



TRANSFERT DE TECHNOLOGIE EN AGRICULTURE

MAPM/DERD

. Février 2008 .

PNTTA

Diagnostic de la gestation chez les ovins

SOMMAIRE

n° 161

Elevage ovin

- Dosages au laboratoire.....p.1
- Principe du RIA.....p.2
- Les stéroïdes.....p.3
- Les méthodes cliniques.....p.4
- Que retenir?.....p.4

En élevage ovin, un suivi efficace du troupeau implique entre autres une bonne maîtrise de la reproduction. Pour ce faire, différentes méthodes sont utilisées pour le diagnostic de gestation, non seulement pour détecter au plus tôt les brebis ou agnelles non gestantes, mais aussi pour pouvoir constituer des lots d'animaux aux besoins similaires afin d'optimiser leur alimentation durant la gestation. Tout cela bien sûr dans le but d'accroître la rentabilité du troupeau. Nous passons ici en revue ces différentes méthodes de diagnostic de gestation.

Introduction

Le diagnostic de gestation revêt une grande importance économique en production ovine. Il permet non seulement de réduire les périodes improductives (lorsque les femelles ne sont pas gestantes) et d'éliminer les mères infertiles, mais aussi de constituer des lots d'animaux présentant des états physiologiques similaires et de là optimiser leur alimentation. Cela peut s'avérer très important pour éviter des états d'embouppement défavorables à la fertilité ou, au contraire en cas de gestation multiple, pour éviter des désordres métaboliques. Ceux-ci sont dus au fait que la capacité d'ingestion des aliments grossiers diminue, vu le volume abdominal important occupé par les fœtus. Ces troubles pouvant conduire, dans les cas extrêmes, à la toxémie de gestation souvent accompagnée de la naissance d'agneaux chétifs et de taux de mortalité élevés chez les agneaux et chez les mères.

Les différentes méthodes de diagnostic de gestation sont classées en deux catégories: **les méthodes de laboratoire**, parmi lesquelles on peut citer les dosages hormonaux (sulfate d'oestrone, hormone lactogène placentaire, progestérone) et les dosages de protéines spécifiques ou associées à la gestation et **les méthodes cliniques**, dont la radiographie, la palpation recto-abdominale, et l'ultrasonographie (Doppler, mode-A et mode-B).

Dans le présent bulletin, nous allons passer en revue ces méthodes, de façon succincte et dans un langage simplifié, pour un public non spécialisé.

Les avantages et inconvénients des diverses méthodes y sont présentés en insistant sur la précocité du diagnostic, la sensibilité de la méthode (probabilité qu'une femelle gravide donne un résultat positif au test ou à l'examen ou en d'autres termes, l'exactitude d'un

test positif), la spécificité ou l'exactitude d'un test négatif et enfin les possibilités de dénombrement des fœtus.

Dosages réalisés en laboratoire

En laboratoire, le diagnostic de gestation des ovins est réalisé à partir de dosages hormonaux: sulfate d'oestrone, hormone lactogène placentaire et dosage de la progestérone ou par des dosages de protéines spécifiques ou associées à la gestation.

Dosage de sulfate d'oestrone

L'origine des hormones oestrogènes dépend du stade de gestation. Au début, elles proviennent des ovaires. Elles sont ensuite produites par le placenta, surtout pendant les deux derniers tiers de la gestation.

Le sulfate d'oestrone est la principale hormone oestrogène présente dans la circulation maternelle durant la gestation. Elle est facilement dosable sur des prélèvements de lait ou de sang. Cependant, comme les concentrations de cette hormone dans le sang n'augmentent qu'à partir du 50^{ème} jour de gestation (Figure 1), il faut attendre le 70^{ème} jour pour que le sulfate d'oestrone soit détectable.

Ainsi, ce diagnostic est qualifié de tardif. Un résultat négatif peut exprimer un état de non gestation mais n'exclut pas une gestation

débutante. Par ailleurs, ce dosage permet de s'assurer de la viabilité fœtale durant les deux derniers tiers de la gestation. Le dosage ne permet pas de dénombrer les fœtus. En conséquence, cette méthode de diagnostic de gestation est peu utilisée.

Dosage de l'hormone lactogène placentaire

Cette hormone qui intervient dans le développement du fœtus et dans l'activité des glandes mammaires est déversée dans la circulation maternelle dès le 40^{ème}-50^{ème} jour de gestation. Elle est détectable dans le sérum de la brebis après le 48^{ème} jour de gestation (Figure 2). Cette apparition tardive dans le sang maternel prive ce dosage d'intérêt pour un diagnostic précoce de la gestation.

Dosage de la progestérone

La progestérone est une hormone indispensable dans le maintien de la gestation. Elle est produite par le corps jaune puis par le placenta (Figure 3). Le dosage peut être réalisé sur des prélèvements de sang ou de lait, applicable dès le 17^{ème} jour après la gestation (Figure 4).

Ce test offre des valeurs d'exactitude de diagnostic de gestation d'environ 90% alors que les valeurs de diagnostic de non gestation approchent les 100%. Les limites du test résident dans l'obligation de connaître avec précision la date de saillie ou de l'insémination et d'en tenir compte individuellement, sinon il peut donner lieu à de faux diagnostics de gestation, ce qui est aussi possible en cas de mortalité embryonnaire précoce.



Pratiquement, ce dosage est très efficace pour le diagnostic de non gestation. Il permet aussi de remettre sans retard à la reproduction des femelles diagnostiquées non gestantes. L'autre avantage est son coût. Il est de l'ordre de 30 à 40 dirhams et peut être considéré comme raisonnable dans le cas de petits troupeaux.

Dosage des protéines spécifiques ou associées à la gestation

Décrites aujourd'hui sous diverses appellations indiquant leur caractérisation en tant que protéines spécifiques ou associées à la gestation (PSPB, PSP-60, PAG, SBU-3), elles ont été isolées pour la première fois chez les bovins. L'existence de protéines associées à la gestation et faisant partie du groupe des protéases aspartiques apparaît commune aux différentes espèces de ruminants mais n'est pas strictement limitée à ceux-ci. Des protéines similaires ont été identifiées également chez le cheval, le chat, et la souris.

Tout au début, deux protéines spécifiques de la gestation: les pregnancy-specific proteins A et B (PSPA et PSPB) ont été isolées à partir du placenta bovin. La PSPA, une protéine de masse moléculaire apparente de 65 à 70 kDa et présentant différents points isoélectriques (pI 4,0-4,4) s'est révélée ultérieurement identique à l'alphafoetoprotéine (AFP), une protéine synthétisée par le foie du fœtus et le sac vitellin de tous les mammifères. Elle présente une grande similarité avec l'albumine et lie les acides gras (AG) polyinsaturés à chaîne longue dans la plupart des espèces. Cette propriété de transport des AG est impliquée dans la maturation du système nerveux de l'embryon et du fœtus.

Chez les rongeurs (rat, souris), l'AFP lie aussi les œstrogènes, surtout l'œstradiol-17β (E2-17β). Les concentrations sériques maternelles d'AFP sont élevées pendant la gestation chez de nombreuses espèces. Des concentrations non négligeables de cette protéine sont détectables en dehors de la gestation. Des taux sériques très élevés d'AFP peuvent être associés à des anomalies du système nerveux fœtal chez la femme par exemple ou encore à des cas de tumeurs hépatiques. La concentration d'AFP chez le fœtus bovin s'est révélée être de 6 mg/ml. L'importance physiologique de telles molécules dans le processus de gestation reste inconnue.

Critères de qualité d'une méthode de diagnostic de gestation

La comparaison objective des méthodes de diagnostic de gestation fait appel à un certain nombre de paramètres dont il importe de connaître la signification. La technique est exacte si elle permet de constater, à un instant donné, l'état de gestation d'un animal. Il est convenu de définir l'exactitude d'un diagnostic en séparant les diagnostics de non-gestation (DG-), dits négatifs, de ceux de gestation (DG+), dits positifs:

- L'exactitude des diagnostics négatifs ou de non-gestation est définie par le rapport suivant:

$$\frac{\text{Nombre de femelles n'ayant pas mis bas suite à un DG-}}{\text{Nombre de femelles diagnostiquées non gestantes}} \times 100$$

- L'exactitude des diagnostics positifs ou pronostics de mises bas est définie par le rapport suivant:

$$\frac{\text{Nombre de femelles ayant mis bas suite à un DG+}}{\text{Nombre de femelles diagnostiquées gestantes}} \times 100$$

Par ailleurs, les termes de sensibilité, spécificité et valeurs prédictives ont été proposés. Ils définissent la sensibilité d'un test comme étant la probabilité pour une femelle gestante d'avoir un résultat positif au test ou à l'examen. La spécificité est la probabilité pour une femelle non gestante d'avoir un résultat négatif au test ou à l'examen. De même, la valeur prédictive est définie comme étant la probabilité pour une femelle d'être gestante ou non quand le résultat du test ou de l'examen a été déclaré positif ou négatif.

Ces définitions, très couramment utilisées aujourd'hui, sont résumées dans les équations suivantes:

$$\text{Sensibilité} = \frac{\text{Nombre de DG positifs exacts}}{\text{Nombre d'animaux réellement gestants}} = \frac{a}{a+d}$$

$$\text{Spécificité} = \frac{\text{Nombre de DG négatifs exacts}}{\text{Nombre d'animaux non réellement gestants}} = \frac{c}{c+b}$$

$$\text{Valeur Prédictive Positive} = \frac{\text{Nombre de DG positifs exacts}}{\text{Nombre total de DG positifs}} = \frac{a}{a+b}$$

$$\text{Valeur Prédictive Négative} = \frac{\text{Nombre de DG négatifs exacts}}{\text{Nombre total de DG négatifs}} = \frac{c}{c+d}$$

Avec a: le nombre de DG positifs exacts; b: le nombre de DG positifs faux; c: le nombre de DG négatifs exacts; d: le nombre de DG négatifs faux ■.

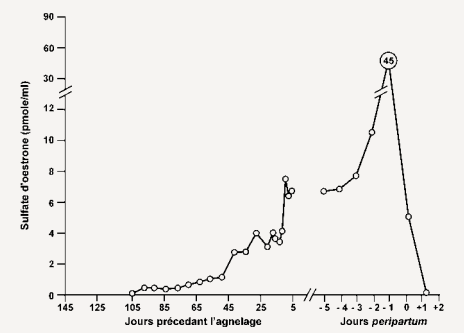


Figure 1. Evolution des concentrations plasmatiques en sulfate d'œstrone chez une brebis ayant une portée double.

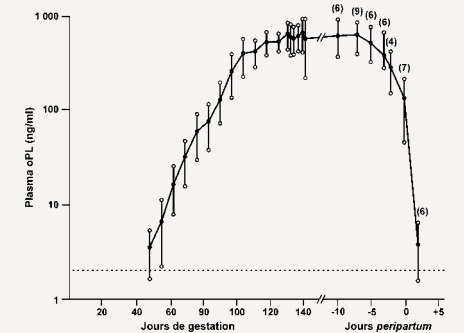


Figure 2. Evolution des concentrations plasmatiques en hormone lactogène placentaire chez la brebis.

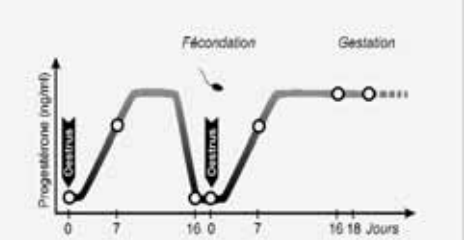


Figure 3. Evolution théorique du niveau de progestérone plasmatique périphérique au cours d'un cycle sexuel et au cours de la gestation.

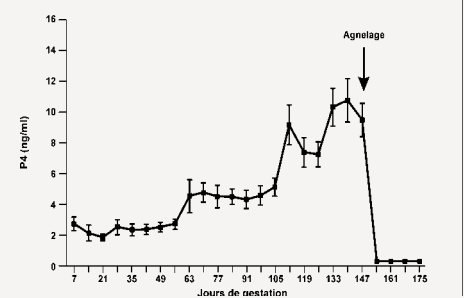
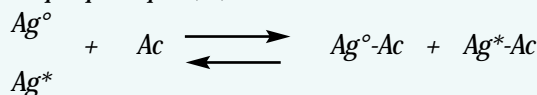


Figure 4. Evolution du niveau de progestérone plasmatique périphérique au cours de la gestation et en post-partum chez la brebis Mérinos.

Principe du RIA

La méthode radio-immunologique (radioimmunoassay ou RIA pour les Anglo-Saxons) a été proposée en 1959 pour le dosage de l'insuline par Yalow et Berson qui poursuivaient des recherches sur la mise en évidence d'anticorps anti-insuline chez les sujets diabétiques traités à l'insuline.

Ce principe repose sur la compétition entre un antigène (Ag°) et le même antigène marqué au moyen d'un isotope (Ag^{*}) vis à vis de l'anticorps spécifique (Ac).



Les concentrations en Ag^{*} et en Ac étant constantes, toute augmentation de la concentration en Ag° entraîne une augmentation de la concentration en complexe $Ag^{\circ}-Ac$ au détriment de la formation du complexe $Ag^{*}-Ac$. Il en résulte une augmentation de la concentration d' Ag^{*} libre dans le milieu d'incubation. Au terme de

la réaction, les Ag^{*} libres et liés sont séparés. Grâce au signal émis par le marqueur, on peut mesurer la concentration en complexe $Ag^{*}-Ac$ pour chaque concentration en Ag° . On établit ensuite une courbe standard ou d'étalonnage avec des concentrations connues en antigène. On détermine ensuite la concentration en antigène de solutions inconnues ■.



La PSPB est une protéine spécifique de la gestation. C'est une glycoprotéine acide de masse moléculaire apparente de 47 à 53 kDa et présentant des variants isoélectriques (pI 4,0 à 4,4). La PSPB n'a pas été caractérisée au niveau d'acides aminés à l'époque de sa découverte. Cependant, il a été rapidement montré que cette protéine est présente dans le sang maternel et que son dosage pourrait permettre un diagnostic de gestation chez les femelles de nombreuses espèces de ruminants. A la même époque, une glycoprotéine de masse 30 kDa a été isolée et a été nommée bCG (bovine chorionic gonadotropin). Par la suite, cette protéine a été considérée comme faisant partie de la famille des glycoprotéines spécifiques ou associées à la gestation et a été dénommée boPAG-2.

La PAG est une glycoprotéine acide de masse moléculaire 67 kDa. Elle présente 4 isoformes de pIs 4,4, 4,6, 5,2 et 5,4. Des expériences par clonage moléculaire ont montré qu'une forme de 64 kDa de la PSPB est par sa structure primaire, apparentée à la boPAG-1. Aujourd'hui dans les banques génomiques, la boPAG-1 et la PSPB sont considérées comme étant la même molécule. De même, les séquences terminales des antigènes SBU-3 présentaient des identités avec les PAGs connues à l'époque. Il en est probablement de même pour la PSP-60.

Les PAGs les mieux connues aujourd'hui sont synthétisées par les cellules binucléées présentes dans les couches superficielles du trophoblaste, et plus précisément dans les granules de cellules binucléées. Plusieurs membres de la famille des PAGs sont exprimés dans les cellules du trophoblaste dès le stade d'élongation du blastocyste.

Dès le début de la gestation, le placenta synthétise toute une série de protéines spécifiques ou associées à la gestation. Les protéines associées à la gestation (PAG) sont facilement détectables dans le sang dès le 20^{ème} jour après fécondation (Figure 5) et dans le lait, à partir du 32^{ème} jour. Il n'est pas nécessaire de connaître ni de tenir compte de la date de saillie pour autant qu'un délai minimum de 22 jours sépare la dernière féconda-

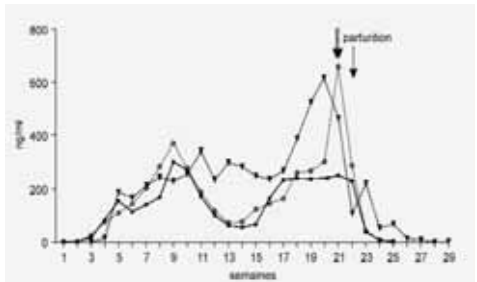


Figure 5. Evolution de la concentration plasmatique périphérique en vPAG au cours de la gestation et du post-partum chez les brebis Mérinos.



Les stéroïdes

Les stéroïdes sont des molécules construites autour d'un noyau commun, le cycle cyclo-pentano-perhydrophénanthrène ou stérane comportant trois cycles hexagonaux A, B, C et un cycle pentagonal D (Figure 1). Si la majorité des stéroïdes sont des hormones, certains d'entre eux sont des produits dépourvus d'action hormonale, comme les vitamines du groupe D.

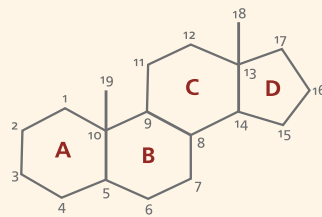


Figure 1: Le noyau stérane

Les hormones stéroïdes constituent un groupe de substances dérivées des stérols, qui sont formées à partir du cholestérol, et isolées à partir des glandes endocrines (cortico-surrénales, ovaire, testicule, placenta).

On classe les stéroïdes hormonaux en trois groupes, suivant la constitution de leur squelette carboné en: dérivés de l'estrane à 18 atomes de carbone avec généralement une fonction phénolique en 3, appelés phénolstéroïdes et qui correspondent aux oestrogènes naturels; dérivés de l'androstane à 19 atomes de carbones, qui correspondent aux androgènes; dérivés de la pregnane à 21 atomes de carbone, qui correspondent aux glucocorticoïdes, aux minéralocorticoïdes et à la progestérone.

La progestérone (P4)

La P4 est la principale des hormones progestatives. Elle appartient au groupe des stéroïdes à 21 atomes de carbones (Figure 2). Elle est synthétisée essentiellement par le corps jaune de l'ovaire au cours du cycle menstruel physiologique et, à moindre degré, par le testicule, les glandes surrénales et le placenta au cours de la deuxième partie de la grossesse. A l'intérieur de l'ovaire la biogenèse de la P4 débute par la synthèse du cholestérol à partir de l'acétyl-coenzyme A et de la prégnénolone comme substance intermédiaire. Elle a pour fonction principale de préparer l'utérus à la nidation et le maintien de la gestation. Mais la P4 est également un intermédiaire métabolique pouvant conduire à la testostérone, l'aldostérone, et au cortisol (Figure 3).

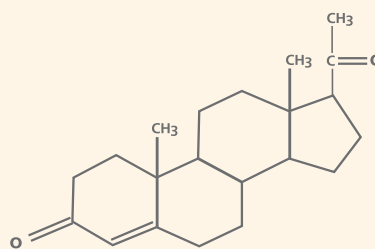


Figure 2: La progestérone (P4)

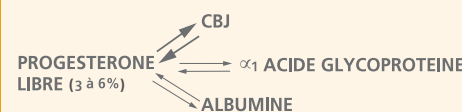


Figure 3: Dans le plasma, la majorité de la P4 est liée à des protéines

Le transport plasmatique des stéroïdes

Les stéroïdes sont lipophiles. Ils peuvent donc traverser les bicouches lipidiques sans difficulté.

Cependant en raison de cette nature lipophile (et donc hydrophobe) les stéroïdes doivent se complexer avec des protéines plasmatiques afin d'être transportés par le flux sanguin.

Dans le plasma, seuls 3% environ de la P4 circulante existe à l'état libre, sous forme biologiquement active, tandis que la majorité de cette hormone est liée à la protéine de liaison du cortisol, la transcortine ou Corticosteroid Binding Globuline (CBG), liaison caractérisée par une haute affinité et une faible capacité (compte tenu du nombre de sites de liaison), et d'autre part à l'albumine, liaison de faible affinité et de grande capacité (Figure 4).

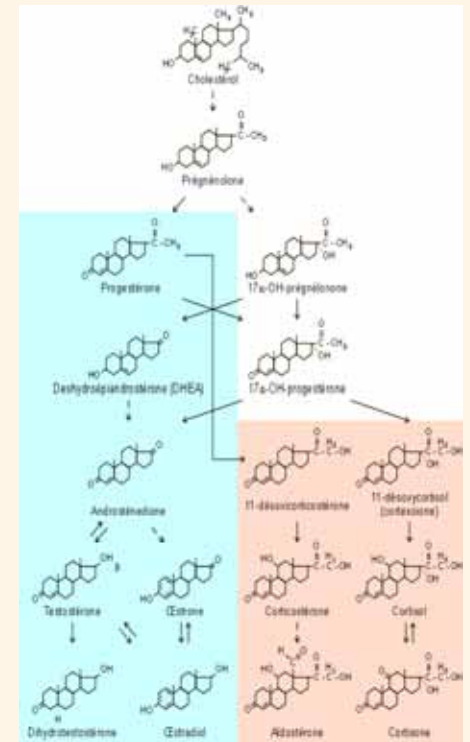


Figure 4: Les hormones stéroïdes

Produites par les gonades et les surrénales, les hormones stéroïdes ont pour précurseur commun le cholestérol. Le groupe des hormones sexuelles (bleu) comprend des hormones féminines (progestérone, œstrone, œstradiol) et mâles (testostérone et dihydrotestostérone). Elles sont toutes formées dans les gonades à l'exception de l'hormone mâle deshydroépi-androstérone (DHEA) qui est synthétisée par les surrénales. Les autres hormones surrénales (beige) comprennent des minéralocorticoïdes (aldostérone) et des glucocorticoïdes (cortisol, cortisone, corticostérone).



tion possible de la date de prélèvement du sang et d'un minimum de 32 jours pour le lait. Dans ces conditions, pour un test sanguin, après 22 jours, la spécificité est de 100% (exactitude d'un test négatif) et la sensibilité de 94%. Ces 2 paramètres passent respectivement à 100% et 99 % à partir du 29^{ème} jour. Le dosage de PAG permet aussi de dénombrer les fœtus mais seulement plus tard dans la gestation (84^{ème} jour au moins).

Le dosage des PAG dans le lait a été testé dans le but de rendre le prélèvement de l'échantillon accessible à l'éleveur. Les résultats ont montré que les concentrations des PAG dans le lait permettent de diagnostiquer l'état de gestation à partir du 32^{ème} jour de gestation. Le coût de l'analyse, qui est de 30 à 50 Dh actuellement est susceptible de diminuer lorsque l'ELISA et un test simplifié entreront en application.

Les méthodes cliniques

Le diagnostic de gestation peut encore être réalisé par trois méthodes cliniques: la radiographie, la palpation recto-abdominale et la méthode des ultrasons.

Radiographie

Le diagnostic de gestation et le dénombrement des fœtus peuvent être réalisés avec une exactitude élevée par radiographie à partir du 70^{ème} jour après la fécondation. Malgré sa précision, la radiographie est peu utilisée du fait de son coût et des risques d'irradiation de l'animal et du manipulateur. Cette technique est seulement utilisée en recherche.

Palpation recto-abdominale

Alors qu'elle est couramment utilisée pour le diagnostic de gestation chez la vache et la jument, la palpation recto-abdominale, méthode simple et peu coûteuse, n'est plus pratiquée en élevage ovin car elle présente des risques non négligeables de blessures rectales et d'avortements.

Cette technique permet de distinguer les gestations simples des gestations multiples à condition de pratiquer l'examen entre les 90^{ème} et 105^{ème} jours après la saillie. Sa sensibilité et sa spécificité sont de 100% après le 50^{ème} jour suivant la fécondation.

Ultrasons

Plusieurs systèmes d'ultrasonographie ont été employés pour le diagnostic de gestation chez les petits ruminants ces 30 dernières années. Le principe de l'écho Doppler a été appliqué dans les années 70.

Cette méthode par son de Doppler nécessite un examen long et a été abandonnée au profit de l'échographie bidimensionnelle pour le diagnostic de la gestation. Elle conserve un certain intérêt pour l'examen de la viabilité fœtale en cours de gestation et pour l'estimation de la date de mise-bas.

L'ultrasonographie unidimensionnelle basée sur la détection du liquide amniotique a elle aussi été abandonnée au profit de l'échographie bidimensionnelle, seule technique applicable à la ferme et réellement efficace. L'échographie est utilisée à la fois pour le diagnostic de gestation, la détermination du nombre de fœtus et la détermination du stade de gestation.

Elle permet un diagnostic de gestation assez précoce, dès le 30^{ème} jour. La sensibilité et la spécificité de cette technique sont élevées après le 29^{ème} jour et atteignent pratiquement 100% entre le 46^{ème} et le 106^{ème} jour de la gestation. La méthode est rapide puisqu'elle permet d'examiner 50 à 100 brebis en une heure. Son utilisation requiert cependant un personnel spécialisé et un appareillage coûteux. Mais vu la vitesse du diagnostic, le coût d'utilisation dans les grands élevages est relativement faible. Le prix de l'examen, dégressif en fonction du nombre d'animaux examinés dans le troupeau varie de 10 à 25 Dh.

Cette méthode permet en outre de dénombrer les fœtus, ce qui ne manque pas d'intérêt pour la constitution de lots d'animaux et la bonne conduite du troupeau. Avec une sonde abdominale, les meilleurs résultats pour le dénombrement des fœtus sont obtenus après le 45^{ème} jour. Ce délai est ramené à 25^{ème} jour avec une sonde transrectale (exactitude de 88%).

Enfin, l'échographie permet aussi d'estimer l'âge de l'embryon ou du fœtus par la prise de ses mensurations (Figure 6). Ces mesures sont cependant rarement demandées par les éleveurs mais intéressent plutôt les chercheurs pour vérifier la normalité du développement du fœtus, surtout en cas de fécondation *in vitro*.

Que retenir ?

Différentes approches sont utilisables pour poser (ou confirmer) le diagnostic de gestation chez la brebis. Parmi les paramètres importants à considérer pour juger de ces techniques, nous retiendrons la précocité du diagnostic, l'exactitude du diagnostic positif correspondant assez bien à la sensibilité, l'exactitude des diagnostics négatifs correspondant assez bien à la spécificité, la facilité de mise en oeuvre et enfin le coût de l'examen ou de l'analyse.

Si l'on considère la précocité, le **dosage de la progestérone** garde la faveur. Applicable dès le 17^{ème} jour après la fécondation, ce test offre des valeurs d'exactitude de diagnostic de gestation d'environ 90 % tandis que les valeurs de diagnostic de non-gestation approchent les 100 %.

Les limites résident dans l'obligation de connaître avec précision la date de la saillie ou de l'insémination et d'en tenir compte individuellement. Son coût varie entre 30 et 40 Dh et peut être considéré comme raisonnable dans le cas de petits troupeaux.

Le **dosage de la PSPB/PAG** permet un diagnostic un peu moins précocement dès le 20^{ème} jour s'il est réalisé dans le sang et le 32^{ème} jour s'il est réalisé dans le lait. Il n'est pas nécessaire de connaître ni de tenir compte de la date de saillie pour autant qu'un délai minimum de 22 jours sépare la dernière fécondation possible de la date du prélèvement s'il s'agit d'un dosage du sang et de 32 jours pour le lait. Dans ces conditions, la sensibilité est de 94 % et la spécificité est de 100 %. Au 29^{ème} jour de gestation, ces valeurs augmentent pour atteindre 100 % de sensibilité et 99 % de spécificité. Le coût de l'analyse, établi aujourd'hui entre 30 et 50 Dhs mais susceptible de diminuer lorsque l'ELISA et un test simplifié entreront en application.

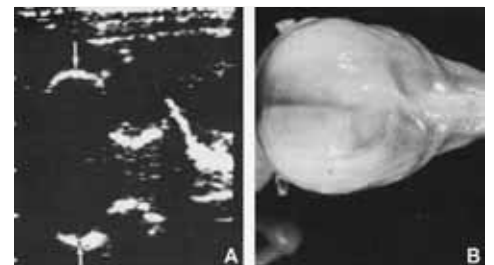


Figure 6. Mesure du diamètre bipariétal par échographie transabdominale (5 MHz). A: Les flèches indiquent le diamètre bipariétal (DBP). B: Vue dorsale de la tête fœtus dans un alignement similaire.



Parmi les méthodes applicables à la ferme, **l'échographie en mode-B** est la seule réellement efficace. Elle est réalisable précocement dès le 30^{ème} jour, et permet un rythme d'examen élevé (50 à 100 brebis/heure).

Elle nécessite néanmoins un personnel spécialisé et un matériel coûteux. Elle se rentabilise assez facilement. Le prix de l'examen, dégressif en fonction du nombre d'animaux examinés dans le troupeau, est de l'ordre de 10 à 25 Dh.

Cette méthode permet en outre de dénombrer le nombre de fœtus, ce qui ne manque pas d'intérêt pour la constitution de lots d'animaux et la bonne conduite du troupeau.

En conclusion, il ne faut pas opposer les différentes approches car elles peuvent être complémentaires dans la recherche des causes de faible fertilité dans un troupeau (détection des mortalités embryonnaire ou fœtale, pseudogestation...) ■.

El Aniri Bouchra

INRA, Centre Régional de la Recherche Agronomique de Settat

Remerciements

L'auteur remercie vivement les auteurs qui lui ont autorisé l'utilisation des profils présentés ici ainsi que l'équipe du laboratoire de physiologie de la reproduction, FMV, Liège (Pr. Beckers, Dr. Sousa et Madame Noucairi) qui ont aidé énormément dans la réalisation de ce travail.