

CONCEPTION ET PLANIFICATION DANS LES BIOTECHNOLOGIES INNOVANTES : LE CAS DU CLONAGE EQUIN

Michel NAKHLA* et Alline DE PAULA REIS*

Résumé. - Depuis le début des années cinquante, certaines biotechnologies ont engendré un système industriel : les CBC « conception biologique complexe » que l'on retrouve dans des domaines comme l'insémination artificielle, le transfert d'embryon ou le clonage des mammifères. Les délais de conception de clones spécifiques, l'accumulation de plusieurs étapes de manipulation, le nombre d'acteurs concernés concourent à cette complexité. En plus, la sophistication croissante des équipements industriels ne s'accompagne pas forcément par un accroissement dans les volumes de production ; l'instabilité des techniques limitera la taille des séries sur un marché de toute façon limité. On observe alors que ces conceptions biologiques complexes actuelles sont de plus en plus soumises à des impératifs économiques, notamment la fiabilisation des cycles de conception et de mise sur le marché. Dans cet article nous adaptons le modèle MRP aux CBC dans un contexte d'incertitude sur les processus de conception des composants. On définira les relations entre composants qui permettent de définir les quantités à lancer pour satisfaire un plan de production.

Mots-clés : Biotechnologie ; Incertitude ; Planification ; Système de production ; MRP.

1. Les caractéristiques des systèmes complexes de conception et de production biologique

Les systèmes de production du clonage sont constitués de trois ateliers principaux : un atelier de cellules, un atelier d'ovocytes et un atelier d'animaux (Figure 1).

* Centre de Gestion Scientifique Mines ParisTech et Agro ParisTech. Allinepr@yahoo.fr, Nakhla@ensmp.fr.

Dans l'atelier de cellules, on réalise la préparation d'une biopsie pour la culture et la multiplication des cellules et leur congélation et stockage si elles ne sont pas utilisées immédiatement. Lors du clonage, la préparation des cellules pour l'utilisation se fait dans cet atelier. Il s'agit de la décongélation des cellules stockées et de leur mise en culture jusqu'à une confluence de 95%, ou en sérum starvation, de façon à ce qu'elles soient au stade du cycle cellulaire idéal pour le clonage. Cet atelier est relativement simple, nécessite peu d'équipements, peu de main d'œuvre et présente un faible pourcentage de perte.

Le deuxième atelier, « ovocytes », est plus complexe. Il nécessite des équipements technologiques de pointe coûteux et dont la valeur ajoutée est élevée. C'est ici que le clonage proprement dit est réalisé à travers l'énucléation d'un ovocyte et l'injection d'une cellule somatique. La main d'œuvre requise est très spécialisée. Le choix des équipements à utiliser dans cet atelier doit être rigoureux afin d'éviter des problèmes d'incompatibilité entre l'équipement et la fragilité des cellules à manipuler.

Dans cet atelier, plusieurs étapes se succèdent dès la récolte d'ovocytes jusqu'à la culture embryonnaire. Dans l'état actuel de cette technologie, les pertes liées à cet atelier sont encore importantes comme nous le verrons plus loin.

Le troisième atelier « animaux » est le plus coûteux et demande une bonne capacité technique de conduite des animaux. Il sert au transfert des embryons viables produits dans l'atelier ovocytes dans des juments receveuses. Une bonne maîtrise de la technique de transfert embryonnaire est requise afin de limiter les pertes. Le coût lié à cet atelier est composé principalement du grand nombre de juments nécessaires, de l'entretien des juments, et du suivi vétérinaire des nouveau-nés.

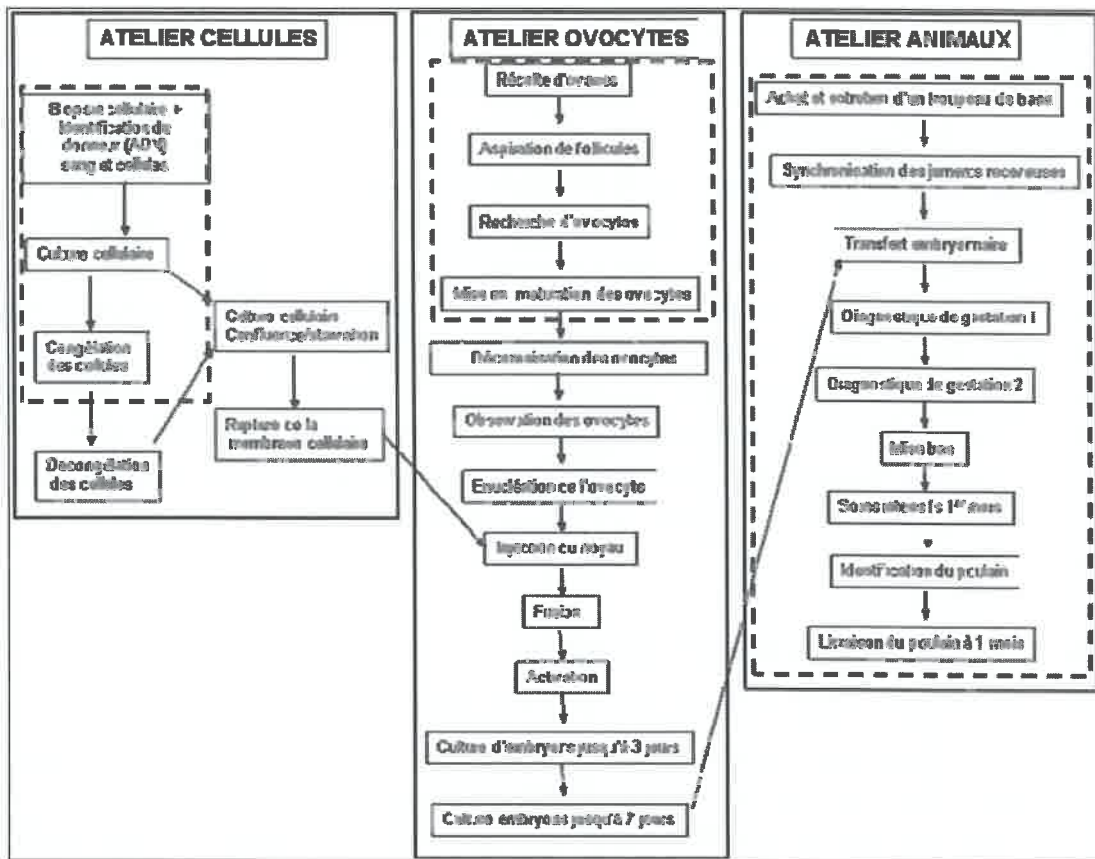


Figure 1 : Les trois ateliers d'un système de production du clonage équin.



Partie de l'atelier passible d'être indépendante du laboratoire de clonage.

Ces trois ateliers peuvent être intégrés dans une même organisation ou éclatés entre plusieurs structures appartenant ou non à une même entreprise. C'est le cas de la préparation des biopsies pour la congélation, de la récolte et de la mise en maturation des ovocytes et de l'atelier « animaux » (parties représentées par des rectangles pointillés de la figure 1).

Si l'on se place du point de vue organisation du système de production, ces industries présentent plusieurs caractéristiques :

1.1 Des processus de conception et de production complexes

En plus des spécificités des objets manipulés et des activités scientifiques mobilisés, la conception et la production d'un produit donné exige une variété d'intervenants. Le processus est distribué parmi un grand nombre d'unités de conception et de production, avec une grande interdépendance et un besoin de coordination. Un des points centraux dans ces systèmes de conception et de production est le degré d'intégration et d'interaction entre ateliers de

conception et de production. Le résultat final dépend principalement de la qualité des connaissances échangées.

Ces centres peuvent faire partie d'une même structure ou, au contraire, appartenir à différentes structures. De la même façon, ils peuvent être localisés dans plusieurs régions du monde. Cependant, malgré cette composition multicentrique, il ne s'agit pas d'un système traditionnel d'open innovation, les limites des centres participant aux CBC sont facilement définies. Le résultat final est facilement partageable selon les contributions respectives. Les commandes sont en général uniques et en très petites quantités. Les plus longues séries dépassent rarement cinq unités par produits. D'une part les technologies développées ne permettent pas d'arriver techniquement à plusieurs produits et, d'autre part, la mise sur le marché d'un grand nombre de produits pénalise la valeur marchande du clone obtenu. A la manière d'un marché d'œuvres d'art, les clients préfèrent posséder quelques exemplaires uniques.

1.2 Un « produit » est synonyme d'un projet ou d'un prototype

Toutefois, étant donné l'existence de produits différents qui partagent les mêmes ressources, les planificateurs de production ont à gérer les priorités des commandes différentes et la répartition des ressources rares de la même manière que dans toute la production classique. Chez le cheval, une dizaine d'années peuvent s'écouler entre les premières manipulations en laboratoire et les premiers résultats qui s'apparentent davantage à des prototypes qu'à une production en série (Vidament 2005 ; Squires et al. 2006). Ainsi, les résultats des premières inséminations artificielles ou de transfert embryonnaire réalisés dans les années 70 ont vu le jour des décennies après. Parallèlement, d'autres techniques comme la fertilisation in vitro, le sexage de semence ou la cryoconservation d'embryon ont aussi apporté une contribution à la réussite de ces biotechnologies. Le lecteur peut se reporter aux travaux de Allen (2005) pour une histoire de l'évolution des biotechnologies de la reproduction dans l'espèce équine et de Squires (2009) pour une discussion des effets des biotechnologies sur le développement de l'industrie du cheval.

1.3 Des cycles de conception longs et incertains

Toutes les caractéristiques précédentes se combinent pour générer dans ces biotechnologies des cycles de conception unitaires allant de plusieurs mois à plusieurs dizaines de mois. Les délais de conception de clones spécifiques, l'accumulation de plusieurs étapes de manipulation, le nombre d'acteurs concernés concourent à cette complexité. De plus, un accroissement des moyens techniques et d'effectifs en laboratoires n'aurait aucun effet sur ces cycles, s'il ne s'accompagnait pas d'un effort similaire de la part des fournisseurs d'ovocytes et

d'un minimum de reproductivité des techniques de manipulation et de coordination au sein du réseau conceptif.

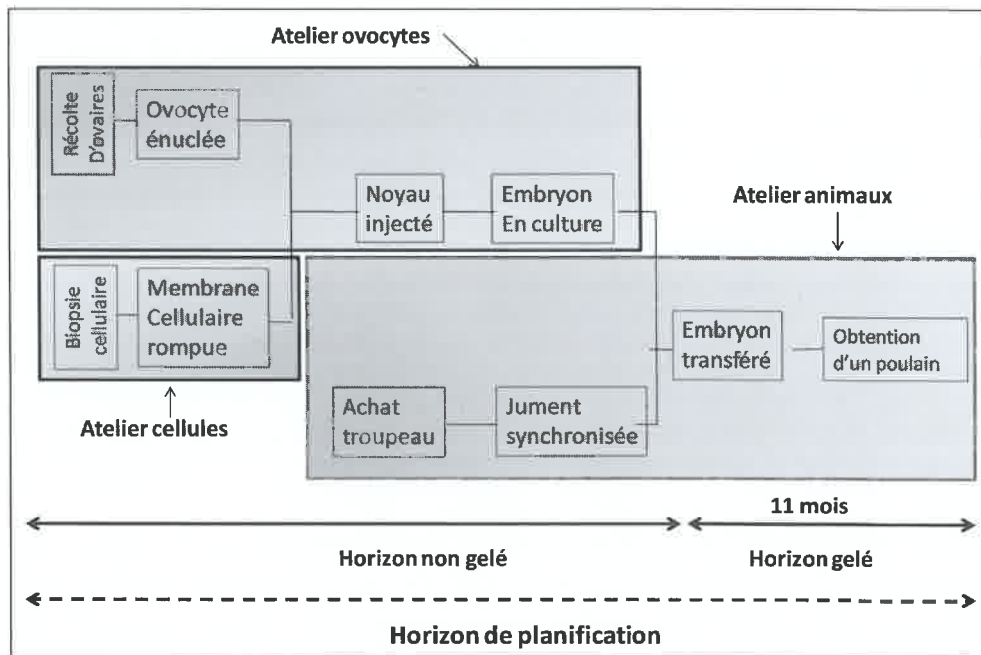


Figure 2 : Système de production du clonage.

Dans ces systèmes de production, ces caractéristiques rendent difficile la tenue des dates de livraison du produit : un clone équin. La pression des clients, qui fixent des échéances de plus en plus fermes, rendent nécessaires des efforts de planification et de coordination. Le lancement en conception et production d'une demande en clones est peu flexible et se heurte à plusieurs imprévus au niveau des différents articles dépendants et rendent le calcul des besoins extrêmement aléatoire.

La sophistication croissante des équipements industriels ne s'accompagne pas forcément d'un accroissement dans les volumes de production ; l'instabilité des techniques limitera la taille des séries sur un marché de toute façon limité : ces deux mouvements sont essentiels pour qu'une activité de type complexe s'installe. Or, nous allons voir que les CBC actuelles sont de plus en plus soumises à des impératifs économiques, notamment la fiabilisation des cycles de conception et de mise sur le marché.

Malgré cela, un petit nombre de laboratoires dans le monde s'intéresse aujourd'hui à la mise au point et à la commercialisation de clones de différentes espèces. De loin, l'espèce bovine est la plus étudiée par les laboratoires de clonage dans le monde (Faber et al. 2003). Les efforts engagés par les laboratoires de clonage consistent souvent à introduire de la flexibilité sous

forme de fourchette de quantités au niveau des différents composants de manière indépendante. Cette tolérance sur les quantités des composants permet de fournir le clone dans un délai donné.

Cette situation peut être traitée en adaptant une approche MRP avec aléas de conception sur les composants de la nomenclature. La demande étant suffisamment répétitive avec une logique de calcul des besoins. Mais en même temps à cause de la spécificité de chacune des commandes la planification relève d'une planification type projet où la conception d'une tâche est aléatoire et conditionne la réalisation des étapes suivantes.

1.4 Une nomenclature d'apparence simple

Le mode de fonctionnement que l'on vient de présenter peut être assimilé à celui du MRP où le lancement en production d'un produit à partir d'un plan de production se calcule au plus tard en partant d'une décomposition en activités (articles), l'ensemble constituant une nomenclature.

L'horizon de planification se décompose en un horizon gelé et un horizon non gelé. La durée de l'horizon gelé ne peut être modifiée. Cet horizon gelé définit le point de découplage entre production à la commande et production pour stock. Les lead times (LT) des différents composants sont extrêmement variables. Certaines manipulations peuvent durer moins d'une minute. Cette nomenclature est supposée être la nomenclature par défaut, l'objectif est de s'en approcher.

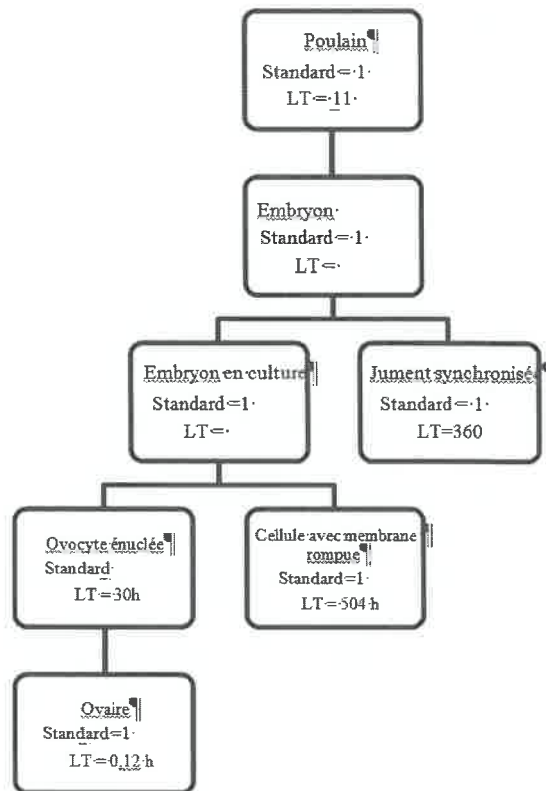


Figure 3 : Nomenclature standard avec quantités fixes.

L'analyse des processus de conception biologique suppose une gestion à la commande de l'ensemble des articles compte tenu de l'unicité du produit (quelques exemplaires de produits finis). Les capacités de production ne sont pas toujours très suffisantes ou très coûteuses. Pour gérer cette situation, il est nécessaire d'introduire des stocks de sécurité (par congélation) pour certains articles (comme les ovaires sources d'ovocytes). Techniquement, on ne peut malheureusement pas congeler les ovaires... et malheureusement on ne peut pas avoir des ovaires en stock. Dans cette partie je comprends comme stocks de sécurité : les cellules (on les multiplie en culture jusqu'à en avoir un nombre bien supérieur à celui dont on aura réellement besoin) ; ou encore la congélation d'embryons (la congélation des embryons ne fait pas partie du processus en soi, mais, dans certains cas, ils peuvent être congelés pour être transportés dans un autre centre pour le transfert. Dans ce cas, pourquoi ne pas réfléchir dans ce sens : congeler des embryons pour en avoir en stock et pouvoir les transférer rapidement dès que les pertes pendant la gestation commencent à apparaître). Une autre forme de stock de sécurité serait la production de gestations supplémentaires pour assurer la naissance d'au moins un poulain en cas de pertes importantes.

La nomenclature de planification d'un ensemble d'activités expérimentales décrit la structure moyenne d'utilisation de ces activités par chaque produit fini. Par conséquent, les durées situées hors horizon gelé ne sont pas connues avec précision. Elles dépendent de la probabilité d'obtention des composants.

L'utilisation de ce mode de planification suppose de surmonter deux difficultés :

- Chaque article est le résultat d'un processus d'expérimentation biologique où l'on accepte un certain nombre d'échecs (avant l'obtention d'un succès), ce qui peut être représenté par une loi de Pascal. La nomenclature peut être considérée comme un vecteur de probabilité de réussite des différentes étapes du clonage.
- La seconde difficulté tient à l'éloignement géographique des ateliers qui contribuent à la fabrication des différents articles ou s'approvisionnant auprès d'un nombre réduit de fournisseurs (quelques abattoirs dans le monde par exemple pour la récolte d'ovaires). Ces deux difficultés constituent la principale source de risque dans la planification. Elles doivent être prises en compte dans les relations entre articles et dans le calcul des coefficients techniques.

2. Revue de la littérature

La littérature dit peu de choses sur des situations d'assemblages de composants issus d'un processus de conception. En revanche, la prise en compte d'aléas sur les délais et sur la qualité des composants dans un environnement MRP ont été largement étudiés. Nous rappelons brièvement les principales pistes poursuivies et les résultats obtenus :

2.1 *Le stock comme levier essentiel*

Une première catégorie d'auteurs s'est focalisée sur la prise en compte des aléas dans la planification basée sur MRP :

- La modélisation de l'incertitude par des variables aléatoires et le calcul à chaque niveau de la nomenclature de la variance de la demande en composants, permet de dimensionner la taille des stocks de sécurité (Büchel, 1982).
- La protection contre l'incertitude en majorant ou en allongeant artificiellement les délais d'obtention (Wijngaard, et al., 1985 ; Guerrero, et al., 1986 ; Buzacott, et al., 1994 ; Molinder, 1997 ; Chang, 1985). Cette stratégie de majoration des délais a pour inconvénient d'aboutir à une accumulation d'encours aux différents niveaux de la

nomenclature sauf s'il s'agit de contrer un problème de qualité d'un composant par une majoration correspondant à une moyenne de composants défectueux.

- La possibilité de se protéger contre l'incertitude par des délais de sécurité en analysant l'arbitrage entre stocks de sécurité et délais de sécurité en fonction de la fiabilité des prévisions, des capacités de production, du coût de possession et du coût de rupture (Buzacott, et al., 1994).

D'autres auteurs ont examiné la question de la localisation des stocks de sécurité dans une planification MRP de produits standardisés. Leur objectif est de maximiser le niveau de service en répartissant sur les différents niveaux de la nomenclature une valeur donnée de stock de sécurité par une approche analytique (Lagodimos, et al., 1993).

En présence d'existence d'aléas sur les délais et la qualité (Camisullis et Giard, 2010) et (Camisullis et al., 2011) ont montré que si le Besoin Brut à couvrir par le lancement en production est connu, il est possible de se protéger contre une rupture de stock liée à la possibilité que chaque pièce à livrer ait la probabilité de ne pas être conforme par l'utilisation d'un stock de sécurité.

2.2 La maîtrise de l'interaction entre niveaux de planification

Hatchuel et Sardas (1998) ont étudié l'interaction entre les étapes de planification et d'ordonnancement dans un système de planification de la production hiérarchique. Ces auteurs ont montré que la performance du respect des délais résulte d'une bonne combinaison entre MRP et PERT. Ces résultats ont été basés sur un modèle de simulation intégrant des stratégies de planification multi-niveaux. Dans l'approche proposée, le problème global est décomposé en sous-problèmes plus simples. Tous ces sous-problèmes exigent une planification qui correspond à une couche de prise de décision.

Pour le calcul des besoins, l'approche s'appuie sur un modèle de simulation. L'entreprise simulée fabrique, à la commande, une grande variété de produits, sans tenir compte des composants communs entre plusieurs produits, dans trois ateliers en cascade, chacun dédié à un niveau de nomenclature. A chaque produit, on affecte une gamme et on identifie chaque opération de la chaîne par un numéro machine et un temps opératoire standard, généré suivant une loi uniforme $\mu(1,99)$. Pour avoir une vision plus réaliste de l'environnement, on multiplie ce temps par un coefficient k généré aléatoirement. On obtient ainsi un temps « réel » et on considère que chaque machine peut réaliser une infinité d'opérations.

Pour anticiper les aléas d'assemblage, les auteurs introduisent dans le calcul du délai de réalisation de chaque article un temps inter-opératoire pour modéliser l'existence des files

d'attente à l'entrée des postes de travail et une marge d'ordonnancement, qui sert à anticiper les pannes, les retards d'approvisionnement et même les changements des besoins des clients. Des marges sont ensuite attribuées aux articles situés sur le chemin critique.

D'autres auteurs comme Ng et al. (2003) simulent le fonctionnement d'un système de production composé de N échelons, avec des délais d'approvisionnements aléatoires et comparent différents types de politiques de stock. Martel (2003) s'intéresse au fonctionnement d'une chaîne logistique composée de trois niveaux, qui utilisent des politiques de complètement périodique avec des délais d'approvisionnement prédéterminés, pour définir des politiques de planification glissante permettant de gérer efficacement les flux.

Ces approches reposent implicitement sur une coopération entre différents niveaux de la chaîne et n'envisagent pas l'autonomie décisionnelle de chaque maillon. On se place donc ici dans le cadre d'une autonomie décisionnelle des maillons de la chaîne. Au niveau de chaque atelier, chaque manipulation comporte un risque de mise au point et donc de rupture du flux à son niveau.

Dans le cas des CBC, l'obtention du produit final suit une distribution qui correspond à la combinaison d'aléas correspondants à des probabilités de réussite des processus de conception de chaque composant. Si ni le délai, ni le plan de conception et de production ne sont flexibles, le recours à une nomenclature flexible peut aider à faire face à des situations d'aléas. Ram et Al, 2006 ont mobilisé ce concept pour faire face aux aléas en utilisant MRP pour planifier les besoins en articles dépendants et substituables. Ces auteurs ont élaboré un modèle qui permet de générer, selon le profil du plan de production, des nomenclatures avec des quantités optimales choisies, pour chaque composant, parmi un ensemble possible de quantités. Selon Ram (2006), les exigences énoncées dans le plan de production sont remplies, dans un temps opportun en permettant de remplacer certains éléments par d'autres en cas d'une pénurie. Un modèle d'optimisation permet de calculer ensuite ces quantités optimales. Le modèle identifie un «mélange» d'éléments de niveau inférieur qui répondent à la pénurie et minimisent l'écart par rapport à la nomenclature par défaut. Ram suppose connu l'ensemble des valeurs possibles de chaque composant et une substituabilité, ce qui n'est pas notre cas ici. Nous nous focaliserons ici sur la détermination des valeurs possibles de chaque composant en supposant que l'obtention du produit final est le résultat d'une combinaison de plusieurs variables aléatoires.

3. Matériel et méthodes

Pour mener ce travail, nous avons mené un travail de terrain auprès de plusieurs laboratoires de clonage en effectuant des mesures et des statiques sur les composants mobilisés. Les composants dont il est question ici sont les résultats d'un processus d'expérimentation

biologique dont l'assemblage vise la production d'un clone. Dans une nomenclature classique, la liaison entre l'article composé et ses composants est accompagnée d'un coefficient. Ce dernier indique le nombre d'unités de ce composant dans l'article composé. Dans notre cas, le nombre de composants disponibles sont des variables aléatoires X représentant le nombre d'échecs (avant l'obtention du nombre donné n de succès). C'est au final un rendement calculé à chaque étape.

Pour estimer ces valeurs, nous avons identifié les différents laboratoires actifs sur le clonage équin dans le monde à partir de publications scientifiques et avons réalisé des entretiens avec des chercheurs et entrepreneurs dans ce domaine. Un des auteurs a réalisé un séjour dans un laboratoire français pour participer aux processus menant au clonage (manipulations des ovocytes et négociations commerciales).

Le choix des laboratoires a été fait selon deux facteurs : le savoir-faire et la proximité de la matière première « présence d'abattoirs pouvant fournir des ovocytes ».

Types de centres
Centres de recherche développant la technologie et ayant déjà produit de clones viables
1 centre universitaire américain 1 centre de recherche italien 1 centre de recherche argentin
Centres de recherche développant la technologie mais pas encore de clones viables
2 centres de recherche polonais 1 centre de recherche brésilien 1 centre de recherche argentin
Centres de commercialisation
1 centre de commercialisation en France
Centres d'inscription et d'autorisation de clones (studbook)
1 studbook en Belgique

Tableau 1 : Liste de centres de clonage équin étudiés entre 2008 et 2010.

Dans le monde, quatre centres de recherche ont produit des clones de chevaux ; quatre centres de recherche travaillent sur la technologie du clonage mais ne sont pas encore capables de produire des clones viables ; deux entreprises commercialisent des clones équins et trois studbooks acceptent l'inscription des clones.

Les quatre centres de recherche spécialisés ayant déjà produit des clones équins (ou plutôt d'équidés) sont représentés par deux universités américaines (dont une est la première à produire des clones d'équidés dans le monde) ; un centre de recherche italien, le premier à produire le clone d'un cheval castré et le premier à faire naître un clone porté dans l'utérus de la

propre donneuse de la cellule somatique (sa « jumelle ») ; et une université Argentine qui a produit son premier clone en 2010.

Les quatre centres de recherche développant la technologie mais pas encore capables de produire des clones viables se situent en Pologne (2), au Brésil (1) et en Argentine (1). Un des centres polonais a produit des embryons en 2008, mais n'a pas obtenu de gestation. Le centre brésilien, développe surtout de la recherche fondamentale sur la maturation et l'activation des ovocytes (Fernandes et al. 2008). En Argentine, un centre de recherche a déjà eu une gestation en 2007 (Czubaj, 2007), étant prématurée à la naissance, la pouliche n'a pas dépassé la phase néonatale.

L'activité commerciale liée à cette biotechnologie a débuté en 2001. Elle est dominée par deux principaux acteurs. La première société à avoir commercialisé des clones de chevaux est basée en France et s'est spécialisée dans le marché de clones de chevaux de haut niveau sportif en jumping, endurance et dressage. La deuxième société existante sur le marché est américaine, spécialisée dans la vente du « service de clonage ». Elle fait partie d'un réseau d'entreprises innovantes et s'est unie à une troisième société, aussi américaine, dont la spécialité est le « service génétique pour l'éleveur de chevaux » afin de commercialiser des clones équins aux Etats-Unis.

L'autorisation du clonage équin est liée à la reconnaissance officielle de poulains, étalons et poulinières clonées par un studbook. Avec cette reconnaissance, les clones sont autorisés à participer à des concours hippiques et leur descendance aura une origine déterminée (une race), facteur valorisant au moment de la vente.

Nous avons rencontré trois studbooks permettant l'inscription de clones. Un belge, un anglais et un américain. Les trois studbooks sont spécialisés dans le sport équestre et font la sélection par la performance. D'où l'intérêt d'inscrire les clones de grands performeurs, futurs reproducteurs. Les studbooks plus traditionnels comme le Hannovrien, Holsteiner, Selle Français, Pur Sang et Arabe n'acceptent pas encore l'inscription de chevaux clonés.

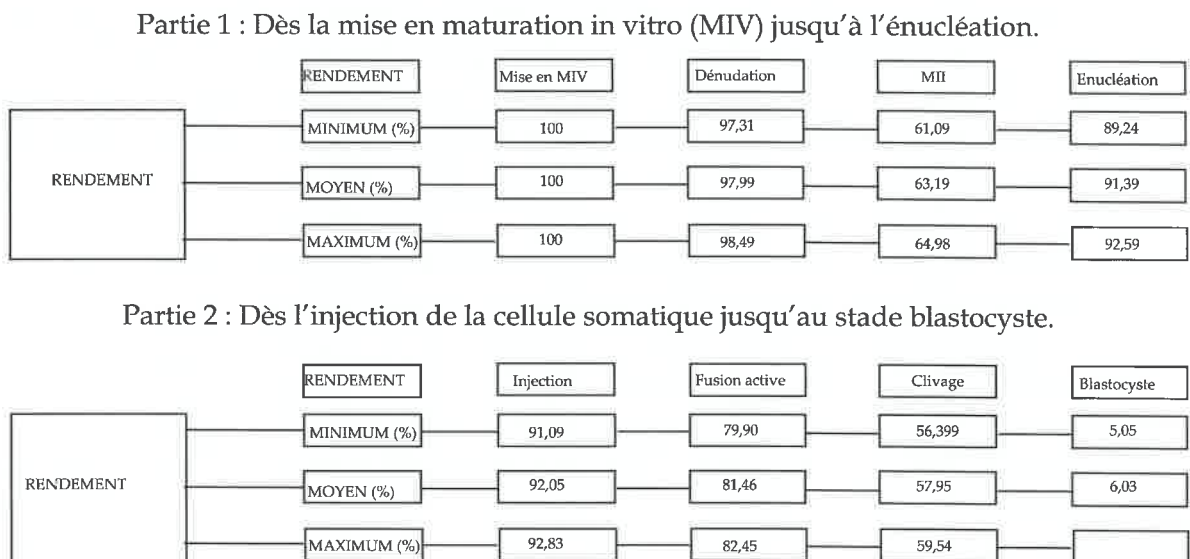
Les clones équins commercialisés dans le monde sont les clones de champions mondiaux d'endurance, jumping, dressage, et grands champions nationaux de cutting et equine herding sport et barrel races. Seule une jument a été clonée pour la recherche et un seul cheval de compagnie a été cloné pour restituer « l'original » à son propriétaire. Il est difficile de savoir le nombre exact de chevaux clonés car nous n'avons pas accès aux bases de données complètes de tous les producteurs mais nous estimons une quarantaine de lignées clonées donnant naissance à une cinquantaine de clones.

4. Détermination des quantités de composants à partir du rendement global du clonage

Une nomenclature flexible repose sur l'allocation d'une zone de tolérance à chaque composant intermédiaire. Les limites de cette flexibilité sont Q_i (la quantité standard du composant i), l_i (limite inférieure), et u_i (limite supérieure). Pour construire ces limites, nous avons constitué une base de données à partir des informations fournies par les laboratoires visités et des publications les plus récentes ayant abouties à des clones vivants et viables à 1 mois de vie (Hinrichs et al. 2007; Hinrichs et al. 2006, Lagutina et al. 2005). Nous n'avons pas pris en compte les études menées jusqu'au stade blastocyste pour ne pas introduire un biais sur le rendement global.

4.1 Calcul du rendement global du clonage entre la mise en maturation des ovocytes et l'obtention d'un poulain cloné vivant et viable après un mois d'un mois de vie (Figure 4).

Nous supposons que la nomenclature de planification C décrit la structure moyenne d'utilisation des composants par un produit fini. Chaque produit fini fait appel à un même ensemble de composants différents biologiquement et contribuant à la diversité finale. Ce vecteur C peut être considéré comme un vecteur de probabilité d'utilisation de composants alternatifs (Giard, 2010). Dans ce contexte, l'utilisation d'un ensemble de composants peut être assimilée à une loi multinomiale $\mathcal{M}(N,C)$ dans laquelle N est le nombre d'expérimentations dans un atelier donné et C l'ensemble d'activité concernées.



Partie 3 : Dès le transfert embryonnaire jusqu'à obtention d'un poulain vivant à 1 mois.

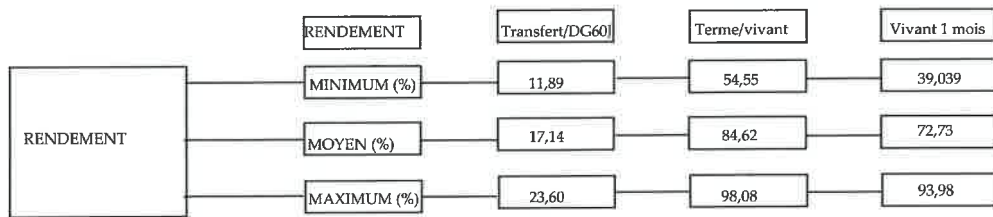


Figure 4 : Fourchette de rendement de chaque phase liée aux ateliers « ovocytes » et « animaux » du processus de clonage équin.

L'agrégation des rendements de chaque étape successive (Figure 4), montre que le clonage équin reste un processus marqué par une grande incertitude, même dans les systèmes les plus performants. Le rendement global moyen est de 0,16% (plus de 600 ovocytes sont nécessaires pour produire un poulain viable 1 mois après la naissance).

En observant la partie 1 de la Figure 4, nous remarquons une perte d'environ 45% des ovocytes pendant la maturation in vitro. Cette étape est étudiée depuis plus de vingt ans (Fulka et Okolski, 1981). Plusieurs facteurs ont déjà été testés dans l'objectif d'améliorer le taux de maturation des ovocytes : les hormones (Borges et al. 1998; Carnevale et al. 2004), les facteurs de croissance (Li et al 1999) et la co-culture (Tremoleda et al., 2003) entre autres. Le résultat de maturation reste toujours compris entre 30 et 70%.

Un facteur majeur peut jouer également sur le rendement de cette étape. Il s'agit de l'intervalle entre l'abattage des juments et la mise en maturation des ovocytes. Guignot et al. (1999) ont démontré qu'un intervalle supérieur à 6h réduit significativement la qualité des ovocytes. Ce facteur est d'autant plus important actuellement puisque les abattoirs de chevaux deviennent rares et de plus en plus éloignés des centres de savoir-faire. Un exemple de ce problème est l'interdiction de l'abattage de chevaux aux Etats-Unis depuis 2007. Les chercheurs américains sont désormais obligés d'utiliser des ovocytes issus d'ovaires de juments abattues au Canada ou obtenus par la technique d'ovum pick-up sur des juments vivantes.

Le deuxième point critique du clonage est la phase d'activation. Malgré les avancées importantes récemment publiées comme la connaissance du régime calcique lors de la fécondation (Bedford et al., 2003) et l'utilisation d'extraits de sperme pour mimer le régime calcique physiologique propre à l'activation (Hinrichs et al. 2006), le taux d'activation moyen reste aux alentours de 50% (Partie 2 de la Figure 4 : clivage).

Actuellement les différents groupes de scientifiques développent des recherches dans ce domaine très peu exploré dans l'espèce équine. Bedford et al (2008) ont utilisé le cRNA PLCz de souris pour activer des ovocytes équins obtenant un très haut taux de clivage (proche de 100%). Cependant le taux de blastocyste est resté faible (environ 5%). D'après les auteurs il est possible que cela soit dû à la nature parthénogénétique des embryons. Il serait nécessaire tester cette nouvelle avancée sur des embryons reconstitués par transfert nucléaire afin d'exploiter cette possibilité d'amélioration du rendement de la phase d'activation et vérifier ces effets sur les phases ultérieures du développement embryonnaire et établissement de gestation.

Autre point critique est représenté par la culture embryonnaire jusqu'au stade blastocyste. Le rendement de cette phase du clonage reste aux alentours de 5% (Figure 4 Partie 3). Cette phase est marquée par une difficulté de contrôle des conditions idéales de culture et une méconnaissance de ces conditions pour l'espèce équine. Ceci reste un vaste domaine d'étude afin d'améliorer le rendement global du clonage équin.

4.2 Calcul des fourchettes de quantités pour chaque composant de la nomenclature à partir des hypothèses de rendement

En faisant l'hypothèse que l'obtention d'un composant peut être représentée par une variable aléatoire X qui suit une loi de Pascal de paramètres r et p . X admet alors une espérance $E(X)=r(1-p)/p$ et une variance $V(X) = r(1-p)/p^2$

p étant la probabilité d'obtenir un composant viable

X le nombre d'échecs précédant le r -ième succès

Les résultats de ces estimations sur 1000 mises en maturation sont donnés dans le Tableau 2.

<i>Phases</i>	<i>Moyenne</i>	<i>Ecart type</i>
Mise en maturation	1000	-
Dénudation	979,9	8,44
MII	619,19	32,30
Enucléation	565,885	44,31
Injection	520,897	47,644
Fusion	424,323	48,106
Clivage	245,895	37,1
Blastocyste transférable	14,827	5,895
Gestation de 60 jours	2,541	2,363
Arrivé à terme vivant	2,15	2,727
Vivant 1 mois après	1,564	2,932

Ces résultats sont repris dans la nomenclature de la figure 4. La « nouvelle nomenclature » n'est pas utilisée directement (Ram, 2006). Les valeurs Q_i sont calculées en résolvant un programme d'optimisation avec la contrainte principale de s'approcher le plus possible de la nomenclature standard. Les calculs des besoins sont effectués en utilisant les résultats du modèle d'optimisation.

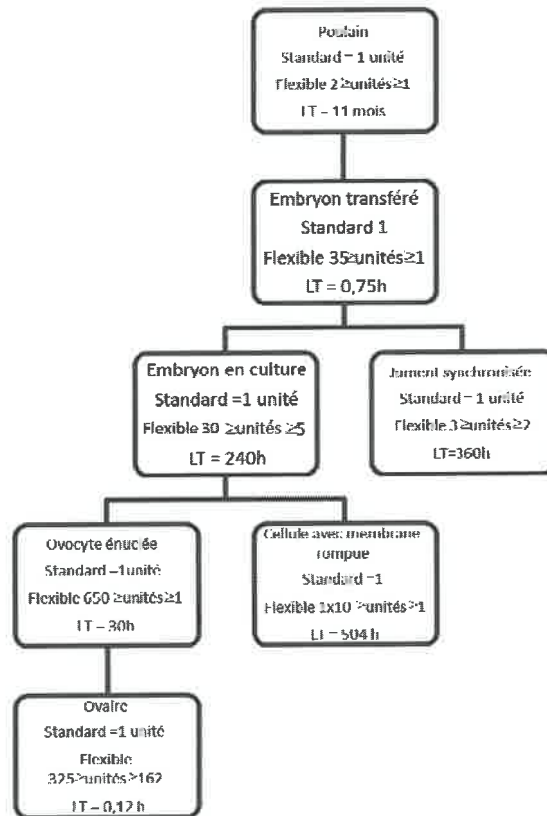


Figure 5 : Nomenclature avec quantités variables.

En posant :

Q_i^s : la quantité standard du composant i nécessaire pour l'obtention d'un clone.

Q_i : la quantité ajustée du composant i nécessaire à l'obtention d'un clone

Δ^+ et Δ^- : Respectivement l'écart positif et négatif de Q_i par rapport à Q_i^s

BB_t : Besoin brut en période t de clones

St_t : Clones en stocks

RA_t : Clones en cours de livraison

l_i : limite inférieure en quantité du composant i

u_i : limite supérieure en quantité du composant i

n : nombre de composant rentrant dans la nomenclature, ici $n = 6$.

Le programme d'optimisation en nombres entiers est donné par la minimisation de l'écart entre la nomenclature standard et la nomenclature de flexible : $\text{Min } \sum \Delta_i^+ + \Delta_i^-$ avec $i = 1, \dots, 6$. Les contraintes principales concernent le respect des limites de variation des Q_i et les délais d'obtention des composants LT (Lead Time).

La confrontation de nos résultats aux pratiques des laboratoires visités et aux résultats publiés dans la littérature montre une focalisation sur deux composants, considérés comme critique, le composant « ovocyte énuclée » et le composant « jument synchronisée ». Il est possible d'identifier deux stratégies « types » que nous appelons « stratégie américaine » et « stratégie italienne », par référence aux pays ayant produit le plus de clones équins viables (figure 6).

La stratégie américaine consiste à réduire l'incertitude au niveau de l'étape d'énucléation en resserrant l'intervalle de flexibilité. Elle réalise une perforation de la zone pellucide à l'aide d'un système de micro injection Piezo pour ensuite pénétrer dans l'espace péri-vitellin en évitant le traumatisme dû à la déformation de l'ovocyte (Choi et al. 2002). Le système Piezo est prouvé efficace pour faciliter la perforation de la zone pellucide et/ou ovocyte sur plusieurs espèces (Kimura & Yanagimachi 1995). Cependant il représente des coûts additionnels liés à l'investissement en équipements. L'utilisation du mercure pour le fonctionnement de cette manipulation génère des risques d'accident au niveau du personnel.

Cette stratégie consiste à transférer un seul embryon par jument. Compte tenu du taux important de perte (coefficient de lien faible) pendant le premier trimestre de gestation de clones (Lagutina et al 2005; Hinrichs et al. 2006) et l'objectif de maximisation du nombre de naissances possible, cette stratégie demande l'achat et l'entretien d'un troupeau important de juments et peut devenir trop coûteuse pour le producteur.

La stratégie italienne opère une digestion de la zone pellucide pour accéder plus facilement à l'ovocyte (Oback, 2003). D'après Lagutina (2005), cette méthode permet d'avoir un très haut rendement sur la phase d'énucléation (environ 98%).

La digestion de la zone pellucide ne représente pas de coût supplémentaire en équipements. Cependant, beaucoup d'habileté en micromanipulation est nécessaire lors de son utilisation afin d'éviter la digestion de la membrane de l'ovocyte ou l'agglutination d'ovocytes.

Cette stratégie adopte le transfert de multiples embryons (2 à 3 par jument) afin d'obtenir une vésicule embryonnaire par jument utilisée. Cela réduirait le nombre de juments nécessaires pour avoir une gestation et, par conséquent, le coût lié à l'atelier animal.

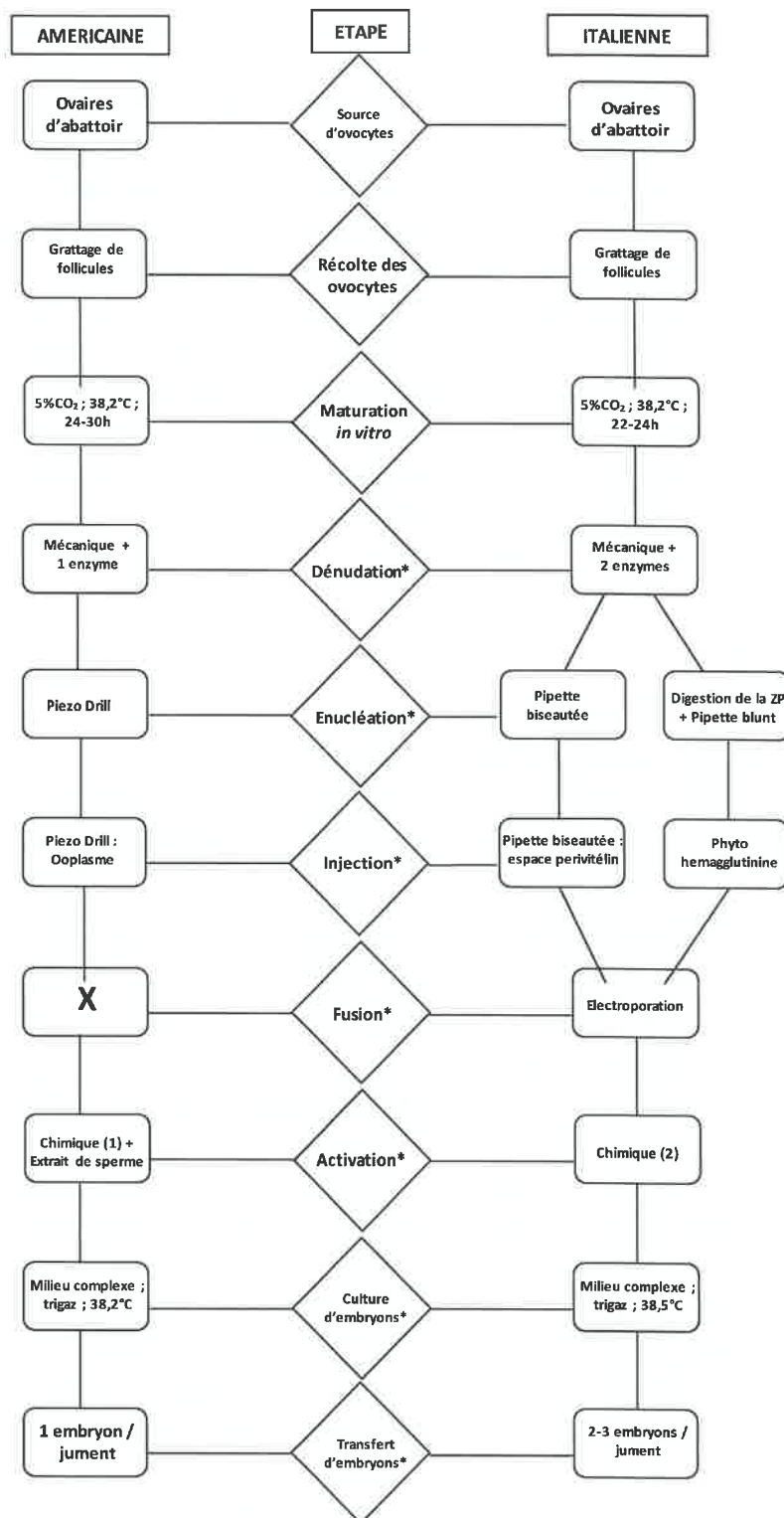


Figure 2 : Les deux principales écoles du clonage équin. Une comparaison détaillée.

5. Conclusion

Le clonage équin est une technologie récente qui va répondre à un marché de chevaux de haute valeur génétique. Les systèmes de conception et de production dans ce domaine sont de plus en plus soumis à des impératifs économiques et de fiabilisation des cycles de conception et de mise sur le marché. La demande étant suffisamment répétitive avec une logique de calcul des besoins. Cette situation relève d'une approche MRP avec aléas de conception sur les composants de la nomenclature. La spécificité de chacune des commandes et le mode de planification est de type projet où la conception d'une tâche est aléatoire et conditionne la réalisation des étapes suivantes. Dans ce papier nous avons proposé une méthode de calcul pour allouer une zone de tolérance à chaque composant. Ce travail a rendu possible la construction d'une nomenclature flexible pour calculer les besoins dépendants. Le résultat numérique montre que pour obtenir un clone équin viable, il faut engager plus de 600 ovocytes énuclées, ce qui explique la pression actuelle sur cette matière issue des abattoirs.

6. Bibliographie

- Allen WR. (2005), The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod Dom Anim* 40, 310-329.
- Bedford S J, Kurokawa M, Hinrichs K, Fissore R A(2003), Intracellular calcium oscillations and activation in horse oocytes injected with stallion sperm extracts or spermatozoa. *Reproduction* 126, 489-499.
- Borges J M L, Rubin M I B, Silva A M, Gonçalves P B D, Rieck A C. (1998), Influence of gonadotropins on nuclear maturation of equine oocytes. *Cienc. Rural* vol.28 n°2 Santa Maria Apr./June
- Büchel, A. (1982) An overview of possible procedures for stochastic MRP. *Engineering Costs and Production Economics*. 1982, 6, pp. 43-51.
- Buzacott, J. A., Shanthikumar, J. G. (1994) Safety stocks versus safety time in MRP controlled Production systems. *Management Science*. 1994, Vol. 40, 12, pp. 1678-1688.
- Camissulis C., Giard V. (2010) Détermination des stocks de sécurité dans une chaîne logistique-amont dédiée à une production de masse de produits fortement diversifiés, *Journal Européen des Systèmes Automatisés*, vol.44, p. 975-1010.
- Chang, Alec C. (1985). The interchangeability of safety stocks and safety lead time. *Journal of Operations Management*. 1985, Vol. 6, 1, pp. 35-42.
- Choi Y H, Love L B, Varner D D, Hinrichs K. (2006), Blastocyste development in equine oocytes with low meiotic competence after suppression of meiosis with roscovitine prior to in vitro maturation. *Zygote*, 14:1:1-8
- Czubaj F. Logran la gestación del primer clon equino de América latina. *La nacion*. 2007. Accessible online: http://www.lanacion.com.ar/nota.asp?nota_id=952365. Accessed : 08/11/2009.

- Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CL, Vander Zwaag DF, Ferré LB. (2003), Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology* 59 125-138).
- Fernandes, C. B. ; Martins, L. R. ; Devito, L. G. ; Blanco, I. D. P. ; Landim-Alvarenga, F. C. (2008). In vitro nuclear maturation of compact and expanded equine oocytes treated with Roscovitine. *Animal Reproduction Science*.
- Fulka, J., Okolski, A. (1981), Culture of horse oocytes in vitro *J. Reprod Fert*, v. 61, p. 213-215.
- Guerrero, Hector H., Baker, Kenneth R. et Southard, Maynard H. (1986.) The dynamics of hedging the master schedule. *International Journal of Production Research*. Vol. 24, 6, pp. 1475-1483.
- Hatchuel et Sardas (1992), "le pilotage des systèmes complexes e production, in de Terssac et Dubois, lesnouvelles rationalizations de la production, Ed Cepadues.
- Hinrichs K, Choi Y H, Love C C, Chung Y G, Varner D D. (2006)vProduction of horse foals via direct injection of roscovitine treated donor cells and activation by injection of sperm extract. *Reproduction* 131 1063-1072.
- Lagodimos, A.G. et Anderson, E.J. (1993(. Optimal positioning of safety stocks in MRP. *International Journal of Production Research*., Vol. 31, 8, pp. 1797-1813.
- Lagutina, I; Lazzari, G; Duchi, R; Colleoni, S; Ponderatto, N; Turini, P; Crotti, G; Galli, C. (2005), Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction* 130 559-567
- Li X, Morris LHA & Allen WR (2002) In vitro development of horse oocytes reconstructed with the nuclei of fetal and adult cells. *Biology of Reproduction* 66 1288-1292.
- Mackinnon, A. O.; Voss, J. L. (1992), *Equine Reproduction*. Williams and Wilkins. Phipladelphia, 1992, 1137p.
- Martel A.(2003), "Policies for multi-echelon supply, DRP systems with probabilistic time-varying demands", *ABI/INFORM Global, INFOR* vol. 41, n° 1, p. 71.
- Molinder, A. (1997). Joint optimisation of lot-sizes, safety stocks and safety lead times in an MRP system. *International Journal of Production Research*., Vol. 35, 4, pp. 983-994.
- Nakhla M,(1993), "Production control in the food processing industry ; the need for flexibility in operations scheduling" *International Journal of Operations & Prodction Management*, volume 15, N°.
- Ng W., Piplani R., Viswanathan S.(2003), "Simulation workbench for analyzing multi-echelon supply chains", *Integrated manufacturing systems*, vol. 14, n° 5, p. 449-457.
- Oback B, Wiersema AT, Gaynor P, Laible G, Tucker FC, Oliver JE, Miller AL, Troskie HE, Wilson KL, Forsyth JT, Berg MC, Cockrem K, McMillan V, Tervit HR & Wells DN (2003), Cloned cattle derived from a novel zona-free embryo reconstruction system. *Cloning Stem Cells* 5 3-12.
- Ram (2006), "Material Requirements planning with flexible bills-of-material, *International Journal of Production Research*., Vol. 44, 2, pp. 399-415.
- Squires E. L. (2009). Changes in equine reproduction: have they been good or bad for the horse industry? *Journal of equine science* v.29, n. 5, 268-272.

- Squires E., Barbacini S., Matthews P., Byers W., Schwenzer K., Steiner J. et al. Retrospective study factors affecting fertility of fresh, cooled and frozen semen. *Equine Vet Educ* 2006; 18: 296-299.
- Tremoleda J.L., Tharasanit T., Van Tol H.T., Stout T.A., Colenbrander B., Bevers M.M. (2003), Effects of follicular cells and FSH on the resumption of meiosis in equine oocytes matured in vitro. *Reproduction*, 2003, 125, 565-577.
- Vidament M. French field results (1985-2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 2005, 89; 115-136.
- Winjaard, J. et Wortmann, J.C. (1985). MRP and inventories. *European Journal of Operational Research.*, 20, pp. 281-293.
- Yanagida k, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Konnai K, Sato A. (1998), The usefulness of a piezo-micromanipulator in intracytoplasmic sperm injection in humans. *Human Reproduction* vol.14 no.2 pp.448-453.

7. Lexique

- Activation : ensemble de réactions nécessaires pour déclencher la division de l'embryon récemment formé.
- Barrel : discipline de l'équitation western.
- Biopsie : prélèvement de peau. Préalable à la culture cellulaire, nécessaire pour l'obtention des fibroblastes : cellules utilisées pour le clonage équin.
- Blastocyste: Stade du développement de l'embryon. A ce stade l'embryon est composé d'une centaine de cellules. Le transfert embryonnaire est réalisé à ce stade.
- Culture cellulaire : processus comprenant la séparation et multiplication in vitro des cellules obtenues à partir de la biopsie.
- Cutting : discipline de l'équitation western.
- Décoronisation des ovocytes (dénudation) : acte de dénuder les ovocytes des cellules du cumulus oophorus (cellules qui entourent l'ovocyte).
- Electroporation : utilisation de pulses électriques pour induire la fusion de la cellule somatique à l'ovocyte.
- Enucléation : acte d'enlever le noyau de l'ovocyte préalablement à l'injection de la cellule somatique.

- Equine herding sport : discipline d'équitation western.
- Extrait de sperme : solution riche en facteurs activateurs contenus dans le spermatozoïde. Il est obtenu par une série de centrifugations de la semence.
- Follicule : agrégats de cellules contenant l'ovocyte et à partir duquel il est relâché pendant l'ovulation. Il consiste en un revêtement externe fibro-vasculaire, un revêtement interne de cellules nucléées, et un fluide transparent, albumineux dans lequel l'ovocyte est présent.
- Fusion : acte de fusionner la cellule somatique à l'ovocyte énucléé pour constituer l'embryon lors du clonage.
- Injection du noyau : injection d'une cellule somatique dans l'espace périvitellin d'un ovocyte.
- Jument receveuse : jument destinée à recevoir un embryon et à porter la gestation.
- Maturation des ovocytes : culture des ovocytes pour promouvoir leur progression dans le cycle cellulaire jusqu'au stade méiose II (MII – nécessaire pour le clonage) in vitro. La maturation des ovocytes dure 24 à 30 heures.
- Ovaire : glande génitale féminine, d'où les ovocytes sont récoltés.
- Ovocyte : gamète femelle, ovule.
- Ovum pick-up : technique de récolte d'ovocytes in vivo. Il est possible de récolter 2 à 5 ovocytes par jument.
- Serum starvation : culture des cellules dans un milieu pauvre en sérum de veau fœtal (ou autre type de sérum).
- Studbook : association de race responsable par la réglementation et le registre des poulains et reproducteurs.
- Synchronisation des juments receveuses : traitement des juments à l'aide d'hormones reproductives afin de les préparer pour recevoir un embryon.
- Transfert embryonnaire : acte de poser un embryon dans l'utérus d'une jument receveuse.

- Zone pellucide : La zone pellucide est une membrane transparente, striée, entourant l'ovocyte. La zone pellucide contient de nombreux pores qui permettent aux nutriments de passer dans la cellule. Elle représente une barrière à la polyspermie lors d'une fécondation naturelle. Une fois que la zone pellucide a été franchie par le premier spermatozoïde, l'ovule devient impénétrable pour tous.