à la puberté est un paramètre plus constant que l'âge, celui-ci se situant autour de 500-600g. Selon

Zaldívar (1986) il est recommandé de mettre les femelles à la reproduction une fois qu'elles ont atteint un poids de 542g, et pas avant l'âge de deux mois. La première gestation doit avoir lieu avant l'âge de six mois, afin d'éviter une calcification de la symphyse pubienne. Cette inextensibilité du cadre osseux entravera alors le passage des fœtus au travers de la voie pelvienne (Mårtensson, 1984).

- **Cycle œstral : activité ovarienne et contrôle hormonal**

- Durée du cycle

Les femelles *Cavia porcellus* ont un cycle polyœstrien de type continu, les œstrus se suivent régulièrement durant toute l'année et l'ovulation est spontanée. La durée des différentes phases du cycle a été établie : proœstrus de 1 à 1,5 jours (hormis lors des premières chaleurs : proœstrus de 3 à 8 jours) ; œstrus de 9 à 11 heures ; métœstrus de 2,5 à 5 jours et une durée total de cycle œstral de 15 à 16,5 jours (Ishii, 1920). La rupture de la membrane vaginale est généralement observée un jour avant l'œstrus et pendant 3 à 4 jours (Mårtensson, 1984). Le cycle œstral de *Cavia porcellus* est ainsi constitué d'une phase folliculaire courte culminant en une ovulation spontanée suivie d'une longue phase lutéale avec la présence d'un corps jaune (CJ) actif durant 12-13 jours (Greenwald et Rothchild, 1968; Hilliard, 1973) (Figure 23). Comme chez les primates, l'accouplement stérile n'entraîne pas de pseudogestation.

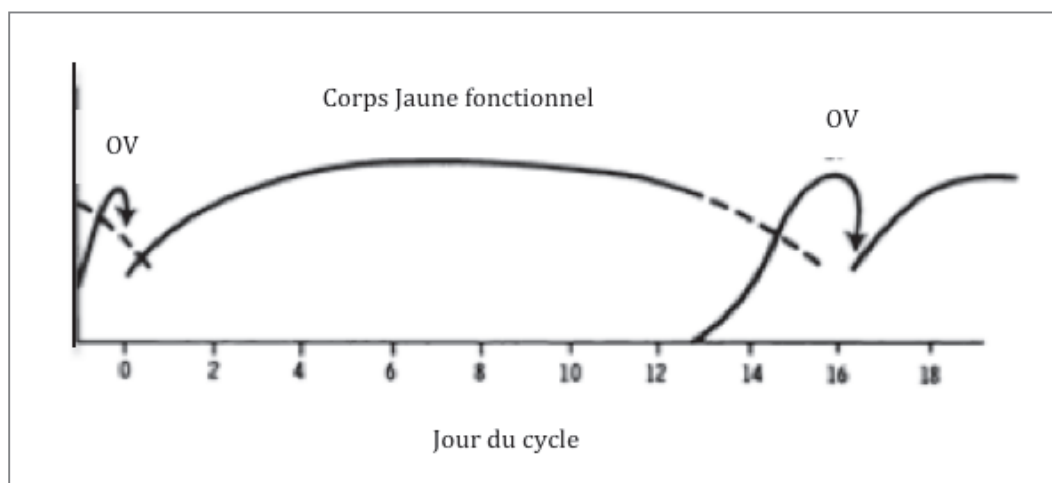


Figure 23 : Représentation du cycle œstral de *Cavia porcellus* : Corps Jaune fonctionnel 12-13 jours, d'après (Hilliard, 1973)

- Croissance folliculaire biphasique

Les follicules se développent par vagues chez *Cavia porcellus*. Le cycle œstral commence le jour après l'ovulation (J0) et se compose de deux vagues de croissance folliculaire (Bland, 1980; Hutz et al., 1990).

Les follicules de la première cohorte atteignent leur diamètre maximal (500-750 μ m) à J10-11 du cycle puis deviennent atrétiques suite à la suppression de LH liée au feedback négatif exercé par la progestérone. En effet, après l'ovulation, les 2-3 CJ actifs sécrètent d'importantes quantités de progestérone, empêchant ainsi la première cohorte de follicules de poursuivre son développement (Garris et Foreman, 1984).

Par la suite, la disparition des CJ permet le développement de la seconde cohorte jusqu'à l'ovulation. Cette vague dure environ 6-7 jours pendant lesquels on observe un recrutement des petits follicules à J12 et une sélection des plus gros follicules vers J13. La sélection folliculaire résulte d'une baisse des concentrations de progestérone qui décline rapidement après J12 (Croix et Franchimont, 1975) et d'une augmentation des niveaux de LH entre J13 et J15 (Wisel et al., 1991). Trois à cinq follicules ovulatoires sont sélectionnés et l'ovulation a lieu à la fin de la deuxième vague vers J17.

- Ovulation

Les relations endocrines impliquées dans la maturation folliculaire, l'ovulation, et la lutéinisation ont été étudiées par l'équipe de Reed (Reed et Hounslow, 1971). Ils ont conclu que dans un cycle normal chez *Cavia porcellus*, environ 13 jours après l'ovulation, quand le niveau de progestérone dans les CJ diminue et que les follicules atteignent la maturité, il y a une augmentation de la sécrétion de FSH. Cette augmentation stimule l'activité des cellules de la thèque interne, encourageant la synthèse d'œstrogènes par les follicules en développement. Cette production d'œstrogènes, associée au taux de base de LH, faciliterait l'augmentation de taille des follicules et leur maturation finale. Ces follicules mûrs sont prêts à ovuler pendant approximativement 2 jours alors que le lobe antérieur de l'hypophyse accumule et relâche un taux croissant de LH suffisant pour que l'ovulation ait lieu. Trois à quatre jours doivent s'écouler entre la baisse de progestérone dans le plasma, conséquence de la régression des CJ, et la rupture folliculaire (Donovan et Lockhart, 1972).

Le nombre de follicules atteignant la maturité et ovulant est en moyenne de $3,34 \pm 0,41$ (moyenne \pm écart-type). Ceux-ci sont produits de façon égale par chacun des ovaires. Toutefois, lorsqu'un animal subit une ovariectomie d'un seul côté au premier jour du cycle, l'ovaire restant assume la production complète de follicules ($3,71 \pm 0,37$). L'ovariectomie unilatérale n'affecte pas la longueur du cycle (Hermreck et Greenwald, 1964).

- Corps Jaunes (CJ) actifs et facteur lutéolytique

Le nombre de CJ varie d'un cycle à l'autre chez *Cavia porcellus*. Dix-neuf paires d'ovaires examinées au cours de 2 cycles présentaient une moyenne de 3,5 CJ, et seulement neuf des dix-neuf avaient le même nombre de CJ lors des deux cycles (Reed et Hounslow, 1971). Un nombre inférieur de CJ est présent sur les ovaires des jeunes *Cavia porcellus* comparés aux adultes. Ford et Young (1953) ont compté une moyenne de $2,17 \pm 0,15$ CJ chez de jeunes animaux, un nombre significativement inférieur à la moyenne de $3,50 \pm 0,18$ CJ comptés chez les adultes. Ils ont aussi constaté que le volume des CJ des jeunes *Cavia porcellus* [$156 (\pm 56) \times 10^6 \mu\text{m}^3$] était significativement inférieur à celui des *Cavia porcellus* adultes [$444 (\pm 45) \times 10^6 \mu\text{m}^3$] 48 heures après l'ouverture de la membrane vaginale. La différence de volume des CJ n'était plus significative à partir de 96 heures après la rupture de la membrane vaginale : les CJ des jeunes avaient un volume de $702 (\pm 102) \times 10^6 \mu\text{m}^3$ et ceux des adultes $887 (\pm 75) \times 10^6 \mu\text{m}^3$. Lors d'un cycle œstral normal, le CJ atteint un volume de 2 mm^3 ($2000 \times 10^6 \mu\text{m}^3$) vers le 9^{ème} à 10^{ème} jour suivant l'ovulation puis il commence à régresser (Labhsetwar et Diamond, 1970).

Les taux de progestérone dans le plasma augmentent rapidement après l'ovulation, atteignant un maximum de $2,8 \pm 0,33 \text{ ng/mL}$ au 5^{ème} jour (Challis et al., 1971). Lorsque les CJ commencent à régresser, les taux de progestérone dans le plasma diminuent jusqu'à moins de $0,5 \text{ ng/mL}$ au 12^{ème} jour. Ils ont calculé que la production maximum de progestérone était de $0,26 \text{ mg/jour}$. Les CJ de *Cavia porcellus* se développent par hypertrophie et hyperplasie des cellules lutéales entre les jours 3 et 10 du cycle et commencent à régresser entre les jours 10 et 12. La régression est graduelle et achevée au jour 16 du cycle.

La plupart des travaux menés pour découvrir le facteur lutéolytique chez *Cavia porcellus* ont été menés dans les années 1970. L'équipe de Blatchley (Blatchley et Donovan, 1969) a démontré qu'une prostaglandine $F_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$) exogène, issue d'une femelle donneuse, était lutéolytique chez *Cavia porcellus* hystérectomisée. Poyser (1972) a par la suite identifié que l'utérus de *Cavia porcellus* est probablement la source principale de ce facteur lutéolytique. Lors de travaux menés par Horton et Poyser (1973), les femelles *Cavia porcellus* traitées avec de l'indométacine, un anti-inflammatoire qui bloque la synthèse des $\text{PGF}_{2\alpha}$, ont présenté des cycles plus longs, confirmant ainsi l'effet lutéolytique des $\text{PGF}_{2\alpha}$.

- **Fécondation et développement foetal**

L'équipe de Hunter (Hunter et al., 1969) a décrit la progression et les stades de développement précoce des embryons de *Cavia porcellus*. Les ovocytes transitent jusqu'à l'ampoule, à la moitié de l'oviducte, en 3-4 heures puis y séjournent une trentaine d'heures. Le moment exact de la fécondation n'a pas été déterminé avec précision chez *Cavia porcellus*. Blandau (1949) a estimé qu'elle a lieu entre 1 et 2 heures *p.c.*. Pendant les heures suivantes, les embryons progressent dans l'oviducte et entrent dans l'utérus 72 heures environ après l'ovulation au stade de développement de 8 à 12 cellules. L'implantation a lieu entre 6 et 7,5 jours *p.c.* (Deanesly, 1960). Dans des conditions de monte naturelle avec des mâles de fertilité éprouvée, la mortalité embryonnaire est basse avant l'implantation avec seulement un embryon dégénéré sur 53 collectés au 6^{ème} jour après l'ovulation (Hunter et al., 1969). Toutefois, cette mortalité embryonnaire augmente si le moment de la fécondation est retardé. Si l'ovocyte est fécondé plus de 20 heures après l'ovulation, son développement normal est compromis et impossible au-delà de 32 heures (Blandau et Young, 1939). D'après ces travaux, nous pouvons proposer une chronologie du développement embryonnaire chez *Cavia porcellus* (Figure 24).

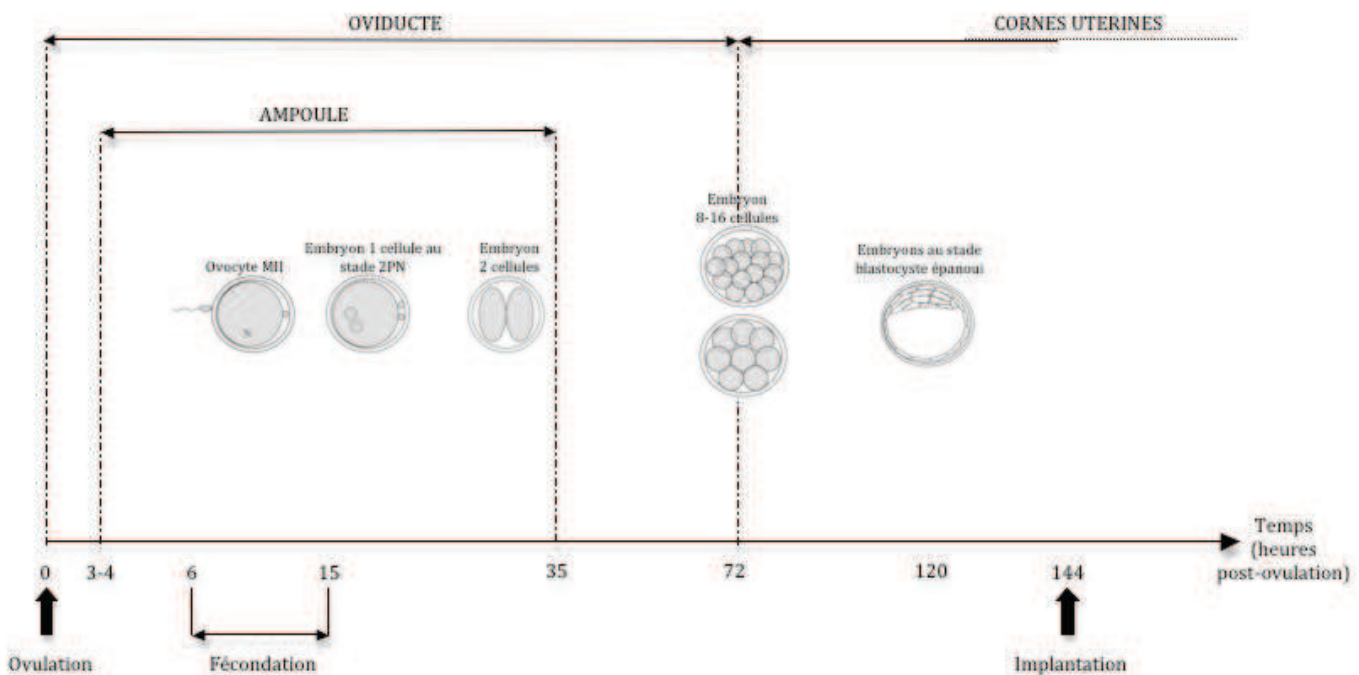


Figure 24 : Chronologie du développement embryonnaire chez *Cavia porcellus*

L'implantation chez *Cavia porcellus* est interstitielle, le blastocyste pénètre l'épaisseur de l'endomètre et s'y développe, environ 6 jours après la fécondation. Les premiers stades de développement foetal, placentaire et de la vésicule vitelline de *Cavia porcellus* sont très complexes et impliquent des mécanismes propres aux rongeurs caviomorphes, tels que

l'involution de la vésicule vitelline et le développement d'un subplacenta (Kaufmann et Davidoff, 1977). L'architecture définitive du placenta de *Cavia porcellus* est réalisée dès le 29-30^{ème} jour de gestation. D'après la classification de Grosser (1927), *Cavia porcellus* a un placenta labyrinthique hémomonochorial, où le trophoblaste est directement baigné par le sang maternel et présente une seule assise trophoblastique.

Le maintien de la gestation de *Cavia porcellus* dépend de la production de progestérone par le placenta. Les taux de progestérone dans le plasma sont d'environ 4ng/mL pendant le diœstrus, à la moitié de la gestation ces taux deviennent 56 fois plus élevés (224ng/mL) puis baissent de moitié (112 ng/mL) à l'approche de la parturition (Batra et al., 1980). La gestation peut être menée à terme sans la présence d'ovaires chez *Cavia porcellus*, bien que les CJ restent fonctionnels tout au long de la gestation. La fonction de soutien du placenta commence dès le 15^{ème} jour de gestation et atteint sa maturité vers le 40^{ème} jour (Csapo et al., 1981).

Le passage du stade embryon au stade fœtus a lieu lorsque les principaux organes et tissu sont formés (Figure 25). La vie fœtale permet alors le développement et la maturation de ces organes. Evans et Sack (1973) décrivent un embryon tardif à 24 jours et un jeune fœtus à 29 jours de gestation chez *Cavia porcellus*.

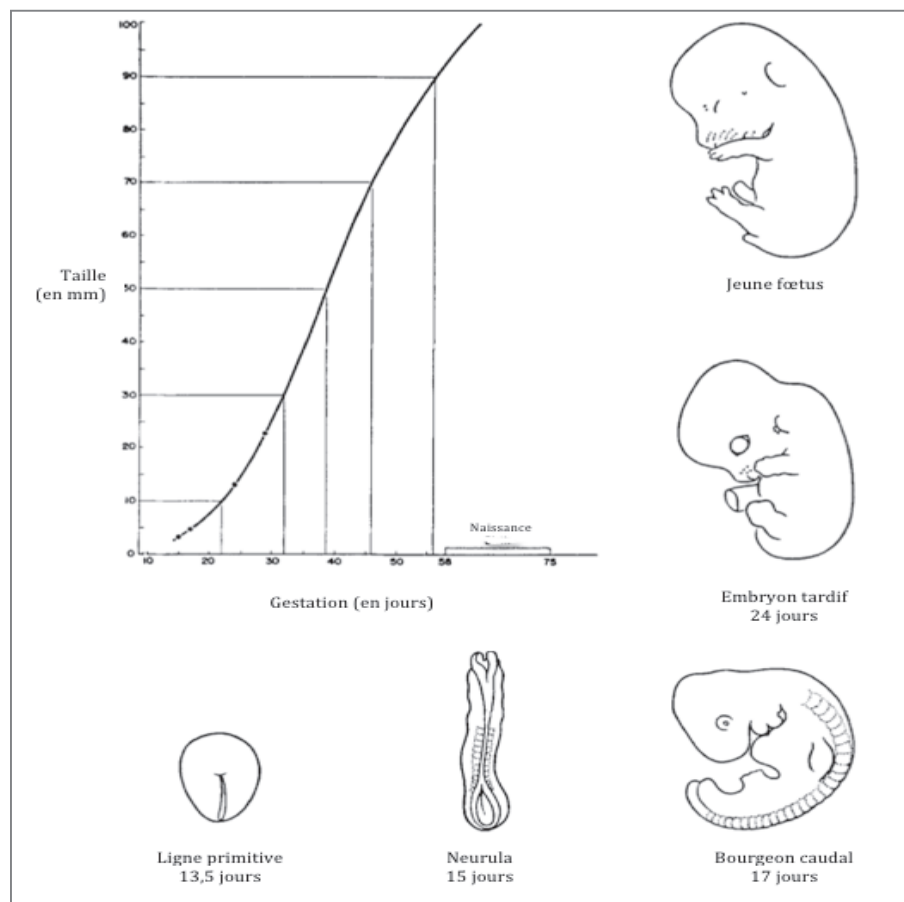


Figure 25 : Développement prénatal de *Cavia porcellus*, d'après (Evans et Sack, 1973)

- **Parturition et allaitement jusqu'au sevrage**

La gestation dure 59 à 72 jours et sa durée est généralement inversement proportionnelle à la taille de la portée (Goy et al., 1957; Rowlands, 1949). Cette dernière peut être constituée de 2 à 5 jeunes pesant 70 à 100g à la naissance. La taille de portée dépend du nombre de follicules qui ont ovulés, du pourcentage d'implantation et du pourcentage d'avortement, tous ces facteurs étant influencés par les facteurs génétiques de la mère, du fœtus et les conditions environnementales. Le stimulus qui déclenche la parturition chez *Cavia porcellus* n'est pas connu. Aucun changement endocrine particulier n'a été identifié à l'approche de la parturition pour cette espèce et l'inhibition du myomètre n'est pas liée aux taux de progestérone (Porter, 1972).

Des chaleurs *postpartum* avec ovulation sont la règle chez *Cavia porcellus*. Elles apparaissent dans les 10 heures suivant la parturition, généralement dès 3 heures, et l'ovulation se produit 12 à 15 heures après la parturition (Labhstewar et Diamond, 1970). La durée des chaleurs *postpartum* est courte, 3,5 heures contre 8,6 heures enregistrées pour les femelles non post-parturientes. De plus, les chaleurs *postpartum* se sont produites chez 68% des femelles parturientes sur 74 femelles observées (Boling et al., 1939).

À la naissance, les jeunes de *Cavia porcellus*, comme ceux de tous les rongeurs hystricomorphes en général, sont nidifuges. Relativement matures, ils possèdent des poils, les dents sont sorties et ils ont les yeux ouverts. Le pic de lactation de la mère a lieu entre le 5^{ème} et le 8^{ème} jour *p.p.*. Bien que les jeunes commencent à manger rapidement de la nourriture solide et à boire de l'eau, la mortalité atteint 50% s'ils ne consomment pas de lait maternel les 3-4 premiers jours de leur vie. La miction volontaire n'apparaît pas avant le 7-14^{ème} jour *p.p.*. Les jeunes sont sevrés à l'âge de 3-4 semaines (Wolfensohn et Lloyd, 2003).

III. MAÎTRISE DE LA REPRODUCTION CHEZ CAVIA

PORCELLUS

III. 1. OBSERVATION DU CYCLE ŒSTRAL

Un aspect essentiel dans l'élaboration des protocoles de synchronisation des chaleurs et de superovulation est de savoir détecter avec la plus grande précision le moment de l'apparition des chaleurs, de pouvoir confirmer l'ovulation des femelles ainsi que de s'assurer de la monte par les mâles pour obtenir des embryons.

- **Comportement pendant le proœstrus et pendant l'œstrus**

Il se caractérise par une augmentation de l'activité de la femelle qui va pourchasser ses congénères dans la cage. Elle se met à osciller de l'arrière-train et émet un son guttural. Les femelles sont plus actives que les mâles et peuvent adopter un comportement de monte dès 53 heures avant l'œstrus. Une activité de monte dynamique ne s'observe toutefois que lors des 10 heures précédant immédiatement l'œstrus (Young et al., 1935). Le début de l'œstrus et sa durée se détectent facilement chez *Cavia porcellus* grâce à des signes extérieurs, le plus fiable étant le reflexe copulatoire ou lordose (la femelle arque et redresse son arrière-train, élevant ainsi sa croupe). L'intensité du comportement lié à l'œstrus est toujours plus importante au début de l'œstrus et diminue progressivement jusqu'à la fin des chaleurs. Une tendance à la synchronisation des cycles des femelles *Cavia porcellus* a été observé au sein d'une même cage (Donovan et Kopriva, 1965). Mais ces observations ont été aussi contredites (Harned et Casida, 1972). Une étude menée par l'équipe de Young (Young et al., 1938) a montré que le nombre de structures ovulées était lié à l'agressivité du comportement œstral. Les animaux très actifs pendant l'œstrus produisaient une moyenne de 3,48 ovocytes tandis qu'une période d'œstrus assez tranquille donnait lieu à seulement 2,63 ovocytes.

- **Observation de la membrane vaginale**

Excepté durant l'œstrus et la parturition, le vagin de la femelle *Cavia porcellus* est hermétiquement fermé par une membrane épithéliale. Son ouverture précède l'œstrus, mais à un rythme trop variable pour établir avec exactitude le début de celui-ci (Harned et Casida, 1972). La membrane vaginale est ouverte pendant $2,3 \pm 0,1$ jours chez la femelle adulte. Lors des premiers cycles, cependant, la durée de l'ouverture est prolongée : premier cycle $11,2 \pm 1,0$ jours ; deuxième cycle 5 jours. Aucune ovulation ne se produit chez les animaux avant

le premier jour où le vagin montre des signes d'ouverture de la membrane vaginale (Mills et Reed, 1971). Ces résultats ont été confirmés et l'ovulation a généralement lieu après que le vagin soit ouvert plus d'un jour (Reed et Hounslow, 1971). En autopsiant des animaux à divers stade des chaleurs, ils ont trouvé que 50% des animaux avaient ovulé le matin après que le vagin ait été totalement ouvert pendant 1 jour. L'ovulation a toujours eu lieu (12 animaux sur 12) chez les animaux tués alors que la membrane vaginale commençait à se refermer. Par contre, l'ovulation était retardée chez les jeunes femelles : 50% avaient ovulé 48 heures après l'ouverture de la membrane vaginale contre 78% chez des femelles adultes (Ford et Young, 1953).

- **Détermination du moment de l'ovulation**

Le frottis vaginal est un indicateur plus fiable que l'ouverture de la membrane vaginale pour déterminer le moment de l'ovulation (Harned et Casida, 1972). Les travaux de Stockard et Papanicolaou (1917), qui utilisaient *Cavia porcellus* pour établir les changements de composition des fluides vaginaux lors des différentes étapes du cycle œstral des rongeurs, ont décrit 4 étapes durant les 24 heures d'activité sexuelle en se basant sur les changements microscopiques observés dans le frottis vaginal. Toutefois ces quatre étapes ont été considérées comme artefactuelles (Young, 1937). Les frottis prélevés après l'ouverture de la membrane vaginale contiennent des cellules épithéliales, des cellules cornées et des leucocytes lors du proœstrus (Donovan et Lockhart, 1972). Lorsque l'œstrus approche, le nombre de leucocytes diminue et de nombreuses cellules cornées rondes sont observables dans les sécrétions. L'ovulation coïncide avec le retour des leucocytes dans le frottis vaginal (Stockard et Papanicolaou, 1917). L'afflux de leucocytes dans le frottis vaginal autour du moment de l'ovulation a été confirmé (Donovan et Lockhart, 1972).

La durée de l'œstrus a été estimée à 24 heures en se basant sur différentes caractéristiques des fluides vaginaux (Stockard et Papanicolaou, 1917). Toutefois leur détermination ne tenait pas compte de la réceptivité au mâle, indicateur utilisé par l'équipe de Young (Young et al., 1935) en étudiant 592 cycles et qui a établi une durée de $8,21 \pm 0,07$ heures (écart = 1-18 heures) en se basant sur la réceptivité au mâle. Après l'accouplement, un bouchon vaginal se forme, constitué par les sécrétions des glandes séminales du mâle, et reste en place quelques heures avant de tomber dans la litière. L'ovulation se produit approximativement 10 heures après le début des chaleurs et normalement 1,5 à 2 heures avant la fin des chaleurs (Blandau et Young, 1939).

III.2. PRODUCTION D'EMBRYONS CHEZ *CAVIA PORCELLUS*

En dépit du grand nombre de travaux réalisés sur des cochons d'Inde pour comprendre leur physiologie, et de l'intérêt que représente l'obtention de leurs embryons pour les travaux de recherche biomédicale, force est de constater dans la littérature qu'il existe très peu de résultats concernant la synchronisation des chaleurs, la superovulation, la congélation et la culture d'embryons *in vitro* pour évaluer leur viabilité.

- **Méthodes d'induction de l'ovulation**

Des tentatives d'utilisation des PGF_{2α} pour induire l'ovulation chez *Cavia porcellus* ont été menées dans les années 1970. Blatchley et Donovan (1976) ont indiqué que la réponse du CJ à un traitement avec des PGF_{2α} issues d'une femelle donneuse change au cours du cycle œstral. Lorsque l'hormone est administrée pendant les 4 à 8 premiers jours du cycle, une diminution temporaire de la libération de progestérone est observée mais la durée de vie du CJ n'est pas raccourcie ; tandis que lorsque les PGF_{2α} sont administrées du 8^{ème} au 14^{ème} jour du cycle, la diminution de progestérone est définitive pour le cycle considéré (dans cette étude le jour 1 correspond au jour où un maximum de cellules kératinisées sont observées dans les frottis vaginaux). Tso et Tam (1977) ont montré que, chez les cochons d'Inde hystérectomisés, le CJ répond à l'action lutéolytique des PGF_{2α} uniquement après le jour 9 du cycle œstral (dans cette étude le jour 0 correspond à l'observation de l'ouverture totale de la membrane vaginale).

Un traitement pour synchroniser les chaleurs des cochons d'Inde dans des conditions de laboratoire existe. Il s'agit d'un implant sous-cutané en silicone imprégné de progestatif (Silastic tubing®, Dow Corning Corporation, Michigan, USA) placé pendant 4 semaines (Ueda et al., 1998). L'ovulation est induite dans les 5 jours qui suivent le retrait de l'implant. En raison de l'importance de sa taille (1cm de long et 0,4cm de diamètre interne), l'implant doit être placé et retiré sous anesthésie générale.

- **Techniques de superovulation**

Cavia porcellus est, par rapport à la souris et à la ratte, peu prolifique et ne produit que quelques ovocytes à chaque cycle. L'équipe de Suzuki (Suzuki et al., 1993) a compté le nombre de CJ de femelles cyclées naturellement et a trouvé qu'elles produisaient $3,6 \pm 0,1$ ovocytes. L'établissement d'un protocole de superovulation est particulièrement important dans le cadre des opérations de cryoconservation des ressources génétiques des espèces peu prolifiques et/ou menacées d'extinction. L'augmentation du nombre d'embryons obtenus par femelle permet

alors de garantir une descendance à chaque animal échantillonné pour sauvegarder une lignée (Donovan et Lockhart, 1974).

Les injections d'hormone chorionique gonadotrope équine (eCG ou PMSG) ou humaine (hCG), communément utilisées pour induire la superovulation chez la souris, ne sont pas efficaces chez *Cavia porcellus* naturellement cyclé (Reed et Hounslow, 1971). Seules quelques méthodes ont été proposées pour cette espèce. Kosaka et Takahashi (1989) ont montré que, chez *Cavia porcellus* traité avec un implant de progestagène pendant quatre semaines, une simple injection d'eCG huit heures avant le retrait de l'implant induisait une superovulation : ils ont obtenu $7,3 \pm 2,6$ ovocytes par animal (n=5), avec un écart de 5 à 11 ovocytes par femelle. Des injections d'eCG 24 heures avant, 8 heures après et 24 heures après le retrait de l'implant n'ont pas provoqué d'ovulation plus importante. Bien que ces résultats soient intéressants, la grande précision requise du moment de l'injection d'eCG par rapport au moment de l'ovulation complique l'utilisation de cette hormone. De plus, l'eCG possède une demi-vie biologique relativement longue (environ 6 jours chez les juments et 5 à 15 jours chez les vaches (Drion et al., 2001)) et une activité mixte FSH et LH qui peut perturber la fécondation et le transit des embryons. Ces travaux portent sur des effectifs très faibles (5 individus).

Les travaux de Shi ((Shi et al., 2000a; Shi et al., 2000b) ont par ailleurs démontré qu'une vaccination anti-inhibine augmentait le taux d'ovulation de façon proportionnelle à la dose appliquée. Mais cette méthode reste toutefois coûteuse et trop aléatoire pour envisager son usage en routine.

Plus récemment, les études de Suzuki (Suzuki et al., 2003) ont montré que la séquence d'acides aminés des récepteurs à FSH de *Cavia porcellus* est plus proche de celle des primates que de celle des autres rongeurs. Suite à un traitement avec de la gonadotrophine ménopausique humaine (hMG), administrée pendant trois jours consécutifs et juste avant l'ovulation, ils ont obtenu $5,4 \pm 1,56$ embryons par femelle (n=10), avec un écart de 0 à 17 embryons.

- **Milieu de culture *in vitro* des embryons**

La seule référence disponible concernant les milieux de culture d'embryons de *Cavia porcellus* concerne un travail qui s'est intéressé aux besoins nutritionnels de l'embryon en fonction de son stade de développement. L'équipe de Suzuki (Suzuki et al., 1993) a déterminé jusqu'à quel stade les embryons de *Cavia porcellus* pouvaient se développer normalement lorsqu'ils étaient cultivés *in vitro* avec des milieux sans sérum généralement utilisés pour les embryons de souris (milieu Whitten, WM) et les embryons de lapins (milieu Kane, KM). Dans les deux cas, des embryons âgés de 1 à 6 jours ont été cultivés *in vitro* dans une étuve à 37°C sous

atmosphère humide à 5% de CO₂. Les embryons d'une à deux cellules cultivés dans le WM se sont développés jusqu'aux stades 4 cellules et morulae respectivement, tandis que ceux cultivés dans le KM ont arrêté leur développement aux stades 2 cellules et 8 cellules respectivement. En revanche, les embryons de 4 cellules se sont développés jusqu'au stade blastocyste dans le KM, mais pas dans le WM. Les embryons de 8 cellules et les morulae sont devenus des blastocystes dans les deux milieux. L'éclosion des blastocystes et l'excroissance du trophoblaste n'ont été observées qu'avec le KM, même lorsque les embryons entraient en culture en étant déjà au stade blastocyste. Cette étude suggère qu'un changement dans les besoins nutritionnels de l'embryon de *Cavia porcellus* a lieu autour du moment de la deuxième division cellulaire et que l'excroissance du trophoblaste peut avoir lieu sans rajouter de sérum dans le milieu.

IV. CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS ET SOLUTIONS CRYOPROTECTRICES

Les premières cryoconservations d'embryons, dans les années 1970 chez la souris (Whittingham et al., 1972) et chez la vache (Wilmot et Rowson, 1973), utilisaient un refroidissement lent ($0,2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) en présence de diméthylsulfoxyde (DMSO) en tant que cryoprotecteur avant de stocker les embryons dans de l'azote liquide à -196°C . Dans les années 1980, une nouvelle technique de cryoconservation s'est développée : la vitrification, qui consiste à plonger très vite les embryons dans l'azote liquide (Rall et Fahy, 1985). De nos jours, plusieurs protocoles existent, allant de la congélation lente, à la vitrification traditionnelle ou ultra rapide, avec différents cryoprotecteurs organiques pénétrant dans les cellules ou non.

IV. 1. PRINCIPES DE LA CRYOCONSERVATION D'EMBRYONS

La cryoconservation d'embryons se réfère au rôle conservateur du froid qui doit permettre le ralentissement voire l'arrêt de tous les phénomènes biologiques ayant lieu au sein des embryons. La méthode consiste à un refroidissement des embryons à des températures inférieures à -150°C . En dessous de cette température, les modifications biologiques que subissent normalement les cellules sont abolies. La congélation des cellules embryonnaires a donc pour but d'arrêter leur métabolisme de façon réversible et de permettre ainsi leur conservation un temps indéfini, à l'état solide, tout en maintenant la viabilité des embryons après décongélation (Mazur, 2004).

À de telles températures, l'eau, constituant majeur des embryons, est sous forme solide et sa transformation en cristaux de glace est considérée comme la première cause de mortalité cellulaire (Vajta et Kuwayama, 2006). Le défi de la cryoconservation des embryons est d'établir l'ensemble des moyens qui permettront d'atteindre ces basses températures sans altérer les capacités fonctionnelles des embryons après la décongélation. Pour cela, il est nécessaire de connaître le comportement de l'eau lors des étapes de congélation et de décongélation et les méthodes utilisées pour minimiser les dommages engendrés par la formation des cristaux de glace afin de proposer une méthode de protection convenable (Mazur et al., 2008). La survie des embryons dépend ainsi essentiellement des conditions de changements de phase de l'eau et de l'action de cryoprotecteurs.

- **Effet solution, effet mécanique, vitesse de refroidissement et pic de survie**

Lorsque les embryons sont congelés, ils se trouvent en solution dans un milieu tamponné de type *Phosphate Buffered Saline* (PBS) qui a pour but de s'approcher des conditions *in vivo* et de s'adapter aux variations de pH observées au cours de la congélation, associées aux changements osmotiques. La grande quantité d'eau de la solution contient une importante variété de solutés répartis de part et d'autre des membranes cellulaires. Lors du refroidissement, les premiers cristaux de glace se forment dans le milieu extracellulaire (Figure 26). Parce que ces cristaux se composent uniquement d'eau pure, la concentration moléculaire augmente dans ce compartiment et provoque la fuite hors des embryons d'une partie de l'eau intracellulaire afin de rétablir l'équilibre osmotique (Leibo et Pool, 2011). Il s'agit de l'« effet solution » qui a pour conséquence une déshydratation des embryons, une augmentation de la concentration des solutés intracellulaires ainsi qu'une dénaturation progressive des protéines pouvant mener jusqu'à la mort cellulaire par effet de saumure si le refroidissement est trop lent. Il en résulte également une importante diminution du volume des cellules dont la contraction peut endommager les membranes cellulaires. Ainsi, les tensions mécaniques peuvent entraîner des ruptures irréversibles des membranes cellulaires (Karlsson et Toner, 1996).

À l'inverse, si le refroidissement est trop rapide, les cellules n'ont pas assez de temps pour se déshydrater suffisamment par effet osmotique et des cristaux de glace se forment de façon importante à l'intérieur des cellules. Ces cristaux de glace tranchants vont augmenter de taille lors de la congélation puis de nouveau lors de la décongélation (recristallisation) et endommager les structures cellulaires en provoquant des lésions des membranes et des organites, ainsi qu'une dénaturation du cytosquelette, il s'agit de l'« effet mécanique ». Ce type de glace est létal pour la majorité des cellules. Toutefois, les cristaux intracellulaires n'entraînent pas toujours des lésions car dans le cas de refroidissement très rapides, seuls des petits cristaux se forment et leur croissance est évitée. Si l'on continue à augmenter la vitesse de refroidissement, jusqu'aux vitesses les plus grandes techniquement possibles, le taux de survie augmente de nouveau. Tout est alors vitrifié : il n'y a pas du tout de cristallisation ni dans la cellule, ni dans le milieu extracellulaire (Muldrew et al., 2004).

L'intégrité des cellules vivantes après décongélation est ainsi étroitement liée aux mouvements de l'eau cellulaire pendant le refroidissement et donc à la vitesse de congélation. Il est possible de déterminer, pour un type de cellule donné, la vitesse optimale de congélation pour laquelle le taux de survie sera maximum. Il s'agit du « pic classique de survie », un compromis entre les vitesses lentes de refroidissement qui provoquent la contraction des

cellules et les vitesses rapides qui entraînent la formation de glace intracellulaire. Toutefois, et quelle que soit la vitesse de refroidissement choisie, les embryons ne peuvent pas survivre à des températures inférieures à -20°C sans la présence de substances spécifiques, les cryoprotecteurs (Ogadescu, 2005).

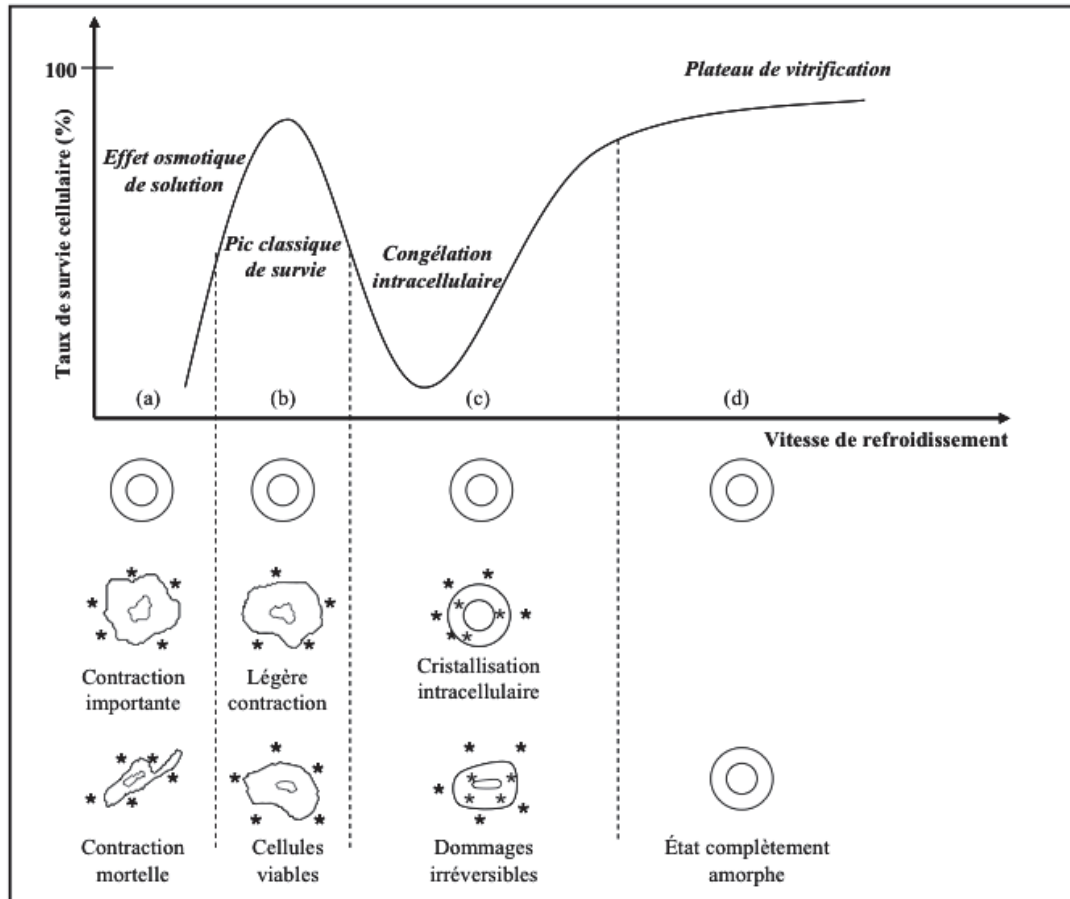


Figure 26 : Taux de survie cellulaire en fonction de la vitesse de refroidissement, d'après (Ogadescu, 2005)

- **Les cryoprotecteurs**

Les cryoprotecteurs sont des substances naturelles ou synthétiques qui ont pour but de protéger les cellules des effets néfastes des très basses températures en limitant au maximum la formation de glace qui a lieu au cours des protocoles de cryoconservation. La présence de groupements électronégatifs capables de former des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau permet de lier très fortement les cryoprotecteurs à celles-ci : leur mobilité diminue et la viscosité de la solution augmente, avec comme conséquence une diminution du taux de cristallisation. Grâce à leur grande affinité avec l'eau, les cryoprotecteurs interfèrent donc avec les processus de nucléation (naissance du premier cristal puis extension à l'ensemble du substrat) et de croissance des cristaux de glace. Au fur et à mesure que leur concentration

augmente, les cryoprotecteurs abaissent la température de congélation. Cette propriété est due au nombre de molécules qui interviennent. Elle est dite propriété colligative (Fuller, 2004).

On distingue deux catégories de cryoprotecteurs en fonction de leur capacité à traverser la membrane plasmique (Baudot et al., 1998; Ogadescu, 2005).

- Cryoprotecteurs intracellulaires dit pénétrants

Ce sont pour la plupart des dérivés d'alcools : glycérol, glycol, 1,2-propanediol (PROH), éthylène glycol (EG), méthanol, éthanol (Figure 27). D'autres composés possèdent la fonction sulfoxyde, comme le DMSO, ou encore amine mais ces derniers sont moins utilisés pour la congélation d'embryons. Ces molécules très hydrophiles possèdent de faibles poids moléculaires (moins de $400\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) et peuvent franchir la membrane plasmique. Les cryoprotecteurs pénétrants se substituent à une partie de l'eau intracellulaire et limitent ainsi la formation de cristaux de glace intracellulaire (Larese et Ehrsam, 1983). Ils réduisent aussi la vitesse de croissance de ces cristaux, abaissent leur température de solidification et modifient leur forme en les arrondissant, ce qui les rend moins traumatisants pour les membranes. Les cryoprotecteurs pénétrants limitent également les dégâts liés à l'effet solution. Une fois l'équilibre osmotique atteint, ils se lient à une partie de l'eau extracellulaire qui ne gèle donc pas quelle que soit la température. En conséquence, la concentration maximale en électrolytes extra et intracellulaires lors de la congélation est plus faible qu'en l'absence de cryoprotecteur. En se liant à une partie de l'eau libre intracellulaire et en abaissant la concentration extracellulaire, les cryoprotecteurs pénétrants limitent la contraction osmotique de la cellule. Ils agissent donc en régulateur de la déshydratation et permettent aux cellules de se maintenir au-dessus de leur volume critique (Pereira et Marques, 2008).

Cryoprotecteur	Nature moléculaire	Unité Moléculaire	Mécanisme d'action	Vitesse de pénétration	Toxicité
Ethylène Glycol	Dialcool organique	62,07	Très miscible avec l'eau, grande stabilité à l'état amorphe, vitesse critique élevée	Très rapide chez l'embryon	+ à +++ en fonction du tissu
1,2 Propanediol (PROH)		76,10	Très stable à l'état amorphe	Rapide	
Dimethyl sulfoxyde (DMSO)	Solvant des corps gras	78,13	Interaction avec l'eau d'hydratation de macromolécules cellulaires : déshydratation partielle, formation de microcristaux, abaissement du point de congélation.	Rapide (passif)	++
Glycérol	Trialcool	92,10	Fixation de l'eau et augmentation de la résistance membranaire	Rapide (moins que les trois précédents)	

Figure 27 : Propriétés physico-chimiques de certains cryoprotecteurs pénétrants, d'après (Claudel, 2007)

- Cryoprotecteurs extracellulaires dits non-pénétrants

En comparaison aux pénétrants, les cryoprotecteurs non-pénétrants sont des polymères ayant un poids moléculaire plus élevé (de l'ordre de plusieurs milliers de $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Larese et Ehrsam, 1983). Il ne peuvent pas traverser la membrane plasmique et ne s'opposent donc pas aux effets de solution. Ces cryoprotecteurs extracellulaires peuvent être divisés en deux catégories : les sucres de faible poids moléculaire (la plupart du temps des disaccharides tels que le saccharose ou le tréhalose) et les polymères de haut poids moléculaire (Ficoll, dextrans).

Lors des protocoles de congélation lente, ils favorisent la déshydratation des cellules avant la cristallisation en agissant sur l'osmolarité du milieu extracellulaire. Ils diminuent ainsi la quantité d'eau que la cellule doit perdre pour atteindre l'équilibre osmotique. Utilisés en association avec des cryoprotecteurs pénétrants, ils permettent ainsi d'augmenter artificiellement la concentration de ces derniers et donc de réduire la formation des cristaux intracellulaires lors du refroidissement. À l'inverse lors du réchauffement, ils empêchent une entrée massive de l'eau dans les cellules qui pourraient éclater. Leurs autres mécanismes d'actions ne sont pas encore bien compris. Toutefois, ils permettraient une meilleure protection des membranes, des protéines intracellulaires et de la zone pellucide par leurs interactions directes avec elles en se liant avec leurs groupements hydrophiles par des liaisons hydrogènes ce qui aiderait à maintenir leurs structures lors de la dessiccation. Ainsi le tréhalose et la proline inhibent le risque de fusion des membranes lipidiques lors du refroidissement. De même, le tréhalose est capable de stabiliser certaines enzymes à basse température (Kuleshova et al., 1999; Kuleshova et al., 2001).

- Toxicité des cryoprotecteurs

L'apport des cryoprotecteurs n'est bénéfique que dans certaines conditions d'utilisation : à fortes concentrations, ils sont toxiques pour l'embryon (Fahy, 1984). La toxicité biochimique se produit du fait de l'interaction des cryoprotecteurs avec les constituants cellulaires en perturbant la perméabilité membranaire et les pompes ioniques. La toxicité osmotique s'exprime lors de l'ajout et du retrait des cryoprotecteurs. Si la concentration du milieu de congélation est trop élevée et la perméabilité membranaire du cryoprotecteur trop faible, la contraction osmotique lors du refroidissement peut alors être trop grande voire irréversible si elle est supérieure à 30-35% (Meryman, 2007).

Ainsi, le contrôle de la concentration et du temps d'exposition des cellules à l'action des cryoprotecteurs a une grande influence sur la réussite des protocoles de congélation d'embryons. Le développement des techniques de cryoconservation d'embryons depuis les

années 1970 a permis de définir, pour chaque espèce animale, différentes concentrations de cryoprotecteurs dans les milieux de congélation qui permettent de diminuer la formation de glace intracellulaire, en tenant compte de la perméabilité membranaire des cryoprotecteurs et de leur toxicité.

IV.2. LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE CRYOCONSERVATION

Il existe deux types de protocoles de cryoconservation : la congélation lente et la vitrification. Basés sur des principes différents (Figure 28), ces protocoles ont toutefois tous les deux le but d'éviter la formation de glace intracellulaire (Ménézo, 2004).

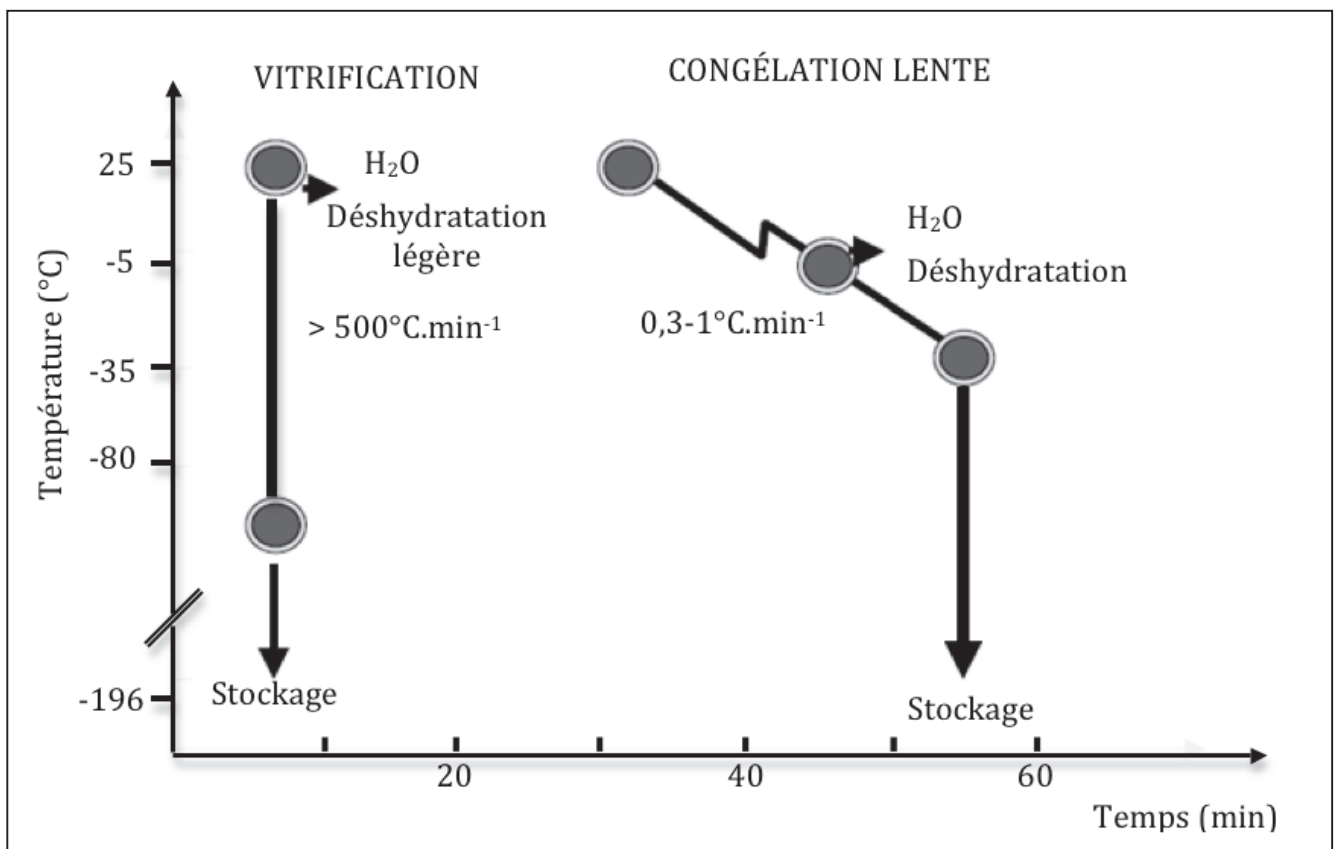


Figure 28 : Représentation schématique des protocoles de congélation lente et de vitrification d'après (Ménézo, 2004)

- **La congélation lente**

La congélation lente a pour principe l'équilibration progressive entre les cryoprotecteurs et le compartiment aqueux des embryons. Elle consiste à appliquer aux embryons une vitesse de refroidissement lente après induction de la cristallisation extracellulaire de manière à déshydrater progressivement les cellules sans déformation excessive ou effet osmotique important (Vajta et Kuwayama, 2006). Les cryoprotecteurs pénétrants utilisés sont le glycérol, l'EG, le DMSO ou encore le PROH. Les concentrations en cryoprotecteurs pour la congélation

lente sont assez faibles : 1 à 1,5 M pour les cryoprotecteurs pénétrants et de 0,1 M pour les cryoprotecteurs non pénétrants (Saragusty et Arav, 2011).

L'incorporation des cryoprotecteurs se fait en un ou plusieurs bains d'équilibration pendant plusieurs minutes, ce qui permet aux cryoprotecteurs pénétrants de traverser la membrane cytoplasmique. Les embryons sont ensuite montés dans des paillettes de 0,25mL, lesquelles sont placées dans un appareil de congélation programmable où elles sont refroidies jusqu'à une température comprise entre -5°C et -7°C . Les paillettes sont maintenues à cette température pendant environ 5 minutes.

Après équilibration, une induction de la cristallisation extracellulaire (« *seeding* ») est effectuée à l'aide d'un instrument (pince, écouvillon) refroidi dans l'azote liquide ou grâce à un système incorporé à l'appareil de congélation (Guignot, 2005). L'induction de la cristallisation par l'opérateur permet d'éviter qu'elle ne soit spontanée et ait donc lieu à des températures trop basses qui entraîneraient un état de surfusion trop important et engendreraient une cristallisation trop rapide, délétère pour les cellules (Woods et al., 2004).

La température descend ensuite lentement ($0,3$ à $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) pour permettre la déshydratation progressive des embryons (Leibo et Pool, 2011). Selon les protocoles, l'arrêt de la descente progressive de la température se fait entre -30 et -40°C . Les paillettes sont ensuite directement plongées dans l'azote liquide pour éviter une déshydratation trop importante, létale pour l'embryon (Saragusty et Arav, 2011).

Après le stockage, les paillettes sont rapidement décongelées dans un bain-marie à $25-30^{\circ}\text{C}$ (vitesse de réchauffement de l'ordre de $4000^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) afin d'empêcher le phénomène de recristallisation de l'eau intracellulaire lors du réchauffement (Hochi et al., 1996). Le contenu des paillettes est vidé et les cryoprotecteurs sont retirés en une seule étape ou par paliers successifs dans des bains de concentration décroissante en cryoprotecteurs, éventuellement couplés avec un gradient décroissant de saccharose. Les embryons peuvent alors être transférés dans une femelle receveuse (Guignot, 2005).

La congélation lente a été la première méthode de cryoconservation développée (Whittingham et al., 1972) et elle est la plus employée aujourd'hui pour congeler des embryons (Pereira et Marques, 2008). Elle est facile à mettre en œuvre et peut être réalisée par un opérateur peu expérimenté. Elle présente toutefois des inconvénients. La nécessité d'acheter un congélateur programmable, voire plusieurs si les lots d'embryons sont importants, la rend coûteuse (Guignot, 2005). D'autre part, cette technique ne convient pas à toutes les espèces (embryons porcins, de poissons ou d'insectes notamment) à cause de leur grande sensibilité à

des températures comprises entre +15 et -5°C (« *cold injuries* ») (Mazur et al., 2008). Afin d'éviter ces problèmes, une méthode alternative de cryoconservation utilisant des vitesses de refroidissement très importante a été développée : la vitrification (Vajta et Kuwayama, 2006).

- **La vitrification**

La vitrification consiste à refroidir très rapidement un liquide afin d'empêcher l'organisation de ses molécules en cristaux. Les solutions aqueuses se trouvent piégées dans un état solide sans cristal de glace appelé « état amorphe ». La viscosité de la solution augmente brutalement (jusqu'à 10^{13} poises) sur un court intervalle de température au moment du passage de l'état liquide à l'état solide amorphe. Au-dessous de cette température de transition vitreuse, les mouvements moléculaires sont bloqués et les molécules restent dans un état désordonné (Ogadescu, 2005).

L'état vitreux est difficile à obtenir techniquement pour l'eau pure car, pour atteindre sa température de transition vitreuse (-140°C) sans que des cristaux de glace ne se forment, il faut refroidir à des vitesses supérieures à $20\ 000^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ (Baudot, 1997). La vitrification de l'eau pure étant très difficile à réaliser techniquement, la survie cellulaire ne peut être assurée qu'en ajoutant des cryoprotecteurs au milieu de suspension. Leur rôle est d'augmenter la viscosité du milieu, ce qui permet d'augmenter la température de transition vitreuse et donc de limiter le risque de cristallisation (Ogadescu, 2005). Toutefois, les cryoprotecteurs pénétrants actuellement connus sont tous toxiques aux concentrations requises (6 à 7,5 M) pour éviter la formation de glace. L'association de plusieurs cryoprotecteurs pénétrants est donc souvent utilisée de manière à ajouter leurs actions tout en diminuant leur toxicité respective (Kuleshova et al., 2001).

Lors d'une procédure classique de vitrification, les embryons sont équilibrés dans des bains à concentration croissante en cryoprotecteurs pénétrants afin de limiter les chocs osmotiques liés à leurs fortes concentrations (par exemple 5 minutes dans des bains successifs contenant 10 puis 20% de cryoprotecteurs pénétrants). Ils sont ensuite exposés brièvement, environ 30 secondes, à une solution beaucoup plus concentrée contenant de 40 à 50% de cryoprotecteurs pénétrants qui engendre une déshydratation substantielle des cellules (Leibo et Pool, 2011).

Les embryons sont alors directement conditionnés dans des paillettes avec de part et d'autre des embryons des colonnes de solutions de dilution contenant des sucres (saccharose, tréhalose, galactose, etc.). Les paillettes sont immédiatement plongées dans l'azote liquide, atteignant une vitesse de refroidissement de l'ordre de $2\ 500^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ pour les paillettes de

0,25mL (Guignot, 2005).

Après le stockage, les paillettes sont rapidement plongées dans un bain-marie à 25-30°C comme pour la congélation lente. Le contenu des paillettes est vidé et les cryoprotecteurs retirés des embryons par diffusion passive dans des bains à concentration décroissante de sucres qui augmentent la pression osmotique du milieu extracellulaire. Les embryons rincés peuvent alors être transférés dans des femelles receveuses.

La vitrification a été développée pour la première fois sur des embryons de souris (Rall et Fahy, 1985) et a permis à des espèces ou à des embryons plus sensibles au froid (produits *in vitro*, issus de clonage ou biopsies par exemple) d'être tout de même conservés (Massip, 2001; Massip et al., 1995). Cette technique ne nécessite pas d'équipement coûteux et peut être utilisée lorsqu'un petit nombre d'embryons est produit. Contrairement à la congélation lente, la vitrification permet de congeler les embryons au fur et à mesure de la collecte, évitant ainsi qu'ils attendent avant d'être congelés. Cette praticité est contrebalancée par une difficulté accrue de réalisation, notamment le passage dans le dernier bain dont la concentration en cryoprotecteurs est très élevée et le temps d'exposition très faible. La dextérité de l'opérateur est un point critique pour le succès de cette méthode (Guignot, 2005).

IV.3. CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS DE *CAVIA PORCELLUS*

Concernant la cryoconservation d'embryons de *Cavia porcellus*, un seul travail est référencé dans la littérature (Dorsch et al., 2008). Deux cryoprotecteurs à une concentration de 1,5M, le PROH et le DMSO, ont été comparés avec une méthode de congélation lente, *seeding* à -6°C et diminution de 0,4°C par minute jusqu'à -32°C. La viabilité des embryons après décongélation a été déterminée par le test à la fluorescéine de diacétate (FDA) avec lequel les cellules vivantes deviennent fortement fluorescentes sous illumination par des rayons ultraviolets. Ils ont montré que la plupart des blastomères devenaient fluorescents lorsque le PROH était utilisé comme cryoprotecteur alors que la plupart des blastomères n'étaient pas viables lorsqu'ils avaient utilisé le DMSO. Cette étude montre que le PROH semble être un cryoprotecteur plus efficace que le DMSO pour les embryons de *Cavia porcellus*.

2ÈME PARTIE : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

Notre objectif est de développer un protocole standard de congélation d'embryons de *Cavia porcellus* qui s'inscrit dans la thématique plus large de conservation de la biodiversité génétique de cette espèce et de la création d'une cryobanque. Une telle finalité implique de proposer des méthodes, en particulier celles de production d'embryons, qui soient applicables aussi bien en laboratoire que sur le terrain pour conserver un nombre suffisant d'embryons sur une population préalablement échantillonnée.

Concrètement, il est nécessaire dans un premier temps de grouper les chaleurs des femelles afin de travailler avec des lots d'animaux, et pas avec des individus considérés au cas par cas. L'étape de synchronisation des chaleurs est incontournable pour organiser des chantiers de collecte-congélation d'embryons directement sur les élevages.

Compte tenu de la taille de cette espèce, la méthode retenue pour collecter les embryons passe par l'abattage de la femelle donneuse. Il convient donc de développer des protocoles de superovulation qui permettent d'augmenter le nombre d'embryons obtenus par femelle. Cela est particulièrement vrai dans le cadre d'opérations de cryoconservation des ressources génétiques d'espèces peu prolifiques, comme *Cavia porcellus*, ou lorsque la population que l'on souhaite conserver possède un faible effectif, comme la lignée consanguine BioAD utilisée par l'Institut Pasteur pour mener des recherches sur la tuberculose. Pour cette lignée, il n'existe plus à ce jour que dix couples au laboratoire et cette population n'est plus disponible commercialement (Annexe 4).

Sur les embryons de bonne qualité, deux cryoprotecteurs en congélation lente et une solution de vitrification ont été testés afin d'obtenir les meilleurs taux de développement embryonnaire après la décongélation.

Enfin, l'ensemble des protocoles précédemment élaborés n'a d'intérêt que si la technique du transfert embryonnaire est maîtrisée et permet l'obtention de descendants, porteurs de l'intégralité de l'information génétique qui a été conservée.

Cette thèse en physiologie implique l'utilisation d'animaux. Au Pérou, les cochons d'Inde sont considérés comme des animaux d'élevage qui rentrent dans l'alimentation carnée traditionnelle. Ainsi il n'a pas été nécessaire de faire de demande d'expérimentation animale car les animaux sacrifiés ont tous été valorisés (consommation, tannage des peaux). L'ensemble de ces expériences aurait été difficile et coûteux à mettre en œuvre en France du fait de la réglementation sur l'expérimentation animale.

I. OPTIMISATION DU PROTOCOLE DE SYNCHRONISATION DES CHALEURS DE *CAVIA PORCELLUS*

Dans la partie bibliographique uniquement deux études (Blatchley et Donovan, 1976; Tso et Tam, 1977) ont montré que les $\text{PGF}_{2\alpha}$ secrétées par l'utérus en fin de cycle sont probablement le facteur lutéolytique chez *Cavia porcellus*. Une autre étude (Ueda et al., 1998) a également rapporté que l'utilisation d'un implant de progestagène pendant 4 semaines induisait l'ovulation dans les 5 jours suivant le retrait de l'implant. Toutefois ce traitement est compliqué à mettre en place dans des conditions d'élevage et pose des problèmes de considération du bien-être animal en raison de la taille de l'implant (1cm de long et 0,4cm de diamètre interne) qui doit être placé et retiré sous anesthésie générale. L'élaboration d'un traitement de maîtrise du cycle œstral plus pratique et respectueux du bien-être de l'animal mérite d'être considérée.

La mise au point de traitements alternatifs basés sur l'utilisation de progestagène, pour tenter de bloquer l'ovulation, ou d'analogues de $\text{PGF}_{2\alpha}$, pour essayer de lyser le corps jaune, constituent donc des pistes intéressantes afin de maîtriser les cycles œstraux chez *Cavia porcellus*.

I.1. OBJECTIFS

L'objectif de cette expérience est de proposer une méthode simple de synchronisation de l'ovulation chez *Cavia porcellus*, tout en tenant compte du respect du bien-être animal. L'activité lutéolytique de trois analogues de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (D-cloprostenol, D,L-cloprostenol et luprostiol) et un traitement de progestagène administré par voie orale (altrenogest) adapté du traitement utilisé normalement chez les truies et les juments (Allen et al., 1980; Kaeoket, 2008) ont été testés. Les traitements ont été administrés à des cochons d'Inde se trouvant à différents stades du cycle œstral afin de tester la capacité des hormones à induire l'ovulation quel que soit le stade de l'animal et envisager ainsi la synchronisation d'un groupe de femelles donneuses et receveuses d'embryons.

I.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

- **Animaux**

Les vingt-quatre femelles *Cavia porcellus* utilisées dans cette expérience provenaient de l'élevage Maria-Marcela (Puente Piedra, Pérou). Les femelles, maintenues en conditions d'élevage agricole, ont été nourries avec de l'aliment commercial spécialement conçu pour les cochons d'Inde reproducteurs et enrichi en vitamine C (Annexe 3). Elles ont également reçu quotidiennement du fourrage frais et avaient à disposition de l'eau de boisson *ad libitum*. Il s'agissait de femelles multipares présentant des cycles normaux, âgées de 18 à 24 mois et pesant de 1 à 1,5kg.

- **Traitements hormonaux**

Dans cette expérience, quatre traitements de maîtrise des chaleurs du cochon d'Inde ont été successivement mis en œuvre sur les mêmes femelles. Trois traitements avec des analogues de PGF_{2α} (D-cloprostenol, D,L-cloprostenol et luprostiol) et un traitement avec un progestagène (altrenogest) ont été administrés.

Les quatre traitements sont (Figure 12) :

a) D-cloprostenol (Ciclar®, Zoovet, Argentine), application d'une injection intramusculaire de 0,1mL d'hormone diluée dans du sérum physiologique de façon à obtenir une concentration de 7,5 µg/kg ; 50 répétitions ont été réalisées.

b) D-L,cloprostenol (Estrumate®, MSD Santé Animale, France), administration par injection intra-musculaire de 0,1mL d'hormone diluée dans du sérum physiologique de façon à obtenir une concentration de 25 µg/kg ; 17 répétitions ont été réalisées.

c) luprostiol (Prosolvine®, Virbac, France), administration par injection intra-musculaire de 0,1mL d'hormone diluée dans du sérum physiologique de façon à obtenir une concentration de 0,75 mg/kg ; 23 répétitions ont été menées.

d) altrenogest (Regumate équine®, MSD Santé Animale, France) administration orale quotidienne de 0,1mL (0,22 mg/kg) pendant 15 jours (Figure 29), 29 répétitions ont été réalisées.

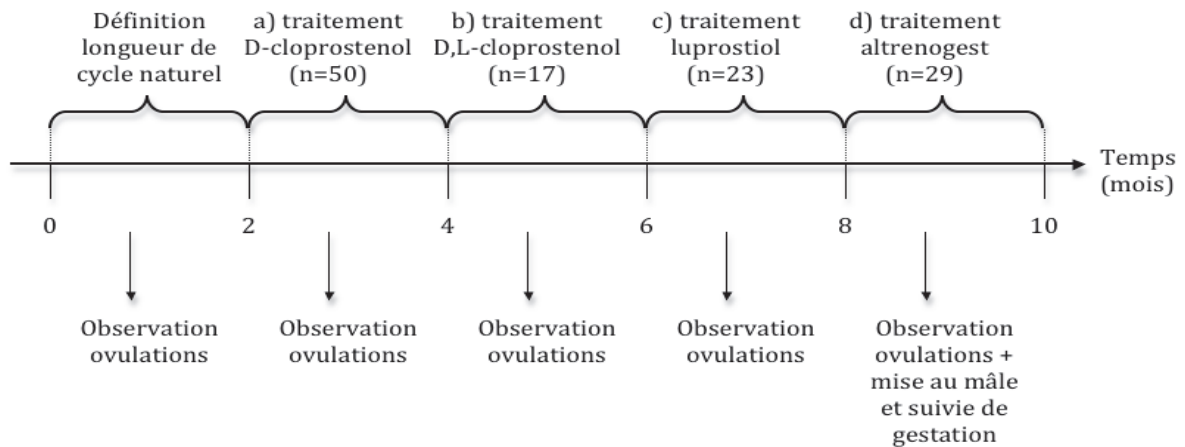


Figure 29 Dispositif expérimental des traitements de synchronisation des chaleurs

Chacun de ces traitements a été testé successivement et à différents stades du cycle œstral sur le même groupe de femelles pendant une période de 8 mois. Le stade de la femelle étant connu grâce au suivi des chaleurs et aux frottis vaginaux, les femelles ont été réparties de façon à ce que tous les moments du cycle soient représentés (phase folliculaire et phase lutéale) dans les expériences. Ainsi les femelles ayant reçu une injection de D-cloprostenol se situaient entre le Jour 1 et le Jour 18 de leur cycle œstral. Celles qui ont reçu une injection de D-L, cloprostenol se situaient entre le Jour 4 et le Jour 16, et celles qui ont reçu une injection de luprostirol se situaient entre le Jour 3 et le Jour 12 de leur cycle. La première administration du traitement d'altrenogest a été menée sur des femelles se situant entre le Jour 1 et le Jour 14 de leur cycle œstral. Dès la dernière administration d'altrenogest, les femelles ont été placées en présence de mâles de fertilité éprouvée.

- **Détermination précise du moment de l'ovulation**

Afin de connaître exactement le stade du cycle œstral de chaque femelle au moment d'appliquer le traitement et pour déterminer le retour des chaleurs, la colonie a été contrôlée deux fois par jour pour détecter les ouvertures de la membrane vaginale et l'ovulation était alors confirmée par un frottis vaginal. Lorsqu'au moins la moitié de la membrane vaginale était perforée, des frottis vaginaux ont été réalisés à 12 heures d'intervalle jusqu'à ce que l'ovulation soit confirmée (Jour 0) par le premier frottis présentant un afflux de leucocytes succédant à des frottis présentant de nombreuses cellules kératinisées (Figures 30 et 31). La longueur moyenne de cycle des cochons d'Inde utilisés dans cette étude était de $16,2 \pm 0,2$ jours (observé sur 83 cycles).

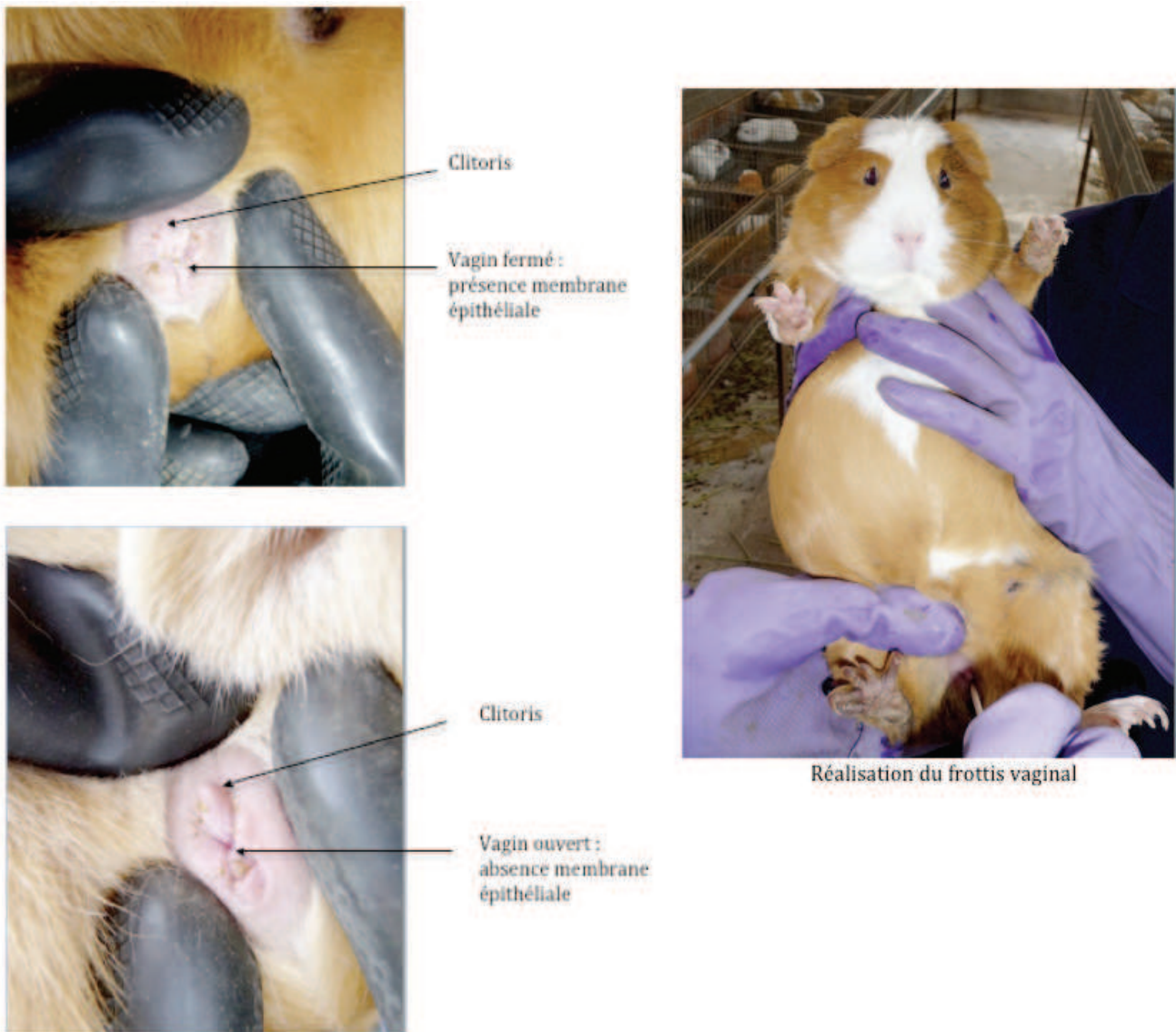


Figure 30 Observation de la membrane épithéliale et réalisation du frottis

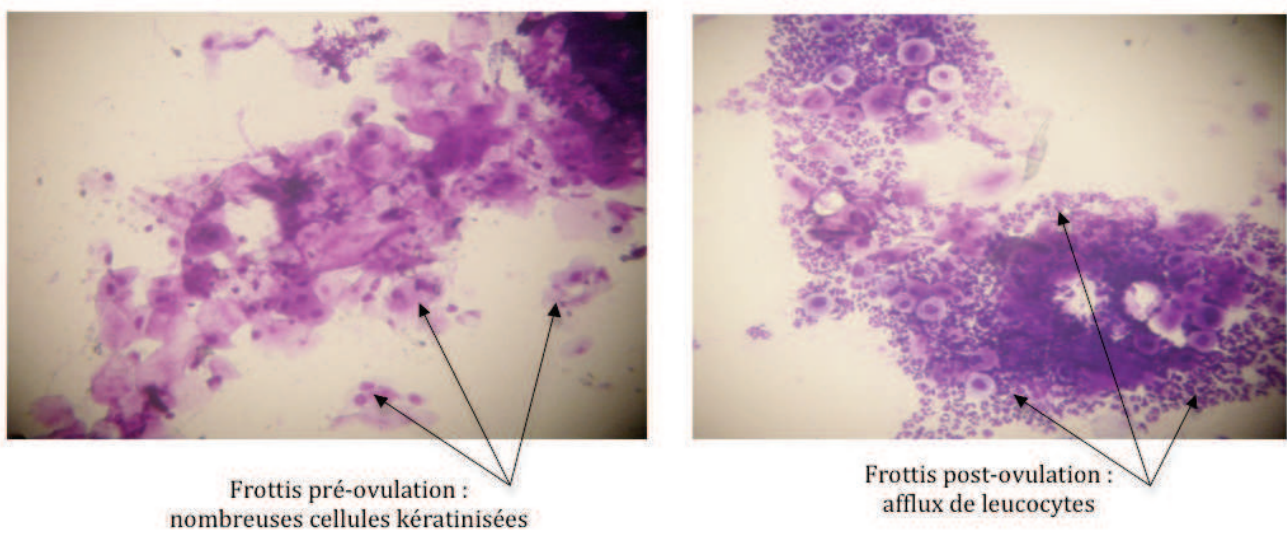


Figure 31 Interprétation des frottis vaginaux

- **Analyse statistique**

La capacité de l'hormone à induire l'ovulation a été évaluée par le biais de l'intervalle traitement-ovulation. Celui-ci correspond au temps (en jours) entre l'injection et le moment de l'ovulation pour les traitements avec des analogues de $\text{PGF}_{2\alpha}$, et l'intervalle entre la dernière administration d'hormone et l'ovulation pour le traitement d'altrenogest.

Les données sont présentées sous la forme moyenne \pm écart-type. L'analyse statistique a consisté en une régression linéaire (Analysis Tool, Microsoft excel). Pour tous les graphiques, le Jour 0 est considéré comme le jour de référence et correspond à la dernière ovulation.

Les données concernant la taille de portée ont été analysées grâce à un test t de Student (Analysis Tool, Microsoft excel).

1.3. RÉSULTATS

Les effets des traitements sur la durée du cycle œstral et l'intervalle fin de traitement-ovulation sont représentés dans la Figure 32.

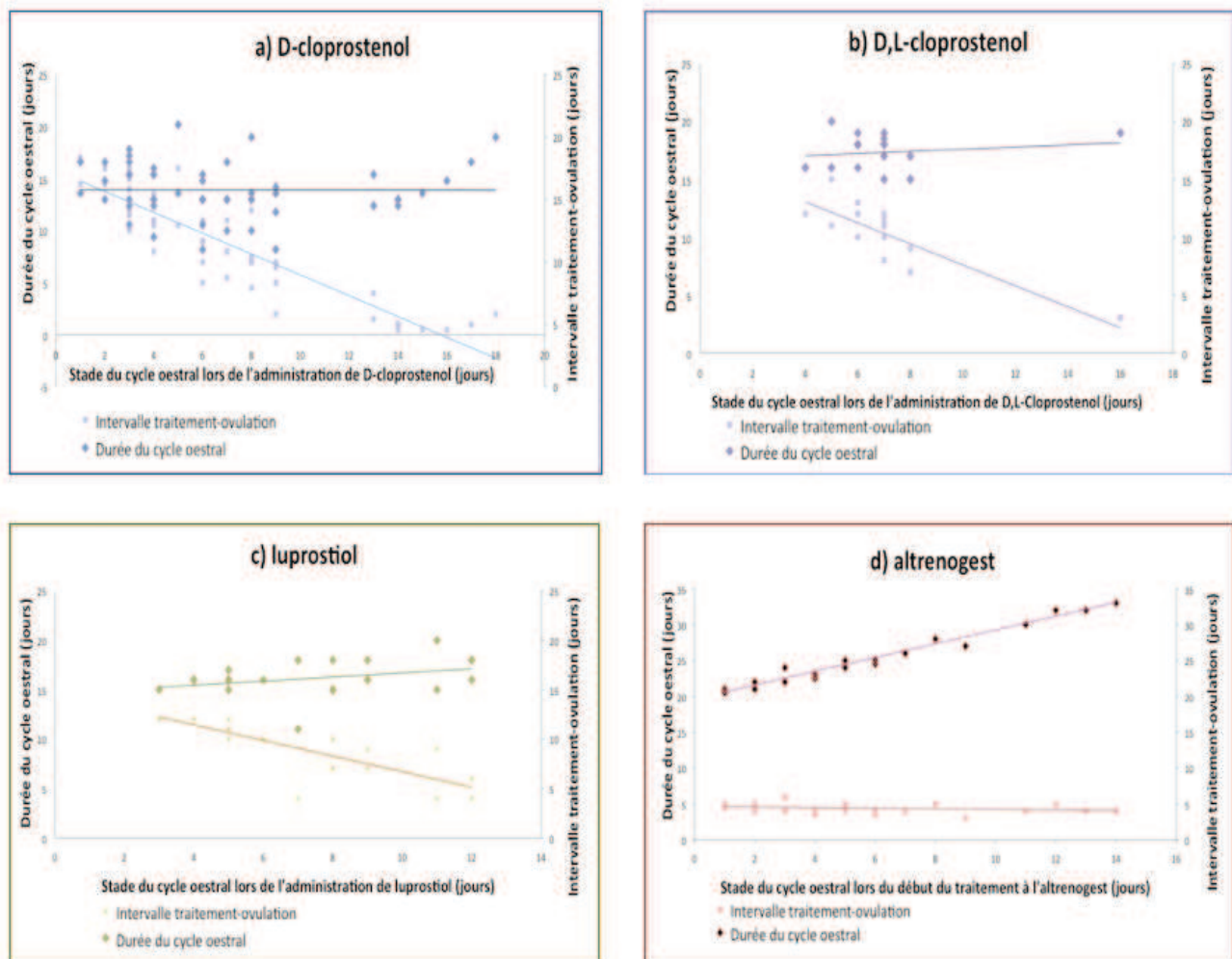


Figure 32 : Effets des analogues de $\text{PGF}_{2\alpha}$ et du progestagène sur la durée du cycle œstral et l'intervalle traitement-ovulation

- **Longueur du cycle**

Quel que soit le stade du cycle des femelles lors de l'administration de l'hormone, aucun des trois analogues de $\text{PGF}_{2\alpha}$ n'a modifié la durée du cycle œstral ($P > 0,05$) avec respectivement $15,76 \pm 0,31$ jours dans le cas du D-cloprostenol, $17,32 \pm 0,42$ jours dans le cas du D,L-cloprostenol et $16,17 \pm 0,36$ jours dans le cas du luprostiol.

En revanche, le cycle s'est allongé tant que l'altrenogest était administré, jusqu'à 34 jours.

- **Intervalle traitement-ovulation**

La durée de l'intervalle entre la fin du traitement et l'ovulation dépendait du stade du cycle des femelles ($P < 0,05$) et variait pour les trois traitements utilisant des analogues de $\text{PGF}_{2\alpha}$ avec respectivement un écart de 1 à 18 jours dans le cas du D-cloprostenol, de 4 à 16 jours dans le cas du D,L-cloprostenol et de 4 à 16 jours dans le cas du luprostiol.

En revanche, la durée de l'intervalle entre la fin du traitement et l'ovulation était constant quel que soit le stade du cycle des femelles ($P > 0,05$) lors du début du traitement d'altrenogest. A l'issue du traitement, les 29 femelles ont ovulé $4,43 \pm 0,13$ jours après la dernière administration par voie orale d'altrenogest. La distribution de l'apparition des chaleurs est très regroupée entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour après l'arrêt du traitement, avec 93% des femelles (27/29) ayant déjà ovulé au 5^{ème} jour (Figure 33).

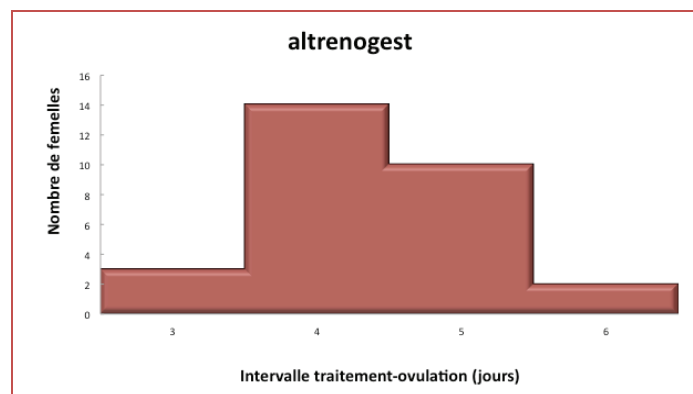


Figure 33 : Distribution des femelles ayant ovulé suite à la dernière administration d'altrenogest

- **Taux de gestation et taille de portée**

Suite au traitement avec l'altrenogest, les 29 femelles dont l'ovulation a été induite ont été placées avec des mâles de fertilité éprouvée. Un mois plus tard, le taux de gestation estimé par palpation abdominale était de 79% (23/29). Six femelles sont mortes ou ont avorté. Le taux de mise-bas était de 66% (19/29) et la taille de portée était de $3,05 \pm 0,19$ jeunes. La taille de portée des animaux traités n'était pas statistiquement différente ($P > 0,05$) des tailles de portée des femelles non-traitées du même élevage pendant la même période ($3,09 \pm 0,27$ jeunes, $n=25$).

I.4. DISCUSSION ET CONCLUSION

Bien que l'étude de la bibliographie indique que les $\text{PGF}_{2\alpha}$ sont responsables de la lutéolyse chez *Cavia porcellus*, il n'a pas été possible d'induire l'ovulation chez les animaux traités avec des analogues de $\text{PGF}_{2\alpha}$ dans cette expérience. Les doses employées pour ce travail étaient plus faibles que celles employées dans les années 1960 et 1970. Toutefois les $\text{PGF}_{2\alpha}$ disponibles à l'époque exigeaient l'emploi de doses plus élevées que celles utilisées de nos jours. La posologie utilisée pour cette expérience est supérieure à celle employée actuellement chez les vaches traitées avec ces mêmes analogues synthétiques de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Plata et al., 1990). Même lorsque les doses de D,L-cloprostenol ont été doublées, lors d'essais complémentaires, aucun effet lutéolytique n'a été détecté. Il convient de remarquer que tous les travaux antérieurs qui ont rendu compte de l'effet lutéolytique des $\text{PGF}_{2\alpha}$ chez *Cavia porcellus* ont été menés sur des femelles hystérectomisées (Blatchley et Donovan, 1969; Tso et Tam, 1977). À ce jour, aucun traitement de maîtrise du cycle œstral utilisant des analogues de $\text{PGF}_{2\alpha}$ n'a été décrit chez des femelles *Cavia porcellus* avec un utérus intact. Osamu Suzuki¹ (communication personnelle, janvier 2012) a essayé de synchroniser les chaleurs de *Cavia porcellus* en utilisant plusieurs doses d'analogues de $\text{PGF}_{2\alpha}$ et a observé une perturbation de l'effet de la progestérone mais n'a jamais constaté d'interruption de la phase lutéale.

En revanche, cette expérience montre que l'administration de 0,1mL (0,22mg/kg) d'altrenogest par voie orale quotidiennement pendant quinze jours permet d'induire l'ovulation dans les 4 à 5 jours après l'arrêt du traitement indépendamment du stade du cycle auquel se trouvait la femelle au début du traitement. Concernant la durée du traitement, il a été décidé d'administrer l'hormone pendant 15 jours afin d'éviter la présence de CJ résiduel à la fin du

¹ Osamu Suzuki (D.V.M., Ph.D.) e-mail: osuzuki@nibio.go.jp
Senior Researcher, Lab. of Experimental Animal Models
National Institute of Biomedical Innovation
Saito-Asagi 7-6-8, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, JAPAN
Phone: +81-72-641-9852 FAX: +81-72-641-9857

traitement, sachant que la durée du cycle œstral naturel des cochons d'Inde utilisés dans cette expérience était de $16,17 \pm 0,21$ jours. Ainsi la durée du traitement devrait être adaptée pour des populations dont la durée de cycle œstral naturel serait significativement différente de celle constatée pour cette expérience.

Comparativement aux autres méthodes pour synchroniser les chaleurs de *Cavia porcellus*, l'utilisation de progestagène par voie orale est facile à mettre en place dans des conditions d'élevage puisqu'elle n'implique pas les anesthésies nécessaires à la pose et au retrait d'un implant (Figure 34).



Figure 34 : Administration d'altrenogest par voie orale

La possibilité de distribuer l'altrenogest directement sur l'aliment, comme c'est le cas lorsqu'il est utilisé chez les juments ou les truies, n'est pas envisageable dans le cas du cochon d'Inde. En effet le comportement alimentaire du cochon d'Inde est caractérisé par un grand nombre de petit repas dispersés tout au long de la journée (Hirsch, 1973), contrairement à la jument et la truie qui mangent l'intégralité de leur ration sitôt servie. Il serait par conséquent

impossible de s'assurer que chaque animal d'un groupe vivant ensemble a reçu la dose appropriée d'hormone. Ainsi l'administration quotidienne et individuelle directement dans la bouche est nécessaire. Cette technique est astreignante pour l'opérateur qui doit attraper puis tenir l'animal tout en lui administrant l'hormone. Toutefois les cochons d'Inde sont très dociles lorsqu'ils sont manipulés fréquemment et avec douceur. Ils s'habituent alors à recevoir le traitement et se laissent manipuler sans problème au bout de quelques jours d'apprivoisement. Ce mode d'administration de progestagène est donc non seulement efficace mais également moins traumatisant et invasif pour l'animal et par conséquent plus respectueux de son bien-être.

La dose de 0,1mL correspond à une dose élevée de progestagène (0,22mg/kg), cinq fois supérieure à celle employée chez les juments par exemple (Pinto, 2011). Il semble toutefois que le surplus d'altrenogest soit éliminé dans les fèces (Stewart et al., 2010). Aucun effet négatif lié au traitement avec de l'altrenogest n'a été identifié au cours de l'expérience : ni sur les cochons d'Inde, ni sur leurs performances reproductives. Les taux de gestation, de mise-bas ainsi que les tailles de portées étaient comparables à ceux des femelles non-traitées. Les jeunes issus de ces portées ont eu une croissance comparable à leurs congénères du même âge au sein de l'élevage. Par la suite, ces jeunes ont été intégrés dans le plan d'accouplement de l'élevage et ont eu les mêmes performances de reproduction que leurs congénères (fertilité et prolificité).

Des essais de synchronisation des chaleurs d'une autre population de cochons d'inde ont été menés suite à cette expérience. Des animaux consanguins de l'Institut Pasteur, utilisés pour la recherche biomédicale, ont reçu le même traitement d'altrenogest que celui décrit précédemment et 87,5% des femelles ont été synchronisées (7 femelles synchronisées sur 8 femelles traitées, dont 3 nullipares et 5 multipares). Il est donc envisageable d'utiliser cette méthode de synchronisation des chaleurs pour tout type de population.

II. PROTOCOLE DE PRODUCTION D'EMBRYONS DE CAVIA PORCELLUS

Le protocole de superovulation de *Cavia porcellus* utilisant de l'hMG décrit par (Suzuki et al., 2003), a été élaboré sur des femelles naturellement cyclées. Il n'existe pas à ce jour de résultats concernant l'efficacité de ce traitement chez des femelles ayant reçu un traitement de synchronisation des chaleurs. La ressemblance entre la séquence d'acides aminés des récepteurs à FSH de *Cavia porcellus* et celle des primates invite à tester l'utilisation d'autres hormones disponibles et utilisées pour induire la superovulation chez les femmes, notamment la FSH-recombinante humaine (FSH-r).

II.1. OBJECTIFS

L'objectif de cette expérience est de proposer une méthode standardisée qui permette d'augmenter le nombre d'embryons produit par femelle *Cavia porcellus* préalablement synchronisée grâce à un traitement de progestagène par voie orale pendant 15 jours. Ainsi, deux hormones ont été testées (hMG et FSH-r) pour évaluer leur capacité à induire une superovulation sur des femelles synchronisées et à augmenter la production d'embryons viables par femelle.

II.2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

- **Animaux**

Cinquante-trois femelles cochons d'Inde normalement cyclées provenant de l'élevage Maria-Marcela (Puente Piedra, Pérou), âgées de 6 à 12 mois et pesant 1 à 1,5Kg, ont été utilisées pour cette expérience. Maintenus en conditions d'élevage agricoles, les animaux ont reçu de l'aliment commercial spécialement conçu pour les cochons d'Inde reproducteurs et enrichi en vitamine C, ainsi que du fourrage frais quotidiennement et de l'eau de boisson *ad libitum*.

- **Traitements hormonaux**

Toutes les femelles ont été synchronisées selon le protocole validé dans l'expérience précédente: 15 jours d'administration orale quotidienne de 0,1mL (0,22mg/Kg) d'altrenogest (Regumate® Equin, MSD Santé Animale, France). Les femelles ont été réparties en trois groupes :

- G1 groupe témoin : seize femelles n'ont reçu aucun traitement de superovulation à l'issue du traitement de synchronisation des chaleurs,
- G2 superovulation avec de l'hMG: vingt-trois femelles ont reçu un traitement de superovulation dérivé de celui proposé par (Suzuki et al., 2003b). Lors de la dernière administration d'altrenogest (Jour 15), les femelles ont également reçu une première injection intra-musculaire de 5UI d'hMG (hMG Massone®, Instituto Massone, Argentine). La deuxième injection a été réalisée 24 heures plus tard (Jour 16) et la troisième 48 heures plus tard (Jour 17). (Figure 35)

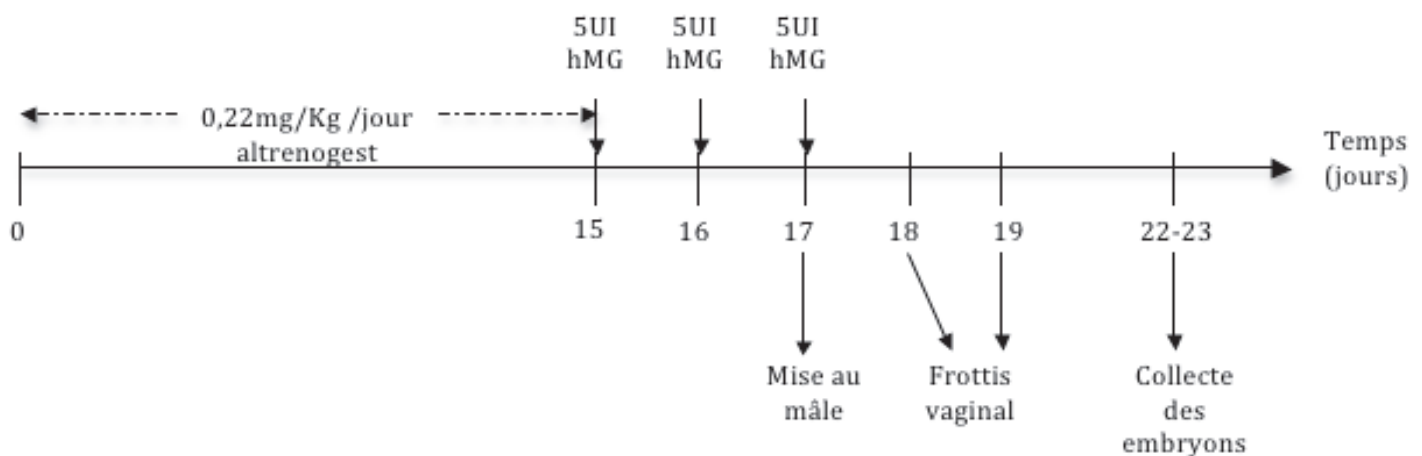


Figure 35 : Protocole de superovulation avec de l'hMG (G2)

- G3 superovulation avec de la FSH-r: quatorze femelles synchronisées avec de l'altrenogest ont reçu six injections intra-musculaires de 5UI de FSH-r (Puregon®, Organon SA, France). La première injection a été réalisée en même temps que la dernière administration d'altrenogest (Jour 15) et les cinq injections suivantes ont été réalisées à 12 heures d'intervalle (Jour 15,5 ; 16 ; 16,5 ; 17 et 17,5). (Figure 36)

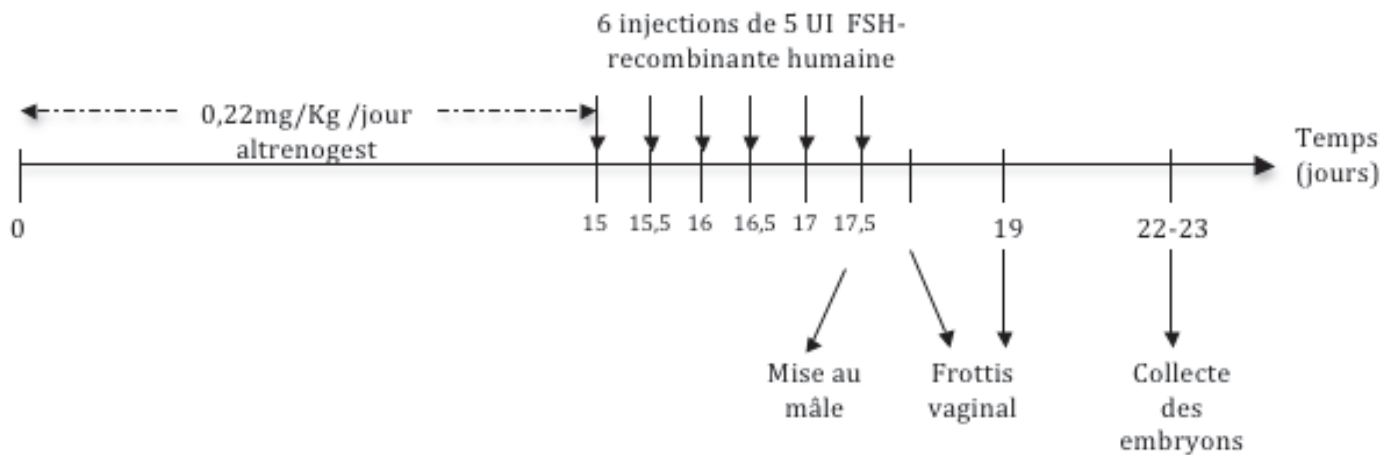


Figure 36 : Protocole de superovulation avec de la FSH-r (G3)

Les cinquante-trois femelles de cette expérience ont été placées en présence de mâles dès le Jour 17, puis la colonie a été contrôlée deux fois par jour afin de détecter l'ouverture de la membrane vaginale. Dès qu'au moins la moitié de la membrane vaginale était perforée, des frottis vaginaux ont été réalisés toutes les 12 heures afin de déterminer le moment précis de l'ovulation, lorsque la prédominance des cellules kératinisées dans le frottis faisait place à l'afflux de leucocytes. La présence d'un bouchon muqueux (vaginal) dans la litière a permis de confirmer la copulation.

- **Collecte des embryons**

Compte tenu de la taille de cette espèce, les cinquante-trois femelles ont été abattues puis les tractus génitaux prélevés pour effectuer la collecte.

- **Techniques d'abattage**

Concernant la méthode d'abattage, un soin particulier a été pris pour limiter le stress et la douleur ressentis par les animaux. Les méthodes traditionnelles d'abattage des cochons d'Inde au Pérou sont la luxation cervicale et le coup violent sur la tête. Le coup doit être asséné sur le milieu du crâne avec suffisamment de force pour produire une hémorragie cérébrale massive, et par conséquent une dépression immédiate du système nerveux central. L'animal devient inconscient immédiatement et est donc insensible à la douleur. Après avoir assommé l'animal, les gros vaisseaux sanguins majeurs ont été sectionnés et l'abdomen ouvert.

La luxation cervicale quant à elle consiste à séparer le crâne et le cerveau de la moelle épinière en exerçant une pression à la base postérieure du crane. Lorsque la séparation de la moelle est faite, le cerveau n'envoie plus de stimulations respiratoires ni cardiaques, conduisant à la mort. La moelle épinière sectionnée n'émet plus de stimulations douloureuses à partir de la zone postérieure à la séparation. Ainsi, avec la séparation de la moelle du cerveau, les stimuli douloureux ne peuvent plus être perçus. Cependant, il peut y avoir des contractions musculaires importantes.

Ces méthodes sont beaucoup plus rapides pour les animaux que l'euthanasie dans un caisson à CO₂ recommandé en France et où l'animal ressent de la douleur pendant plusieurs secondes avant la sédation puis finalement la mort.

Lors de l'abattage des animaux, l'opérateur principal chargé des traitements et donc connu des animaux s'est chargé de leur transport entre le bâtiment d'élevage et le lieu d'euthanasie afin de limiter leur stress. La personne chargée de l'abattage possède une grande maîtrise des deux méthodes choisies. Le coup violent sur la tête a été retenu chaque fois que cela était possible car c'est la méthode la plus rapide pour l'animal (pas de nécessité de l'immobiliser comme c'est le cas pour la luxation cervicale).

- Prélèvement et perfusion des tractus génitaux

Les embryons des cinquante-trois femelles euthanasiées ont été collectés 3 à 5 jours après l'ovulation. À ce moment, les embryons ont traversé la jonction utéro-tubaire et se trouvent dans la corne utérine aux stades 8-16 cellules à morula compactée-jeune blastocyste respectivement. Les tractus génitaux (oviducte et cornes utérines) ont été immédiatement prélevés après l'euthanasie. Dans un premier temps, les cornes utérines ont été perfusées en injectant 1mL de liquide de collecte (Ringer lactate supplémenté avec 10% (v/v) de sérum de veau fœtal) directement dans la lumière de la corne à l'aide d'une aiguille de 27 gauge reliée à une seringue de 1mL. Afin de s'assurer que toutes les structures étaient collectées, l'oviducte était ensuite perfusé à l'aide d'un capillaire en verre effilé d'environ 0,3mm de diamètre attaché à une seringue de 2mL remplie de liquide de collecte. Dans les deux cas, les embryons ont été collectés dans des boîtes de pétri.

Les structures ovariennes ont été observées et le nombre de corps jaunes enregistrés. Les embryons collectés ont été dénombrés et observés sous loupe binoculaire (x100) pour évaluer leur qualité selon les critères morphologiques établis par l'IETS (*International Embryo Transfer Society*) (IETS, 2010). L'évaluation de l'intégrité de la zone pellucide et de l'homogénéité des blastomères a permis de distinguer les embryons de bonne qualité (qualité 1 à 2 notées Q₁ et Q₂), congelables, et ceux de mauvaise qualité (qualité 3 notée Q₃) voire non-fécondés (notés NF).

Pour chaque groupe de femelles, le pourcentage de femelles ayant ovulé, l'intervalle entre la fin du traitement de synchronisation et l'ovulation, le nombre de CJ, le nombre de structures collectées, le taux de collecte (nombre total de structures collectées/ nombre de corps jaunes) ainsi que la qualité des embryons collectés ont été déterminés.

- **Analyse statistique**

Les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm écart-type. Les comparaisons ont été réalisées avec des tests *t* de Student pour analyser les effets relatifs de chaque hormone sur le taux d'ovulation, le nombre et la qualité des structures collectées par rapport au groupe témoin. Le seuil de significativité choisi est $P < 0,05$.

Les évaluations statistiques du pourcentage de femelles qui ont ovulé et du taux de collecte ont été réalisées à l'aide d'un test de Khi², avec un intervalle de confiance de 95% ($\alpha = 0.05$).

II.3. RÉSULTATS

Le pourcentage de femelles qui a ovulé varie de 91,3% à 100% et le taux de collecte de 63,4% à 81,0% en fonction du traitement (Tableau 1). Ces taux ne sont pas significativement différents pour les femelles superovulées par rapport au groupe témoin ($P > 0,05$).

Le nombre de CJ observés et le nombre de structures collectées sont significativement plus élevés chez les animaux superovulés que chez le groupe témoin ($P < 0,05$): $9,1 \pm 1,6$ CJ et $6,7 \pm 1,3$ structures ont été collectées sur les femelles traitées avec de l'hMG contre $12,2 \pm 2,1$ et $9,6 \pm 2,1$ pour les femelles traitées avec de la FSH-r.

Le nombre d'embryons Q1 et Q2 est significativement plus élevé chez les femelles superovulées par rapport au groupe témoins ($P < 0,05$): $4,4 \pm 1,5$ et $3,0 \pm 1,9$ embryons congelables ont été respectivement obtenus avec les traitements d'hMG et de FSH-r en comparaison de $0,8 \pm 0,4$ chez le groupe témoin.

Un nombre élevé d'ovocytes non-fertilisés est observé dans le groupe 3 traité avec de la FSH-r.

L'intervalle entre la fin du traitement de synchronisation et l'ovulation n'est pas significativement différent chez les femelles superovulées par rapport au groupe témoin ($P > 0,05$).

Tableau 1 : Effets des traitements de superovulation sur la réponse ovarienne et la qualité des embryons collectés

	n	Femelles qui ont ovulé (%)	Intervalle Traitement synchronisation-ovulation (jours)	Nombre de corps jaune	Nombre de structures collectées	Taux de collecte (%)	Nombre d'embryons Q1 et Q2	Nombre d'embryons Q3	Nombre de NF
G1 : témoin	16	100 ^a	5,6±0,3 ^a	3,4±0,3 ^a	2,3±0,5 ^a	63,4 ^a	0,8±0,4 ^a	0,9±0,3 ^a	0,5±0,3 ^a
G2 : hMG	23	91,3 ^a	4,9±0,2 ^a	9,1±1,6 ^b	6,7±1,3 ^b	72,4 ^a	4,4±1,5 ^b	2,0±0,4 ^b	0,4±0,3 ^a
G3 : FSH-r	14	92,9 ^a	4,5±0,27 ^a	12,2±2,1 ^b	9,6±2,1 ^b	81,0 ^a	3,0±1,9 ^b	2,4±1,3 ^b	4,2±1,3 ^b

Les exposants présentant des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différents ($P < 0,05$)

II.4. DISCUSSION –CONCLUSION

Quel que soit le traitement, plus de 90% des femelles ont ovulé après la synchronisation, aussi bien dans le groupe témoin que dans les groupes superovulés. Les traitements de superovulation n'ont pas affecté l'apparition des chaleurs dans les 4 à 5 jours après la fin du traitement de synchronisation. L'ovulation semble avoir lieu un peu plus rapidement chez les animaux traités, dont les ovaires ont été stimulés, mais l'analyse statistique des données ne montre aucune différence significative.

Chez les femelles traitées avec de l'hMG et de la FSH-r, le nombre de CJ a été multiplié par 3 et 4 respectivement par rapport au groupe témoin. Il en est de même pour le nombre d'embryons congelables obtenus sur les femelles superovulées. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par les équipes de Suzuki (Suzuki et al., 2003) et de Dorsch (Dorsch et al., 2008) qui avaient collecté respectivement $5,4 \pm 1,6$ et $5,7 \pm 2,0$ embryons 4 jours après l'accouplement des femelles superovulées avec 15UI d'hMG. Ces travaux avaient été réalisés sur des femelles naturellement cyclées, tandis que les résultats présentés dans ce travail ont été obtenus sur des femelles préalablement synchronisées.

Les taux de collecte obtenus sur les femelles superovulées sont supérieurs à 70% et confirment que la perfusion de la corne utérine puis de l'oviducte est une méthode appropriée pour optimiser le nombre de structures collectées. La vitesse de transit des embryons peut être modifiée par le traitement de superovulation comme l'a remarqué l'équipe de Dorsch (Dorsch et al., 2008), une collecte en deux étapes, en commençant par la corne utérine puis les oviductes, permet d'avoir des renseignements sur la vitesse de transit des embryons en fonction des traitements. Dans notre expérience, les embryons de bonne qualité collectés au-delà de 3 jours

se trouvaient toujours dans les cornes utérines aussi bien chez le groupe témoin que chez les femelles superovulées. Les ovocytes non-fécondés et les embryons de mauvaise qualité ont souvent été collectés dans les oviductes.

La quantité relativement élevée d'ovocytes non-fécondés obtenus avec le traitement utilisant de la FSH-r mérite réflexion. Bien que la fertilité des mâles n'ait pas posé problème lors des expériences précédentes, les températures anormalement élevées pouvant atteindre 35°C et le stress hydrique ont pu perturber la fertilité des mâles utilisés sur les femelles du groupe 3. En effet, *Cavia porcellus* est très sensible au coup de chaleur, lorsque la température ambiante dépasse 28°C, ainsi qu'à la déshydratation. L'ensemble de l'organisme est affecté et des symptômes apparaissent rapidement : congestion des vaisseaux périphériques avec polypnée, hyperthermie, soif, ptyalisme important, cyanose, prostration, voire mort de l'animal (Solau Poissonnet, 2004). De plus, la quantité significativement plus élevée de structures non-fécondées collectées sur les femelles traitées avec de la FSH-r peut être également liée à la mauvaise qualité des ovocytes produits. Cette expérience devra être réitérée dans des conditions environnementales mieux maîtrisées et avec un nombre d'animaux suffisant pour optimiser les doses de FSH-r et les moments d'administration afin de mesurer l'influence du traitement sur la qualité des embryons collectés.

En conclusion, les protocoles de superovulation avec hMG ou la FSH-r sur femelles avec synchronisation des chaleurs peuvent être validés pour la mise en place d'une cryobanque chez cette espèce.

III. CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS DE CAVIA PORCELLUS

Dans la littérature, une seule publication rapporte des essais de congélation d'embryons de *Cavia porcellus* au stade morula (Dorsch et al., 2008). Ces travaux ont permis de comparer l'efficacité du DMSO et du PROH comme cryoprotecteurs pour congeler des embryons de *Cavia porcellus*. Les tests de viabilité à la fluorescéine de diacétate (FDA) ont montré que l'on obtenait de meilleurs résultats avec le PROH. Néanmoins, ce test à la FDA ne montre que la viabilité des embryons décongelés mais ne prouve pas leur capacité à se développer de nouveau. Pour démontrer que le métabolisme des embryons est préservé à l'issue du processus de congélation-décongélation, il est nécessaire de les cultiver *in vitro* et de vérifier qu'ils soient capables de reprendre un développement normal.

III. 1. OBJECTIFS

L'objectif de cette expérience est de proposer une méthode de congélation des embryons de *Cavia porcellus* évaluée sur la base des résultats de culture *in vitro* des embryons décongelés. L'efficacité du PROH a été comparée à celle de l'éthylène glycol (EG) en utilisant un processus de congélation lente. Par ailleurs, quelques essais préliminaires de vitrification d'embryons de *Cavia porcellus* ont été menés dans une phase exploratoire.

III.2. ESSAIS PRÉLIMINAIRES RELATIFS AU MILIEU DE CULTURE D'EMBRYONS FRAIS

Des essais préliminaires de culture *in vitro* ont été menés sur vingt-huit embryons frais à des stades et de qualités différentes afin de tester l'efficacité du milieu envisagé pour cultiver les embryons décongelés.

- **Matériels et méthodes**

Vingt-huit embryons collectés sur trois femelles synchronisées avec de l'altrenogest et superovulées avec de l'hMG puis euthanasiées 3,5-4,5 jours après l'ovulation ont été utilisés dans cette expérience. Ils ont été cultivés *in vitro* dans des boîtes à quatre puits (Nunc®, ThermoFisher Scientific, USA). Trois à quatre embryons ont été placés par puits dans 750 µL de milieu de culture KSOM (EmbryoMax® KSOM Embryo Culture, Millipore, France) dans une étuve à 38,5°C sous atmosphère de 5% de CO₂ dans l'air et 98% d'humidité. La capacité de développement des embryons frais a été évaluée par le taux de développement des embryons après 48 heures de

culture *in vitro* et leur qualité jugée de la même façon que dans l'expérience précédente, selon les critères morphologiques établis par l'IETS.

- **Résultats**

Aucun embryon collecté à un stade inférieur à 8 cellules 3,5-4,5 jours après l'ovulation ne s'est développé après 48 heures de culture *in vitro*, ni les embryons de 8 cellules (Q₃) de mauvaise qualité. En revanche tous les embryons de 8 cellules et plus de bonne qualité (Q₁) se sont développés jusqu'au stade de blastocyste après 48 heures de culture *in vitro* dans du KSOM. (Tableau 2 et Figure 37)

Tableau 2 : Taux de développement des embryons de *Cavia porcellus* après 48h de culture *in vitro*

Type d'embryon	Nombre d'embryons	Stade des embryons après 48h de culture <i>in vitro</i>	Taux de développement
2 cellules Q ₃	5	5 embryons de 2 cellules	0 %
4 cellules Q ₃	5	5 embryons de 4 cellules	0 %
8 cellules Q ₃	3	3 embryons de 8 cellules	0 %
8 cellules Q ₁	14	14 blastocystes	100 %
16 cellules Q ₁	1	1 blastocyste	100%
Morula Q ₁	2	2 blastocystes	100%

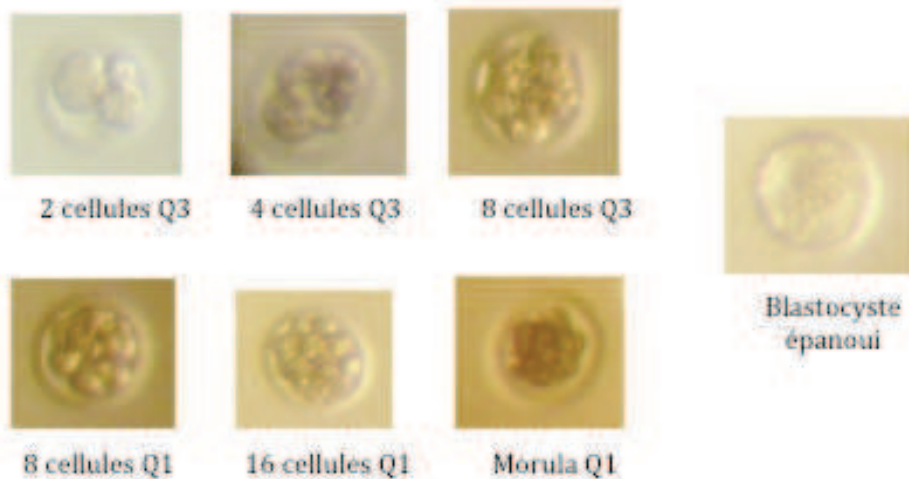


Figure 37 : Stades et qualités d'embryons de *Cavia porcellus*

- **Discussion-conclusion**

D'après les travaux de Hunter (Hunter et al., 1969), les embryons normalement développés doivent avoir atteint le stade 8 à 16 cellules au bout de 3 jours après l'ovulation. L'absence de développement, après 48 heures de culture *in vitro*, des embryons de moins de

8 cellules collectés 3,5-4,5 jours après l'ovulation confirme leur non-viabilité. Lorsque des embryons normalement développés à 3,5-4,5 jours après l'ovulation sont cultivés *in vitro* dans du KSOM, seuls les embryons au moins au stade 8 cellules de bonne qualité (Q₁) se développent. Afin de pouvoir observer la reprise du développement embryonnaire d'embryons décongelés, seuls les embryons de qualité Q₁ ont donc été utilisés pour les essais de congélation lente et de vitrification d'embryons de *Cavia porcellus*.

III.3. CONGÉLATION LENTE ET VITRIFICATION D'EMBRYONS

- **Matériels et méthodes**

Un total de quatre-vingt-onze embryons aux stades jeune morula à jeune blastocyste de bonne qualité (Q₁) ont été choisis parmi les embryons collectés sur les femelles du groupe 2 et 3. Immédiatement après la collecte, les embryons ont été recherchés sous loupe binoculaire dans le milieu de collecte et transférés dans une solution de conservation en frais (holding medium, IMV technologies, France) pour les dénombrer et évaluer leur qualité. Les embryons ont été stockés à température ambiante et dans l'obscurité avant congélation pendant une durée n'excédant pas 2 heures entre la collecte et le début de la congélation.

- Congélation lente

Le protocole de congélation lente a commencé par une étape d'imprégnation des embryons dans une solution cryoprotectrice composée d'IMV holding medium contenant 0,2M de tréhalose (réf. T0167, Sigma, France) et 10% (v/v) de cryoprotecteurs à température ambiante pendant 10 minutes. Deux cryoprotecteurs ont été testés pour la congélation lente : le Groupe A comporte les embryons congelés avec de l'EG (réf. E9129, Sigma, France) et Groupe B les embryons congelés avec du PROH (réf. 134368, Sigma, France). Les embryons ont alors été montés en paillettes stériles de 0,25mL (IMV Technologies, France), en utilisant deux colonnes d'IMV holding medium contenant 0,25M de sucrose (réf. S7903, Sigma, France) séparées de la colonne centrale contenant les embryons par des bulles d'air, et scellées par un bouchon stérile permettant l'identification (Figure 38).



Figure 38 : Schéma du montage des embryons en paillettes avant congélation lente:

- (a) bouchon ; (b) IMV holding medium + 0.25M Sucrose ; (c) bulle d'air ;
 (d) solution cryoprotectrice + embryons

Après 10 minutes dans cette solution, les embryons montés en paillettes ont été placés dans un congélateur programmable (CL 8800®, CryoLogic, Australie) préalablement refroidi à -6°C (Figure 39). Après 5 minutes d'équilibration, l'induction de cristallisation a été réalisée en touchant l'extrémité de la paillette située à côté du bouchon avec un écouvillon refroidi dans l'azote liquide jusqu'à l'apparition des premiers cristaux de glace (opacification du milieu). Une deuxième période d'équilibration de 10 minutes à -6°C a été observée avant de refroidir les paillettes jusqu'à -35°C avec une vitesse de $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, puis elles ont été directement plongées dans l'azote liquide pour un stockage d'une durée minimum de 48 heures.



Figure 39 Congélateur programmable :
 (A) chambre de congélation ; (B) cuve à azote liquide ; (C) programmeur ; (D) relais informatique

- Vitrification

Le protocole de vitrification évite la formation des cristaux de glace en utilisant des concentrations importantes de cryoprotecteurs. Afin de minimiser leur toxicité propre, il est nécessaire de minimiser le temps d'exposition des embryons et d'utiliser plusieurs agents au cours d'un même protocole et de faire subir aux embryons des bains de concentration en cryoprotecteurs croissante.

Ainsi les embryons ont d'abord subi une étape d'imprégnation dans une solution cryoprotectrice contenant de l'EG et du DMSO appelée VS1 [IMV holding medium contenant 0,1M de tréhalose (réf. T0167, Sigma, France), 5% (v/v) d'EG et 5% (v/v) de DMSO (réf. D2650, Sigma, France)] pendant 5 minutes à température ambiante.

Les embryons ont ensuite été transférés dans la solution de vitrification VS2 [IMV holding medium contenant 0,2M de tréhalose, 10% (v/v) d'EG et 10% (v/v) de DMSO] pendant 3 minutes à température ambiante.

Finalement, les embryons ont été transférés dans VS3 [IMV holding medium contenant 0,4M de tréhalose, 20% (v/v) d'EG et 20% (v/v) de DMSO] pendant 30 secondes durant lesquelles ils ont été directement montés en paillettes stériles de 0,25mL en utilisant deux colonnes d'IMV holding medium contenant 0,5M de sucrose séparées de la colonne centrale contenant les embryons par des bulles d'air, et scellées par un bouchon stérile permettant l'identification (Figure 40).

Pour la vitrification, les paillettes ont été placées directement dans l'azote liquide dans les 30 secondes suivant l'incubation dans VS3. Les embryons vitrifiés constituent le Groupe C.



Figure 40 : Schéma du montage des embryons en paillettes avant vitrification:

(a) bouchon ; (b) IMV holding medium + 0.5M Sucrose ; (c) bulle d'air ;
(d) VS3 + embryons

- Décongélation

Les paillettes ont été décongelées en les agitant doucement dans l'air à température ambiante une dizaine de secondes avant de les immerger 20 secondes dans un bain-marie à 25°C. Immédiatement après la décongélation, les paillettes ont été vidées de leur contenu dans des boîtes de pétri. Afin d'assurer la sortie des cryoprotecteurs des embryons et de les réhydrater, des bains successifs de concentration en sucrose décroissante ont été appliqués comme suit :

- Groupes A et B (congélation lente) : IMV holding medium contenant 0.25M de sucrose pendant 5 minutes, puis l'IMV holding medium pendant 5 minutes
- Groupe C (vitrification) : IMV holding medium contenant 0.5M de sucrose pendant 5 minutes, puis IMV holding medium contenant 0.25M de sucrose pendant 5 minutes, et enfin IMV holding medium pendant 5 minutes.

- Culture in vitro

Tous les embryons ont ensuite été cultivés *in vitro* par groupe de trois à quatre dans des boîtes à quatre puits Nunc, avec 750 µL de milieu de culture KSOM par puits, placées dans une étuve à 38,5°C sous atmosphère de 5% de CO₂ dans l'air et 98% d'humidité. Le taux de

développement embryonnaire a été évalué par le nombre d'embryons qui se sont développés jusqu'au stade blastocyste après 48 heures de culture *in vitro* par rapport au nombre d'embryons mis en culture.

- Analyse statistique

L'analyse statistique de l'influence de la solution cryoprotectrice et de la méthode de congélation sur le taux de développement embryonnaire a été réalisée grâce à un test de comparaison des proportions, avec un intervalle de confiance de 95% ($\alpha = 0.05$).

• Résultats

Les résultats des taux de survie embryonnaire sont présentés dans le Tableau 3. Le taux de survie embryonnaire des embryons de bonne qualité (8-16 cellules à morulae Q₁) après décongélation et 48 heures de culture *in vitro* a atteint 70,3% après la congélation lente avec de l'EG comme cryoprotecteur, 10% après la congélation lente avec du PROH et 41,7% après vitrification. L'analyse statistique montre une différence significative ($P < 0,05$) entre les trois groupes de congélation.

Tableau 3 : Influence des solutions cryoprotectrices sur le taux de survie embryonnaire des embryons cryopréservés

Groupes	Nombre d'embryons			Taux de survie embryonnaire
	Congelés	Cultivés <i>in vitro</i>	Blastocystes après 48h <i>in vitro</i>	
Group A : congélation lente avec EG	37	37	26	70,3% ^a
Group B : congélation lente avec PROH	30	30	3	10,0% ^b
Group C : Vitrification	24	24	10	41,7% ^c

Taux de Survie Embryonnaire = nombre de Blastocystes après 48h de culture *in vitro* / nombre d'embryons cultivés
Les exposants avec des lettres différentes dans la même colonne sont significativement différents ($P < 0,05$)

• Discussion-conclusion

Pour la première fois, des embryons décongelés de *Cavia porcellus* ont été évalués après 48 heures de culture *in vitro*, permettant ainsi l'obtention d'informations plus précises que les tests de viabilité à la FDA réalisés antérieurement (Dorsch et al., 2008). Lors de cette expérience,

aucun embryon congelé avec du DMSO n'avait été considéré viable tandis que 64,8% des embryons congelés dans du PROH étaient considérés viables sur la base d'une fluorescence de la plupart des blastomères. Le taux de survie embryonnaire obtenu après 48 heures de culture *in vitro* des embryons congelés avec du PROH (10%) très inférieurs à ceux obtenus avec le test à la FDA indiquent que cette méthode n'est pas suffisante pour estimer la viabilité des embryons après congélation et invitent à écarter le PROH comme cryoprotecteur pour la congélation d'embryons de *Cavia porcellus*.

Une différence significative est observée entre la congélation lente avec de l'EG comme cryoprotecteur et la vitrification. Toutefois, les taux de survie embryonnaire de 70,3% en congélation lente avec de l'EG et de 41,7% avec la vitrification sont satisfaisants par rapport aux résultats obtenus avec des protocoles similaires chez d'autres espèces. Par exemple, le taux de survie embryonnaire obtenu pour des embryons bovins congelés lentement avec de l'EG comme cryoprotecteur se situent autour de 70% (Voelkel et Hu, 1992). Chez le lapin, (Mehaisen et al., 2006) ont obtenus des taux de survie embryonnaire après culture *in vitro* d'embryons dévitrifiés de 34,3% lorsque les femelles étaient superovulées avec de l'eCG et de 46,7% lorsqu'elles étaient superovulées avec de la FSH.

Bien que les résultats de vitrification soient encourageants, l'objectif de mise en place d'une cryobanque des lignées natives invite à considérer la méthode de congélation lente avec de l'EG comme plus appropriée. Il s'agit en effet de proposer des méthodes pratiques pour une utilisation de terrain. Or la vitrification, si elle présente les avantages d'être plus rapide et d'avoir besoin de moins de matériel, est une technique qui demande une grande habileté de la part de l'opérateur par rapport à la congélation lente et la rend peu propice à l'utilisation en routine sur le terrain pour la cryoconservation de populations d'élevage de *Cavia porcellus*.

IV. TRANSFERTS D'EMBRYONS FRAIS ET DÉCONGELÉS DE *CAVIA PORCELLUS*

Seule l'équipe de Suzuki (Suzuki et al., 2000) a mentionné la réalisation de transfert d'embryons de *Cavia porcellus*. Trois femelles receveuses au 4^{ème} jour de leur cycle ont reçu trois à quatre embryons âgés de 4 jours directement dans les cornes utérines. L'une d'entre elles a donné naissance à un jeune. Le mode opératoire n'est pas détaillé (protocole d'anesthésie, protocole chirurgical, technique de transfert). Des essais similaires de transfert d'embryons frais ont donc été réalisés afin de mettre au point les protocoles anesthésiques et chirurgicaux ainsi que pour tester des techniques de transfert proprement dites. La validation de ces protocoles a permis la réalisation ultérieure de transferts d'embryons décongelés.

IV. 1. TRANSFERT D'EMBRYONS FRAIS

Compte tenu de la présence d'une membrane épithéliale qui obstrue le vagin et de la forme en Y du cervix du cochon d'Inde, il est difficile d'envisager le transfert des embryons directement dans les cornes utérines par voie transcervicale. Ainsi le transfert d'embryons a été effectué par voie chirurgicale par laparotomie ventrale.

- **Matériels et méthodes**

- Embryons et synchronisation des femelles receveuses

Un total de vingt embryons aux stades jeune morula à jeune blastocyste de bonne qualité (Q₁) ont été choisis parmi les embryons collectés sur les femelles superovulées des groupes 2 et 3. Avant le transfert, ils ont été stockés dans une solution d'IMV holding medium à température ambiante et dans l'obscurité pendant une durée n'excédant pas 2 heures.

Cinq femelles multipares normalement cyclées provenant de l'élevage Maria Marcela (Puente Piedra, Pérou), pesant de 1 à 1,5Kg ont été synchronisées suivant le protocole d'altrenogest décrit précédemment (0,22mg/kg d'altrenogest quotidiennement par voie orale pendant 15 jours). Le moment précis de l'ovulation a été déterminé par frottis vaginal. Toutes les femelles receveuses se situaient au 4^{ème} jour de leur cycle œstral au moment des transferts. Les femelles receveuses étaient à la diète depuis la veille au soir de l'intervention, pour que le caecum soit moins volumineux et ainsi faciliter l'accès aux cornes utérines et limiter le risque de lésions lors de l'incision.

- Anesthésie et protocole chirurgical

Une solution composée d'un anesthésique générale (50mg/kg de poids vif de kétamine, Ketaminol Vet®, MSD Santé animale, France) combiné à un sédatif possédant également des propriétés analgésiques (5mg/kg de poids vif de xylazine, Dormi-xyl® 2, AgroVet Market, Pérou) a été administrée par voie intrapéritonéale. L'injection intrapéritonéale est une voie facile chez les cochons d'Inde qui permet une action rapide du produit et un volume d'injection plus important que la voie intramusculaire (maximum 0,3mL). L'animal est tenu verticalement, la tête en bas. L'injection est alors réalisée au niveau de la ligne blanche (raphé tendineux médian tendu entre les deux muscles grands droits de l'abdomen) à 1cm en dessous de l'ombilic à l'aide d'une seringue d'1mL munie d'une aiguille de 27 gauge. Une injection sous-cutanée en arrière des épaules d'anti-inflammatoire et analgésique (5mg/kg de poids vif de méglumine de flunixin, Algimine®, Zoovet, Argentine) a également été pratiquée le jour de l'intervention et répétée les deux jours suivants.

Une fois tondu et désinfecté, l'animal est placé en décubitus dorsal sur une couverture isolante elle-même placée sur la table opératoire afin d'assurer le maintien de la température corporelle. La cavité abdominale est abordée par une incision verticale médiane sous ombilicale de la peau (environ 1cm au-dessus de l'os pelvien et jusqu'à 0,5cm de l'ombilic). Une dissection des tissus sous-cutanés est réalisée afin de visualiser l'endroit où la paroi musculaire sera incisée. Une ouverture en boutonnière le long de la ligne blanche (pour limiter les saignements et faciliter la cicatrisation) est réalisée et les cornes utérines sont extériorisées afin d'y transférer directement les embryons de façon rétrograde. La paroi musculaire, les tissus sous-cutanés et la peau sont ensuite suturés par un surjet passé au fil résorbable stérile (Vycril Plus®, décimale 2).

- Transfert des embryons dans la corne et diagnostic de gestation

Deux types de pipettes de transfert ont été testés dans cette expérience (Figure 41). Trois femelles ont été transférées à l'aide de paillettes en plastique OPS de 0,25mL qui ont été étirées (Open Pulled Straw®, Minitüb, Allemagne), tandis que les deux autres femelles ont été transférées à l'aide d'un capillaire en verre d'approximativement 0,3mm de diamètre et dont le bout a été effilé. Dans les deux cas les pipettes de transfert étaient reliées à une seringue afin d'aspirer les embryons dans la boîte de pétri avec la plus petite quantité possible d'IMV holding medium puis de les expulser dans la corne utérine.

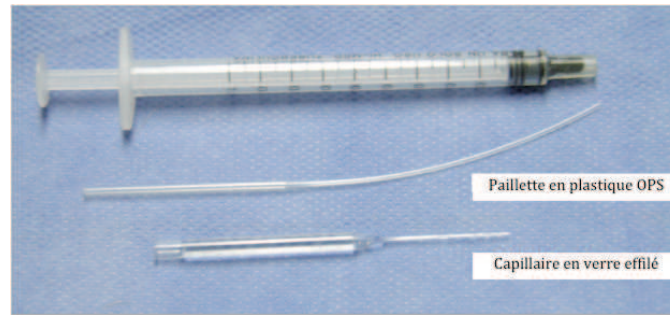


Figure 41 : Deux types de pipettes de transfert utilisées dans l'expérience

Un petit trou a été réalisé au travers de la paroi de la corne utérine extériorisée et jusqu'au niveau de la lumière de la corne à l'aide d'une aiguille de 27 gauge. La pipette de transfert (OPS ou capillaire en verre) a été insérée directement dans l'orifice et deux embryons ont été déposés dans chaque corne (Figure 42).

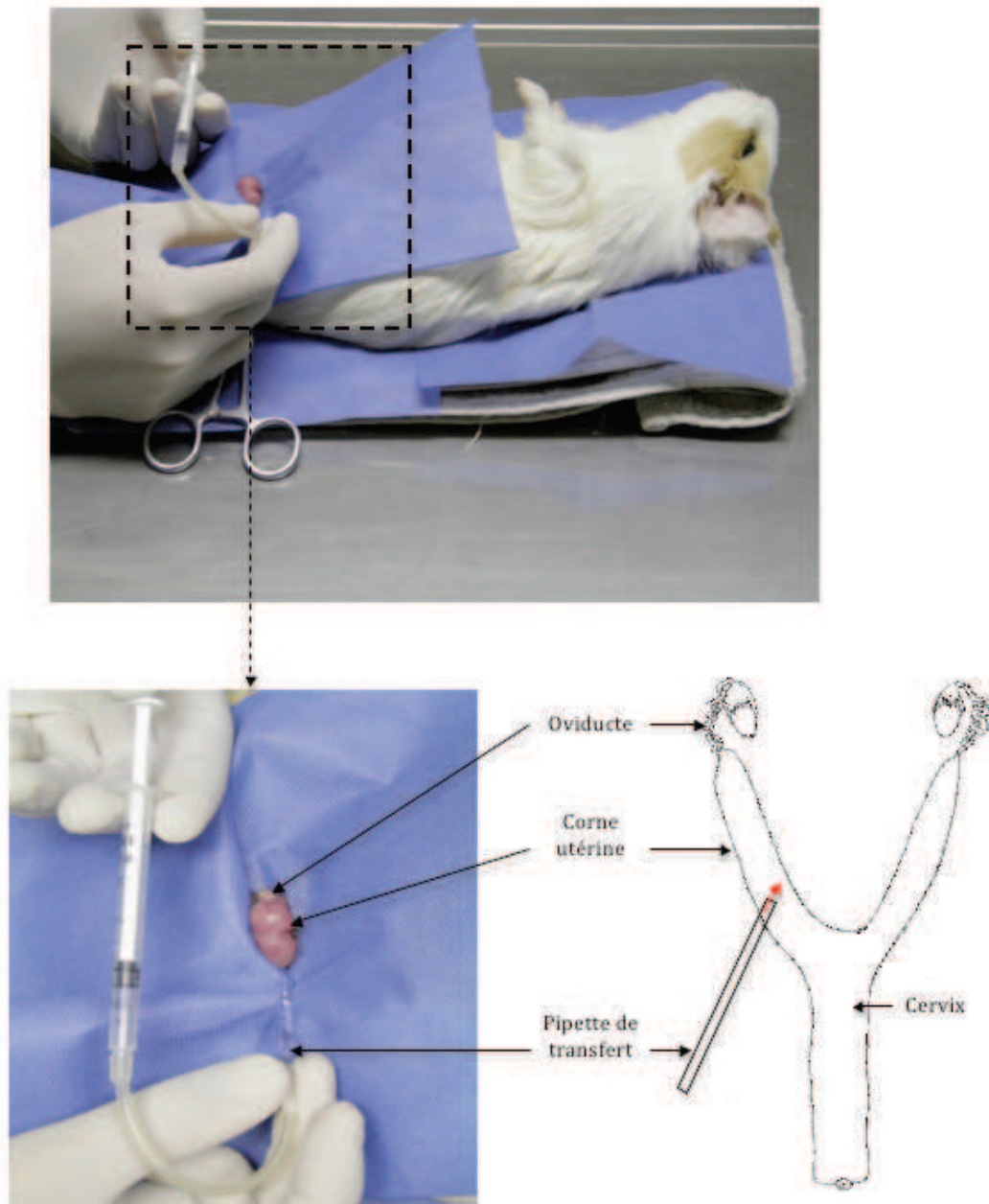


Figure 42 : Transfert d'embryons de *Cavia porcellus* par laparotomie ventrale

L'observation du retour des chaleurs des femelles receveuses à partir de quinze jours après la dernière ovulation a été effectuée afin de diagnostiquer l'éventuelle gestation suite au transfert embryonnaire. Celle-ci a été alors confirmée par palpation abdominale puis par échographie un mois après l'intervention.

- **Résultats**

Les trois femelles transférées à l'aide de la paillette en plastique OPS sont revenues normalement en chaleurs à l'issue de l'intervention et aucune n'a été gestante.

Une des deux femelles transférées à l'aide du capillaire en verre effilé a présenté une gestation normale et a mis-bas deux jeunes mort-nés (un dans chaque corne utérine) au terme de celle-ci (69 jours après la dernière ovulation).

Aucune complication post-chirurgicale n'a été observée et les femelles transférées sont retournées normalement à la reproduction lorsqu'elles n'étaient pas gestantes.

- **Discussion-conclusion**

Pour la première fois chez *Cavia porcellus*, un transfert embryonnaire a été réalisé avec succès dans une femelle receveuse dont les chaleurs ont été synchronisées. Il a été mis en évidence que le transfert embryonnaire par laparotomie médiane ventrale sous ombilicale peut être mis en œuvre facilement pour cette espèce. Il semble plus opportun d'utiliser des pipettes de transfert en verre qui permettent à l'opérateur de sentir avec plus de précision l'entrée dans la lumière de la corne utérine et d'assurer un dépôt plus précis des embryons. Osamu Suzuki (communication personnelle, Janvier 2012), a réalisé deux incisions des muscles abdominaux au niveau des flancs afin d'accéder directement à chaque corne. La laparotomie médiane ventrale sous ombilicale permet d'accéder aux deux cornes utérines par le biais d'une seule incision le long de la ligne blanche, où la cicatrisation présente moins de complications. Il est certes plus délicat, par rapport à la technique utilisant deux incisions au niveau des flancs, d'accéder aux cornes qui se trouvent alors sous le caecum. Mais la diète imposée à l'animal 12 heures avant l'intervention limite cette difficulté. Les gros ligaments qui relient les cornes utérines à la paroi dorso-latérale de l'abdomen sont souples et permettent une extériorisation des cornes utérines sans difficultés. Il convient toutefois de manipuler les cornes le plus doucement possible pour optimiser la probabilité d'obtenir des gestations.

La gestation s'est passée normalement jusqu'au jour de la parturition. La femelle n'a pas été capable de mettre-bas les deux jeunes qui étaient morts depuis quelques heures lorsqu'ils sont finalement sortis. Les femelles gestantes sont très sensibles au stress et un simple changement de température peut provoquer des avortements massifs dans un élevage. Dans le cas de la femelle transférée, le terme de la gestation a coïncidé avec le passage à l'hiver qui se caractérise à Lima (Pérou) par une chute des températures et une augmentation de l'humidité de l'air d'un jour à l'autre. D'autres facteurs extérieurs indépendants du climat peuvent avoir perturbé la femelle. Des attaques nocturnes de rats dans l'élevage ont fait des ravages les jours précédents la parturition. Attirés par les placentas des mises-bas regroupées des femelles qui avaient été synchronisées à l'altrenogest, les attaques de rats (qui n'avaient pas occasionné de dégâts jusqu'alors) ont provoqué la mort de nombreux nouveaux nés retrouvés en partie déchiquetés à travers les barreaux des cages. L'ensemble des femelles a été très stressé par cet épisode (animaux prostrés au fond de la cage, perte de poils, perte d'appétit). La naissance de petits mort-nés peut donc éventuellement s'expliquer par le stress, mais il convient également de noter que leur taille relativement grande peut avoir posé problème lors de la mise-bas. Cet unique transfert d'embryon réalisé dans une receveuse synchronisée n'est pas suffisant pour faire un parallèle avec les problèmes de gigantisme foetal rencontrés chez des bovins et des ovins suite à des transferts embryonnaire et connus sous le nom de *large offspring syndrome* (Young et al., 1998). Il convient toutefois de ne pas écarter la possibilité que la grande taille des morts-nés soit liée au transfert embryonnaire et de noter qu'il s'agit d'un facteur aggravant la difficulté lors de la parturition. En effet il est courant dans les élevages, où la tendance est de sélectionner les reproducteurs les plus grands possibles, d'observer des portées de mort-nés dont la taille est trop importante pour que la femelle arrive à les mettre-bas vivants. Tous ces facteurs sont des hypothèses et il n'est malheureusement pas possible de connaître la, ou les, raison(s) réelle(s) de cet incident. Seules des répétitions permettront de déterminer si le transfert embryonnaire a une influence significative sur la taille de la progéniture et sur les difficultés lors de la parturition.

IV.2. ESSAIS PRÉLIMINAIRES DE TRANSFERTS D'EMBRYONS DÉCONGELÉS

- **Matériels et méthodes**

Un total de vingt-quatre embryons décongelés a été transféré dans cinq femelles receveuses préalablement synchronisées suivant le protocole établi dans l'expérience 1. Les embryons, congelés dans les trois solutions cryoprotectrices des groupes A, B et C, ont été décongelés et mis en culture *in vitro* 24 heures suivant les protocoles décrits précédemment. Les protocoles d'anesthésie, de chirurgie et de diagnostic de gestation validés lors des transferts d'embryons frais ont été reproduits. Les transferts ont été réalisés à l'aide du dispositif muni de capillaires en verre effilés qui permet un dépôt plus précis des embryons dans la corne.

- **Résultats**

Toutes les femelles receveuses ayant reçu des embryons décongelés sont revenues en chaleurs moins de 20 jours après le transfert embryonnaire et aucune gestation n'a été diagnostiquée (Tableau 4). Les femelles sont retournées normalement à la reproduction après avoir été maintenues séparées des mâles pendant deux cycles, jusqu'à ce que la cicatrisation de la laparotomie soit totale, et ont toutes été gestantes après accouplement par monte naturelle.

Tableau 4 : Résultats des transferts embryonnaires d'embryons décongelés

	Nombre d'embryons transférés	Nombre de femelles receveuses	Nombre de femelles gestantes
Group A : congélation lente avec EG	14	3	0
Group B : congélation lente avec PROH	6	1	0
Group C : Vitrification	4	1	0
Total :	24	5	0

- **Discussion-conclusion**

La priorité de l'ensemble de cette étude était de valider une méthode de cryoconservation standardisée des embryons en testant leur capacité à reprendre leur développement après 48 heures de culture *in vitro* suite à la décongélation. L'obtention de blastocystes issus d'embryons décongelés ainsi que la disponibilité de femelles receveuses a permis de tenter des transferts. Malheureusement, aucune gestation n'a été obtenue, bien que la reprise du développement des embryons placés en culture *in vitro* et l'obtention de blastocystes nous indique que le métabolisme de l'embryon n'a pas été altéré par la congélation. La technique de transfert d'embryons frais a permis d'obtenir une gestation lors d'essais préliminaires. Toutefois les taux de gestation obtenus suite aux transferts d'embryons frais n'était pas élevés (une femelle gestante sur 5 femelles transférées). Il conviendra à l'avenir de réitérer des transferts d'embryons directement après la décongélation en faisant varier le stade de développement des embryons ou encore le stade du cycle œstral des femelles receveuses.

V. DISCUSSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail était d'élaborer des méthodes de production et de congélation d'embryons de *Cavia porcellus* utilisable sur le terrain afin de mettre en place une cryobanque de conservation des ressources génétiques pour cette espèce. L'ensemble des résultats obtenus permet d'envisager dès aujourd'hui la création de cette cryobanque d'un point de vue technique.

Une méthode standardisée de synchronisation des chaleurs a été mise au point. Elle consiste en un traitement de 15 jours basé sur l'administration quotidienne de 0,1mL d'un analogue de progestérone, l'altrenogest, par voie orale et qui induit l'ovulation dans les 4 à 5 jours après l'arrêt du traitement. Cette méthode a été définie dans des conditions d'élevage et ne requiert pas d'aptitude particulière de la part de l'opérateur, si ce n'est faire preuve de douceur avec les animaux pour qu'ils s'habituent à recevoir le traitement sans difficulté. Il est donc désormais possible de synchroniser les chaleurs de *Cavia porcellus* sur le terrain et de travailler avec des lots de femelles donneuses et receveuses d'embryons. Cette méthode de synchronisation peut être utilisée dans des conditions de laboratoire où son utilisation, bien qu'astreignante pour l'opérateur, est plus respectueuse du bien-être animal que l'implant sous-cutané de progestagène qui n'est pas utilisé.

D'un point de vue zootechnique, l'efficacité de la synchronisation des chaleurs de *Cavia porcellus* par un traitement facile à mettre en place en élevage permet d'envisager le développement de l'insémination artificielle et les développements consécutifs de la production et du contrôle sanitaire des élevages. Toutefois, cette pratique dépend également de la maîtrise de la collecte du sperme des mâles *Cavia porcellus* pour pouvoir inséminer les femelles. Une étude menée en 1977 au Pérou a défini une méthode d'électroéjaculation en utilisant des stimuli de 8 Volts et en immobilisant l'animal dans un tube (Vivanco et al., 1977). Une méthode de collecte du sperme à la fois efficace et compatible avec les bonnes pratiques d'élevage doit encore être définie pour cette espèce si on envisage de développer l'insémination artificielle dans les élevages.

Pour la première fois, deux traitements pratiques de superovulation de femelles *Cavia porcellus* dont les chaleurs ont été synchronisées sont proposés. Les résultats obtenus sur des femelles synchronisées avec un traitement de 15UI d'hMG humaine ou 30UI de FSH-r sont comparables à ceux obtenus par (Suzuki et al., 2003a) sur des femelles naturellement cyclées et à (Shi et al., 2000b). Ces deux traitements permettent de multiplier par 3 à 4 le nombre d'embryons congelables par femelle. D'autres expériences avec de la FSH-r devraient être toutefois menées pour identifier l'influence de ce traitement sur la qualité des embryons et optimiser les doses et moments d'application.

Les méthodes de congélation d'embryons de bonne qualité issus de femelles *Cavia porcellus* synchronisées et superovulées ont pour la première fois été évaluées à travers le taux de survie embryonnaire après 48 heures de culture *in vitro* suite à la décongélation. Avec cette méthode, l'évaluation de la viabilité des embryons à l'issue des protocoles de congélation-décongélation est plus fiable que celle mesurée avec des tests de fluorescences comme l'avaient fait l'équipe de Dorsch (Dorsch et al., 2008). Leur étude montrait une viabilité de l'ordre de 64% pour les embryons congelés lentement avec du PROH, tandis que la mise en culture *in vitro* pendant 48h a montré un taux de survie embryonnaire de 10% pour des embryons congelés dans les mêmes conditions.

Deux méthodes de congélation des embryons de *Cavia porcellus* ont présenté des résultats comparables à ceux obtenus chez d'autres espèces domestiques : la congélation lente avec l'EG et le tréhalose comme cryoprotecteurs (avec des taux de survie embryonnaire de l'ordre de 70%) et la vitrification (avec des taux de survie embryonnaire de l'ordre de 40%). Lorsque peu d'embryons sont produits et que l'habileté de l'opérateur le permet, la vitrification représente une alternative intéressante pour cryoconserver les embryons de *Cavia porcellus*. On lui préférera toutefois la congélation lente avec de l'EG et du tréhalose comme méthode de routine plus facile à mettre en place et permettant d'obtenir de meilleurs taux de survie embryonnaire.

L'obtention d'une gestation suite à un transfert d'embryons frais de *Cavia porcellus* dans une femelle synchronisée est une première mondiale. La méthode de transfert chirurgicale par laparotomie médiane ventrale sous ombilicale est donc validée et l'emploi de capillaire en verre, d'approximativement 0,3mm de diamètre dont le bout a été effilé, préconisée pour assurer un lieu de dépôt des embryons plus précis dans la corne utérine.

Aucune gestation n'a été obtenue suite au transfert d'embryons décongelés. D'autres essais devront être menés en transférant les embryons directement après la décongélation et en testant différents stades de cycle œstral des femelles receveuses afin de définir une méthode standard de transfert des embryons décongelés de *Cavia porcellus*.

Il est donc dès à présent possible de produire des embryons de *Cavia porcellus* de bonne qualité et de les cryopréserver dans l'azote liquide. D'un point de vue technique, la réalisation d'une cryobanque peut être envisagée pour cette espèce. L'amélioration des techniques de superovulation et de transferts embryonnaires permettra de considérer cet outil comme efficace pour la conservation des ressources génétiques des lignées natives tout comme des lignées précieuses pour la recherche biomédicale.

Les travaux menés au cours de cette étude ont été menés au Pérou, pays d'origine de *Cavia porcellus*, où la conservation de sa biodiversité génétique prend tout son sens. Le maintien des animaux en conditions d'élevage au sein des locaux de l'Université Agraire de La Molina (Lima, Pérou) a permis de développer des méthodes compatibles avec les exigences de la création d'une cryobanque d'animaux d'élevage et pas seulement d'animaux de laboratoire. Cela a toutefois occasionné des situations qui ont induit des doutes quand à l'interprétation des résultats, notamment lié à l'absence de maîtrise des conditions environnementales. *Cavia porcellus* est une espèce extrêmement sensible au stress et néophobe. Le moindre changement dans son environnement (changement de nourriture, de température, d'humidité, d'animalier, etc.) peut être à l'origine de bouleversements importants (pertes d'appétit, alopecies, prostrations, mortalités périnatale, avortements) et peut mener rapidement à la mort (Solau Poissonnet, 2004). L'absence de maîtrise de nombreux facteurs (en particulier les variations brusques de température, l'absence d'eau de boisson *ad libitum* pour les mâles, l'impossibilité de gérer l'entrée des rats dans l'élevage la nuit, ou encore les visites inopportunes de groupes d'étudiants souvent bruyants et manipulant les animaux sans autorisation) a posé de nombreux problèmes pendant les expériences. Il est notamment impossible de savoir si la mortalité prénatale observée chez la femelle transférée, ou encore l'absence de fécondation de nombreux ovocytes issus de femelles superovulées avec de la FSH-r incombent aux conditions environnementales ou découlent de la méthode expérimentée.

Compte tenu de la grande sensibilité au stress de *Cavia porcellus*, il serait nécessaire de réitérer ces expériences dans des conditions environnementales maîtrisées afin, dans un premier temps, d'identifier sans équivoque les facteurs ayant un impact négatif sur les méthodes

de transfert et de superovulation et de savoir dans quelle mesure l'environnement influe sur celles-ci. L'intérêt de l'Institut Pasteur de Paris pour la cryoconservation de lignées de *Cavia porcellus* utilisées dans la recherche biomédicale constitue une opportunité en ce sens et devrait permettre de poursuivre des expériences en environnement contrôlé. Lorsque ces méthodes seront standardisées dans des conditions maîtrisées, il sera alors temps de les adapter à des conditions d'élevage ou, inversement, adapter les conditions d'élevage des populations à conserver aux exigences des méthodes.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif du projet de mise en œuvre d'une cryobanque des ressources zoogénétiques andines est de proposer un outil complémentaire et efficace à la conservation *in situ* réalisée par les éleveurs andins et pour faire face à l'érosion génétique de populations d'espèces natives des Andes qui pourraient à terme courir des risques d'extinction. Nous avons choisi le cochon d'Inde comme espèce modèle pour illustrer la problématique lors de la mise en place d'une cryobanque et avons élaboré des méthodes de production et de congélation d'embryons qui permettent de mettre en œuvre, d'un point de vue technique, une cryobanque pour cette espèce. Il faudra à l'avenir envisager les étapes nécessaires à la concrétisation de cette cryobanque et élargir son champ d'application aux autres espèces domestiques andines.

Le défi scientifique porté par ce projet de cryobanque concerne le développement des biotechnologies permettant la cryoconservation des cellules reproductrices et cutanées des espèces de mammifères qui ont été domestiquées dans les Andes et pour lesquels les protocoles restent à définir ou améliorer en vue d'une application standardisée. Les espèces considérées sont le cochon d'Inde, les camélidés sud-américains (l'alpaga, le lama ainsi que la vigogne, espèce sauvage mais dont la fibre est utilisée par les communautés andines) et le chien nu du Pérou, d'origine précolombienne (Figure 43).



Figure 43 : Ressources zoogénétiques andines

- Pour le cochon d'Inde, nous avons vu dans ce travail que la production d'embryons de bonne qualité ainsi que leur cryoconservation sont possibles, tout comme le transfert embryonnaire par voie chirurgicale. Une optimisation des techniques de superovulation et de transfert des embryons décongelés permettra d'assurer l'obtention de petits viables et normaux issus d'embryons congelés et ainsi de remplir pleinement les objectifs inhérents à la création d'une cryobanque d'embryons pour la conservation des ressources zoogénétiques, aussi bien celle des lignées natives que celle des lignées utilisées pour la recherche biomédicale.

L'alternative de la conservation de la diversité génétique de cette espèce par la voie mâle devra faire l'objet d'études afin de définir un protocole de collecte de la semence respectueux du bien-être animal. La possibilité de prélever la semence des mâles *Cavia porcellus* à l'aide d'un vagin artificiel, en présence d'une femelle en chaleur et avec une stimulation manuelle comme cela existe pour le chat (Posière, 2002) semble envisageable bien que compliquée à mettre en œuvre compte tenu de la taille de cette espèce. La possibilité de pratiquer une électroéjaculation a été confirmée par les travaux de (Vivanco et al., 1977). Il faudrait néanmoins l'adapter en pratiquant une contention des animaux par anesthésie générale pour atténuer le stress et la douleur ressentis par l'animal. Les protocoles de congélation de la semence restent à définir pour cette espèce. Ces techniques permettraient notamment d'envisager la conservation d'animaux précieux lors d'une situation d'urgence (mort de l'animal) en conservant le sperme épидidymaire ou des fragments de tissu testiculaire.

- Pour les camélidés, des protocoles d'induction de l'ovulation et de superovulation existent pour les lamas (Correa et al., 1997; Ratto et al., 2002) et les alpagas (Vivanco et al., 2012). Des transferts d'embryons frais par voie transcervicale et laparotomie ont été réalisés, y compris des transferts d'embryons de camélidés produits *in vitro* (Tibary et al., 2005) et même des transferts d'embryons de lamas dans des femelles receveuses alpagas et inversement (Huanca et al., 2011). Des transferts d'embryons dévitrifiés ont permis d'obtenir 50% de taux de gestation chez le lama (Aller et al., 2002). Aucun transfert d'embryons décongelés n'a encore été rapporté chez les alpagas. Toutes ces techniques, particulièrement celles de congélation d'embryons, existent au stade expérimental et devraient être standardisées pour être utilisables en routine sur le terrain dans le cadre de la création d'une cryobanque d'embryons.

La collecte de semence de camélidés peut se réaliser grâce à l'utilisation d'un mannequin de monte et d'un vagin artificiel. La congélation de la semence de camélidés reste à ce jour compliquée compte tenu de la formation d'un gel peu de temps après la collecte. Des techniques

permettant la séparation de la phase spermatique sont à l'étude et font l'objet d'un projet de recherche mené au sein du *Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones* (CIETE) de Lima au sein duquel les travaux sur les cochons d'Inde ont été menés.

L'ensemble des biotechnologies de la reproduction développées sur l'alpaga et le lama devrait être adapté à la vigogne si l'on souhaite l'intégrer dans la cryobanque des ressources zoogénétiques andines. L'accès aux animaux constitue le plus grand frein à ces démarches. Les vigognes sont des animaux sauvages protégés appartenant à l'Appendice II de la *Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvage menacées d'extinction* (CITES). À ce titre, il est interdit de les manipuler sans l'autorisation préalable des communautés auxquelles elles appartiennent et pour lesquelles elles constituent une source de revenu importante grâce au commerce de leur fibre. La peur de la part des communautés de perdre un animal lors des expériences qui pourraient être menées les incite à refuser l'accès aux animaux. Des collaborations avec des parcs zoologiques détenant légalement des vigognes permettraient de s'affranchir de cet obstacle et de tester des protocoles de production, congélation et transfert d'embryons ou de collecte et congélation de semence pour cette espèce.

- Pour le chien nu du Pérou, la technique de collecte et les méthodes de cryoconservation de semence canine sont connues et standardisées. Elle peuvent être appliquées directement à la race de chien nu du Pérou afin d'intégrer sa conservation dans la cryobanque d'espèces domestiques andines. Les technologies relatives à la production, la collecte, la cryoconservation et le transfert embryonnaire font l'objet d'études au sein de l'unité de recherche ICE, VetAgro Sup à Lyon. Les protocoles efficaces, mis au point par cette équipe de référence en France pour la congélation du sperme de chien et la cryoconservation des races canines, pourraient être transférés et utilisés par les équipes péruviennes.

- Pour toutes ces espèces, la cryoconservation de fragments de tissu cutané permettrait à des équipes de recherche en biologie moléculaire de disposer de matériel afin d'extraire de l'ADN et de réaliser des caractérisations génotypiques des populations. Les cellules somatiques prélevées et congelées pourraient également être utilisées dans le futur pour recréer des fibroblastes qui serviront, après avoir été mis en culture, à faire des cellules IPS (*Induced Pluripotent Stem cells*), lesquelles retrouvent des capacités de spécialisation et de prolifération propres aux cellules embryonnaires. Des clones des individus conservés pourraient alors être obtenus. Le développement de ces technologies est en cours sur le lapin notamment par des équipes

françaises de l'INSERM U846 de Bron, en collaboration avec l'unité de recherche ICE, VetAgro Sup à Lyon.

De nombreuses techniques restent à améliorer pour les utiliser en routine au sein d'une cryobanque pour la conservation des ressources génétiques des espèces domestiques andines. Il n'est cependant pas nécessaire d'attendre qu'elles soient toutes standardisées pour commencer à mettre en place concrètement la cryobanque. Les efforts de recherche menés dans les années à venir permettront probablement de valoriser le matériel biologique qui peut être conservé dès aujourd'hui. La cryobanque, en tant qu'institution, peut donc être mise en place dès à présent. Elle devrait être réalisée en tenant compte des *guidelines* de la FAO et pourrait s'inspirer des expériences des cryobanques européennes et notamment de la Cryobanque Nationale Française. Plusieurs étapes préalables à sa création devront ainsi être respectées :

- La première étape consiste à identifier, pour chaque espèce concernée, les populations qu'il est important de conserver. Compte tenu de l'absence de races définies et reconnues unanimement chez le cochon d'Inde et les camélidés, il conviendra de choisir les populations à conserver sur la base de leurs fonctions économique, environnementale et culturelle. À titre d'exemple, il semble intéressant dans un premier temps de conserver les cochons d'Inde de la zone géographique de Telarmachay (région Junin, Pérou) qui ont été identifiés comme étant les plus proches des premiers cochons d'Inde domestiqués grâce à des analyses d'ADN mitochondrial (Ramirez Baca, 2009). Il sera par ailleurs important de se mettre en relation avec les associations de producteurs pour identifier des populations présentant une originalité génétique, notamment en fonction de la zone géographique de production et des pratiques d'échanges des éleveurs, ou encore en fonction d'usages particuliers des animaux (dans la médecine traditionnelle par exemple). Les populations sélectionnées sur des caractères de production par les instituts de recherche péruviens depuis les années 1970 devront également être considérées.

- Les populations identifiées devront ensuite être caractérisées, aussi bien d'un point de vue moléculaire que sur leurs aptitudes zootechniques. Une collaboration avec des spécialistes de biologie moléculaire permettrait de mesurer la distance génétique entre les individus des populations identifiées. Une caractérisation zootechnique réalisée avec les producteurs permettrait de définir des caractéristiques de prolificité, de rendement de carcasse ou encore de rusticité des populations. Si une originalité génétique sur l'ADN mitochondrial d'une population est mise en évidence ou si l'on caractérise des populations originales d'un point de vue

zootechnique, il conviendra alors de les échantillonner afin de conserver dans la cryobanque du matériel biologique d'une vingtaine de mâles et de femelles non apparentés au sein de cette population.

- Le choix du type de matériel biologique conservé dans la cryobanque devra être étudié pour chaque espèce. La conservation *ex situ* peut être réalisée selon trois approches complémentaires : en conservant des cellules germinales (spermatozoïdes, ovocytes et cortex ovarien qui permettent une conservation de l'information génétique sous forme haploïde), des cellules embryonnaires (conservation d'un accouplement) et des cellules somatiques (conservation d'un individu). Dans le cadre de la mise en œuvre d'une cryobanque des ressources zoogénétiques andines, il est judicieux dans un premier temps et pour chaque espèce concernée de considérer l'approche la plus réalisable compte tenu des protocoles existants ou en cours de définition. Ainsi la conservation par la voie embryonnaire semble être l'option la plus plausible à ce jour pour les cochons d'Inde. La voie germinale permettra de conserver rapidement les chiens nus du Pérou (cryoconservation de semence). Les voies embryonnaires et germinales devront être standardisées pour les camélidés. Enfin, l'ensemble des populations échantillonnées devrait faire l'objet de prélèvements cutanés afin de prévoir de futures caractérisations génotypiques ou d'envisager des possibilités futures de clonage.

- La gestion de la cryobanque doit être prévue avant sa création. La clarification du statut légal et juridique de la cryobanque devra être réalisé en accord avec les résolutions de la *Sub Dirección de recursos Genéticos y Biotecnología* (SUDIRGEB) de l'*Instituto Nacional de Investigación Agraria* (INIA) péruvien, institution responsable de la conservation des ressources génétiques animales selon la loi péruvienne. En partenariat avec cette institution ainsi qu'avec le *Ministerio de Agricultura* (MINAG) du Pérou, un Comité Scientifique et Opérationnel devra être créé. Il sera composé d'experts scientifiques, de représentants d'associations d'éleveurs, pour lesquelles des espèces seront conservées dans la cryobanque, ainsi que de représentants du Service Public (INIA, MINAG). Les missions confiées à ce conseil concerneront notamment les points suivants : une méthode de caractérisation de la diversité et du choix des donneurs ; la définition du matériel à conserver et des méthodes de conservation ; la valorisation de la cryobanque en élevage ; la gestion des demandes d'utilisation des doses conservées. Une fois l'existence de la cryobanque officialisée par l'INIA, la concrétisation de celle-ci et son remplissage pourront commencer immédiatement en conservant par exemple les populations de cochons d'Inde de la région de Telarmachay, les lignées de cochons d'Inde sélectionnées par

l'INIA, les populations élites d'alpagas sélectionnés par les industriels de la fibre, les chiens nu du Pérou inscrits au Kennel Club péruvien. La cryobanque se constituera progressivement suivant la désignation par un Comité Scientifique et Opérationnel des populations intéressantes à conserver. Une base de données spécifique à la cryobanque devra être créée afin de sauvegarder les informations sur les donneurs et sur le matériel conservé ; de pouvoir visualiser en permanence le contenu de la cryobanque ; de gérer les entrées et sorties de matériel de la cryobanque et de pouvoir échanger des informations avec d'autres cryobanques régionales. Les espèces domestiques andines sont transfrontalières et il est donc souhaitable d'envisager un plan de conservation à l'échelle régionale et centralisé par rapport à la FAO, comme cela se fait en Europe et en Afrique. Ainsi la cryobanque des ressources zoogénétiques andines du Pérou pourrait servir de modèle aux pays voisins dans le cadre d'un plan de conservation régional.

BIBLIOGRAPHIE

A

Allen, W.R., Urwin, V., Simpson, D.J., Greenwood, R.E., Crowhurst, R.C., Ellis, D.R., Ricketts, S.W., Hunt, M.D., Digby, N.J., 1980. Preliminary studies on the use of an oral progestogen to induce oestrus and ovulation in seasonally anoestrous Thoroughbred mares. *Equine Vet J* 12, 141-145.

Aller, J.F., Rebuffi, G.E., Cancino, A.K., Alberio, R.H., 2002. Successful transfer of vitrified llama (*Lama glama*) embryos. *Animal Reproduction Science* 73, 121-127.

André, A., 2006. Le cuy (*Cavia porcellus*) Importance sociale et culturelle dans les Andes. , Th. Méd. Vét. , Lyon, p. 72.

B

Batra, S., Sjöberg, N.O., Thorbert, G., 1980. Sex Steroids in Plasma and Reproductive Tissues of the Female Guinea Pig. *Biology of Reproduction* 22, 430-437.

Baudot, A., 1997. Cryopreservation d' 'organes par vitrification mesures calorimétriques et mesures dielectriques, Thèse de l' 'Institut National Polytechnique de Grenoble.

Baudot, A., Mazuer, J., Odin, J., 1998. Conserver des éléments biologiques par vitrification *Revue générale du froid* 88, 35-40.

Bland, K.P., 1980. Biphasic follicular growth in the guinea-pig oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 60, 73-76.

Blandau, R.J., 1949. Observations on implantation of the guinea-pig ovum. *The Anatomical Record* 103, 19-47.

Blandau, R.J., Young, W.C., 1939. The effect of delayed fertilization on the development of the guinea pig ovum. *American Journal of Anatomy* 64, 303-329.

Blatchley, F.R., Donovan, B.T., 1969. Luteolytic effect of prostaglandin in the guinea-pig. *Nature* 221, 1065-1066.

Blatchley, F.R., Donovan, B.T., 1976. Effect of intra-uterine foreign bodies and of prostaglandin administration on progesterone secretion during the oestrous cycle of the guinea-pig. *J Endocrinol* 70.

Boling, J.L., Blandau, J.G., Wilson, J.G., Young, W.C., 1939. Post-parturitional heat response of newborn and adult guinea pigs. *Data on Parturition. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 42.

Bolton, R., 1979. Guinea Pigs, Protein and Ritual. . *Ethnology*, 229-252.

Bouglér, J., 1981. La race et les livres généalogiques, *Le concept de race en zootechnie*, pp. 69-72.

C

Challis, J.R.G., Heap, R.B., Illingworth, D.V., 1971. Concentrations of oestrogen and progesterone in the plasma of non-pregnant, pregnant and lactating guinea-pigs. *Journal of Endocrinology* 51, 333-345.

Chauca de Zaldívar, L., 1997. Producción de cuyes (*Cavia porcellus*), FAO, Rome.

Chauca, L., Muscari, J., Higaonna, R., 2005. Informe Final Sub Proyecto: Generación de Líneas Mejoradas de Cuyes del Alta Productividad INIA, Lima.

Chiba, J., Egashira, Y., 1978. Specific immune response genes of new inbred strains of guinea pigs. *J. Med. Sci. Biol.* 31, 425-430.

Claudel, C., 2007. Congélation du cortex ovarien de la vache : plan d'expérience et résultats. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Lyon.

Correa, J.E., Ratto, M.H., Gatica, R., 1997. Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination. *Animal Reproduction Science* 46, 289-296.

CRL, 2009. IAF hairless guinea pig. Research Animal Models, <http://www.criver.com/en-US/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/IAFHairlessGuineaPig.aspx>.

Croix, D., Franchimont, P., 1975. Changes in the serum levels of gonadotrophins progesterona and estradiol during the estrous cycle of the guinea pig. *Neuroendocrinology* 19, 1-11.

Csapo, I., Pari, C.P., Tarro, S.P., 22, 131., 1981. Relationship between timing of ovariectomy and maintenance of pregnancy in the guinea pig. *Prostaglandins* 22, 131-140.

D

Deanesly, R., 1960. Implantation and early pregnancy in ovariectomized guinea-pigs. *Journal of Reproduction and Fertility* 1, 242-248.

Donovan, B.T., Kopriva, P.C., 1965. Effect of removal or stimulation of the olfactory bulbs on the estrus of the guinea pig. *Endocrinology* 77, 213-217.

Donovan, B.T., Lockhart, A.N., 1972. Gonadal hormones and the control of ovulation in the guinea-pig. *J Endocrinol* 55, 599-607.

Donovan, B.T., Lockhart, A.N., 1974. The hormonal induction of ovulation or of luteinization in the intact or hypophysectomized guinea-pig. *J Endocrinol* 60, 285-292.

Dorsch, M.M., Glage, S., Hedrich, H.J., 2008. Collection and cryopreservation of preimplantation embryos of *Cavia porcellus*. *Lab Anim* 42.

Drion, P.V., De Roover, R., Houtain, J.Y., Mcnamara, E.M., Remy, B., Sulon, J., Beckers, J.F., 2001. Increase of plasma eCG binding rate after administration of repeated high dose of eCG to cows. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 207-215.

E

Evans, H.E., Sack, W.O., 1973. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves, External Features and Selected References. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 2.

F

Fahy, G.M., 1984. Cryoprotectant toxicity reduction: biochemical or osmotic? *Cryo Letters* 5, 287-294.

FAO, 1996. Plan d'action mondial pour la conservation et l'utilisation durable des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, p. 67.

FAO, 2007a. L'état des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture dans le monde in: l'agriculture, C.d.r.g.p.l.a.e. (Ed.). FAO, Rome, p. 577.

FAO, 2007b. Plan d'action mondial pour les ressources zoogénétiques et la Déclaration d'Interlaken, Rome, p. 52.

Ford, D.H., Young, W.C., 1953. Duration of the first cyclic vaginal openings in maturing guinea pigs and related ovarian conditions. *The Anatomical Record* 115, 495-504.

Fuller, B.J., 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters* 25, 375-388.

G

Gad, S., 2007. *Animal Models in Toxicology -Second Edition*. Taylor and Francis Group, London. p.921

Gade, D.W., 1967. The Guinea Pig in Andean Folk Culture. *Geographical Review* 213-224.

Garris, D.R., Foreman, D., 1984. Follicular growth and atresia during the last half of the luteal phase of the guinea pig estrous cycle: relation to serum progesterone and estradiol levels and utero-ovarian blood flow. *Endocrinology* 115, 73-77.

Goy, R.W., Hoar, R.M., Young, W.C., 1957. Length of gestation in the guinea pig with data on the frequency and time of abortion and stillbirth. *The Anatomical Record* 128, 147-157.

Greenwald, G.S., Rothchild, I., 1968. Formation and maintenance of corpora lutea in laboratory animals. *J Anim Sci.* 27, 139-162.

Grosser, O., 1927. *Fruhentwicklung, Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Saugestiere*, München.

Guerrini, A., 2003. *Experimenting with Humans and Animals: From Galen to Animal Rights.* , Baltimore. p.161

Guignot, F., 2005. Cryoconservation des embryons des espèces domestiques. *INRA Prod. Anim.* 18, 27-35.

H

Hafez, E.S.E., 1970. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals Published by The Macmillan Company of Canada Limited, Toronto.

Harned, M.A., Casida, L.E., 1972. Failure to obtain group synchrony of estrus in the guinea pig. *Journal of Mammalogy* 53, 223-225.

Hermreck, A.S., Greenwald, G.S., 1964. The effects of unilateral ovariectomy on follicular maturation in the guinea pig. *The Anatomical Record* 148, 171-176.

Hilliard, J., 1973. Corpus Luteum Function in Guinea Pigs, Hamsters, Rats, Mice and Rabbits. *Biol Reprod* 8, 203-221.

Hirsch, E., 1973. Some determinants of intake and patterns of feeding in the guinea pig. *Physiol Behav* 11.

Hochi, S., Semple, E., Leibo, S.P., 1996. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of *in vitro*-produced bovine embryos. *Theriogenology* 46, 837-847.

Hoff, D.R., Ryan, G.J., Driver, E.R., Ssemakulu, C.C., De Groote, M.A., Basaraba, R.J., Lenaerts, A.J., 2011. Location of intra- and extracellular *M. tuberculosis* populations in lungs of mice and guinea pigs during disease progression and after drug treatment. *PLoS One*. 2011; 6 (3) : e17550.

Horton, E.W., Poyser, N.L., 1973. Elongation of oestrous cycle in the guinea-pig following subcutaneous or intra-uterine administration of indomethacin. *Br J Pharmacol* 49, 98-105.

Huanca, T., Cárdenas, O., Gonzales, M., Apaza, N., Sapana, R., Cabrera, M., Requena, M., 2011. Transferencia interespecífica de embriones en camelidos, Programa de Innovación en Camélidos, Lima.

Hunter, R.R.F., Hunt, D.M., Chang, M.C., 1969. Temporal and cytological aspects of fertilization and early development in the guinea pig, *Cavia porcellus*. *The Anatomical Record* 165, 411-429.

Hutz, R.J., Bejvan, S.M., Durning, M., Dierschke, D.J., 1990. Changes in follicular populations, in serum estrogen and progesterone, and in ovarian steroid secretion *in vitro* during the guinea pig estrous cycle. *Biol Reprod* 42, 266-272.

I

IETS, 2010. Manual of the International Embryo Transfer Society.

Ioannou, J.M., 1964. Ooogenesis in the Guinea-Pig. *J Embryol Exp Morphol* 12, 673-691.

Ishii, O., 1920. Observations on the sexual cycle of the guinea pig. *The Biological Bulletin* 38, 237-250.

K

Kaeoket, K., 2008. Study on the oestrous synchronization in gilts by using progestin altrenogest and hCG: its effect on the follicular development, ovulation time and subsequent reproductive performance. *Reprod Domest Anim* 43, 127-129.

- Karlsson, J.O., Toner, M., 1996. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials* 17, 243-256.
- Kaufmann, P., Davidoff, M., 1977. The guinea-pig placenta. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 53, 1-91.
- Kawaguchi, S., Hultcrantz, M., Zhe, J., Ulfendahl, M., Suzuki, M., 2010. Vestibular Morphology in the German Waltzing Guinea Pig. *Journal of otolaryngology-head and neck surgery* 39, 115-121.
- Kosaka, T., Takahashi, K.W., 1989. Effect of pregnant mare's serum gonadotrophin on increased ovulation in guinea pigs with synchronized estrous cycle. *Experimental Animals* 38, 81-83.
- Kuleshova, L.L., MacFarlane, D.R., Trounson, A.O., Shaw, J.M., 1999. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology* 38, 119-130.
- Kuleshova, L.L., Shaw, J.M., Trounson, A.O., 2001. Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation. *Cryobiology* 43, 21-31.

L

- Labhsetwar, A.P., Diamond, M., 1970. Ovarian changes in the guinea pig during various reproductive stages and steroid treatments. *Biol Reprod* 2, 53-57.
- Larese, A., Ehram, A., 1983. Les agents cryoprotecteurs: leurs nature et leurs fonctions en cryobiologie. *Journées de l'Association Française de Cryobiologie*.
- Leibo, S.P., Pool, T.B., 2011. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes. *Fertil Steril* 96, 269-276.
- Maeda, K., Naganuma, M., 1998. Topical trans-4-aminomethylcyclohexanecarboxylic acid prevents ultraviolet radiation-induced pigmentation. *J. Photochem. Photobiol.* 2, 136-141.
- Mårtensson, L., 1984. The pregnant rabbit, guinea pig, sheep and rhesus monkey as models in reproductive physiology. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 18, 169-182.
- Massip, A., 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim.* 36, 49-55.
- Massip, A., Mermillod, P., Dinnyes, A., 1995. Morphology and biochemistry of in vitro produced bovine embryos : implications for their cryopreservation. *Hum. Reprod.* 10, 103-108.
- Mauléon, P., 1967. Cinétique de l'ovogenèse chez les mammifères. *Arch Anat Microsc Morph Exp* 56, 125-150.
- Mazur, P., 2004. Principles of cryobiology, in: Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E. (Eds.), *Life in the frozen state*. CRC Press, Boca Raton, pp. 205-236.
- Mazur, P., Leibo, S.P., Seidel, G.E., Jr., 2008. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol Reprod* 78, 2-12.

Mehaisen, G.M., Viudes-de-Castro, M.P., Vicente, J.S., Lavara, R., 2006. In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does. *Theriogenology* 65, 1279-1291.

Ménézo, Y.J.R., 2004. Blastocyst freezing. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 115, 12-15.

Meryman, H.T., 2007. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* 47, 935-945.

Mills, P.G., Reed, M., 1971. The onset of first oestrus in the guinea-pig and the effects of gonadotrophins and oestradiol in the immature animal. *Journal of Endocrinology* 50, 329-337.

Morales, E., 1995. *The Guinea Pig: Healing, Food, and Ritual in the Andes*.

Muldrew, K., Acker, J.P., Elliott, J.A.W., McGann, L.E., 2004. The Water to Ice Transition: Implications for Living Cells, in: Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E. (Eds.), *Life in the frozen state*. CRC Press, Boca Raton, pp. 205-236.

Myers, P., Espinosa, R., Parr, C.S., Jones, T., Hammond, G.S., Dewey, T.A., page consultée le 9 février 2012. *The Animal Diversity Web*

N

Nilsson, Reinius, 1969. *The Mammalian Oviduct*. University of Chicago Press, Chicago.

Nowak, R.M., 1999 *Walker's Mammals of the World*, 6th Edition ed, Baltimore

O

Ogadescu, V.M., 2005. Etudes liées à la vitrification sans fracture de solutions cryoprotectrices Spécialité : Physique de la matière et du rayonnement. Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Grenoble, p. 103.

P

Pereira, R.M., Marques, C.C., 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank* 9, 267-277.

Pinto, C.R.F., 2011. *Progestagens and Progesterone*. Wiley-Blackwell Publishing Ltd.

Plata, N.I., Spitzer, J.C., Thompson, C.E., Henricks, D.M., Reid, M.P., Newby, T.J., 1990. Synchronization of estrus after treatment with Luprostiol in beef cows and in beef and dairy heifers. *Theriogenology* 33, 943-952.

PNUE, 1992. *Convention sur la diversité biologique*, Secrétariat de la Convention sur la Diversité Biologique, (Ed.), Montréal, p. 32. www.cdb.int

PNUE, 2010a. *Perspectives mondiales de la diversité biologique 3 in: biologique*, Secrétariat de la Convention sur la Diversité Biologique, (Ed.), Montréal, p. 94. www.cdb.int

PNUE, 2010b. *Plan stratégique pour la diversité biologique 2011-2020*, in: biologique, Secrétariat de la Convention sur la Diversité Biologique, (Ed.), Montréal, www.cdb.int

Popesko, P., Rajtova, V., Horak, J., 1992. Colour atlas of small laboratory animals volume 1 : rabbit, guinea pig, London.

Porter, D.G., 1972. Myometrium of the pregnant guinea pig: the probable importance of relaxin. *Biol. Reprod.* 7, 458-464.

Posière, S., 2002. Récolte de la semence de chat (*Felis catus*) par electroejaculation et par dissection de l'épididyme - Comparaison des méthodes - Essai de cryoconservation avec un dilueur canin, Ecole Nationale Vétérinaire de Maison Alfort.

Poyser, N.L., 1972. Production of prostaglandins by the guinea-pig uterus. *J Endocrinol* 54, 147-159.

R

Rall, W.F., Fahy, G.M., 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 313, 573-575.

Ramirez Baca, O., 2009. Identificación de los múltiples orígenes del cuy doméstico (*Cavia porcellus*): un estudio filogeográfico utilizando ADN mitocondrial. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.

Ratto, M.H., Singh, J., Huanca, W., Adams, G.P., 2002. Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology* 60, 1645-1656.

Reed, M., Hounslow, W.F., 1971. Induction of ovulation in the guinea-pig. *J Endocrinol* 49, 203-211.

Rowlands, I.W., 1949. Post-partum breeding in the guinea-pig. *J Hyg* 47, 281-287.

Rowlands, I.W., Weir, B.J., 1974. *The Biology of Hystricomorph Rodents*, London.

S

Saragusty, J., Arav, A., 2011. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141, 1-19.

Shi, F., Mochida, K., Suzuki, O., 2000a. Development of embryos in superovulated guinea pigs following active immunization against the inhibin alpha-subunit. *Endocrine Journal* 47, 451-459.

Shi, F., Ozawa, M., Komura, H., 2000b. Induction of superovulation by inhibin vaccine in cyclic guinea-pigs. *Journal of Reproduction and Fertility* 118, 1-7.

Solau Poissonnet, C., 2004. Principales maladies du lapin, du cobaye du chinchilla, du hamster et du rat de compagnie, Ecole Nationale Vétérinaire de Maison Alfort.

Stewart, R.A., Pelican, K.M., Brown, J.L., Wildt, D.E., Ottinger, M.A., Howard, J.G., 2010. Oral progestin induces rapid, reversible suppression of ovarian activity in the cat. *Gen Comp Endocrinol* 166.

Stockard, C.R., Papanicolaou, G.N., 1917. A Rhythmical "Heat Period" in the Guinea-Pig. *Science* 46, 42-44.

Sugawara, I., Udagawa, T., Aoki, T., Mizuno, S., 2009. Establishment of a guinea pig model of latent tuberculosis with GFP introduced *Mycobacterium tuberculosis*. *Tohoku J Exp Med*, 257-262.

Suzuki, O., Koura, M., Noguchi, Y., Takano, K., Yamamoto, Y., Matsuda, J., 2003. Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotrophin in guinea pigs based on follicular waves and FSH-receptor homologies. *Molecular Reproduction and Development* 64, 219-225.

Suzuki, O., Kurosawa, S., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Mochida, K., Matsuda, J., Ogura, A., Asano, T., 2000. Superovulation and embryo transfer in the guinea pig. *Theriogenology* 53, 508.

Suzuki, O., Ogura, A., Asano, T., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Oike, M., 1993. Development of Preimplantation Guinea-pig Embryos in Serum-free Media. *Reprod Fertil Dev* 5.

T

Terril, L.A., Clemons, D.J., Suckow, M.A., 1998. The laboratory guinea pig.

Tibary, A., Anouassi, A., Khatir, H., 2005. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology* 64, 618-638.

Tso, E.C., Tam, W.H., 1977. The effect of continuous treatment with prostaglandin F-2alpha on oestrous cycle length and corpus luteum regression in hysterectomized guinea-pigs. *J Reprod Fertil* 50, 335-336.

U

Ueda, H., Kosaka, T., Takahashi, K.W., 1998. Intrapерitoneal insemination of the guinea pig with synchronized estrus induced by progesterone implant. *Exp Anim* 47, 271-275.

V

Vajta, G., Kuwayama, M., 2006. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* 65, 236-244.

Vivanco, W., Angeles, V., Muscari, J., Chavez, J., 1977. Colección, evaluación y conservación del semen de cuy doméstico (*Cavia porcellus*), Estación Experimental Agropecuaria La Molina. UNA La Molina, Lima.

Vivanco, W., Huaman, E., Leon, S., Nunez, T., Grégoire, A., Ponce, D., Alvarado, E., Asparrin, M., 2012. Comparison between equine chorionic gonadotropin and porcine follicle stimulating hormone for in vitro production of embryos in alpacas (*Vicugna pacos*) showing natural luteal phase after induction of ovulation *Reproduction, Fertility and Development*, CSIRO Publishing 23, 182-182.

Voelkel, S., Hu, Y., 1992. Use of ethylene glycol as a cryoprotectant for bovine embryos allowing direct transfer of frozen-thawed embryos to recipient females. *Theriogenology* 37, 687-697.

W

Wagner, J.E., Manning, P.J., 1976. *The Biology of the Guinea Pig*.

Whittingham, D.G., Leibo, S.P., Mazur, P., 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science* 178, 411-414.

Wilmut, I., Rowson, L.E., 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet Rec* 92, 686-690.

Wisel, M.S., Datta, J.K., Saxena, R.N., 1991. Changes in the levels of protein and steroid hormones in the plasma and steroid hormone receptors in the uteruses of normal cycling guinea pigs. *Steroids* 56, 148-153.

Wolfensohn, S., Lloyd, M., 2003. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, third edition, Oxford.

Woods, E.J., Benson, J.D., Agca, Y., Critser, J.K., 2004. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology* 48, 146-156.

Y

Young, L.E., Sinclair, K.D., Wilmut, I., 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 3, 155-163.

Young W.C., Dempsey E.W., Hacquist C.W., J.L., B., 1939. Sexual behavior and sexual receptivity in the female guinea pig. *Journal of Comparative Psychology* 27, 49.

Young, W.C., 1937. The vaginal smear picture, sexual receptivity, and the time of ovulation in the guinea pig. *The Anatomical Record* 67, 305-325.

Young, W.C., Dempsey, E.W., Myers, H.I., 1935. Cyclic reproductive behavior in the female guinea pig. *Journal of Comparative Psychology* 19, 313-335.

Young, W.C., Dempsey, E.W., Myers, H.I., Hacquist, C.W., 1938. The ovarian condition and sexual behavior in the female guinea pig. *The Anatomical Record* 63, 457.

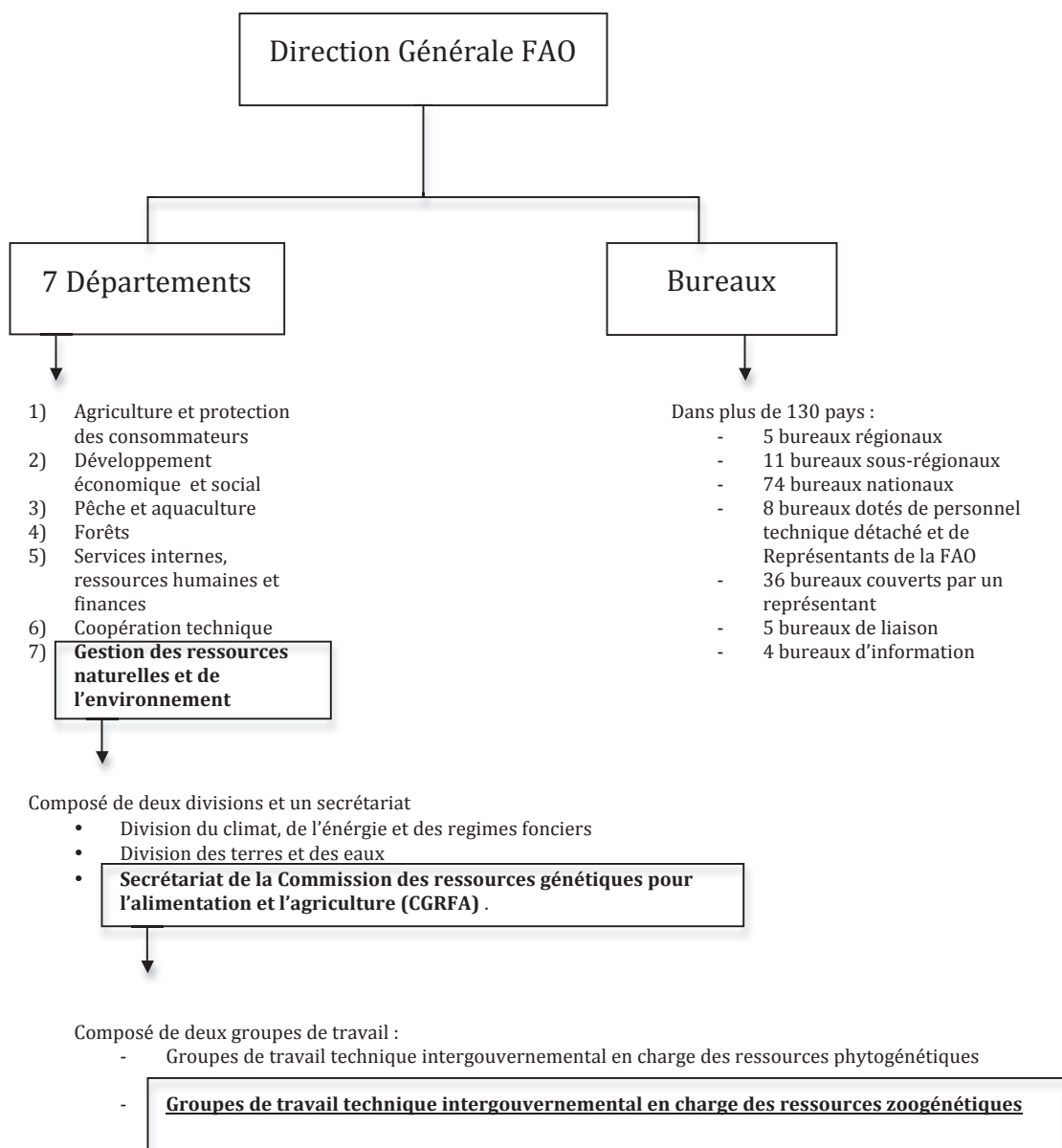
Z

Zaldívar, A.M., 1986. Estudio de la edad de empadre de cuyes hembras (*Cavia porcellus*) y su efecto sobre el tamaño y peso de camada. . UNA La Molina, Lima Peru, p. 119.

Zhao, J., Wicher, V., Burger, R., Schafer, H., Wicher, K., 1992. Strain and age-associated differences in lymphocyte phenotypes and immune responsiveness in C4-deficient and Albany strains of guinea-pigs. *Immunology* 77, 165-170.

ANNEXES

**ANNEXE 1 PLACE DU GROUPE DE TRAVAIL TECHNIQUE
INTERGOUVERNEMENTAL SUR LES RESSOURCES
ZOOGÉNÉTIQUES AU SEIN DE L'ORGANISATION
GLOBALE DE LA FAO²**



² La FAO est une organisation intergouvernementale qui compte 191 Etats membres, deux membres associés et une organisation membre, l'Union européenne.

ANNEXE 2 CLASSIFICATION ZOOLOGIQUE DE *CAVIA PORCELLUS*

Classe : Mammifères (*Mammalia*)

Infra-classe: Euthériens ou placentaires (*Eutheria Placentalia*)

Ordre : Rongeurs (*Rodentia* ou *Simplicidentés*)

Sous ordre: Hystricomorphes (*Hystricomorpha*)

Super famille: Cavioidés (*Cavioidae*)

Famille: Caviidés (*Caviidae*)

Sous famille: Caviinés (*Caviinae*)

Genre: Cobaye (*Cavia*)

Espèce: Cobaye domestique ou Cochon d'Inde (*Cavia porcellus*)

Le cochon d'Inde domestique appartient à la classe des Mammifères (*Mammalia*), et à l'infra-classe des Euthériens (*Eutheria*) ou Placentaires (*Placentalia*) dont l'embryon se développe complètement dans l'utérus où il est nourri par l'intermédiaire du placenta. Le super-ordre des Glires regroupe les ordres des Rongeurs (*Rodentia* ou *Simplicidentés*) et des Lagomorphes (*Duplicidentés*). Les Rongeurs possèdent une seule paire d'incisives par mâchoire (*Simplicidentés*) à la différence des Lagomorphes chez lesquels on observe une seconde incisive de plus petite taille en arrière de la première, au niveau de la mâchoire supérieure (*Duplicidentés*).

Le sous-ordre des Hystricomorphes (*Hystricomorpha*) regroupe les Rongeurs dont le masséter médial est de taille supérieure au masséter latéral ; cette particularité est associée à un développement considérable du trou infraorbitaire et à un soulèvement important de l'arc zygomatique. Parmi les rongeurs Hystricomorphes, on trouve également les chinchillas, les porcs-épics, les ragondins ou encore un certain nombre de rats. Les Hystricomorphes diffèrent des Myomorphes (*Myomorpha*) ; comme la gerbille, le hamster, la souris et le rat ; en ce sens qu'ils possèdent une membrane cellulaire qui recouvre l'orifice vaginal excepté au moment de l'œstrus et de la parturition (le ragondin fait exception). La période de gestation des Hystricomorphes est relativement longue (plus de cent jours chez la plupart d'entre eux) avec un état de développement précoce des petits à la naissance.

La super famille des Cavioidés (*Cavioidae*) comprend entre autres l'Agouti doré (*Dasyprocta aguti*) et le Cabiai ou Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). La famille des Caviidés

(*Caviidae*) est la famille des cobayes au sens large. Leur formule dentaire est (i1/1 c0/0pm1/1 m3/3) par demi mâchoire soit 20 dents au total. Les Caviidés se divisent en deux sous-familles :

- les Dolichotinés (*Dolichotinae*) comprenant un genre unique : *Dolichotis*, dont le représentant le plus connu est le Mara ou Lièvre de Patagonie (*Dolichotis patagonum*).
- les Caviinés (*Caviinae*) ; regroupant plusieurs genres de cobayes au sens strict.

Les Caviinés (*Caviinae*) présentent une grosse tête avec des oreilles courtes, des membres courts avec des ongles courts, une queue atrophiée et une seule paire de mamelles.

Le genre *Cavia* regroupe les sept espèces de cobayes sauvages que l'on peut rencontrer en Amérique du Sud (*Cavia tschudii*, *Cavia aperea*, *Cavia guianae*, *Cavia anolaimae*, *Cavia nana*, *Cavia fulgida* et *Cavia magna*) et le cobaye domestique : *Cavia porcellus*. La différence principale entre les espèces sauvages et l'espèce domestique se situe au niveau de l'appareil digestif : on observe chez le cobaye domestique un fort développement de l'estomac et de l'intestin grêle, associé à une régression du cæcum et du gros intestin. (Nowak, 1999) (André, 2006) (Myers et al., page consultée le 9 février 2012) (Rowlands et Weir, 1974)

**ANNEXE 3 COMPOSITION DE L'ALIMENT COMMERCIAL POUR COCHONS
D'INDE REPRODUCTEURS ENRICHIS EN VITAMINES**

**CARACTERISTICAS NUTRICIONALES
DE LOS ALIMENTOS BALANCEADOS**

La Molina PARA CUYES

NUTRIENTES	INICIO	CRECIM.	ACAB.	REP.
ENERGÍA DIGESTIBLE, Mcal/kg., Min	3.0	2.8	2.7	2.9
PROTEÍNA, % Min.	20	18	18	19
FIBRA, % Min.	7.0	8.0	10.0	10.0
CALCIO, % Máx.	0.8	0.8	0.8	0.8
FÓSFORO, Total% Min.	0.8	0.8	0.8	0.8
SODIO, % Min.	0.2	0.2	0.2	0.2
LISINA, % Min.	0.84	0.84	0.84	0.84
METIONINA-CISTINA, % Min.	0.60	0.60	0.60	0.60
ARGININA, % Min.	1.2	1.2	1.2	1.2
TREONINA, % Min.	0.6	0.6	0.6	0.6
TRIPTÓFANO, % Min.	0.18	0.18	0.18	0.18

CARACTERÍSTICAS

DIAMETRO PELLET (mm)	3.0	4.5	4.5	4.5
LONGITUD PELLET (mm)	8.0	12.0	12.0	12.0
HUMEDAD %	10	10	10	10

INGREDIENTES PRINCIPALES

Maíz amarillo, torta de soya 48, pasta de algodón, torta de girasol, subproductos de agroindustria, heno de alfalfa, carbonato de calcio, fosfato dicálcico, aminoácidos sintéticos, promotores orgánicos, vitaminas, minerales, cloruro de sodio, antifúngico, antioxidantes

- Mantener el alimento en un lugar seco y ventilado.
- El alimento proporciona la cantidad adecuada de fibra.
- Suministrar al animal agua en forma diaria, en especial en la estación de verano.
- Este alimento puede ser consumido en las diferentes etapas productivas (gazapos, recría y reproductoras).

INFORMES

PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN
Y PROYECCIÓN SOCIAL EN ALIMENTOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA

Av. La Molina s/n - La Molina
Telefax: 348-1524
349-5647 349-5669 Anexos: 368 / 370
proalimentos@la.molina.edu.pe

La Molina

CUYES



UNIVERSIDAD
NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA



**ALIMENTOS
BALANCEADOS**

"La Molina"
PARA CUYES

Formulación Científica



FACULTAD DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE INVESTIGACIÓN Y
PROYECCIÓN SOCIAL EN ALIMENTOS
PLANTA DE ALIMENTOS BALANCEADOS

LIMA - PERU

**ANNEXE 4 INTENTION DE CRYOCONSERVER LES LIGNÉES PRÉCIEUSES
POUR LA RECHERCHE BIOMÉDICALE DE
L'INSTITUT PASTEUR**



INSTITUT PASTEUR

Paris, le 1^{er} Octobre 2009

*Start Up Immunotherapix
Animalerie Centrale*

Monsieur Thierry Joly
ISARA-Lyon
23, rue Jean Baldassini
69364 LYON CEDEX 07

Objet : Collaboration Institut Pasteur – ISARA dans le but de cryoconserver les lignées de cobayes consanguines S13 et BIO AD

Cher Monsieur,

Nous hébergeons actuellement au sein de l'Animalerie Centrale de l'Institut Pasteur deux lignées de cobayes consanguines (lignées BIOAD et S13) qui ont prouvé leur utilité dans l'étude de la Tuberculose.

En effet, le cobaye, contrairement à la souris, est très sensible aux mycobactéries dans la mesure où 1 à 2 unités formant colonies (c.f.u.) de *M. tuberculosis* suffisent à l'infecter (Smith et al 1966, Riley et al 1959). De plus, il développe des lésions histologiques et des réactions d'hypersensibilité de type retardé semblables à celles observées chez l'homme. Par contre il n'existe que quelques lignées consanguines de cobayes (Altman et al 1979). Quant aux autres rongeurs, rats et hamsters, ils ne sont pas plus sensibles que les souris à la tuberculose et n'en ont aucun des avantages.

Ces deux lignées ne sont pour l'instant plus utilisées à l'Institut Pasteur, mais ne sont pas non plus disponibles commercialement, à notre connaissance la lignée BIOAD n'existe plus ailleurs. Nous souhaiterions donc étant donné leur intérêt scientifique rappelé ci-dessus, pouvoir les conserver sous forme de stocks congelés pour pouvoir les réutiliser dans de futurs projets.

Le Centre des Opérations Sanitaires de l'Animalerie Centrale (COSAC) cryoconserve en routine les lignées de souris pour l'ensemble des scientifiques de l'Institut Pasteur mais ne possède pas les compétences pour cryoconserver des lignées de cobayes.

Étant donné vos compétences dans ce domaine, nous souhaiterions établir une collaboration avec votre équipe de façon à sécuriser ces deux lignées qui pourraient se révéler extrêmement utiles pour l'ensemble de la communauté scientifique.

Dans l'attente de votre réponse, veuillez agréer monsieur nos sincères salutations,


Gilles MARCHAL
 Immunotherapix


 Marion BERARD
 Animalerie Centrale

Institut Pasteur
 25-28 rue du Docteur Roux
 75724 Paris Cedex 15
 Téléphone : +33 (0)1 40 61 39 09
 Télécopie : +33 (0)1 45 68 66 34

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles à comité de lecture :

- **Grégoire Anne**, Allard Aurélie, Leon Trinidad Silvia, Huaman Fuertes Ethel, Bérard Marion, Buff Samuel, Joly Thierry, « Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*) » *Theriogenology* Volume 78, Issue 4, 1 September 2012, Pages 842–847
- **Grégoire Anne**, Allard Aurélie, Leon Trinidad Silvia, Huaman Fuertes Ethel, Bérard Marion, Buff Samuel, Joly Thierry, « Production and cryoconservation of embryos in guinea-pig (*Cavia porcellus*) », article soumis à *Theriogenology* (juillet 2012)
- **Grégoire A.**, Peredo F., León S., Huamán E., Allard A. and Joly T., « First successful pregnancy after embryo transfer into synchronized females in guinea-pig (*Cavia porcellus*) », *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), CSIRO Publishing, 170-170
- Vivanco W., Huaman E., Leon S., Nunez T., **Grégoire A.**, D. Ponce, E. Alvarado and M. Asparrin, « Comparison between equine chorionic gonadotropin and porcine follicle stimulating hormone for in vitro production of embryos in alpacas (*Vicugna pacos*) showing natural luteal phase after induction of ovulation », *Reproduction, Fertility and Development* 23(1), CSIRO Publishing, 182-182

Publication professionnelle :

- **Grégoire Anne**, Huaman Fuertes Ethel, Silva Arce Rosa Maria, Leon Trinidad Silvia, Joly Thierry, « Crioconservación de los recursos genéticos del cuy (*Cavia porcellus*): producción y congelación de embriones », *Bulletin de l'Institut Français d'Etudes Andines*, 2010, n°39 (1) : 185-188

Colloques avec actes

- internationaux :

- **Anne Grégoire**, Aurélie Allard, Silvia Leon Trinidad, Ethel Huaman Fuertes, Thierry Joly, « A simple method for estrus synchronization of guinea-pig (*Cavia porcellus*) », 27th Scientific Meeting of the AETE, Association Européenne de Transfert Embryonnaire, Chester, England, 9-10 septembre 2011 (Abstract et Poster)
- **Anne Grégoire**, Aurélie Allard, Frank Peredo Arenas, Silvia Leon Trinidad, Ethel Huaman Fuertes, Thierry Joly « First Successful Pregnancy after Embryo Transfer into Synchronized Females in Guinea Pig (*Cavia porcellus*) », 2012 IETS Annual Conference, International Embryo Transfer Society, Phoenix, United States of America, 7-11 janvier 2012 (Abstract et Poster)

- **Grégoire A.**, Allard A., Huamán E., León S., Silva R.M., Buff S., Berard M., Joly T, «Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*) », 5th Asian Federation of Laboratory Animal Science Association Congress (AFLAS 2012), 10-12 octobre 2012 Bangkok, Thaïlande (Abstract et Poster)

- nationaux :

- **Anne Grégoire**, Aurélie Allard, Silvia Leon Trinidad, Ethel Huaman Fuertes, Thierry Joly, « Cryoconservation de la biodiversité du cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) », COLLOQUE FRB : Les Ressources Génétiques face aux nouveaux enjeux environnementaux, économiques et sociétaux, Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité, Montpellier, France, 20-21-22 septembre 2011 (Abstract et Poster)

- **Grégoire A.** , Allard A., Huamán E., León S., Silva R.M., Buff S., Berard M., Joly T., « Le contrôle du cycle œstral chez le cobaye(*Cavia porcellus*) », 38^{ème} Colloque AFSTAL, Marseille, 6-8 juin 2012, Marseille, France.



Control of the estrous cycle in guinea-pig (*Cavia porcellus*)

A. Grégoire^{a,*}, A. Allard^b, E. Huamán^c, S. León^{a,c}, R.M. Silva^c, S. Buff^{de}, M. Berard^{df},
T. Joly^b

^a Institut Français d'Etudes Animales, UMR1717 CNRS/MAE, Lima 18, Peru

^b Université de Lyon, VetAgro Sup/InraU Lyon, Unité ICE-Cryobio, 69 243 Lyon, France

^c CIETE - Ministry of Agriculture/La Molina, National Agrarian University, Lima, Peru

^d Institut Pasteur, Anatomie Centrale, 75 724 Paris, France

Received 31 January 2012; received in revised form 22 March 2012; accepted 24 March 2012

Abstract

The aim of this work was to look for a simple method to obtain synchronized ovulation in guinea pigs under farming conditions while respecting animal welfare. The luteolytic activity of three different prostaglandins F₂α (PGF₂α) analogs (D-cloprostenol, D,L-cloprostenol and laprostenol) and a daily treatment with oral progestagen (altrenogest) was tested successively at different stages of the estrous cycle on the same group of females during a period of 8 mo. The estrous cycle length was not modified by the administration of PGF₂α analogs, whatever the stage of the estrous cycle when the treatment was initiated. Our results led us to reject the use of PGF₂α analog to induce practical synchronization of the estrus in this species. In females (n = 29), given 15 days with altrenogest (0.1 mL po once a day), ovulation occurred 4.43 ± 0.13 days after the end of the treatment. Altrenogest treatment was followed by mating. No negative impacts of the treatment on the pregnancy rates, delivery rates and litter sizes were observed. This standard method of guinea-pig estrus synchronization is less stressful for the animals compared to techniques using progesterone tubing.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Estrus; Synchronization; Guinea Pig; Altrenogest; Prostaglandin-F₂α

1. Introduction

The guinea-pig (*Cavia porcellus*), together with the camelids and the dog, was domesticated in the Andes [1] where it still plays an important role in highland societies as a source of protein for many low income indigenous people [2]. Peru is the country with the highest population and consumption of guinea pigs. About 16, 500 tons of meat are produced there every year, out of a constant population of about 22 million animals raised essentially upon family production sys-

tems [3]. In this part of the world, guinea pigs are also involved in many folklore traditions, exchanged as gifts and used in traditional medicine to diagnose diseases [4]. The conservation of native genetic diversity is a longterm issue.

The guinea-pig has also been used commonly since the late 18th century as a laboratory animal [5]. It played a major role in the establishment of the germ theory in the late 19th century, in particular through the studies of Robert Koch on tuberculosis [6]. Despite its important role in laboratory animal science, the use of guinea pigs has decreased significantly since the middle of the 20th century, mostly because mice and rats have replaced them. In 2007, guinea pigs represented only

* Corresponding author. Tel: (511) 4476070; fax: (511) 4457650.
E-mail address: anne.gregoire@gmail.com (A. Grégoire).

1 Production and successful in vitro survival of cryopreserved 2 embryos in Guinea Pig (*Cavia porcellus*) 3

4 A. Grégoire^{a*}, A. Allard^b, E. Huamán^c, S. León^{a,c}, R.M. Silva^c, S. Buff^b,
5 M. Berard^d, T. Joly^b

6 ^a Institut Français d'Etudes Andines - UMIFRE17 CNRS/MAEE, Lima 18, Peru

7 ^b Université de Lyon, VetAgro Sup, UPSP 2011-03-101 ICE, IsaraLyon 69243 Lyon, France

8 ^c CIETE - Ministry of agriculture / La Molina National Agrarian University Lima, Peru

9 ^d Institut Pasteur, Animalerie Centrale, 75 724 Paris, France

10 Abstract

11 The aims of this work were first to optimize the superovulation treatment in Guinea pig using hMG
12 and human recombinant-FSH (r-FSH) and second, to test two embryo cryopreservation procedures
13 (slow-freezing and vitrification) using different cryoprotective agents. After a 15 days
14 synchronization treatment of 0,1 mL altrenogest p.o. s.i.d., two superovulation treatments were
15 compared : 3 injections of SIU hMG injected at 24 hours interval and 6 injections of SUI human
16 recombinant-FSH injected at 12 hours interval. On day 4.5 after ovulation, 4.4±1.5 and 3.0±1.9
17 freezable embryos were recovered respectively with hMG treatment and r-FSH treatment in
18 comparison of 0.8±0.4 with control group (no superovulation). Slow-freezing of good quality
19 embryo (8-16 cells to morulae) in 1.5M ethylene glycol + 0.2M trehalose resulted in a 70.3% embryo
20 survival rate after 48 hours of in vitro culture. For vitrification group, 41.7% of the embryos were
21 able to develop to morula or blastocyst stage after warming.

23 1. Introduction

24 The guinea pig (*Cavia porcellus*) was domesticated between 5,000 and 7,000 years ago in the Andes
25 (1) where it is still raised primarily for food and represents a source of protein for many low-income
26 indigenous people (2). In Peru, the country with the highest population and consumption of guinea
27 pigs, a constant population of about 22 million animals raised essentially upon family production

CSIRO PUBLISHING Books Journals About Us Shopping Cart You are here: Journals > Reproduction, Fertility and Development

Reproduction, Fertility and Development

Vertebrate Reproductive Science & Technology

Search

This Journal: [Advanced Search](#)

Journal Home
About the Journal
Editorial Board
Contacts

Content
Online Early
Current Issue
Just Accepted
All Issues
Special Issues
Research Fronts
Sample Issue

For Authors
General Information
Instructions to Authors
Submit Article
Open Access

For Referees
Referee Guidelines
Review Article

For Subscribers
Subscription Prices
Customer Service
Print Publication Dates

e-Alerts
Subscribe to our email Early Alert or feeds for the latest journal papers

Connect with us
 

Affiliated Societies
RFD is the official journal of the International Embryo Transfer Society and the Society for Reproductive Biology

Article

« Previous | Next » Contents Vol 24(1)

115 FIRST SUCCESSFUL PREGNANCY AFTER EMBRYO TRANSFER INTO SYNCHRONIZED FEMALES IN GUINEA PIG (*CAVIA PORCELLUS*)

A. Grégoire^A, F. Peredo^C, S. León^{A,B}, E. Huamán^B, A. Allard^D and T. Joly^D

^A Institut Français d'Études Andines, UMIFRE17 CNRS/MAEE, Lima, Peru;
^B Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones, Ministry of Agriculture-La Molina National Agrarian University, Lima, Peru;
^C Hospital Veterinario Eban, Lima, Peru;
^D Université de Lyon, VetAgroSup/SantLyon, Unité ICE-Cybio, Lyon, France

Reproduction, Fertility and Development 24(1): 170-170 <http://dx.doi.org/10.1071/RDz26-1A6115>
 Published: 4 December 2011

Abstract

The guinea pig (*Cavia porcellus*) has been used as a laboratory animal since the late 18th century and still remains essential in many research areas. It also plays an important role in the Andes societies as a source of protein for many low-income highlanders and as part of rituals and traditional medicines. Thus, the conservation of genetic diversity is a long-term issue that must be considered. To establish an embryo cryobank, it is necessary to develop a method of embryo transfer. Up to now no pregnancies after surgical embryo transfer into synchronized females have been reported in guinea pigs. The aim of this work was to design a standard embryo transfer method in this species. Eight normally cycling female guinea pigs from the Maria-Marcela Farm (Puerto Piedra, Peru), weighing from 1 to 1.5 kg, were used in this study. Females were housed under farming conditions and fed on commercial pellets and tap water *ad libitum*. Three donor females were superovulated using 15 IU of human menopausal gonadotrophin (hMG, Massona[®], Buenos Aires, Argentina) and mated as soon as the vagina opened. Copulatory plug was observed and vaginal smears were taken to guarantee successful mating. Thirty-eight embryos were collected between Days 3.5 and 4.5 after ovulation at the morula and early blastocyst stages. Five recipient females were synchronized by a daily 0.1-mL dose of altrenogest (Regumate[®] Equine, Intervet, France) per os by means of a syringe for 15 days. Two embryos were transferred into each uterine horn by laparotomy at Day 3.5 and 4.5 after ovulation. Two types of pipettes were tested for embryo transfer: pulled glass pipettes approximately 0.3 mm in diameter in 2 female recipients and plastic open pulled straws (OPS, MiniLab[®], Germany) in 3 recipients. Pregnancy diagnosis was detected by observation of no return to oestrus at Day 16 and confirmed by ultrasonography. None of the 3 OPS-transferred females were pregnant. One of the 2 pulled glass pipette-transferred females was diagnosed as pregnant and delivered 2 stillbirths (one per uterine horn). There were no postsurgical complications and the females undergoing embryo transfer returned to normal reproduction. We demonstrated that a classic surgical embryo transfer method is possible under field conditions to obtain pregnancy in this species. We suggest further studies using glass pipettes, which allow a more precise embryo deposition. Future experiments will incorporate the transfer of frozen-thawed embryos on a larger scale.

Legal & Privacy | Contact Us | Help

© CSIRO 1996-2012

Grégoire A., Peredo F., León S., Huamán E., Allard A. and Joly T., « First successful pregnancy after embryo transfer into synchronized females in guinea-pig (*Cavia porcellus*) », *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), CSIRO Publishing, 170-170

CSIRO PUBLISHING
Books Journals About Us Shopping Cart
You are here: Journals > Reproduction, Fertility and Development

Reproduction, Fertility and Development

Vertebrate Reproductive Science & Technology

Search

[This journal](#) GO

[Advanced Search](#)

- Journal Home
 - [About the Journal](#)
 - [Editorial Board](#)
 - [Contents](#)
- Content
 - [Online Early](#)
 - [Current Issue](#)
 - [Just Accepted](#)
 - [All Issues](#)
 - [Special Issues](#)
 - [Research Fronts](#)
 - [Sample Issue](#)
- For Authors
 - [General Information](#)
 - [Instructions to Authors](#)
 - [Submit Article](#)
 - [Open Access](#)
- For Referees
 - [Referee Guidelines](#)
 - [Review Article](#)
- For Subscribers
 - [Subscription Prices](#)
 - [Customer Service](#)
 - [Print Publication Dates](#)
- e-Alerts

Subscribe to our email [Early Alert](#) or [RSS feeds](#) for the latest journal papers.
- Connect with us
- Affiliated Societies

RFD is the official journal of the [International Embryo Transfer Society](#) and the [Society for Reproductive Biology](#).

Article
<< Previous | Next >>
Contents Vol 23(1)

159 COMPARISON BETWEEN EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN AND PORCINE FOLLICLE STIMULATING HORMONE FOR *IN VIVO* PRODUCTION OF EMBRYOS IN ALPACAS (*VICUGNA PACOS*) SHOWING NATURAL LUTEAL PHASE AFTER INDUCTION OF OVULATION

W. Vivanco^A, E. Huaman^B, S. Leon^B, T. Nunez^B, A. Gregoire^B, D. Ponce^B, E. Alvarado^B and M. Asparrin^C

^AVivanco Internacional SAC, Lima, Peru;
^BLa Molina National Agrarian University, Lima, Peru;
^CMalkin Alpaca Farm, Puno, Peru

Reproduction, Fertility and Development 23(1): 182-182 <http://dx.doi.org/10.1071/RD23n1Ab159>
 Published: 7 December 2010

Abstract

Alpacas are animals with induced ovulation, and they show high individual variation in the symptoms, duration, and regularity of oestrus or period of female receptivity to males; their follicular phase does not end in ovulation and subsequent luteal phase unless an external stimulation such as copulation or exogenous application of an ovulation-inducing hormone is applied. The objective of the present study was to compare the use of eCG v. porcine (p)FSH as superovulatory hormones for the *in vivo* production of embryos in alpacas that were selected as being receptive to the male and were treated with an ovulation-inducing hormone to generate a luteal phase. Twenty adult (3 to 5 years old) female alpacas, located at Malkin, Puno, Peru (at 4100 m elevation), were used for the trial. A group of females was exposed to males to test for breeding receptivity; 20 alpacas were receptive, adopting copulatory position. Each of the selected females received 3.75 mg of LH IM (Lutropin[®], Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada). Day 0 was then considered the date of LH injection. The 20 alpacas were then distributed into 2 treatments: Treatment 1 (T1 = 10 alpacas) received on Day 2, 1000 IU of eCG IM (Pregnecol[®], Bioniche Animal Health) and on Day 7, a dose of PGF_{2α} IM (0.263 mg of cloprostenol; Ciclar[®], Andeanvet-Zoovet, Lima, Peru). Treatment 2 alpacas (T2 = 10 alpacas) received from Day 2 and up to Day 5, at 12-h interval, decreasing doses of pFSH IM (100 mg; Foltropin V[®], Bioniche Animal Health) for 4 days, and on Day 7, a dose of PGF_{2α} IM (0.263 mg of cloprostenol; Ciclar[®], Andeanvet-Zoovet). All alpacas from T1 and T2 were mated twice with fertile males, the first mating at 24 h after the injection of PGF_{2α} and the second at 12 h after the first mating. All females received a dose of GnRH IM (0.0084 mg of buserelein; Buserelein[®], Andeanvet-Zoovet) at time of first mating. The embryos in both treatments were collected 6.5 days after the first mating by nonsurgical transcervical embryo flushing. There were no significant differences in the mean number of blastocysts collected per treatment ($P > 0.05$), being 3.0 ± 2.87 blastocyst for T1 and 1.6 ± 2.57 for T2. The number of blastocysts per treatment was 30 and 16 for T1 and T2, respectively. The results show that superovulatory treatment with eCG is more effective for the production of viable blastocysts than treatment with pFSH in alpacas treated for superovulation during the luteal phase.

[Legal & Privacy](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

© CSIRO 1996-2012

Vivanco W., Huaman E., Leon S., Nunez T., **Grégoire A.**, D. Ponce, E. Alvarado and M. Asparrin, « Comparison between equine chorionic gonadotropin and porcine follicle stimulating hormone for *in vitro* production of embryos in alpacas (*Vicugna pacos*) showing natural luteal phase after induction of ovulation », *Reproduction, Fertility and Development* 23(1), CSIRO Publishing, 182-182



Bulletin de l'Institut Français d'Études Andines, 2010, 39 (1), 185-188

Crioconservación de los recursos genéticos del cuy (*Cavia porcellus*): producción y congelación de embriones

Anne Grégoire
Thierry Joly
Ethel Huamán Fuertes
Rosa María Silva Arce
Silvia León Trinidad

El cuy (*Cavia porcellus*) es un animal emblemático de la diversidad genética de los animales domésticos de los Andes. Como tal, la conservación de la biodiversidad intraespecífica del cuy es primordial, tanto por ser una fuente de proteínas importante para los pobladores andinos como para conservar la herencia simbólica del cuy, las prácticas culturales relacionadas con su crianza, como animal de consumo y en medicina tradicional. Por otro lado, los programas de selección llevados a cabo desde los años 1970 por el Instituto Nacional de Investigación Agraria del Perú dieron lugar a una nueva diversidad genética orientada hacia la

¹ IFEA, casilla TB-1217, Lima 18, Perú; UPSP École Nationale Vétérinaire de Lyon/ISARA-Lyon : Unité de recherche CRYOBIO. E-mail: anne.gregoire@gmail.com

² UPSP École Nationale Vétérinaire de Lyon/ISARA-Lyon : Unité de recherche CRYOBIO. E-mail: tjoly@isara.fr

³ Universidad Nacional Agraria La Molina. Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones-CIETE (Consejo Ministerial de Agricultura-Universidad Nacional Agraria La Molina). E-mails: ethelhi@gmail.com; rosamariasilva.arce@gmail.com; sleont@gmail.com

Anne Grégoire

formación de animales más productivos. Más aún el uso del cuy como un animal de laboratorio ha sido un valioso aporte andino para la investigación biomédica, particularmente en enfermedades como la tuberculosis o como animal modelo en la investigación para el desarrollo de las técnicas de reproducción asistida en humanos. El mayor éxito para conservar una especie es a través de las formas *in situ* y *ex situ* complementarias. El objetivo de nuestro proyecto de investigación es la elaboración de protocolos de producción y de congelación de embriones que permitan lograr una conservación *ex situ* de los recursos genéticos de esta especie, vía el recurso hembra. Las etapas necesarias a la concretización de este proyecto son el control de la producción de embriones, gracias a tratamientos hormonales de sincronización de los ciclos estrales y de superovulación de las hembras, y la crioconservación de los embriones obtenidos. Los protocolos eficaces para el control del ciclo estral del cuy (*Cavia porcellus*) son escasos. La sincronización de celos de *Cavia porcellus* es comúnmente obtenida en laboratorio usando un implante subcutáneo de progesterona similar al que se usa en contracepción humana (tubo de silicona de 1 cm de largo) durante 4 semanas. La hembra entra en celos 5-6 días luego de remover el implante (Lieda et al., 1988). Sin embargo el uso de este método es costoso y complicado de implementar fuera de las condiciones de asepsia de un laboratorio (el implante se coloca bajo anestesia general realizando un corte en la piel); además plantea problemas de bienestar animal. En nuestro caso la producción de embriones debe realizarse en condiciones de crianza en granja.



Figura 1 – Revisión diaria de aparición de celos en las hembras

Foto: Thierry Joly

186

Producción y congelación de los embriones del cuy (Cavia porcellus)

La primera etapa para la producción de embriones es la sincronización de los celos de las hembras. Para tal efecto se ha utilizado un análogo de progesterona de administración oral, el altrenogest, producto usado comúnmente en la sincronización de celo de cerdas y yeguas. En un ciclo natural, la fase lútea corresponde a la presencia de un cuerpo lúteo activo en el ovario, el cual secreta progesterona y bloquea una nueva ovulación. Cuando el cuerpo lúteo regrésiona naturalmente, la secreción de progesterona cae y el retrocontrol negativo que ejerce sobre el hipotálamo desaparece. Entonces se estimula la secreción de FSH y LH por la hipófisis, lo que provoca el desarrollo de una nueva onda folicular y la ovulación. Al mantener alto el nivel de progesterona en el organismo de las hembras, se bloquean las nuevas ovulaciones consecutivas de la regresión de los cuerpos luteos, con el fin de obtener el inicio de un nuevo ciclo al retirar el tratamiento. *Cavia porcellus* presenta una longitud de ciclo de 16 días en promedio (con 12-13 días de fase lútea). Por ello se decidió aplicar la hormona por 20 días consecutivos para sincronizar todos los animales. Todas las hembras presentaron síntomas de celos a los 4-5 días después del retiro del tratamiento. Se comprobó la aparición de celos por observación de la apertura de la membrana vaginal así como el comportamiento de las hembras en presencia de un macho: al aceptar la monta; y, entre hembras, al presentar agresividad para acceder al macho. Los primeros resultados muestran que la simulación de una fase lútea gracias a la aplicación diaria de progesterona oral permite sincronizar los celos de las hembras, en cualquier momento del ciclo estral. Este método presenta la ventaja de poder aplicarse en condiciones de granja, siempre y cuando los animales estén acostumbrados al manejo diario de quienes los manipulan, ya que el cuy es un animal muy sensible al estrés y neófito. El estrés provocado por una manipulación diaria inadecuada o por personas desconocidas puede estresar el animal de manera significativa (pérdida de pelos, de peso y hasta ser letal). Otra limitante de este método es la dificultad que representa aplicar un tratamiento diario a hora fija durante 20 días en otras condiciones que no sean experimentales.

Con el fin de limitar tanto el estrés de los animales como la obligación de los trabajadores, se ha elaborado un nuevo tratamiento menos tedioso, el cual se basa en el uso de prostaglandinas. En un ciclo natural y en ausencia de la implantación de un embrión en el útero, la mucosa uterina secreta prostaglandinas PGF_{2α}, que provoca la



Figura 2 - Aplicación diaria de altrenogest por vía oral

Foto: Anne Grigore

Anne Grégoire

lisis del cuerpo lúteo del ovario, la concentración de progesterona en la sangre disminuye provocando así la ovulación y un nuevo ciclo puede empezar. Para que el tratamiento hormonal tenga el mismo efecto que la secreción natural de hormonas, el animal tratado debe encontrarse en fase lútea y tener un cuerpo lúteo activo. Con el fin de sincronizar un grupo de animales que se encuentran en diferentes fases del ciclo, se decidió aplicar dos inyecciones intra-muscular de luprostiol (análogo sintético de prostaglandinas) con un intervalo de 10 días. En la primera inyección, los animales que se encuentran en fase lútea empiezan un nuevo ciclo y están de nuevo en fase lútea 10 días después, cuando se realiza la segunda inyección. Por otra parte, consideramos que los animales que no se encuentran en fase lútea en el momento de la primera inyección tienen que estar en fase lútea 10 días después, cuando se realiza la segunda inyección, tomando en cuenta que la fase lútea dura 12-13 días de los 16 días del ciclo. Los primeros intentos realizados con nulíparas de 6 meses han mostrado que todas las hembras entraron en celos 4-5 días luego de la segunda inyección de luprostiol. Este protocolo alivia mucho el estrés en los animales (dos manipulaciones en total, contra 20 manipulaciones por el tratamiento con progesterona vía oral) y simplifica el trabajo. Los primeros resultados son satisfactorios; sin embargo la aparición de celos en los animales se escalona en 2 a 3 días. Sin embargo, se desea desarrollar un protocolo que permita agrupar mejor los celos, por lo cual se utilizará un nuevo protocolo que combina el uso de progesterona y prostaglandinas.

Nuestros primeros trabajos sobre la sincronización de celos en cuyes nos permiten desarrollar técnicas eficaces y realizables en condiciones de granja. La segunda etapa de nuestro proyecto es aumentar el número de embriones por hembra, desarrollando un tratamiento de superovulación. Nuestros primeros intentos de sincronización y superovulación con HmG (*Human menauposal Gonadotrophin*) nos hacen pensar que los embriones transitan más rápidamente en los oviductos de los animales tratados. Nuevos intentos deben permitirnos determinar la velocidad de tránsito de los embriones en los animales sincronizados y superovulados con el fin de colectarlos en el estado mórula compactada (32-64 células) a la altura de la unión entre el oviducto y el útero. La última etapa consistirá este año en definir un protocolo de congelación óptimo para los embriones de *Cavia porcellus*. Nuestro objetivo es obtener, en el mundo, los primeros cuyes resultantes de una transferencia de embriones congelados.

Es primordial que el Perú controle el manejo de los recursos zoogenéticos de los animales domésticos endémicos del país, como el cuy y la alpaca. La creación de un criobanco nacional de recursos genéticos endémicos permitirá prevenirse tanto de problemas sanitarios como de pérdidas genéticas inestimables.

Referencia citada

UEDA, H., KOSAKA, T. & TAKAHASHI, K.W., 1988 - Effects of long-term progesterone treatment on synchronized ovulation in guinea pigs. *Zoological Science*, n.° 5: 139-143.

A SIMPLE METHOD FOR ESTRUS SYNCHRONIZATION OF GUINEAPIG (*Cavia porcellus*)

Grégoire A.¹, León S.^{1,2}, Huamán E.², Silva R.M.², Allard A.³, Joly T.³

¹Institut Français d'Etudes Andines (UMIFRE17 CNRS/MAEE, Lima 18, Peru)

²Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriones (Ministry of agriculture / La Molina National Agrarian University Lima – Peru)

³Université de Lyon, Vetagrosup/IsaraLyon, Unité ICE-Cryobio, 69243 LYON, France

INTRODUCTION

Guineapigs play an important role in the Andes societies as a source of protein for many low income highlanders and as part of rituals and traditional medicines. It is also used as a laboratory animal since the late 18th century and still remains essential in many research areas. The establishment of an embryo cryobank is an interesting way to reach the conservation of his biodiversity.

Controlling the heat period is necessary to obtain embryos at morula/early blastocyst stage and to prepare synchronous recipients for embryo transfer. A classic treatment exists to synchronize ovulation under laboratory conditions (4 weeks of a subcutaneous tube filled with crystalline progesterone). This treatment is demanding to set up in farming conditions and presents ethical problems regarding the use of anaesthesia and the large size of the implant (1,0 cm long and 0,4 cm i.d.).

The aim of this work was to propose an alternative method to obtain synchronized ovulation in guineapigs under farming conditions using oral progesterone in respect of animal welfare.



Traditional breeding in the Andes

MATERIALS AND METHODS



Treatment administration

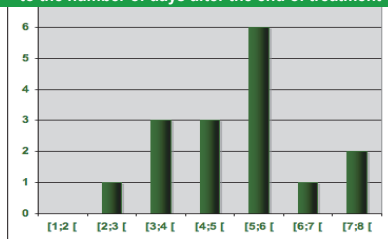
- ▶ 19 multiparous guineapigs of the Cieneguillas strain (La Molina National Agrarian University Lima-Peru).
- ▶ Animals were housed under farming conditions (groups of 5 females together living on vegetal litter) and were fed on commercial pellets and tap water ad libitum.
- ▶ Guinea pigs were given a daily **0,1mL dose of oral progesterone** (Regumate® Equine, Intervet, France) per os by means of a syringe for **20 days**.
- ▶ Beginning of the heat period was determined when females presented an open vagina .



Daily checking of females heat period

RESULTS

Number of females that presented heat period according to the number of days after the end of treatment



☞ Overall, **84%** of the treated females (n=16) presented an heat period within 7 days after the end of the treatment .

☞ The vagina was open in average **5.06 ± 1.36 days** after the last administration of Regumate®.

Such an estrus spreading remains a problem for embryo-collection and transfer. In order to obtain a more accurate synchronization, we will **adjust the dose** of oral progesterone, the **length of the treatment** and we will use **vaginal smears** to have a better control of the time of ovulation.



CRYOCONSERVATION DE LA BIODIVERSITÉ DU COCHON D'INDE (*Cavia porcellus*)

Grégoire A.¹, León S.^{1,2}, Huamán E.², Allard A.³, Joly T.³

¹Institut Français d'Etudes Andines (UMIFRE17 CNRS/MAEE, Lima 18, Peru)

²Centro de Investigación y Enseñanza en Transferencia de Embriónes (Ministry of agriculture / La Molina National Agrarian University, Lima, Peru)

³Université de Lyon, VetAgro Sup/IsaraLyon, Unité ICE-Cryobio, 69243 Lyon, France

Importance économique, culturelle et scientifique

Dans les Andes

- domestiqué depuis l'époque précolombienne, le cochon d'Inde fait parti de nombreuses traditions folkloriques, est échangé comme cadeau et est utilisé dans la médecine traditionnelle andine.
- sa consommation constitue une importante source de protéines.
- au Pérou, environ 22 millions d'animaux majoritairement au sein d'unités familiales, fournissent 16500 tonnes de viande chaque année.
- les programmes de sélection menés depuis les années 1970 ont donné lieu à une nouvelle diversité génétique, orientée vers la formation d'animaux plus productifs.

Il convient aujourd'hui de conserver cet héritage symbolique et culturel en sauvegardant les lignées non-sélectionnées moins productives mais plus rustiques et plus résistantes afin d'envisager un schéma de sélection de l'espèce sur le long terme

Recherche biomédicale

- alors plus connu sous le nom de **cobaye**, il a été très largement utilisé depuis le 18^{ème} siècle.
- supplanté aujourd'hui par d'autres rongeurs (souris, rats) il ne représente plus que 2% des animaux de laboratoire en 2007.
- les similitudes de son système immunitaire avec celui de l'homme font de lui un excellent modèle pour des recherches spécifiques notamment sur la tuberculose.
- sa gestation longue (68 jours) et la présence d'un système nerveux central abouti à la naissance permettent de mener des recherches sur les facteurs et produits tératogènes.

La mise en place d'une cryobanque d'embryons permettra de conserver les lignées précieuses d'un point de vue scientifique et de minimiser les coûts de maintenance des colonies dans les laboratoires.

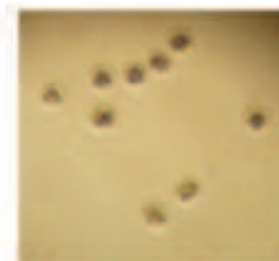
Cryobanque d'embryons



Élevage traditionnel dans les Andes

- l'objectif de notre projet de recherche est l'élaboration d'une cryobanque d'embryons de cochons d'Inde qui permettra une conservation *ex situ* des ressources génétiques de cette espèce, par la voie femelle.
- nous avons ainsi élaboré des protocoles de production d'embryons, grâce à des traitements hormonaux de synchronisation des cycles oestriques et de superovulation des femelles.

Nous mettons actuellement au point les protocoles de la cryoconservation des embryons obtenus et de transfert embryonnaire qui nous permettront d'atteindre nos objectifs de conservation.



Embryons de cochons d'Inde



First Successful Pregnancy after Embryo Transfer into Synchronized Females in Guinea Pig (*Cavia porcellus*)

A. Grégoire^{1,4}, F. Peredo², S. León^{1,2}, E. Huamán², A. Allard³, T. Joly⁴

(1) Institut Français d'Études Andines – LIMIFRE17 CNRS/MAEE, Lima, Peru
 (2) CIETE – Ministerio de Agricultura / Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Peru
 (3) Hospital Veterinario Elbas, Lima, Peru
 (4) Université de Lyon, VetAgro Sup/ISARALYON, Unité ICE-Cryobio, Lyon, France

Introduction

The Guinea pig (*Cavia porcellus*) has been used as a laboratory animal since the late 18th century and also plays an important role in the Andes societies as a source of protein for low income highlanders and as a part of rituals and traditional medicines. Thus, the conservation of its genetic diversity is a long term issue that must be considered.

The aim of this work was to design a standard embryo transfer method in order to establish an embryo cryobank in this species.

Materials and Methods

♀ Females:

- 8 multiparous and normally cycling Guinea pigs from the Maria-Marcela Farm (Puente Piedra, Peru), weighing 1-1.5 kg;
- housed under farming conditions and fed on commercial pellets and tap water *ad libitum*;
- **synchronized** by a **daily dose of 0.22 mg altrenogest** (0.1 mL Regumate® Equin, Intervet, France) **per os** for 15 days



- **3 donor females** were **superovulated** using 15 IU of human menapausal gonadotropin (hMG, Massone®, Argentina) and mated as soon as the vagina opened. Copulatory plug was observed and **vaginal smears** were taken to guarantee successful mating and ovulation.

Vaginal smears



♂ Embryos

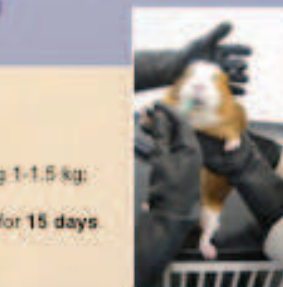
- 38 embryos were collected between days 3.5 and 4.5 after ovulation at the **morula** and **early blastocyst** stages;
- 2 embryos were transferred into each uterine horn by laparotomy at days 3.5 and 4.5 after ovulation.



Embryo transfer pipettes

♂ Two types of pipettes for embryo transfer were tested:

- plastic Open Pulled Straws (OPS®; Minitub, Germany), to transfer into 3 recipients;
- puffed glass pipette of approximately 0.3 mm diameter, to transfer into 2 recipients.



Altrenogest administration



Surgical transfer by laparotomy



Focus: insertion of the glass pipette into the uterine horn

Results

- **None of the three OPS transferred females were pregnant** as pregnancy diagnosis was detected by observation of no return to estrus at day 16 and confirmed by ultrasonography.
- **One of the two pulled glass pipette transferred females was diagnosed pregnant and delivered two stillbirths** (one per uterine horn).
- No post-surgical complications were observed and the females undergoing embryo transfer returned normally to reproduction.

Conclusion

We evidenced that classic surgical embryo transfer method is possible under field conditions to obtain pregnancy in this species. We suggest further studies using glass pipettes which allow a more precise embryo deposition. Future experiments will incorporate the transfer of frozen-thawed embryos on a larger scale.