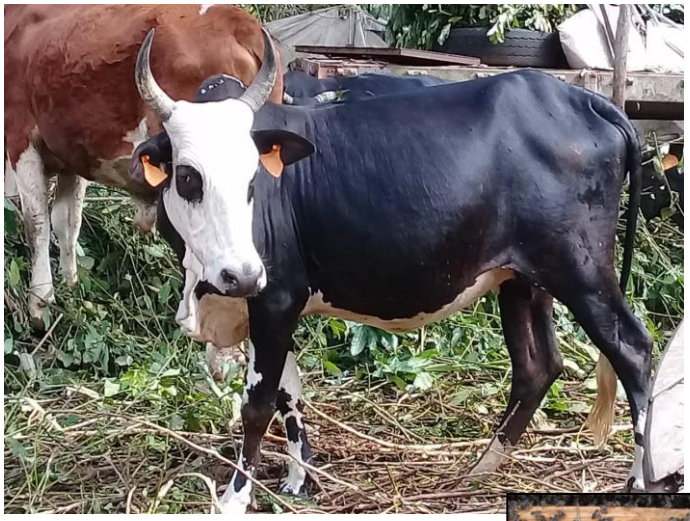
Rapport de mission Mayotte
29/11/2020 au 04/12/2020

DEFI ANIMAL



Jérôme Janelle (CIRAD SELMET)

UMR SELMET
Départements ES

Décembre 2020

ACCES AU DOCUMENT
- Documentation du CIRAD à Mayotte
- Plateforme Web du RITA

AUTEURS : Jérôme Janelle

ORGANISME AUTEUR
CIRAD, départements ES
UMR SELMET

ACCES A LA REFERENCE DU DOCUMENT
Réservé (interne au CIRAD)

ETUDE FINANCEE PAR : CIRAD et projet RITA2 DEFI ANIMAL – financement UE – ETAT – Conseil départemental

REFERENCE : ES – C0112 – UMR SELMET – 2020 –

AU PROFIT DE : projet RITA2 DEFI ANIMAL

TITRE : Rapport de mission à Mayotte du 29/11 au 04/12/2020

TYPE D'APPROCHE : Appui scientifique, Gestion de projet, Formation, Transfert

DATE ET LIEU DE PUBLICATION : DECEMBRE 2020, St Pierre, La Réunion

PAYS OU REGION CONCERNEES : Mayotte

MOTS CLES : DEFI ANIMAL, zootechnie, caractérisation génétique, ovin, caprin, conservation des races locales

RESUME :

La mission avait trois objectifs principaux :

1- Formation aux prélèvements sanguins et aux prélèvements de fèces : prélèvements sur bovins ;
2- Formation à l'extraction d'ADN et aux analyses OPG ;

3- Appui scientifique à la mise en œuvre des activités planifiées sur l'action WP2 « *Evaluation des aptitudes de production et d'adaptation des races bovine, ovine et caprine* » (notamment les tâches *Caractérisation de la diversité morphologique et génétique des populations caprines locales* et « *Evaluation des capacités d'adaptation du zébu mahorais et des animaux métissés zébu* ») ;

Préparation du protocole de caractérisation génotypique et phénotypique du caprin mahorais.

1. Programme de la mission

29/11

- Arrivée vers 20 heures après 1h30 d'attente en vol stationnaire, transfert vers le gîte tata gnagna qui avait reloué la chambre en raison de mon arrivée tardive.

30/11

- 08h-12h : Prélèvements sanguins et de fèces sur bovins
- 13h-17h : Prélèvements sanguins et de fèces sur bovins

01/12

- 08h-12h : Travail à Dembéni, rangement et préparation du laboratoire,
- 13h-17h : Inventaire du matériels, récupération par les VSCs du matériel présent à Mamoudzou, pour moi récupération des lames Mac master à la Coopadem ainsi que la verrerie;

02/12

- 07h-9h : Travail avec ZsuZsa et Audrey (préparation protocole caprin, prévision de planning.
- 9h-11h : Aller-retour Mamoudzou pour la récupération de la centrifugeuse oubliée la vieille.

- 14h-16h : Entretien avec Mr Maxime Bergonzo, directeur technique de la **CAPAM** et les techniciens Métis, Ned et Kamardine pour l'organisation du travail à venir avec Audrey Rozier.
  + questions diverses avec Audrey (saisie des temps, téléphone,…).

03/12

- 08h-15h : Formation à l'extraction d'ADN
  Formation et analyses OPG

04/12

08h-12h : Réhydratation des échantillons ADN et mise au congélateur 24h après.
13h-18h : Débriefing avec ZsuZsa et Audrey Rozier et Rédaction rapport de mission

05/12

10h30 : transfert aéroport

2. CR de la formation et visite de terrain

2.1. Formation aux prélèvements sanguins et de fèces

- Prélèvements sanguins

Pour la collecte du sang, il est prévu 2 échantillons par animal, soit :

- Tubes Vacutainer stérile EDTA bouchon Hemogard K2 10 ml VIDE x100 Quantité= 1
- Tubes Vacutainer stérile EDTA bouchon Hemogard K2 5 ml VIDE x100 Quantité= 1
- Aiguilles de prélèvement stérile BD Vacutainer : 0,8 x 38 mm (21G) x1000 Quantité=1
- Corps de prélèvement BD Vacutainer blanc translucide x1000 Quantité=1
- 1 boîte de gants

- Pour le stockage du sang :

- Une glacière avec des pains de glace lors de la visite
- Un frigidaire pour la conservation en frais à 4°C au siège de Dembéni + paniers : capacité 50 tubes 10 ml
- Un congélateur à -80°C pour les échantillons de sécurité et éventuellement pour les échantillons destinés à l'extraction : capacité 400 tubes de 5 ml
- Thermomètre pour vérifier la température du frigo
- Boites pour tubes (ex: Boîte de congélation cubique en carton hydrophobe - dimensions 148 x 148 x 128 mm - 6 x 6 compartiments -tubes 15ml- blanc) Quantité=14
- Tubes Eppendorf 5 ml, PCR clean (par 200) Quantité =1 (pour le stockage des échantillons de sécurité à -80°C).

- Pour les prélèvements de fèces :

- Une glacière avec des pains de glace lors de la visite
- Des gants de fouilles.

2.2. Visite de terrain

Une visite de l'exploitation de Mr Soule Haladi a été effectuée sur Combani le 30/11/2020.

Le travail consistait à la réalisation de prélèvements sanguins et de fèces.

Nous avons pu prélever seulement 8 zébus en raison des difficultés de manipulation.

2.3. Formation à l'extraction d'ADN et aux analyses OPG

Le protocole d'extraction de l'ADN génomiques a été rédigé par Catherine Cêtre Sossah et Laurence Fiori à partir des kits d'extraction prévus à cet effet : support de formation : Isolation of Genomic DNA from Whole Blood with the Wizard Genomic DNA Purification Kit).

L'extraction d'ADN génomiques se fera sur l'ensemble des échantillons où nous avons pu extraire une grande quantité d'ADN. L'utilisation de matériels de pointes est un atout considérable, par exemple ces nouveaux kits d'extraction permettent un gain de temps importants ainsi qu'une meilleure qualité des résultats.

L'ensemble du matériel nécessaire étant disponible pour démarrer ce protocole (annexe 3).

2.4. Formation aux analyses OPG

Les échantillons ont été traités au laboratoire de Dembéni mais en raison d'un traitement trop tardif des échantillons (+ 72 heures), les résultats n'ont pas été satisfaisants.

Le protocole nécessaire est en annexe 4.

3. Sommaire du protocole CAPRIN

3.1 Contexte

3.2 Objectifs de l'étude « caractérisation génétique du caprin mahorais »

3.3 Matériels

3.3.1 Ressources
3.3.2 Etapes du génotypage (du sang frais à l'analyse de phénotypage)

3.4 Méthodes

3.4.1 Population étudiée

3.4.2 Méthodes d'échantillonnage et choix des animaux
a) Pour le phénotypage
b) Pour le génotypage

3.4.3 Etapes de la caractérisation
a) Organisation des visites
b) Etape du phénotypage
c) Pour le génotypage
Figure 1: exemple de tableau de suivi

3.4.4 Données à recueillir
a) Les données relatives à l'entretien exploitation
Annexe 1 : questionnaire d'exploitation

b) Les données relatives à chaque animal
Annexe2 : questionnaire animal
Variables discrètes ou qualitatives
Variables quantitatives
Démonstration de réalisation des mesures corporelles

4. Présentation du protocole

CARACTERISATION ET AMELIORATION GENETIQUE DES RACES DE RUMINANTS LOCALES A MAYOTTE

Cas de la race « caprin mahorais »

(Version provisoire)

PROTOCOLE DE CARACTERISATION PRIMAIRE DU CAPRIN MAHORAIS

Troupeau traditionnel de caprins *(photo : Jérôme Janelle)*

Source : CIRAD

E. Tillard, A. Rozier, M. Naves,
L. Flori, M. Gautier, J. Janelle

4.1 Contexte de l'étude

Les races locales d'animaux domestiques constituent une des composantes de la biodiversité des espèces d'intérêt agronomique et d'élevage, pour lesquelles on note un regain d'intérêt à l'heure actuelle. Elles constituent en effet un réservoir de gènes d'adaptation face à des conditions défavorables d'élevage, qui risquent de prendre une importance croissante dans le contexte des changements globaux à venir, notamment des changements climatiques. Ces races locales et leurs diverses aptitudes présentent également un intérêt pour les systèmes de production en agroécologie, qui constituent une des voies de développement de l'agriculture à venir. La problématique envisagée dans ce projet s'inscrit donc dans des démarches scientifiques d'actualité.

Les acteurs locaux à Mayotte sont conscients qu'ils doivent apporter des efforts d'appui-conseil à deux niveaux : l'amélioration de la productivité des cheptels, et l'adoption d'orientations communes en matière génétique. Le projet sera l'occasion d'introduire un dossier de reconnaissance des races mahoraises bovine, ovine et caprine auprès de la CNAG (Commission Nationale d'Amélioration Génétique) du Ministère chargé de l'agriculture. Cette reconnaissance permettra d'établir et financer un dispositif de conservation et de valorisation des ressources génétiques locales, dans un noyau d'élevages producteurs de géniteurs. Il s'agit d'un élément important dans la réflexion préalable à la mise en place d'un tel schéma de conservation et d'amélioration des populations locales.

A Mayotte, aucun schéma d'amélioration génétique cohérent n'a été proposé jusqu'à présent, pour permettre à la fois d'augmenter la productivité du cheptel local et de maintenir son adaptation, en conservant des gènes de résistance aux maladies et de tolérance aux contraintes climatiques et alimentaires. La question du devenir de la population du caprin mahorais est passée sous silence ; elle est condamnée à disparaître dans des termes plus ou moins longs avec un effectif ne dépassant pas 15000 individus.

La priorité réside donc dans la définition d'un type racial qui permettra de caractériser la race en BDNI. Ce type racial qui permettra par la suite la création d'un code race doit être défini en caractérisant le phénotype de la race, c'est-à-dire en collectant les données morpho-biométriques qui permettront la définition d'un standard. Une fois ces données collectées, elles seront présentées à la Commission Nationale d'Amélioration Génétique dans un dossier de demande de reconnaissance de la race. Afin de connaître les réelles origines génétiques de la race, les techniques de génotypage seront utilisées pour mettre en évidence la situation du cabri mahorais par rapport à d'autres races. Le protocole présent s'attache à décrire la collecte de ces données afin de réaliser le phénotypage et le génotypage.

La seconde action amorcée par cette étude réside dans la mise en place d'un suivi génétique de la population, où seront étudiées cette fois les performances zootechniques et d'adaptation des animaux.

La première phase de caractérisation des populations locales a débuté en 2017 dans le cadre de l'action 2 du projet DEFI ANIMAL.

4.2 Objectifs de l'étude « caractérisation du caprin mahorais »

A l'heure actuelle, si le caprin mahorais apparaît être une race spécifique à l'île de Mayotte, la race n'est pas officiellement reconnue et n'est pas désignée par un code race permettant de l'identifier. Effectivement, dans les conditions présentes, les caprins sont enregistrés dans une base interne à la CAPAM et n'est pas reliée à la base nationale d'identification. Il n'existe pas non plus de description phénotypique permettant d'identifier des individus à cette race, ni de critères permettant d'exclure des animaux de l'appartenance à cette race. La caractérisation phénotypique d'une race correspond à la description de ses caractéristiques externes et de production dans un environnement et un cadre de gestion donné, auxquels on ajoute des éléments descriptifs du milieu de production. La caractérisation génétique est nécessaire pour mesurer et décrire la diversité génétique des phénotypes et établir des relations entre les races.

Les directives de la FAO distinguent deux phases ou niveaux de caractérisation. Le terme
« Caractérisation primaire » est utilisé pour désigner les activités qui peuvent être réalisées en une seule visite sur le terrain (par exemple la mesure des caractéristiques morphologiques des animaux, les entretiens avec les éleveurs, l'observation et la mesure de certains aspects du milieu de production, la cartographie de la répartition géographique). Le terme « Caractérisation avancée » est utilisé pour décrire les activités qui nécessitent des visites répétées. Ces activités incluent la mesure des aptitudes de production (croissance, production laitière), les aptitudes d'adaptation, comme la résistance ou la tolérance à des maladies spécifiques, et l'évolution des effectifs et de la structure d'âge de la population. Le protocole que nous présentons s'attache à définir la première phase de caractérisation primaire.

La première étape de caractérisation du caprin mahorais cible un objectif majeur : établir un standard de race précis en relation avec le type racial des animaux. Il s'agit ici de collecter les mensurations et les observations de caractères morphologiques visibles, pour décrire la race et la variabilité de critères mesurables ou observables dans cette race. Ce standard sera validé puis intégré au dossier de demande de reconnaissance officielle de la race, qui sera présenté à la CNAG afin que le caprin mahorais soit reconnu comme une race à part entière. A cette race sera attribué un code race qui représentera la race en BDNI. Ce dossier présente, en plus des caractéristiques phénotypiques de la race, les données relatives à son origine, son contexte d'élevage et sa situation génétique.

De cette manière, une fois les animaux identifiés comme caprin mahorais, il sera plus aisé de contrôler les effectifs de la population et son évolution. Il sera ainsi possible de constituer une population de référence pour mettre en place le suivi génétique de ces animaux, parallèlement à l'ouverture du livre généalogique permettant l'enregistrement des lignées. Cette population de référence sera étoffée au fur et à mesure que les ascendants des animaux enregistrés y seront intégrés avec l'attribution du nouveau code race.
Ce travail nous permettra de sélectionner les animaux à génotyper. En effet, en utilisant les nouveaux outils de génotypage et en particulier la puce bovine SNP50, il est possible de caractériser la diversité génétique pour une race caprine donnée. Cette approche permet de connaître l'histoire d'une population à travers la caractérisation de cette diversité génétique, puisque les facteurs démographiques qui affectent une population au cours de son évolution

ont une influence sur la diversité génétique. Dans un premier temps, ce sont des analyses descriptives qui sont effectuées, qui permettent de mettre en évidence des distances génétiques entre paires d'individus (proportion moyenne d'allèles partagée sur l'ensemble des marqueurs génétiques), de réaliser des analyses en composantes principales des génotypes individuels sur l'ensemble des marqueurs disponibles, et de déterminer les proportions des différentes ascendances (caprine européenne, caprine africaine). Cette caractérisation primaire est ainsi la première étape pour la reconnaissance du cabri mahorais et la mise en place d'un suivi génétique des différentes populations caprines sur le territoire mahorais.

4.3 Matériels

La caractérisation génétique du cabri Mahorais nécessite la mise à disposition de ressources et matériels spécifiques.

4.3.1 Ressources humaines

Pour l'application de ce protocole, le tableau ci-dessous résume les tâches attribuées à chacun :

Nom de la personne	Structure	Tâche	Temps sur le projet
Emmanuel Tillard	CIRAD	Appui à la coordination du projet DEFI ANIMAL	0.1 ETP
Abdallah Oussoufi Ned Kamardine	CAPAM	Collecte de données	½ ETP
Laurence Flori	INRA	Vérification ADN + caractérisation génétique (analyse des données)	Mission
Matthieu Gautier		Vérification ADN + caractérisation génétique (analyse des données)	Mission
Audrey Rozier	CIRAD	Logistique des échantillons, gestion et traitement de données	1 ETP
Michel Naves	INRA	Appui protocole et analyse de données	Mission
Jérôme Janelle	CIRAD	Coordination action 2 + appui technique	0.1 ETP
	LABOGENA	Génotypage	Prestation
Abdou Hachirafi Sitty Bahyat Chamassi	LVAD 976	Extraction ADN	Cf convention (mise à disposition)

Pour l'étape de collecte des données, un technicien CAPAM sera présent à chaque visite d'exploitation.

Décembre 2020 :

⇨ Équipe constituée sur le terrain

⇨ Equipe d'experts en appui constituée aussi (3 experts)

Les déplacements en élevage nécessitent la mise à disposition d'un véhicule adapté (type 4x4).

L'équipement des techniciens à prévoir est :

- Bottes (1 paire par technicien)
- Combinaisons (1 par technicien)
- Gants (5 paires par technicien par visite)
- Gants de fouille (Quantité = 500)
- Un thermomètre à déclenchement rapide (Digiflash 5'')

Les outils de mensurations à prévoir sont :

- Un mètre ruban de minimum 2.5 m
- Une toise ou un pied à coulisse,
- Un appareil photo

Les outils pour la contention à prévoir sont :

- Deux cordes de 5m (diamètre 18 mm)
- Bombe septijet alu
- Rouleau de papier absorbant pour nettoyer la queue de l'animal si besoin
- 10 x paquet de 50 compresses
- 10 x flacon de 100 ml d'alcool modifié à 70 °C
- Sacs d'aliment R1

Le matériel pour la collecte et l'enregistrement des données à prévoir est :

- Du papier, stylos et porte document à pinces
- Un smartphone avec logiciel WEPI (EPI concept)
- Un ordinateur portable

4.3.2 Etape du génotypage (du sang frais à l'analyse de génotypage)

- Prélèvements sanguins

Pour la collecte du sang, il est prévu 2 échantillons par animal, soit :

- Tubes Vacutainer stérile EDTA bouchon Hemogard K2 10 ml VIDE x100 Quantité= 1
- Tubes Vacutainer stérile EDTA bouchon Hemogard K2 5 ml VIDE x100 Quantité= 1
- Aiguilles de prélèvement stérile BD Vacutainer : 0,8 x 38 mm (21G) x1000 Quantité=1
- Corps de prélèvement BD Vacutainer blanc translucide x1000 Quantité=1

- Pour le stockage du sang :

- Une glacière avec des pains de glace lors de la visite
- Un frigidaire pour la conservation en frais à 4°C au siège de Dembéni + paniers : capacité 50 tubes 10 ml
- Un congélateur à -80°C pour les échantillons de sécurité et éventuellement pour les échantillons destinés à l'extraction : capacité 400 tubes de 5 ml
- Thermomètre pour vérifier la température du frigo
- Boites pour tubes (ex: Boîte de congélation cubique en carton hydrophobe - dimensions 148 x 148 x 128 mm - 6 x 6 compartiments -tubes 15ml- blanc) Quantité=14
- Tubes Eppendorf 5 ml, PCR clean (par 200) Quantité =1 (pour le stockage des échantillons de sécurité à -80°C)

- Centrifugation :

- Pipette stérile de sérologie 5 ml Greiner Bio-One x500 " Quantité=1
- Tube à fond conique 50 ml (sur socle) Falcon x500 Quantité=1
- Tube à fond conique 15 ml (sur socle) Falcon x500 Quantité=1
- Centrifugeuse avec rotor pour tubes 50 et 15 ml
- Micro centrifugeuse 1.5/2 ml

Extraction d'ADN

Pour les extractions, le laboratoire devra être équipé avec le matériel suivant :

- Incubateur à 37°C et/ou bain marie 37°C (+ portoirs flottants si bain marie)
- Microtube EPPENDORF 1,5 ml 3810 coloris bleu x 1000 Quantité=1
- Kit Wizard Genomic DNA Purification de Promega Quantité = 4
- Isopropanol
- L'éthanol pur (usage biologie moléculaire) à diluer à 70%
- Eau pour biologie moléculaire (Dutscher)
- "Pipette stérile de sérologie 10 ml Greiner Bio-One x200 " Quantité=1
- "Pipette stérile de sérologie 25 ml Greiner Bio-One x200 " Quantité=1
- Pointe à filtre PIPETMAN DIAMOND 0,1 - 10 µl sur rack stérile TIPACK GILSON x 960 pointes Quantité=1
- Pointe à filtre PIPETMAN DIAMOND 2 - 30 µl sur rack stérile TIPACK GILSON x 960 pointes Quantité=1
- Pointe à filtre PIPETMAN DIAMOND 20 - 200 µl sur rack stérile TIPACK GILSON x 960 pointes Quantité=1
- Pointe à filtre PIPETMAN DIAMOND 200 - 1000 µl sur rack stérile TIPACK GILSON x 960 pointes Quantité=1
- Pipeteur Basic Pipette Quantité=1
- Portoirs pour tubes : 15 et 50 ml Quantité = 4 de chaque et 1.5 et 2 ml Quantité = 4 de chaque
- Vortex type Vortex Genie (Dutscher)

- Pour le stockage de l'ADN extrait:

- Boîte de congélation Cryogène 100 places coloris naturel 132x132 pour 100 CRYOTUBES 1,2 et 2 ml blanc Quantité=1
- Microtube EPPENDORF 1,5 ml Safe-Lock 3815 coloris naturel x1000 Quantité=1 (pour stockage après extraction et transport)
- Congélateur -20°C

- Génotypage

Prestation LABOGENA.

4.4 Méthodes

4.4.1 Population étudiée

Un recensement des effectifs de caprins a été effectué à partir des données BDNI de la CAPAM. Le choix a été fait de ne considérer que les animaux inscrits dans la BDNI (des ajouts en cours de projet modifieront légèrement les chiffres).

D'après les extractions de la BDNI, il y aurait actuellement 16000 caprins présents à Mayotte, soit un total de 94% sur l'effectif petits ruminants de Mayotte qui s'élève à environ 17000 animaux.

4.4.2 Méthode d'échantillonnage et choix des animaux

a) Pour le phénotypage

Nombre de caprins à phénotyper : 200

Ce chiffre a été déterminé à partir des 100 échantillons nécessaires à l'étape du génotypage. Nous avons porté à 200 le nombre d'échantillon d'où seront sélectionnés ceux à génotyper. Il s'agit tout d'abord de permettre une sélection facilitée des 100, notamment quant au critère de non apparentement (critères ci-dessous). De plus, il s'agit de constituer une base génétique plus importante afin de permettre, si besoin, des études génotypiques complémentaires à l'issue du génotypage. Il nous semble possible de collecter ces 100 caprins en 2021. Les deux semaines de collectes nous permettrons de confirmer cette hypothèse. Dans le cas contraire, le nombre total sera revu à la baisse, avec modification de l'échantillonnage en conséquence.
L'échantillonnage des individus sera effectué d'après différents critères, listés ci-dessous par ordre de priorité :

Critère 1 : La localisation des élevages
Afin de respecter la représentativité géographique, le nombre de caprins à échantillonner dans chaque commune X a été établi ainsi :
X= (nombre de caprins présents dans la commune) / (nombre total de caprins à Mayotte) x 100.

Critère 2 : Le sexe
Dans chaque commune, le ratio mâle/femelle des chiffres BDNI sera à respecter dans le choix des animaux phénotypés.

Critère 3 : L'âge
A l'issue de la concertation entre les différents partenaires (CIRAD, INRA, CAPAM), il a été convenu de restreindre le phénotypage aux individus de plus de 2 ans. Cela permettra tout d'abord un repérage facilité des individus par les techniciens (phénotype visuel à priori). De plus, à cet âge, on peut considérer que le développement de l'animal est suffisant et que les caractéristiques morpho-biométriques mesurées n'évolueront plus. La détermination de l'âge sera faite via la BDNI.

Critère 4 : La composition du troupeau
Il a été décidé de privilégier tous les troupeaux

Critère 5 : La taille du troupeau
Respecter la représentativité de la taille des élevages à Mayotte supposerait de visiter une majorité d'élevages composé de 2 à 5 têtes. Les délais de la période de phénotypage seraient ainsi allongés de plusieurs mois. De par les contraintes de calendrier et de moyens (techniciens, véhicule), nous faisons le choix de privilégier les exploitations ayant au moins 5 individus.

Critère 6 : Le maintien de l'animal dans le troupeau
Dans l'éventualité du choix de l'animal pour l'étape de suivi du projet, il convient de choisir majoritairement des animaux qui ne sont pas destinés à être tué ni vendu dans l'année. La question sera posée à l'éleveur lors du repérage des animaux dans l'élevage.

Critère 7 : Logistique de terrain
Le dernier critère interviendra au stade du terrain et de la faisabilité de la collecte. Ainsi les éléments suivants interviendront dans le choix des élevages et des individus :

- La disponibilité de l'éleveur et/ou du bouvier
- L'accessibilité de l'exploitation

La possibilité de contention de l'animal : docilité, présence de supports de contention . . .

b) Pour le génotypage

Le génotypage des animaux est une étape nécessaire pour connaître l'origine génétique de la race. Les individus seront sélectionnés parmi les 200 phénotypés puisque que le prélèvement sanguin sera réalisé sur ces animaux.

Sélection de 100 individus à génotyper :

Ce chiffre a été déterminé par le groupe d'expert (M. Gautier, L. Flori, M. Naves). Il s'agit d'avoir un échantillon représentatif de la diversité génétique du caprin mahorais pour l'étape du génotypage.

Parmi les 200 individus, la sélection des 100 à génotyper se fera selon les critères suivants :

Critère 1 : La localisation des élevages
La représentativité géographique sera à respecter de la même façon qu'à l'étape du phénotypage. Ainsi le nombre d'individus phénotypés par commune devra respecter la proportion de cabris de cette commune par rapport à la population totale de l'île.

Critère 2 : Le sexe
De façon similaire ont cherchera à conserver le ratio mâles/femelles de chaque commune dans le choix des individus à génotyper.

Critère 3 : Le non apparentement
L'apparentement des 100 individus est à limiter au maximum. Les données de filiation étant peu renseignées dans la BDNI, le choix des individus sera basé sur les dires de l'éleveur quant aux liens de parenté au sein du troupeau. Au vu de la structure des élevages mahorais, il est probable que la possibilité de génotypage d'un seul individu au sein d'un troupeau se présente souvent (tous les animaux apparentés). Le choix se fera alors selon les critères d'échantillonnage de la commune.
Il faut veiller à choisir des animaux non ou peu apparentés afin de ne pas fausser les résultats de génotypage et de pouvoir obtenir une caractérisation génétique représentative de l'ensemble de la population. Ces animaux seront choisis a posteriori, après l'ensemble des prélèvements et des extractions réalisées.

Critère 4 : Logistique de contention
Si plusieurs animaux suivent les trois premiers critères, le choix sera fait selon la docilité de l'animal à dire d'éleveur afin de limiter les risques de blessure au cours de la contention.

Le choix des 100 au sein de la base des 200 nous assurent le génotypage d'individus de plus de 2 ans. L'âge ne sera donc pas un critère de sélection.

Critère 5 : la qualité et la quantité de l'ADN extrait
Pour que le génotypage puisse être effectué dans des conditions optimales à Labogena, il faut que l'ADN soit en quantité suffisante et d'une bonne qualité. Ces paramètres seront vérifiés au laboratoire de Laurence Flori à Montpellier, les échantillons de mauvaise qualité ou en quantité insuffisante seront ainsi exclus du génotypage.

4.4.3 Etapes de la caractérisation

a) Organisation des visites

La première étape du phénotypage est le repérage des élevages de caprins. Cette étape sera faite avec les techniciens de la CAPAM sur la base des extractions de la BDNI. Ces extractions contiennent les informations suivantes : nom de l'éleveur, commune et nombre de caprins présents sur l'exploitation à ce jour. Les techniciens sont informés des critères de sélection. Sur la base de leur expérience, ils indiquent les élevages où le travail de terrain leur semble possible (effectivité de la présence de moutons, disponibilité de l'éleveur, accès).

Les éleveurs repérés pour le projet sont contactés par téléphone et un planning est réalisé pour établir les rendez-vous de concert avec l'éleveur. L'éleveur et/ou son bouvier devra être présent lors de la visite. Ce planning tiendra également compte des délais de collecte des données et des envois des prélèvements sanguins. La visite est composée en deux parties sans ordre prédéfini :

- Une partie entretien avec l'éleveur portant sur l'exploitation : questionnaire en annexe. Cette partie se rapporte à l'étape du phénotypage
- Une partie portant sur les animaux avec la contention, le prélèvement sanguin et la collecte de données (qualitatives et quantitatives) : questionnaire en annexe. Cette partie se rapporte à la fois à l'étape du phénotypage (collecte données) et du génotypage (prélèvement sanguin).

b) Etape du phénotypage

A l'arrivée sur l'exploitation, un repérage de tous les animaux présents est suivi de la sélection des caprins à collecter selon les critères définis dans la partie IV 2 a). Un inventaire est réalisé par les identificateurs CAPAM. Une photo de l'environnement dans lequel évoluent les animaux est réalisée en premier lieu.

L'éleveur et/ou son bouvier s'assure de la contention des animaux afin de garantir l'intervention des techniciens en toute sécurité. Pour cela le matériel de contention est mis à leur disposition. L'animal doit être immobilisé mais le moins contraint possible.

La collecte débute par la prise de l'ensemble des données quantitatives et qualitatives via des mensurations et observations sur l'animal vivant et « sur pied » ainsi que des questions à l'éleveur et/ou bouvier. Puis le relevé de température et le prélèvement des bouses et pour terminer le prélèvement sanguin. Ensuite la partie « entretien exploitation » peut avoir lieu avant ou après l'étape de collecte. Elle a lieu sur le siège de l'exploitation.

Les données sont enregistrées sur smartphone avec le logiciel WEPI, déjà utilisé auparavant pour des enquêtes auprès des éleveurs. Le remplissage du questionnaire ne

requiert pas d'accès internet, les données sont stockées sur le téléphone et envoyées sur le site internet lors du retour au laboratoire où elles sont téléchargeables à tout moment.

c) Pour le génotypage

Prélèvement sanguin

Chaque animal sélectionné se voit prélever 1 tube EDTA de 10 ml (numéro de version = 1) et un tube EDTA de 5 ml (numéro de version = 2). Les prélèvements sont effectués dans la veine caudale ou la gouttière jugulaire selon les conditions pratiques de contention des animaux. Sur chacun des tubes sera noté un numéro de série (entre 1 et 100) correspondant à l'animal, identique pour les deux tubes et associé au numéro d'identification de l'animal dans le tableau de suivi (cf figure 2 ci-dessous).
Les tubes seront mélangés doucement immédiatement après le prélèvement, par retournements successifs complets (5 à 10 fois).

Deux prélèvements de sang sont donc systématiquement effectués pour chaque animal, et stockés dans une glacière avec pains de glace entre l'exploitation et le siège de Dembéni. Sur place, un technicien actualise la base de données de prélèvements sur le modèle suivant :

Date de visite	Commune	N° elevage	Sexe	N° ID animal	N° de série animal	Version du tube	Situation	Echantillonothèque
20/06/2015	Bandraboua	97607005	F	976234859	225	1	extrait ADN envoyé INRA	
20/06/2015	Bandraboua	97607005	F	976234859	225	2	Congélateur -80°C	congélateur panier 1 4/7
05/07/2015	Chiconi	97603257	M	976589677	196	1	sang frais frigo 4°C	frigo 1 panier 2 3/15
05/07/2015	Chiconi	97603257	M	976589677	196	2	Congélateur -80°C	frigo 1 panier 2 3/16

Figure 1: exemple de tableau de suivi

Les échantillons sont ensuite traités pour extraction au siège de Dembéni par rapport à l'emplacement des équipements.

Les prélèvements sont ensuite stockés au frigo entre 2° et 8°C si l'extraction est prévue dans les 8 jours suivant le prélèvement, si le délai est supérieur, les échantillons seront congelés à -80°C. La décongélation se fera à température ambiante avant extraction.

Extraction de l'ADN des échantillons destinés au génotypage (n° de version =1, tube de 10ml) : Pour chaque caprin, le prélèvement destiné au génotypage (n° de version =1) subit ensuite une extraction d'ADN réalisée par le laborantin du LVAD à partir de 5 ml de sang. Une formation préalable de l'agent du LVAD a été prévue par un chercheur du CIRAD sur le protocole d'extraction de l'ADN. Le kit Wizard Genomic DNA Purification de Promega sera utilisé pour effectuer les extractions. Le protocole d'extraction de l'ADN est joint en annexe.
L'ADN extrait est ensuite congelé à -20°C à Dembéni. Le tableau de suivi des prélèvements est mis à jour.

Stockage des échantillons de sécurité (n° de version =2, tube de 5 ml) : Les prélèvements de sécurité, sont directement congelés à -80°Cà la Dembéni.

Transport des échantillons à génotyper

Envoi du lot via DHL et pains de glace à l'INRA de Montpellier.

Laurence Flori réceptionne les échantillons à Montpellier et vérifie la quantité et la qualité de l'ADN de l'ensemble du lot. Elle transmettra ensuite les échantillons à LABOGENA pour effectuer les analyses de génotypage.

4.4.4 Données à recueillir

Les sorties dans les élevages de caprins nous permettront de recueillir les données suivantes pour la caractérisation :

d) Les données relatives à l'entretien exploitation:

On relèvera en priorité le n° IPG de l'exploitation ainsi que le lieu d'exploitation.

- Le tempérament habituel des animaux : docile, moyennement docile, sauvage
- Les pratiques d'accouplement : contrôlé ou non, saisonnier ou non, MN ou IA
- Tolérance à la chaleur, aux parasites et aux maladies
- Les effectifs du troupeau
  La composition du troupeau : nombre de femelles reproductrices, nombre de femelles de renouvellement, nombre de mâles reproducteurs, nombre de mâles non reproducteurs, nombre de chevreaux mâles et femelles. La composition du troupeau sera vérifiée en amont de la visite via la BDNI. L'observation du troupeau permettra de vérifier l'effectivité des identifications.
- Utilisation des animaux : lait, viande, fumier, socio-culturel
- Images caractéristiques d'une femelle reproductrice et d'un mâle reproducteur avec un arrière-plan permettant des comparaisons.
- Image typique du troupeau dans son milieu de production habituel en arrière-plan
- Les causes des visites vétérinaires

Voir questionnaire exploitation (annexe 1)

b) Les données relatives à chaque animal :

Pour chaque animal est relevé en premier lieu son numéro IPG ainsi que les données relatives à sa filiation (n° mère et père si existant). Des photos de chaque animal sont réalisées ; dans l'idéal : une photo de profil de l'animal dans son ensemble, une photo de face, une photo de l'arrière et une photo de la tête de l'animal.

Données qualitatives issues de l'observation :
Données quantitatives issues des mensurations :

VARIABLES DISCRÈTES OU QUALITATIVES

• Sexe: femelle, mâle, castré
• Âge estimé ou catégorie de denture
• Motif de la robe: unie, panachures/ pie, moucheté (petites tâches)
• Couleur de la robe: noir, rouge foncé, rouge clair, fauve, gris
• Couleur de la peau: pigmentée, non pigmentée
• Longueur du poil: moyen (1-2mm); long (>2mm)
• Présence de cornes (au niveau du troupeau; séparément pour les mâles et les femelles): pourcentage d'animaux sans corne, pourcentage d'animaux avec cornes
• Forme de la corne: partielle, droite, courbe, en spirale, en tire-bouchon
• Orientation de la corne (au niveau du troupeau; séparément pour les mâles et les femelles): latérale, oblique vers le haut, en arrière (indiquer également si l'animal n'a pas de cornes, si les cornes sont flottantes, ou si les cornes sont juste des moignons).
• Orientation de l'oreille: dressée, semi-pendante, pendante, horizontale
• Profil facial (tête): droit, concave, convexe, ultra-convexe
• Collerette: absente, présente
• Profil de la ligne du dos: droit, descend vers la croupe, descend à partir du garrot, creusé (incurvé)
• Profil de la croupe: plat, pentu, pointu

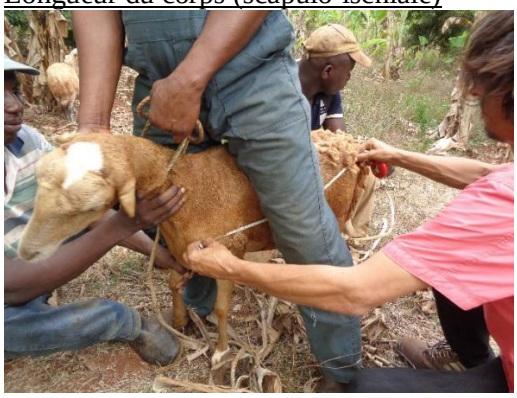
VARIABLES QUANTITATIVES

• Poids vif (si une balance ou un peson est disponible) en spécifiant l'âge

• Taille du corps chez les mâles et les femelles adultes (à 0,5 cm près):
- longueur du corps
- hauteur au garrot
- tour de poitrine
- profondeur de poitrine
- écart entre les pointes des épaules
- longueur de la croupe
- largeur de la croupe
- longueur de la tête
- largeur de la tête
- tour du canon
- longueur de la corne
- longueur de l'oreille
- longueur du poil (sur la ligne du dos, sur la croupe)

Démonstration de réalisation des mesures corporelles

Longueur du corps (scapulo-ischiale)



Hauteur au garrot

Périmètre thoracique

Profondeur de poitrine

Ecart entre les pointes des épaules

Longueur de la croupe

Largeur de la croupe

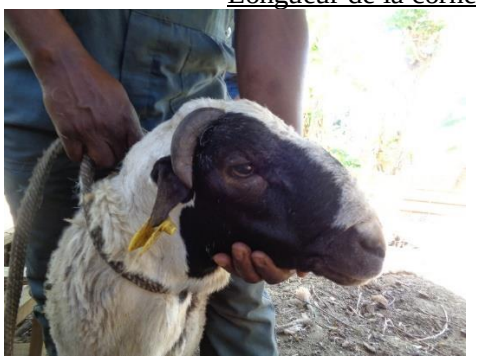
Longueur de la tête

Largeur de la tête

Tour du canon

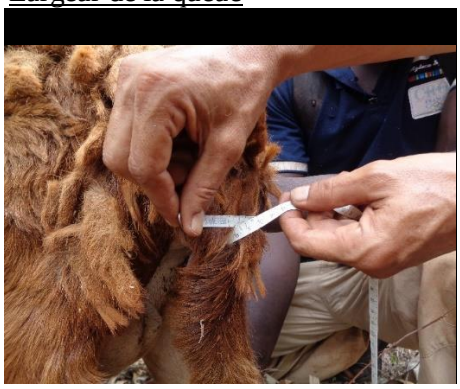
Longueur de l'oreille

Longueur de la corne



Longueur de la queue

Largeur de la queue



Longueur du poil

DEFINITION DES VARIABLES QUANTITATIVES POUR LES MESURES CORPORELLES :

Longueur de l'oreille: longueur (en centimètres) de l'oreille externe depuis sa base sur la nuque jusqu'à la pointe.

Longueur de la corne: longueur de la corne (en centimètres) sur son côté extérieur, depuis sa racine sur la nuque jusqu'à la pointe.

Hauteur au garrot: la taille (verticale en centimètres) depuis la partie inférieure du pied avant jusqu'au point le plus haut de l'épaule sur le garrot. La mesure est prise de préférence avec une règle coulissante.

Tour de poitrine: la circonférence du corps (en centimètres) immédiatement derrière l'omoplate (scapula) dans un plan vertical, perpendiculaire à l'axe longitudinal du corps.

Longueur du corps: la distance horizontale (en centimètres) depuis la pointe de l'épaule jusqu'à l'ischion.

Largeur du bassin: la distance horizontale (en centimètres) entre les points extrêmes latéraux de l'ilion (tuber coxae ou pointes de la hanche) du bassin.

Poids vif: le poids vif à jeun (en kilogrammes)

Voir questionnaire animal (annexe 2)

Données d'adaptation :

Ce protocole n'intègre pas le suivi des animaux, seules quelques mesures seront faites sur chaque animal pour déterminer ponctuellement sa tolérance aux parasites, maladies et à la chaleur.

- **Tolérance ou résistance aux parasites et aux maladies**

On relèvera les causes des visites du vétérinaire.

Pour les parasites externes :

Une évaluation du nombre de tiques et de la présence de gales sera réalisée sur chaque animal en utilisant les descriptifs suivants :

- Absence de tiques
- Présence de tiques
- Forte présence de tiques

- Absence de gales
- Présence de gales
- Forte présence de gales

Pour les parasites internes :

Une petite quantité de fèces sera prélevé sur chaque animal pour effectuer un comptage d'œufs de strongles digestifs. Les analyses seront réalisées dans un délai de 48h maximum par le laborantin au siège de Dembéni.

- **Tolérance à la chaleur**

Un relevé de température rectale sera effectué sur chaque animal ainsi que l'heure du relevé.

- **Tolérance au stress hydrique**

Pour apprécier les conditions de stress hydrique, on effectuera le test du « pli de peau » en observant le temps que la peau de l'animal met à se retendre après avoir été pincée.

4.4.5 Calendrier prévisionnel

Nous estimons un temps d'une heure de collecte de données par animal ainsi que 30 minutes pour l'entretien « exploitation » et 30 minutes pour l'inventaire préalable.

Nous estimons collecter en moyenne 10 animaux par exploitation, soit une durée moyenne de 10h de visite par exploitation. En prévoyant une visite quotidienne, avec des sorties prévues sur 5 jours par semaine, cela revient à collecter 50 animaux par semaine.

Les estimations conduisent ainsi, à une durée de deux semaines de collecte de données pour 100 individus.

Conclusion

Le caprin local possède des années d'adaptations, c'est un modèle de petit gabarit, résistant avec des besoins moins important que le Boer comparativement à sa capacité de production. De plus sa grande résistance aux contraintes climatiques, sanitaires et alimentaires en fait un modèle intéressant. L'amélioration génétique par insémination permettrait d'avoir des animaux plus grand tout en gardant les qualités citées précédemment. Cela permettrait également d'améliorer les qualités les plus intéressantes. La diversité génétique est fondamentale pour satisfaire les besoins présents, mais elle est encore plus importante pour répondre aux besoins futurs. Par exemple, si l'attention passe des systèmes de production à forte intensité d'intrants, ceci favorisera différentes races et différentes caractéristiques intra-raciales.

D'une façon générale, l'attention particulière apportée de plus en plus à certains facteurs, comme le bien-être animal, la protection de l'environnement, la qualité spécifique des produits, la santé humaine et les changements climatiques, demandera un plus grand nombre de critères à inclure dans les programmes de sélection. Ces critères sont souvent satisfaits par les races locales. Il est donc probable que les stratégies les plus appropriées pour la gestion de ces races ne puissent impliquer qu'un changement génétique limité. Par exemple, il serait sage de maintenir les caractères d'adaptation aux conditions difficiles d'environnement ainsi que ceux de résistance aux maladies.

Les pays tropicaux sont handicapés, pour ce qui est de l'amélioration génétique de leurs cheptels par la sélection, du fait de l'insuffisance du contrôle de performances et du manque de connaissances précises au niveau de certains paramètres génétiques nécessaires au fonctionnement optimal des schémas de sélection dès leur lancement. L'infrastructure requise pour diffuser les gains génétiques obtenus par les programmes de sélection est par ailleurs souvent inadéquate. Il reste que les cheptels de production en zone tropicale présentent le formidable avantage de présenter une très grande variabilité de la performance – l'atout maître du succès.

Elevage traditionnel mahorais *(photo Jérome Janelle)*

Annexe 1

Questionnaire exploitation – CAPRIN DEFI ANIMAL

Date de la visite

N° IPG élevage

Latitude

Longitude

Commune

Nom de l'éleveur

Données exploitation {GROUP1}

Nombre de caprins (total)

Nombre de femelles

Nombre de mâles

Nombre de chevrettes

Nombre de chevreaux

Type de production

- ☐ Viande
- ☐ Lait
- ☐ Épargne
- ☐ Abattage cérémonial

Conduite de l'élevage

- ☐ Lot unique
- ☐ Lots différenciés selon l'âge
- ☐ Lots différenciés selon le sexe

Nombre de lot

Approvisionnement pour les boucs

- ○ Renouvellement
- ○ Extérieur (famille)
- ○ Extérieur (hors famille)

Annexe 2

Questionnaire animal - CAPRIN DEFI ANIMAL

Date de la visite :

Heure :

:

Commune :

N° IPG élevage :

Nom de l'éleveur :

Données Animal

Numéro IPG animal :

Série :

Date de naissance :

Sexe :

- Masculin
- Féminin
- Castré

N° mère :

N° père :

Motif de la robe :

- Unie
- Pie
- Moucheté

Proportion pie :

- Entre 1/4 et 1/2
- Entre 1/2 et 3/4
- Plus de ¾

Couleur de la robe :

- Noir
- Rouge foncé
- Rouge clair

- Fauve
- Gris

Couleur de la peau :

- Pigmentée
- Non pigmentée

Marque en tête :

- Oui
- Non

Type de fibre :

- Laine
- Poil

Tonte :

- Oui
- Non

Etat corporel :

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5

Orientation de l'oreille :

- Dressée
- Semi-pendante
- Pendante
- Horizontale

Taille de l'oreille :

- Petites
- Grandes

Profil facial :

- Droit
- Concave
- Convexe
- Ultra-convexe

Présence de cornes :

Oui

Non

Profil de la ligne de dos :

Droit

Descend vers la croupe

Descend à partir du garrot

Creusé (incurvé)

Profil de la croupe :

Plat

Pentu

Pointu

Mesures

Hauteur au garrot :

Longueur scapulo-ischiale :

Tour de poitrine :

Profondeur de poitrine :

Ecart entre les pointes des épaules :

Longueur de la croupe :

Largeur de la croupe :

Longueur de la tête :

Largeur de la tête :

Tour du canon :

Longueur de la corne :

Longueur de l'oreille :

Longueur de la queue :

Longueur du poil :

Données adaptation

Environnement d'élevage :

- Sur herbe
- Sur béton
- Sur terre

Déparasitage :

- Entre 15 jours et 1 mois
- + d'1 moi
- + d'1 an ou jamais

Vermifugation :

- - d'1 moins
- Entrez 1 mois et 1an
- + d'1 an ou jamais

Présence de tiques :

- Aucune présence
- Faible présence
- Présence moyenne
- Forte présence

Présence de gales :

- Aucune présence
- Faible présence
- Présence moyenne
- Forte présence

Observations diverses :

Annexe 3

I- Protocole d'extraction ADN génomique à partir de sang avec le kit Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega

Réactifs (température ambiante)
- Wizard Genomic DNA Purification kit
- Réactifs fournis dans le kit
- Isopropanol
- Ethanol 70%
- Solution de réhydratation DNA fournie dans le kit/DNA rehydratation solution: TE 10:1 pH=7 for bovine blood (Kit)

Matériel
- Tubes stériles 50ml (1/échantillon)
- Tubes stériles 15ml (1/échantillon)
- Microtubes Eppendorf 1.5 ml safelock (1/échantillon)
- Vortex
- incubateur 37°C (avec agitation) ou bain Marie (37°C)
- Centrifugeuse avec rotor swing pour tubes de 50ml et 15 ml
- Microcentrifugeuse pour tubes de 1.5/2 ml

Volumes:

Volume de sang à utiliser : 5ml à partir d'un tube de sang EDTA de 10 ml (le reste étant congelé à -20°C en back-up)

Volume échantillon	Cell Lysis solution	Nuclei Lysis solution	Protein Precipitation Solution	Isopropanol	DNA Rehydration Solution (TE10:1)
10 ml	30 ml	10 ml	3.3 ml	10 ml	600 µl
5 ml	**15 ml**	**5 ml**	**1.65 ml**	**5 ml**	**300 µl**
3ml	9ml	3ml	0.99ml	3ml	180µl
2ml	6ml	2ml	0.66ml	2ml	120µl
1.5ml	4.5ml	1.5ml	0.495ml	1.5ml	90µl

Préparer et identifier les tubes de 50ml, 15ml et Safelock de 1,5/2ml.
Attention : Changer de pipettes plastiques et de cônes pour chaque solution utilisée et entre chaque échantillon.

A. Etape de Lyse des Globules Rouges

1. Se reporter aux volumes mentionnés dans le tableau ci-dessus en combinant les volumes appropriés de Cell Lysis Solution et de sang (dans un tube de 50ml).

Par exemple : ajouter la « Cell Lysis Solution » dans chacun des tubes de 50 ml et ajouter ensuite chaque échantillon de sang correspondant **(dans notre cas : 15 ml).** Mélanger par inversion.

2. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante (inverser 2-3 fois pendant incubation)
3. Centrifuger:
3,700 × g (4200 rpm, Jouan); 15 minutes à température ambiante (2000g dans le protocole Promega)
4. Aspirer et Eliminer autant de surnageant que possible dans toucher au culot. Il devrait rester environ 750µl de liquide résiduelle (pour un échantillon de 5ml).

PS : Si le sang a été congelé, ajouter un volume supplémentaire de “Cell Lysis Solution”, inverser le tube 5–6 fois pour mélanger le contenu et répéter l’étape 2 et 3 jusqu’à ce que le culot soit blanc. Dans le cas d’échantillons congelés, il peut y avoir des pertes d’ADN.

5. Vortexer le tube vigoureusement jusqu’à ce que le culot de globules blancs soit resuspendu (15 s)

B. Etape de lyse des noyaux (Nuclei Lysis)

6. Se reporter aux volumes mentionnés dans le tableau ci-dessus en combinant le volume approprié de Nuclei Lysis Solution **(5 ml dans notre cas)** et mélanger par inversion.

Vortexer pendant 30 secondes. Incuber pendant **1 heure** à 37°C sous faible agitation (150RPM; les tubes sont placés horizontalement) **ou manuellement (horizontalement) 3 à 4 fois.**
Pendant la période d’incubation, préparer dans chacun des tubes de 15 ml le volume approprié d’isopropanol comme indiqué dans le tableau plus haut.

C. Etape de précipitation des Protéines

7. Ajouter la solution « Protein Precipitation Solution » **1.65 ml dans notre cas;** mélanger par inversion. Attendre 5 minutes
8. Centrifuger à 3,700 × g pendant 15 minutes

D. Etape de Précipitation de l’ADN et Réhydratation

9. Transférer le surnageant dans le nouveau tube de 15 ml contenant l’isopropanol (utiliser les volumes mentionnés dans le tableau) : **5 ml dans notre cas**
10. Mélanger en inversant le tube jusqu’à visualiser l’ADN sous forme de méduse de type « jellyfish »
10. Transférer cette “méduse/ jellyfish” dans un tube propre Eppendorf (Safelock) de 1.5-2 ml à l’aide d’une micropipette.
11. Ajouter 1 ml 70% d’éthanol.

12. Centrifuger à la vitesse maximale 14.000 rpm dans une centrifugeuse de paillasse à Eppendorf

13. Aspirer l'ethanol avec une micropipette et laisser sécher le culot à l'air libre à **4°C, toute la nuit, tube ouvert.**

14. Rehydrater le culot d'ADN avec le volume approprié de « **rehydratation solution** (TE 10:1) » c'est-à-dire **300 ul** à **4°C pendant 24h** (volume indiqué dans le tableau).

Annexe 3bis: Protocole original en anglais: Isolation of Genomic DNA from Whole Blood with the Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega (Laurence Flori)

Reagents (room temperature)
- Wizard Genomic DNA Purification kit
- Reagents provided in the kit
- Isopropanol
-Ethanol 70%
-DNA rehydratation solution: TE 10:1 pH=7 for bovine blood (Kit)

Materials
-sterile 50ml tubes (1/sample)
-sterile 15ml tubes (1/sample)
-sterile1.5ml safelock microcentrifuge tubes (1/sample)
-37°C incubator (with shaker) or water bath (37°C)
-Centrifuge with rotor swing out for 50ml and 15 ml tubes
-Microcentrifuge 1.5/2 ml

Volumes:

Blood volume: 5ml from the 10 ml EDTA tube

Sample vol	Lysis solution Cell	Lysis solution Nuclei	Protein Precipitation Solution	Isopropanol	DNA Rehydration Solution (TE10:1)
10 ml	30 ml	10 ml	3.3 ml	10 ml	600 µl
5 ml	**15 ml**	**5 ml**	**1.65 ml**	**5 ml**	**300 µl**
3ml	9ml	3ml	0.99ml	3ml	180µl
2ml	6ml	2ml	0.66ml	2ml	120µl
1.5ml	4.5ml	1.5ml	0.495ml	1.5ml	90µl

Protocol:

Preparation and identification of 50ml, 15ml and 1,5/2ml Safelock tubes.
Be careful: Change plastic pipettes and pipet tips after each addition between samples/tubes.

E. Red Blood Cell Lysis

1.Using volumes from the table above, combine the appropriate volumes of Cell Lysis Solution and blood (in 50ml tubes): i.e. add the lysis solution in each 50ml tube and then add each blood sample to each tube. Mix by inversion.

2. Incubate for 10 minutes at room temperature (invert 2-3 times once during incubation)

3. Centrifuge:
3,700 × g (4200 rpm, Jouan); 15 minutes at room temperature (2000g in the Promega protocol)

4. Remove and discard as much supernatant as possible without disturbing the pellet. Approximately 750µl of residual liquid will remain (for 5ml sample).
If blood sample has been frozen, add an additional volume of Cell Lysis Solution, invert 5–6 times to mix, and repeat Steps 2–3 until pellet is nearly white. There may be some loss of DNA in frozen samples

5. Vortex the tube vigorously until the white blood cells are resuspended (15 s)

F. Nuclei Lysis

6. Using volumes from the table above, add Nuclei Lysis Solution and mix by inversion. Vortex for 30 seconds. Incubate for 1 hour at 37°C with low shaking (150RPM; the tubes are placed horizontally) or manually (horizontally) shake the tubes (3-4 times).
During the incubation step, add appropriate volume of isopropanol in each 15ml tube as indicated in the table above.

G. Protein Precipitation

7. Add Protein Precipitation Solution; mix by inversion. Wait for 5 minutes
8. Centrifuge: 3,700 × g; 15 minutes

H. DNA Precipitation and Rehydratation

9. Transfer supernatant to a new tube contaning isopropanol (using volumes from table above).
10. Mix by inversion to obtain DNA jellyfish
10. Transfer jellyfish to a 1.5-2 ml eppendorf tube (Safelock)
11. Add 1 ml 70% ethanol.
12. Centrifuge at max speed in a standard bench centrifuge
13. Aspirate the ethanol and air-dry the pellet (at 4°C, Overnight, open tube).
14. Rehydrate the DNA in the appropriate volume of DNA rehydratation solution (TE 10:1) at 4°C 24h as indicated in the table above.

Annexe 4

Prélèvements d'échantillon de fécès

A l'aide d'un gant de fouille, récupérer des selles fraîches ; retourner le gant et noter au feutre le nom de l'éleveur, le numéro de l'animal et la date. Par précaution, placer un petit morceau de bristol indiquant ces infos dans le gant.

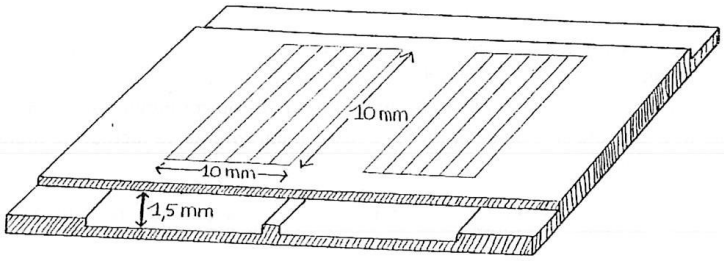
Conserver les prélèvements en glaciaire à 4-6°C pendant le transport jusqu'au laboratoire. Au laboratoire, les échantillons se conservent au maximum 3 jours avant l'analyse coproscopique.

Analyse coproscopique : Méthode de Mac Master

La méthode de Mac Master est une méthode quantitative basée sur le principe de la flottation. Elle consiste à compter le nombre d'éléments parasitaires contenus dans 0,30 mL d'une suspension de matière fécale diluée au 1/15ème et nécessite l'utilisation d'une lame de Mac Master.

1. *Présentation de la lame de Mac Master*

La lame de Mac Master est composée de deux compartiments contigus séparés par une cloison, chacun d'entre eux ayant un volume de 0,15 ml (150 mm^3). Le plafond de chaque compartiment est divisé en 6 cellules de 1,7 mm de largeur.



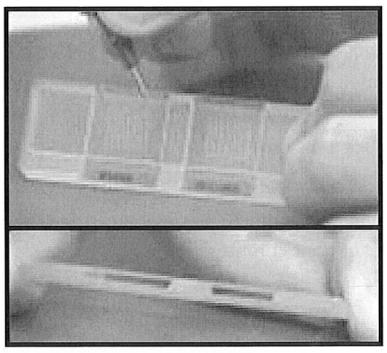


Schéma et photographie (31) d'une lame de Mac Master

De même, on ne peut pas faire une analyse quantitative des larves. En effet, leur mobilité les entraîne vers le bas de la cellule alors que la mise au point se fait dans la partie supérieure

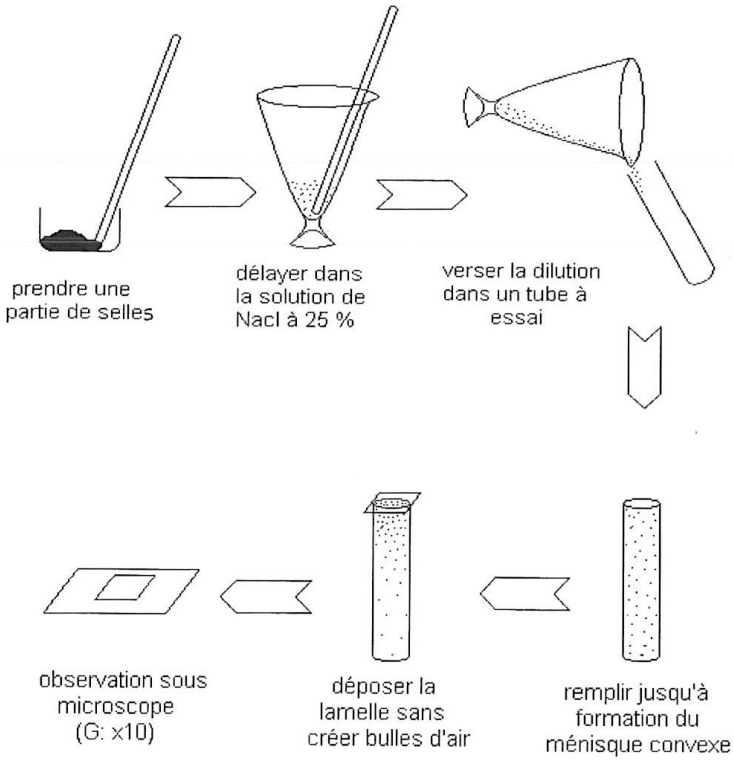
6. Bibliographie

Chartier C., Itard J., MorelL PC., Troncy PM., 2000 : Précis de parasitologie vétérinaire tropicale : Editions Médicales Internationales., 773 p.

Euzeby J. 1981. Diagnostic expérimental des helminthoses animales. Livre 1. Diagnostic ante mortem. Editions « Informations Techniques des Directions des Services Vétérinaires ». Ministère de l'Agriculture. 349 p.

Analyse coproscopique : méthode de flottation pour les œufs de douve (gros œufs, pour lesquels la méthode de McMaster marche assez mal).

Après avoir bien agité la solution de flottation, remplir un tube à essai jusqu'à former à l'ouverture du tube un ménisque liquide convexe. Sur ce ménisque, déposer une lamelle de microscope (2 x 2 cm). La retirer au bout de 15 minutes (le temps pour les œufs de remonter à la surface et se coller sur la lamelle) et la déposer sur une lame porte-objet. Regarder au grossissement X 10.



2. *Réalisation*
   - Réaliser l'inspection macroscopique du prélèvement.
   - Homogénéiser le prélèvement au moyen d'un mortier et d'un pilon (surtout les fecès de petit ruminant, qu'il faut bien écraser)
   - Peser précisément 3 grammes de matières fécales.
   - Ajouter à ce prélèvement 42 ml d'une solution de flottation (eau + chlorure de sodium à saturation) et bien homogénéiser le mélange à l'aide d'un agitateur. Une solution d'eau et de chlorure de sodium à saturation s'obtient en mélangeant dans un grand becher de l'eau et du sel jusqu'à ce que le sel ne puisse plus se dissoudre.
   - Passer la solution au chinois pour retirer les gros morceaux
   - Prélever un échantillon de la suspension à la pipette.
   - Remplir à l'aide d'une pipette chacun des deux compartiments de la lame de Mac Master avec la suspension.
   - Attendre pendant 5 min environ que les œufs remontent. On peut durant ce laps de temps préparer d'autres lames de McMaster (avec d'autres échantillons).
   - Se placer à l'objectif x10 (la largeur des cellules est alors juste contenue dans le champ du microscope).
   - Faire défiler successivement les 6 cellules et compter le nombre total d'œufs en les identifiant.

3. *Calcul du nombre d'oeufs par gramme de fèces (OPG)*

Chaque cellule a un volume connu de 0,15 ml donc, comme la solution est diluée au quinzième[1], le nombre d'œufs comptés est celui contenu dans un centième de gramme de fèces. Pour obtenir le nombre d'œufs par gramme, **on multiplie le résultat obtenu lors du comptage sur un compartiment par un facteur 100. On conseille de compter les deux compartiments, le facteur de multiplication sera alors de 50.**

Si le nombre d'œufs est très élevé, il est recommandé de ne compter qu'une seule cellule, et de multiplier le résultat par 600.

Conclusion : OPG = nombre d'œufs dans les deux compartiments x 50.

Remarque : afin d'obtenir un résultat statistiquement significatif, il est recommandé de pratiquer plusieurs lectures de lames et d'en effectuer la moyenne.

4. *Avantages*

La méthode de Mac Master permet une étude coproscopique quantitative.

Elle est assez rapide.

5. *Limites*

La lecture ne peut se faire qu'avec l'objectif x10. Les éléments de très petite taille (Protozoaires) ne pourront donc pas être identifiés et donc comptés.

---

[1] *42 ml de solution de flottation + 3 gr de fecès (≈ 3 ml) donne un volume total de 45 ml. 3 ml dans 45ml donne bien une solution au 1/15ème*

5. Annexes

Document de travail