

Chapitre : Biotechnologies de l'embryon

Introduction

On appelle biotechnologies de l'embryon l'ensemble des techniques mises au point à partir des connaissances de base acquises sur le développement de l'embryon.

Il est classique de distinguer **trois générations** de biotechnologies de l'embryon :

- La première génération a permis de **produire des embryons in vivo (in utero)** après un traitement hormonal de superovulation des femelles donneuses. Ce mode de production a permis le développement de la technologie du transfert d'embryons associée à leur congélation.
- Plus récemment, une deuxième génération de biotechnologies est apparue qui s'appuie sur la **production d'embryons en culture**, après maturation et fécondation **in vitro** d'ovocytes prélevés sur l'animal vivant ou après abattage (FIVETE : Fécondation in vitro et transfert d'embryons, OPU : Ovum Pick Up).
- Les progrès des connaissances sur la physiologie de l'embryon de mammifère permettent maintenant l'émergence d'une troisième génération de techniques. Celles-ci tirent parti de l'extraordinaire plasticité des premiers stades de l'embryogenèse et visent à modifier encore plus en avant les caractéristiques de l'embryon : le transfert nucléaire qui aboutit à la **production de clones**, et la **transgénèse** qui consiste à introduire un gène étranger dans les cellules de l'embryon.

A ces techniques viennent s'ajouter le sexage de l'embryon, sa congélation ou encore l'ICSI (*Intra Cytoplasmic Spermatozoa Injection*).

Rappels (les hormones utilisées en synchronisation et en superovulation)

- **La GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormon*)**

C'est une hormone synthétisée par l'hypothalamus. Elle agit directement sur l'antéhypophyse pour induire une libération transitoire de LH et de FSH pendant 2 ou 3 heures.

La réponse à son injection dépend du stade de la vague folliculaire :

- ✓ En phase folliculaire elle stimule la croissance folliculaire ;
- ✓ Elle provoque indirectement l'ovulation ;
- ✓ Sous imprégnation progestéronique, elle permet la lutéinisation des follicules dominants.

Les formes disponibles de GnRH :

- ✓ La gonadolibérine de synthèse :
CYSTORELINE (Laboratoires Ceva)
FERTAGYL (Laboratoires Janssen)
- ✓ La buséreline :
RECEPTAL (Laboratoires Intervet)

Ils sont indiqués dans les traitements des kystes folliculaires et de l'aneustrus *post partum*.



▪ La prostaglandine F2 α et ses analogues

La prostaglandine F2 α est naturellement synthétisée par l'utérus dans 2 situations :

- ✓ À la fin du cycle œstral s'il n'y a pas de gestation ;
- ✓ À l'approche de la mise bas s'il y a gestation.

Son rôle :

- ✓ Action lutéolytique utilisée pour les traitements de maîtrise du cycle ;
- ✓ Action utéro tonique en agissant sur les fibres musculaires lisses de l'utérus.

Les analogues ont une action essentiellement lutéolytique

Les formes de prostaglandines disponibles

- ✓ La prostaglandine F2 α naturelle : qui est commercialisée sous forme de sel de trométhamine le dinoprost que l'on trouve dans :
Le *DINOLYTIQUE* (Laboratoires Pfizer) ou
l'ENZAPROST (Laboratoires Ceva).





✓ Les analogues de synthèse :

L'alfaprostol : *ALFABEDYL* (Ceva) ;

Le cloprosténol : *ESTRUMATE* et *UNIANDINE* (Schering Plough) ;

L'étiproston : *PROSTAVET* (Virbac) ;

Le luprostiol : *PROSOLVIN* (intervet).



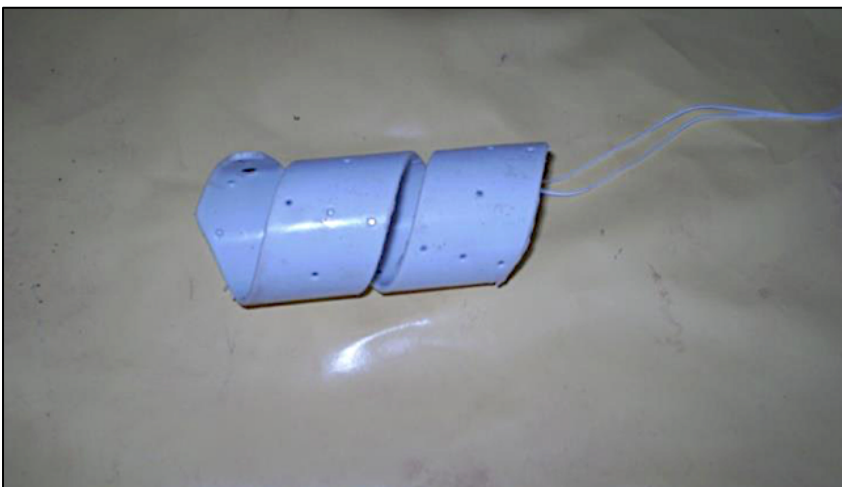
▪ Les progestagènes

Les progestagènes sont des molécules de synthèses qui exercent un rétrocontrôle négatif sur le GnRH, ce qui inhibe la sécrétion hypophysaire de la LH et de la FSH. Ainsi l'imprégnation progestéronique bloque les chaleurs et l'ovulation.

Le follicule dominant de la vague en cours devient atrélique en présence de progestérone. La levée d'inhibition entraîne le redémarrage des cycles

Les formes de progestagènes disponibles :

- ✓ La **progestérone naturelle** : Elle est contenue dans les spirales vaginales ;
- ✓ Le **norgestomet** : on le trouve dans les implants sous cutanés.



▪ Les œstrogènes

Ils sont utilisés principalement pour leur rôle dans :

- ✓ Le démarrage d'une nouvelle vague folliculaire ;
- ✓ Leur action lutéolytique ;

- ✓ Ils améliorent en plus l'absorption vaginale des progestagènes en créant une vasodilatation locale, d'où l'intérêt de les associer avec les progestagènes pour les synchronisations à dispositif intravaginaux.

Les formes d'œstrogènes disponibles

- ✓ Le benzoate d'œstradiol qui est associé au PRID ;
- ✓ Le valérate d'œstradiol qui est associé au crestar

L'utilisation de ces hormones en association avec le crestar et le PRID est interdite par la commission européenne depuis 2003.



▪ LA PMSG (*Pregant Mare Serum Gonadotropin*)

Elle est issue du sérum de jument gravide et elle possède une action à la fois LH et FSH Elle provoque la croissance folliculaire.

La forme disponible :

- ✓ Le SYNCRO-PART PMSG (Ceva) ;
- ✓ Le folligon.



G1 : La production d'embryons in vivo et transfert embryonnaire

I. La Superovulation

1.1. Critères de choix de la (les) donneuse(s)

L'objectif premier du transfert embryonnaire étant l'**accélération du progrès génétique**, on choisit une génisse ou une vache de haute production laitière ou de bonne conformation viandeuse associées à de bonnes performances de fertilité et de fécondité.

La donneuse choisie ne doit pas avoir eu une dystocie et/ou de complications puerpérales ou du post-partum (telles qu'une rétention placentaire, une infection utérine, une fièvre vitulaire ou acétonémie).

Au moment de l'instauration du traitement hormonale de superovulation, l'animal ne doit pas avoir de lésions du tractus génital (examen gynécologique voire complémentaire le cas échéant), il doit avoir accouché depuis 60 voire 90 jours au moins (involution utérine complète) et être en phase de bilan énergétique positif (BCS \geq 3). Il doit avoir manifesté deux ou trois chaleurs à intervalles réguliers. S'il y a des traitements antiparasitaires et vaccinations, ils doivent être effectués 30 jours au moins avant le début du traitement de superovulation.

1.2. Les traitements de superovulation

1.2.1. Nature des traitements hormonaux

- La **GnRH** s'est révélée inefficace pour provoquer une superovulation. Cependant, elle peut être utilisée en association à d'autres schémas de superovulation.
- La **PMSG** (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) possède une activité biologique correspondant classiquement à un mélange de 2/3 de FSH et de 1/3 de LH (ce rapport n'est pas table et dépend du stade de gestation de la jument).

La concentration de la **PMSG** est maximale dans l'organisme 15 à 32 heures après son injection et est caractérisée par une demi-vie particulièrement longue (120 heures). Il est donc indispensable de lui adjoindre l'injection de 1800 UI d'anticorps anti-PMSG (obtenus sur moutons) au moment des chaleurs.

- L'**hMG** (Human Menopausal Gonadotrophin) fournit des résultats comparables à ceux de la PMSG mais son coût est plus élevé.
- Les **extraits hypophysaires** sont de plus en plus largement utilisés. Possédant une demi-vie plus courte (5 à 6 heures) que la PMSG, ils doivent faire l'objet d'injections répétées.

Leur concentration atteint une valeur maximale 3 heures après leur injection et ne sont plus

décelables 12 heures après l'injection.

Leur utilisation répétée n'entraîne pas la formation d'anticorps contrairement à la PMSG.

1.2.2. Schémas des traitements hormonaux de superovulation

a) Schéma 1 (nécessite une détection des chaleurs)

Un traitement de superovulation peut être mis en place lors du pro-œstrus c'est-à-dire vers le 16^{ème} voire 17^{ème} jour du cycle. Cependant étant donné la difficulté de prévoir le moment exact du retour en chaleurs de l'animal, il est plus aisé de mettre en place le traitement de superovulation 9 à 15 jours après une **chaleur dite de référence**.

	PMSG (2500 à 3000 UI)		pFSH (32 mg VL et 40 mg VA)
J 0 (9 à 15)	Matin	PMSG	FSH/LH (6 ou 8 mg)
	Soir		FSH/LH (6 ou 8 mg)
J1	Matin		FSH/LH (5 ou 6 mg)
	Soir		FSH/LH (5 ou 6 mg)
J2	Matin	PGF	FSH/LH (3 ou 4 mg) et PGF
	Soir		FSH/LH (3 ou 4 mg)
J3	Matin		FSH/LH (2 mg)
	Soir		FSH/LH (2 mg)
J4	Matin	IA	IA
		Anti-PMSG (1800 UI)	
	Soir	IA	IA
J11 (7 jrs après)	Récolte et PGF		Récolte et PGF

Si le traitement de superovulation est basé sur l'utilisation de **PMSG**, celle-ci est injectée par voie intramusculaire à une dose comprise entre 2.500 et 3.000 UI. La réponse au traitement augmente avec la dose injectée. Par contre, on observe une augmentation du risque d'anovulations et d'embryons de moins bonne qualité avec la dose administrée.

En cas d'utilisation des extraits hypophysaires de FSH, les doses sont comprises entre 32 mg (recommandée souvent chez la vache laitière) et 40 mg (chez la vache viandeuse) administrées de manière fractionnée et décroissante en doses bijournalières (matin et soir) pendant 4 jours.

La **chaleur de superovulation** est obtenue par injection unique ou répétée (pour compenser la demi-vie courte de certains analogues et optimiser la chute de la progestéronémie) d'une prostaglandine naturelle ou synthétique 48 heures en général après le début du traitement de superovulation.

L'injection de 1800 UI d'anticorps anti-PMSG doit se faire au moment des chaleurs. Ces anticorps ont pour objet d'inhiber l'action de la PMSG et ce faisant le développement d'une seconde vague de

croissance folliculaire et d'éviter la formation de follicules kystiques.

En ce qui concerne le timing de l'insémination, une double insémination doit être réalisée respectivement 12 et 24 heures après le début de l'œstrus.

Après une récolte d'embryons, il est indispensable de s'assurer de la lyse des corps jaunes induits pour éviter une gestation gémellaire et induire aussi rapidement que possible le retour à une cyclicité normale. Deux stratégies sont possibles : injecter une PGF₂α le jour de la récolte ou différer cette injection d'une semaine ou deux. On obtiendra par la suite une **chaleur dite de récolte**.

b) Schéma 2 (sans détection des chaleurs)

Une solution alternative consiste à réaliser un traitement de superovulation au cours de la phase d'induction d'une chaleur au moyen d'un progestagène (spirale ou implant). Selon ce schéma, l'implant ou la spirale peuvent être mis en place quel que soit le moment du cycle. Il n'est donc pas nécessaire dans ce cas de tenir compte d'une chaleur de référence.

		PMSG (2500 à 3000 UI)	gESH (32 mg PN et 40 mg BBB)
J0		Implant/spirale	Implant/spirale
J7	Matin	PMSG	FSH/LH (6 ou 8 mg)
	Soir		FSH/LH (6 ou 8 mg)
J8	Matin		FSH/LH (5 ou 6 mg)
	Soir		FSH/LH (5 ou 6 mg)
J9	Matin	Retrait	Retrait
	Soir	PGF	FSH/LH (3 ou 4 mg) et PGF
J10	Matin		FSH/LH (2 mg)
	Soir		FSH/LH (2 mg)
J11 (J0)	Matin	IA 1 Anti-PMSG (1800 UI)	IA 1
	Soir	IA 2	IA 2
J7		Récolte et PGF	Récolte et PGF

L'implant auriculaire (norgestomet) est laissé en place pendant 9 à 10 jours pendant que l'implant intravaginal (progestérone) est maintenu pendant 7 à 12 jours.

Le traitement de superovulation débute entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour suivant le début du traitement par un progestagène.

En cas de recours à la PMSG, l'injection de PGF₂α est réalisée soit en même temps que le retrait de l'implant soit 12 à 48 heures avant son retrait pour permettre la lyse du corps jaune naturel

éventuellement en place ou en développement.

Si le traitement de superovulation utilise de la FSH, l'injection de PGF2 α est réalisée souvent à la 5^{ème} injection de FSH soit 12 à 48 heures avant l'arrêt du traitement par le progestagène. La **chaleur de superovulation** est obtenue par le retrait des implants ou des spirales vaginales.

Il est recommandé d'inséminer 36 et 48 heures après le retrait de l'implant si la PGF2 α est injectée 48 heures avant ce retrait, et 48 et 60 heures après le retrait si l'injection du PGF2 α est faite 12 heures avant le retrait.

1.2.3. Résultats du traitement de superovulation

L'**objectif** d'une stimulation ovarienne est d'obtenir un **maximum d'embryons transférables**. On estime d'une manière générale que 85 % des donneuses répondent à un traitement de superovulation c'est-à-dire présentent plus de deux corps jaunes, 75 % présentent plus de 4 corps jaunes et 65 % en ont plus de 5.

On estime le nombre total moyen d'embryon produits après superovulation à 7,8. Le nombre moyen d'embryons transférables à 5,6 (soit 72 %), 71 % étant de qualité 1 et 29 % de qualité 2.

Parmi d'autres, la réponse variable (0 à 40 ovulations) et peu prédictible des animaux à un traitement de superovulation constitue encore à l'heure actuelle un des facteurs limitants de la méthode.

1.2.4. Facteurs de variation des résultats

Des réponses variables entre individus voire d'un traitement à l'autre ont été enregistrés. Divers facteurs ont été impliqués. Outre de la **saison** (effet négatif des températures élevées) ou de l'**alimentation** (carence en énergie), ils relèvent **essentiellement** des facteurs intrinsèques liés au **statut ovarien** de l'animal et du **rythme d'injection** des substances utilisées dans les traitements de superovulation.

a) Facteurs propres à l'animal

- La qualité de la réponse va dépendre de l'importance de la **réserve des follicules préantraux**. Ainsi une corrélation entre le nombre de follicules de diamètre compris entre 2 et 5 mm et le nombre d'embryons récoltés a été démontrée par des études échographiques.
- De même, la **présence d'un follicule dominant** au moment de la mise en place du traitement de superovulation est de nature à réduire la qualité de la réponse observée.

- L'**âge** de l'animal peut également constituer un facteur limitant compte tenu du fait que le nombre de follicules qui quittent la réserve diminue avec celui-ci.
- Des différences **raciales** ont également été rapportées (4,6 dans les races Holstein, Normande et Charolaise ; 3,9 en Blonde d'Aquitain ; 3,6 en race BBB).

b) **Nature et moment de mise en place du traitement de superovulation**

- Des études ont montré que le **rapport LH/FSH** de la préparation hypophysaire utilisé avait un effet sur le nombre d'embryons récoltés, concentration croissante en LH ?
- Aucune différence significative du taux d'ovulation n'a été observée entre les traitements mis en place entre le 9^{ème} et le 15^{ème} jour du cycle (période classique de mise en place).
- La majorité des auteurs s'accorde à observer une réduction de la réponse à un traitement de superovulation mis en place entre le 2^{ème} et le 7^{ème} jour du cycle (dans le but de faire coïncider davantage le début du traitement avec le moment d'émergence d'une vague de croissance folliculaire). Ce schéma thérapeutique s'accompagne en effet davantage d'une augmentation du développement folliculaire que de l'augmentation du nombre d'ovulations. Cette réduction du nombre d'ovulations a été imputé à l'absence de lutéolyse.

II. **La récolte des embryons**

2.1. **Matériel**

Il se compose des éléments suivants :

- **Sonde dilatatrice** : d'une longueur de 60° cm, possédant une extrémité conique de 4 mm au sommet et de 7 mm à la base, elle permet de préparer le cas échéant le col à la pénétration de la sonde de récolte.
- **Sonde de récolte** : deux types sont disponibles.
 - Une sonde à **trois (sonde IMV)** : Elle assure un circuit continu du milieu de collecte. Une voie permet de gonfler le ballonnet. Une autre permet d'injecter le liquide de récolte et la troisième assure la récupération du liquide injecté dans la corne. Cette sonde se compose d'un corps rigide de 56 cm de long et de 6 mm de diamètre. Il est muni d'un bouchon d'étanchéité postérieur et d'un ballonnet en caoutchouc à son extrémité antérieure. Le tuyau de récupération a une longueur de 160 cm et un diamètre de 3 mm. Il est muni à son extrémité d'une bille métallique destinée à en faciliter la progression dans la corne utérine. Il est percé dans sa partie terminale d'orifices.

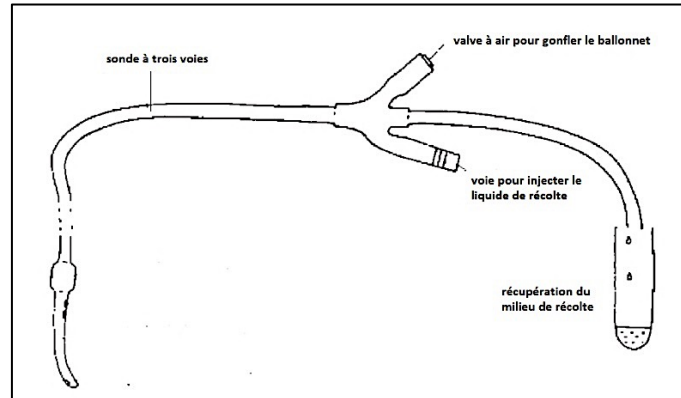


Figure 1 : Schéma d'une sonde à 3 voies.

- La seconde **sonde est à deux voies (sonde de Foley ; sonde de Han)** : Une voie permet de gonfler le ballonnet, tandis que la seconde permet d'injecter et de récupérer en alternance le liquide de récolte des embryons. La sonde a une longueur de 70 cm et un diamètre de 6 à 7 mm. Elle est munie d'un mandrin interne pour la rendre plus rigide et faciliter ainsi sa mise en place dans l'utérus.

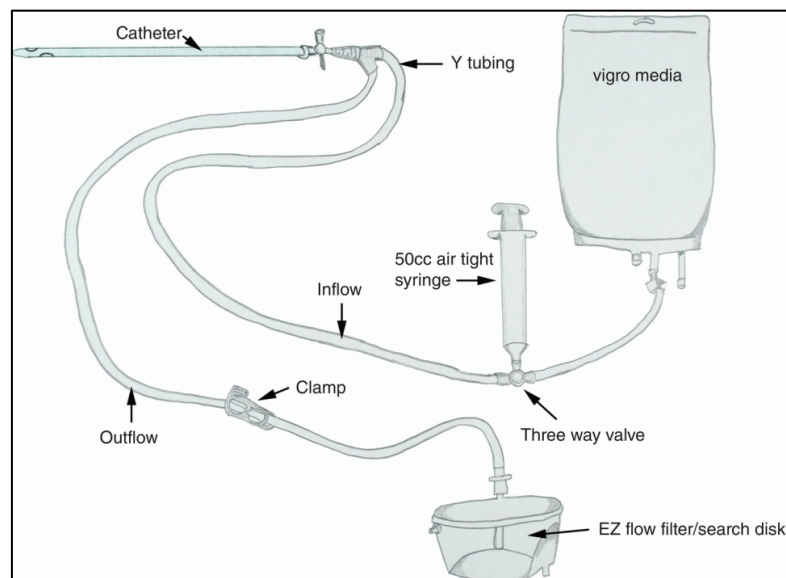


Figure 2 : Schéma d'une sonde à deux voies.

- **Seringues** : l'une de 20 ml pour gonfler le ballonnet et l'autre de 50 ml pour injecter le liquide de récolte.
- **Liquides de récolte** : Il faut prévoir par récolte 1 litre environ (250 à 500 ml par corne utérine) de PBS (Phosphate Buffered Saline). Certains auteurs utilisent une solution de Bovine Serum Albumine (BSA) à 0.4 % ou du PBS additionné de sérum de veau fœtal (FCS) à 2%. Ces liquides seront placés dans un **flacon stérile** et maintenu à température de 37 °C.

2.2.Méthodologie

2.2.1. Méthode chirurgicale

Initialement, la récolte des embryons se faisait par voie chirurgicale sous anesthésie générale. Une fois l'utérus extériorisé, une incision d'un cm de long était pratiquée à la base de la corne utérine pour permettre l'introduction d'un cathéter à deux voies (sonde de Foley).

Le ballonnet était ensuite gonflé. Le liquide de récolte était injecté au moyen d'une seringue et d'une aiguille à bout mousse au sommet de la corne utérine et récupéré par l'orifice situé à la base du ballonnet. Après récolte, le ballonnet était dégonflé, l'utérus suturé et on procédait de la même manière pour l'autre corne utérine.

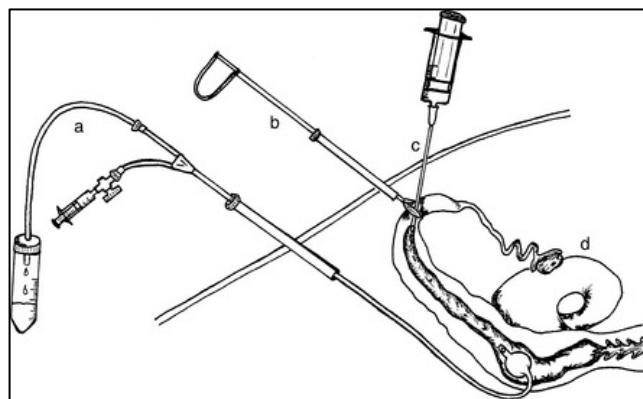


Figure 3 : Schéma de récolte d'embryons par laparoscopie chez une chèvre.

2.2.2. Collecte transcervicale (Méthode non chirurgicale)

2.2.2.1.Sonde à trois voies

a) Principes de base

- L'animal est placé dans une stalle de contention pour en limiter les déplacements et éventuellement prémédité au moyen d'un tranquillisant, d'une épidurale (3ml de xylocaïne à 2 %) et d'un spasmolytique (Buscopan 20 mg en IV).
- Le rectum est débarrassé des matières fécales et la région vulvaire convenablement lavée et désinfectée.
- La dilatation mécanique préalable du col ne s'avère habituellement nécessaire que chez la génisse. Il convient dans un premier temps d'insérer la sonde dilatatrice dans un anneau cervical et de maintenir une pression constante mais contrôlée. Le plus souvent, la résistance s'efface brutalement une fois le 3^{ème} anneau franchi.

- La sonde de récolte sera préalablement rincée au moyen de sérum physiologique, recouverte d'une chemise sanitaire et introduite dans le vagin en longeant le plafond pour éviter le méat urinaire.

Une fois arrivée au col, la chemise sanitaire sera rompue. Le col est alors manuellement ramené vers l'arrière et vient coiffer l'extrémité de la sonde. La progression de la sonde dans le col est assurée en prenant le col en avant de la sonde et en le manipulant de bas en haut et de gauche à droite. Une fois le col franchi, la sonde est alors introduite dans l'une ou l'autre corne. La corne est alignée sur la sonde en la prenant par en-dessous et en la faisant progressivement glisser sur la sonde.

- Le ballonnet sera placé trois travers de doigts environ en avant de la bifurcation des cornes. Parce qu'elle réduit le volume mort de liquide dans la corne. Le gonflement du ballonnet a pour but de fixer la sonde dans la lumière de la corne et d'éviter que le liquide de perfusion ne reflue vers l'arrière. Le volume d'air nécessaire sera de 10 à 12 cm³ pour une génisse et de 14 à 18 cm³ pour une vache.
- Une fois le ballonnet en place, il convient de dévisser le bouchon étanche en arrière du corps de la sonde pour permettre la progression du flexible. En général, la corne utérine forme un coude juste en avant du ballonnet. Il conviendra donc de la relever légèrement pour y faciliter la progression du flexible. Celui-ci sera introduit jusqu'à l'obtention d'une résistance signant la position de la bille terminale au niveau de la région utéro-tubaire soit après 30 à 40 cm chez une génisse et 40 à 50 cm chez une vache. Une fois le flexible positionné, le bouchon proximal sera revissé.
- Le flacon de récupération sera placé en contrebas de l'utérus pour favoriser la récolte du liquide de perfusion.
- 20 à 30 ml de liquide de perfusion seront injectés avant d'ouvrir la voie de retour. Normalement, le liquide commence à s'écouler instantanément. L'aide ajustera le débit d'injection de manière à maintenir en permanence 30 à 50 ml de liquide dans la corne. Pendant la perfusion (200 ml par corne), l'opérateur agite et déplie la corne utérine tout en évitant de la manipuler pendant les phases de contractions du rectum.
- Une fois la corne perfusée, on injectera dans la sonde un volume d'air suffisant pour en chasser le liquide et être sûr de récupérer l'entièreté des embryons. Il faut ensuite dévisser le bouchon d'étanchéité et ramener le flexible tout en continuant de récupérer le liquide. Une fois le flexible retiré, on obture la voie de retour et on dégonfle le ballonnet. Le corps de la sonde est retiré de manière à éviter le voile intercornual avant d'introduire la sonde dans l'autre corne.

- L'intervention sera complétée par l'instillation d'une solution d'antibiotiques dans l'utérus et l'injection d'une prostaglandine pour éviter le développement d'une gestation multiple qui s'accompagne fréquemment d'avortement.

b) Quelques difficultés pratiques

- Si l'utérus est trop plongeant, la surélévation du train antérieur de l'animal est de nature à faciliter la manipulation des cornes. Le cas échéant la traction sur un fil passé au moyen d'une aiguille courbe dans l'exocol permet de maintenir l'utérus en position plus postérieure.
- Si le flexible ne sort pas du corps de sonde, c'est que la corne est peut-être insuffisamment relevée. S'il bute après 10 à 20 cm, c'est que l'extrémité de la corne n'est pas assez dépliée.
- L'absence du retour de liquide ou un retour en goutte à goutte peut être imputé à une position trop antérieure du flexible, à son enroulement dans la corne ou à l'obturation de ses orifices par de la fibrine ou du mucus. Le cas échéant, il sera débouché en injectant du liquide sous pression. Si le ballonnet est trop postérieur, du liquide risque de refluer dans la corne contralatérale. Parfois l'absence du retour est due à l'éclatement du ballonnet.

c) Particularités de la sonde à deux voies (sonde de Foly, Han)

Plus que pour la sonde à trois voies, la mise en place de cette sonde est essentielle :

- Il faut en effet la faire progresser le plus loin possible tout en retirant le mandrin. Une fois le ballonnet gonflé, le mandrin est complètement retiré et les voies d'injection et de récupération branchées. L'injection peut se faire par simple pesanteur ou par injection de 50 ml.
- Les voies d'injection et de sortie seront clampées et ouvertes en alternance jusqu'au passage dans chaque corne de 350 à 400 ml.
- Le mandrin ne pouvant être réintroduit dans la sonde, une seconde est nécessaire pour la perfusion de l'autre corne.
- Il persiste au niveau du tuyau un volume mort dans lequel les embryons peuvent être aspirés et refoulés.

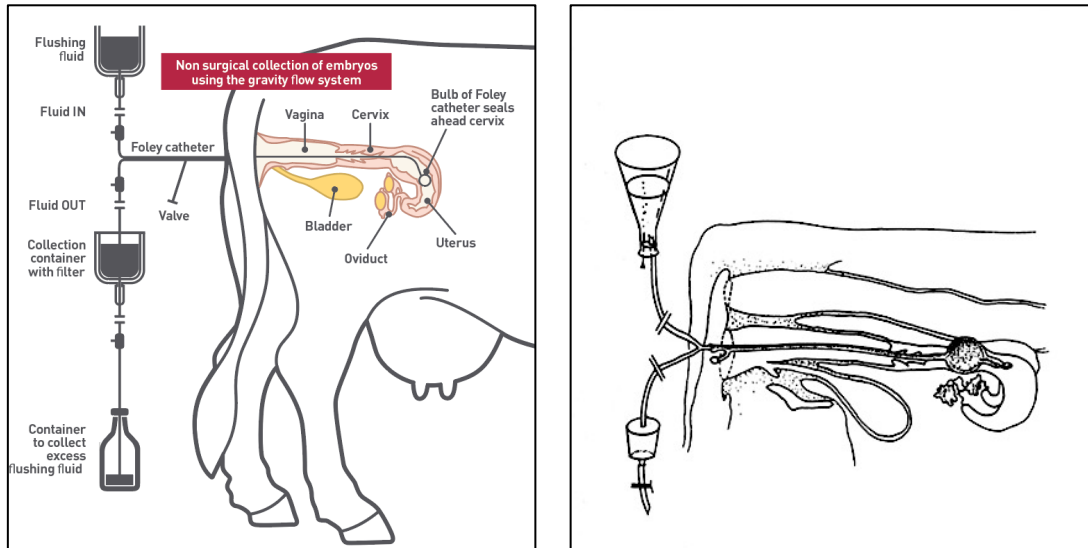


Figure 4 : Schémas de récolte transcervicale d'embryons chez une vache.

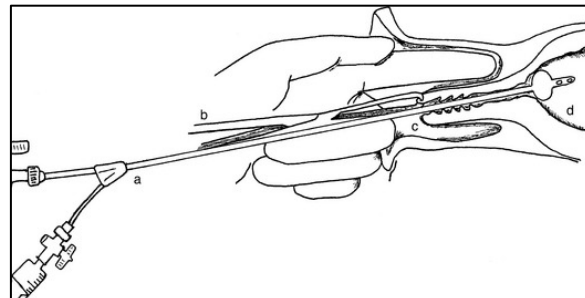


Figure 5 : Schéma de récolte transcervicale d'embryons chez une chèvre.

III. Détermination de la qualité des embryons

3.1. Identification des embryons

Après superovulation ou fécondation in vitro, les embryons récoltés 5 à 7 jours après l'œstrus se présentent sous des aspects morphologiques divers (figure 6), il est important d'en apprécier la qualité avant leur transfert ou autres manipulations biotechnologiques éventuelles.

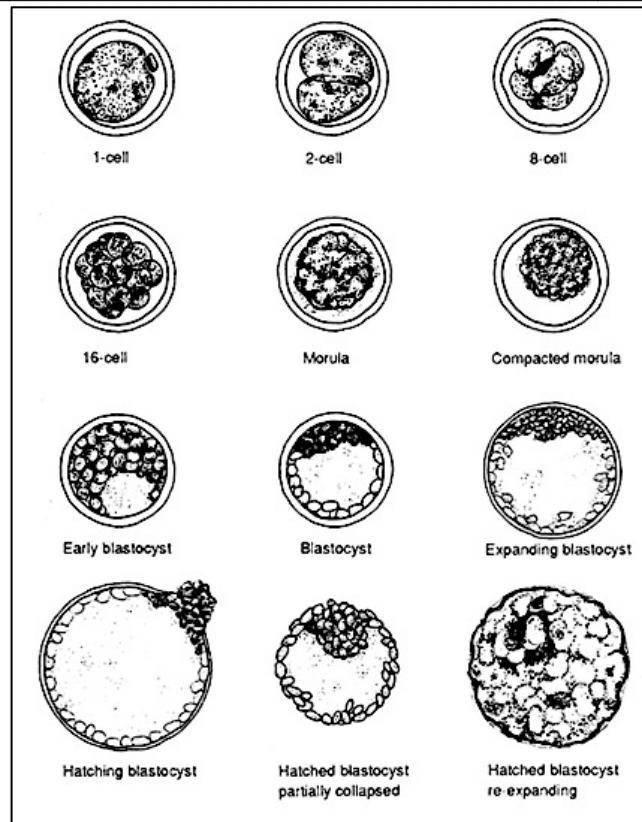


Figure 6 : schéma d'embryons normaux de qualité excellente à différents stades de développement

- **Morula** : les blastomères sont de forme ronde, ne sont pas étroitement liés mais difficiles à discerner les uns des autres. La masse cellulaire de l'embryon occupe la plus grande partie de l'espace périvitellin.
- **Morula compacte** : sa forme est similaire à une balle de golf (le bord extérieur est légèrement bosselé en raison de la compaction). Les blastomères individuels ne sont plus reconnaissables. La masse de l'embryon occupe 60 à 70% de l'espace périvitellin.
- **Jeune Blastocyste** : Un petit espace clair contenant du liquide est visible. Cette zone est le début de formation de la blastocèle. L'embryon occupe 70 à 80% de l'espace périvitellin.
- **Blastocyste** : La cavité de la blastocèle comprend plus de 70% du volume de l'embryon. Deux groupes de cellules sont présents et clairement reconnaissables comme la couche trophoblastique sous la zone pellucide et la masse cellulaire interne plus sombre occupant un côté de l'embryon. L'espace périvitellin peut être encore visible.
- **Blastocyste expansé** : Il n'y a pas d'espace périvitellin entre la couche de cellules trophoblastiques et l'intérieur de la zone. Il y a amincissement de la zone pellucide. Une petite masse cellulaire interne (bien compactée) positionnée d'un côté de l'embryon est observée. La couleur de l'embryon est pâle à claire en raison de la grande quantité de liquide présent à l'intérieur.

- **Blastocyste libre (éclos)** : Enfin, le blastocyste s'étend jusqu'au point de rupture et l'embryon s'échappe de la zone rompue. Les blastocystes éclos peuvent être sphériques avec une blastocèle bien défini ou ils peuvent être déformés, ressemblant à des débris. L'identification des embryons à ce stade peut être difficile pour l'opérateur inexpérimenté.

Lorsque les blastocystes sont exempts de zone pellucide, les risques de dommages dus à la manipulation sont plus grands. De plus, les blastocystes libres sont « collants » et peuvent adhérer aux tubulures et à la verrerie. Les filtres d'embryons ne devraient pas être utilisés lorsqu'il y a une possibilité que les embryons libres soient récupérés (> jour 7).

3.2.Critères d'identification de la qualité des embryons

Divers critères ont été proposés. Les uns évaluent les caractéristiques morphologiques de la pellucide et des blastomères et vérifient si elles sont en accord avec le stade de gestation. Dans ce but, des valeurs de diamètre externe de l'embryon et de l'épaisseur de la pellucide ont été déterminées.

D'autres moins couramment utilisés se basent sur le nombre de cellules identifiées à un stade de développement donné, l'activité enzymatique ou métabolique ou encore sur le délai voire les modalités d'éclosion du blastocyste une fois sa phase d'expansion réalisée.

Une fois récoltés, les embryons seront placés dans 2 à 3 ml de milieu de récolte propre et examinés aux grossissements 10-40 pour en préciser les éléments morphologiques généraux. Les blastocystes dits normaux seront isolés des autres. Les blastocystes jugés anormaux seront ensuite examinés au grossissement 120 pour en préciser les caractéristiques cellulaires. Ils seront à nouveau examinés après 4 à 6 heures.

L'évaluation morphologique fait classiquement référence à celle proposée par Eldsen en 1978. En pratique, 8 éléments d'observation peuvent être retenus. Ils concernent

- La **membrane pellucide** (1. sphéricité, 2. épaisseur, 3. aspect fissuré ou non),
- Le **blastocyste** en général (4. régularité de son aspect général, 5. degré d'identification de ses différentes structures à savoir le trophoblaste, le bouton embryonnaire et la cavité blastocoelique)
- Les cellules **blastocytaires** (6. aspect des contours cellulaires et degré de variation de taille entre les cellules, 7. présence de cellules détachées dans l'espace vitellin, 8. présence de vacuoles dans les cellules ou de granulations à leur surface).

Il faut néanmoins tenir compte de certaines remarques : pour un jour de récolte donné, plusieurs blastocystes au demeurant normaux peuvent se trouver à des stades de développement plus ou moins

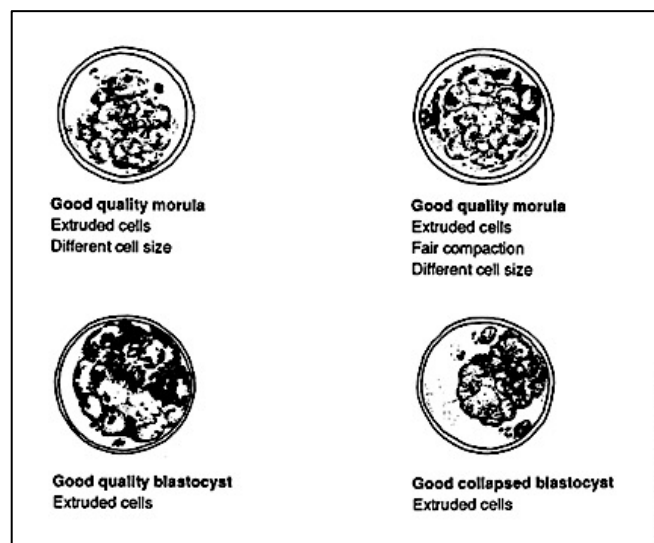
avancés. De même, il n'est pas rare de récolter des ovocytes non fécondés. Leur zone pellucide sera sphérique ou oblongue. Ils ne présentent pas de contours cellulaires bien visibles. Le matériel cellulaire est dispersé dans l'espace vitellin (aspect pycnotique).

3.3. Classification des embryons

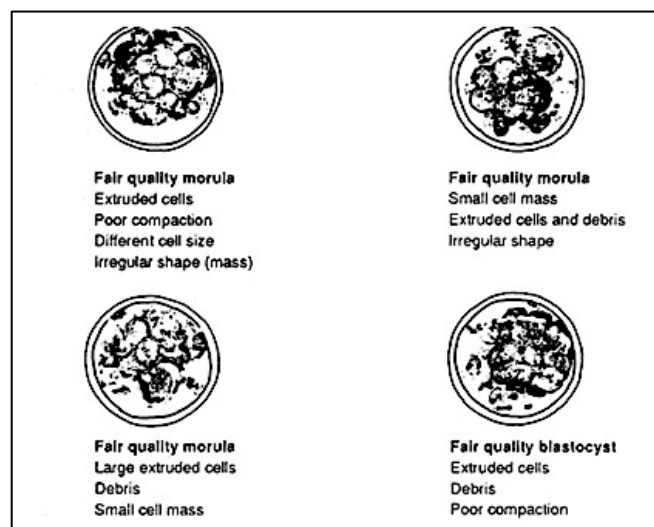
Quatre (Eldsen 1978) voire cinq (Kennedy et al. 1983) classes d'embryons sont distinguées :

- **Classe 1 (excellent) :** Embryon au stade normal de développement au moment de l'observation qui n'a pas d'imperfections visibles : aspect symétrique, blastomères polygonaux formant une masse compacte au stade morula (figure 6).

- **Classe 2 (bon) :** Aspect semblable aux embryons de classe 1 mais présence de quelques imperfections visibles : embryons de forme asymétrique pouvant contenir des blastomères séparés de l'amas compact des cellules formant la morula. Ils peuvent également présenter un retard de développement par rapport aux autres embryons récoltés sur la même donneuse.



- **Classe 3 (Moyen) :** Embryons en retard de développement de 1 à 2 jours. Les blastomères sont sphériques et de taille variable au stade morula. On constate la présence de vésicules dans les blastomères. L'aspect de l'embryon est plus sombre ou plus clair que la normale.



- **Classe 4 (mauvais) :** Embryon en retard de développement de 2 jours ou plus. Les limites cellulaires sont indistinctes.
- **Classe 5 (dégénérés) :** La dégénérescence peut parfois être, très évidente, qu'il n'est plus possible de reconnaître le stade de développement. Les embryons sont composés principalement de débris et contiennent soit des cellules toutes mortes soit quelques cellules vivantes seulement ou une très petite masse cellulaire d'apparence extrêmement désorganisée.



IV. Le transfert d'embryons

4.1. Le choix des receveuses

- Il faut accorder une priorité aux génisses car les résultats obtenus sont en moyenne de 50 % de gestation. En utilisant des multipares comme receveuses le résultat baisse d'environ 20 %. L'âge recommandé pour une génisse est d'environ 15 mois avec un poids qui correspond à 60 % de l'âge adulte.
- Pour finir il faut choisir des animaux dociles car les manipulations sont nombreuses surtout pour la synchronisation et la pose de l'embryon qui est une étape extrêmement délicate.
- Il est conseillé de prévoir plus de receveuses que d'embryons à mettre en place car toutes les receveuses synchronisées ne seront pas aptes à recevoir un embryon. L'opérateur réalise un palper transrectal pour s'assurer de la présence d'un corps jaune sur un des deux ovaires. Si l'opérateur a le moindre doute sur la présence du corps jaune le transfert ne se fera pas.
- Avant le transfert il est essentiel de noter les chaleurs des receveuses, car c'est le meilleur critère de la bonne cyclicité des femelles. Au minimum deux chaleurs doivent être observées avant de commencer la synchronisation.
- De plus les femelles choisies comme receveuses doivent présenter un état d'engraissement moyen ($BCS \geq 3$).

4.2. Synchronisation de la donneuse et des receveuses

Une synchronisation aussi parfaite que possible entre l'âge de l'embryon et donc la donneuse et l'état physiologique de l'utérus de la receveuse constitue l'élément essentiel de la réussite du transfert d'un embryon.

Un écart de 24 heures maximum entre le jour des chaleurs de la donneuse et de la receveuse sera donc accepté. Il est vrai qu'in vitro le développement des blastocystes peut être retardé. Il est connu cependant que ceux qui atteignent le stade blastocyttaire au 7^{ème} jour de développement sont de meilleure qualité que les autres.

- Injection unique au 2^{ème} jour du traitement de superovulation de la donneuse (4^{ème} injection de FSH/LH) d'une prostaglandine F2alpha naturelle ou de synthèse en IM après avoir confirmé manuellement ou par échographie la présence d'un corps jaune de diamètre supérieur à 2 cm.
- Double injection d'une prostaglandine F2alpha naturelle ou de synthèse à 11 (génisses) ou 14 jours (vaches) d'intervalle, la deuxième injection ayant lieu au 2^{ème} jour du traitement de superovulation de la donneuse (4^{ème} injection de FSH/LH) : ce traitement offre l'avantage d'assurer un plus grand degré de synchronisation des receveuses.
- Retrait au 2^{ème} jour du traitement de superovulation de la donneuse (4^{ème} injection de FSH/LH) d'un implant de norgestomet ou d'une spirale de progestérone et injection simultanée d'une prostaglandine F2alpha naturelle ou de synthèse après respectivement 7 et 9 jours de mise en place.

4.3. Le transfert d'embryons : matériels et techniques

Initialement, les transferts d'embryons étaient réalisés par **voie chirurgicale** au niveau du flanc ipsilatéral à l'ovaire porteur du corps jaune. La peau et la tunique abdominale sont incisées au moyen d'un bistouri et les couches musculaires dilacérées sur une longueur de 10 cm environ au moyen des doigts. Le péritoine est ponctionné au moyen de l'index. L'extrémité de la corne est amenée au niveau du site opératoire et l'embryon mis en place dans son tiers supérieur après ponction de la corne au moyen d'une aiguille mousse.

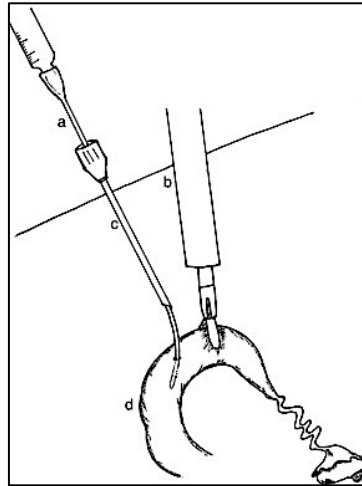


Figure 7 : Schéma du transfert d'embryon par voie chirurgical chez une chèvre.

A l'heure actuelle, le transfert d'embryon est réalisé par **voie transcervicale** au moyen de pistolet de transfert de diamètre de 3 mm pour les génisses ou de 4 mm plus rigide pour les vaches.

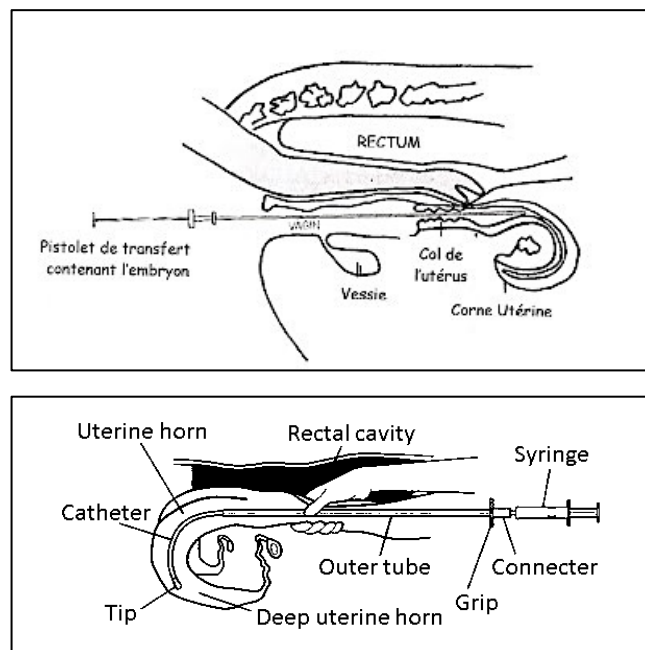


Figure 8 : Schéma de pose d'un embryon sur une vache receveuse

- Toutes interventions ou causes de stress sont à éviter dans le mois précédent le transfert (vaccination, déparasitage, transition alimentaire, mise à l'herbe, etc.).
- Après le transfert les conditions d'élevage doivent être identiques durant les deux mois qui suivent le transfert en évitant toujours de stresser les animaux, il est nécessaire de surveiller les éventuels retours en chaleurs.
- Lors de cette pratique l'hygiène est extrêmement importante, la vulve doit être nettoyée. Il ne faut pas introduire de matière fécale dans l'utérus (risque de métrite). Le geste doit être fluide.
- Si l'embryon n'est pas frais il faut le décongeler.

4.4. Facteurs limitants

Deux facteurs limitent l'application du transfert d'embryons direct : le **nombre relativement faible d'embryons** que l'on obtient après un traitement hormonal de superovulation (7 à 8 embryons en moyenne dont seulement 5 à 6 d'entre eux sont transférable) et la **variabilité** de production entre femelles traitées. En outre, 20 à 30 % des femelles traitées ne donnent pas d'embryons transférables, alors que 25 % produisent plus de 6 embryons ce qui **limite** les possibilités de **planification rigoureuse** du nombre de femelles receveuses. Il en résulte un coût technique environ 2 fois plus élevé que celui de l'insémination artificielle.

V. La conservation des embryons

La conservation des embryons récoltés sur un animal donneur ou obtenus par fécondation in vitro constitue une étape essentielle du transfert d'embryons. Cette conservation peut s'envisager à court ou long terme.

5.1. Conservation à court terme

L'embryon récolté peut être stocké temporairement avant son transfert. Il a été démontré que les milieux de Ham's F-10 ou du PBS additionné de 20 % de sérum fœtal de veau (FCS) ou de BSA (Bovine Serum Albumine) convenaient parfaitement pour maintenir les embryons en vie pendant un délai d'une douzaine d'heures à température ambiante.

Pour une conservation plus longue (> 12 heures), il semble nécessaire de stocker les embryons au réfrigérateur (4°C) pour une période de 12 à 24 heures en remplaçant régulièrement le milieu. Cependant, les résultats obtenus seront d'autant meilleurs que l'embryon est rapidement transféré à l'animal receveur (< 3 heures).

Remarque : Les embryons obtenus in vitro présentent des caractéristiques cellulaires différentes de ceux obtenus in vivo. Leur conservation à court terme ne peut s'envisager que pendant 24 heures à une température de 20°C.

5.2. Conservation à long terme

Pour une conservation à long terme, une congélation de l'embryon sera requise. La méthode s'est rapidement intégrée aux programmes de superovulation étant donné les nombreux avantages présentés tant du point de vue zootechnique (inutilité de synchronisation des donneuses), que

commercial (exportation plus aisée) ou génétique (banque d'embryons d'animaux d'élite, conservation d'espèces en voie de disparition) voire scientifique (études biochimiques et cryobiologiques fondamentales). Elle a permis ainsi de dissocier dans l'espace et dans le temps la production et le transfert des embryons.

La transplantation d'embryons est maintenant étroitement associée à la congélation, le plus souvent au stade blastocyste, par des méthodes compatibles avec une décongélation réalisée juste avant la transplantation.

5.2.1. Données générales

a) La surfusion

Le point de congélation d'une solution dépend de sa concentration en solutés dissous (Loi de Raoult) : ceux de l'eau, d'une solution de tampon phosphate (PBS) renfermant du glycérol 1.5 M sont respectivement de 0, -0.8 et -4.5°C. La glace ne se forme le plus souvent que si le point de congélation est dépassé. Cependant, il arrive que des températures inférieures à celles du point de congélation puissent être atteintes sans qu'il n'y ait formation de glace. C'est l'état de surfusion. Il est particulièrement instable. Il suffit d'une vibration, d'un choc mécanique, d'une injection d'azote liquide ou d'une impureté pour initier le processus de cristallisation. Une fois amorcé ce processus de cristallisation (seeding), on constate que la température remonte jusqu'à celle correspondant au point de congélation de la solution utilisée. Un pic de surfusion trop important (> 2°C) est préjudiciable à la survie des embryons.

b) Les effets de la congélation

Au cours de la congélation, les cristaux de glace se forment d'abord dans le milieu extracellulaire : sa concentration en solutés augmente rapidement. Il en résulte une sortie d'eau de la cellule dont le volume diminue : l'embryon se déshydrate.

L'importance de ces mouvements d'eau cellulaire dépend cependant de la vitesse de congélation. Si la vitesse de refroidissement est lente, l'eau sort progressivement de la cellule. A l'inverse, si la vitesse de congélation est élevée, l'eau ne sort pas de la cellule et se congèle brutalement. Il en résulte la formation de gros cristaux intracellulaires. Ces deux conséquences peuvent être atténuées en contrôlant la vitesse de refroidissement entre 0°C et -60°C d'une part et en recourant à des agents cryoprotecteurs d'autre part. De leur concentration va dépendre en effet la quantité d'eau résiduelle intracellulaire lors du passage de l'embryon dans l'azote liquide.

c) Nature des agents cryoprotecteurs

En l'absence d'agent cryoprotecteur, les cellules de mammifères ne survivent pas à une température inférieure à -20°C .

La congélation des embryons fait essentiellement appel aux cryoprotecteurs de type pénétrant. Le degré de pénétration de l'agent cryoprotecteur dépend de divers facteurs dont le coefficient de perméabilité de l'embryon au cryoprotecteur (celui-ci dépend du stade de développement de l'embryon et de l'espèce), le gradient existant entre les concentrations intracellulaires et extracellulaires de l'agent cryoprotecteur et la température de surface de l'embryon.

5.2.2. La congélation proprement dite

La congélation comprend une série d'étapes relativement classiques mais aussi parfois spécifiques des laboratoires qui les utilisent. De même, l'appareillage qu'elle nécessite est de nature fort diverse, certains fonctionnant à l'éthanol pur ou à l'azote liquide.

a) Étapes classiques

- La première étape de la congélation consiste à équilibrer l'embryon dans sa solution de PBS (renfermant 10 % de sérum fœtal bovin) avec une solution de glycérol 1.4 M soit 10 % pendant 20 minutes à la température ambiante (20°C).
- La seconde étape visera à conditionner la solution PBS-glycérol renfermant l'embryon dans une paillette de 0.25 ml. Pour ce faire la solution est aspirée tout en séparant la partie renfermant l'embryon par deux bulles d'air.
- Lors d'une troisième étape, la paillette est transférée dans l'appareil à congélation et refroidie jusque -7°C à la vitesse de 1 à 3°C par minute. La paillette est alors maintenue pendant 5 à 7 minutes à cette température pour la stabiliser.
- La quatrième étape consistera à provoquer la cristallisation par seeding. Pour ce faire on heurtera la ou les paillettes ou le liquide de refroidissement au moyen d'une pince par exemple.
- Lors de la cinquième étape, la paillette est refroidie de -7°C à -35°C à raison de 0,3 à $0,6^{\circ}\text{C}$ par minute. Cette température semble être optimale pour obtenir un compromis entre déshydratation et formation de glace intracellulaire.
- Lors de la sixième étape, la paillette est plongée dans l'azote liquide à -196°C .

b) La vitrification

La vitrification constitue une méthode alternative intéressante. Elle se base sur le concept de solidification directe. L'élévation extrême de la viscosité du milieu permet de créer un état amorphe ou vitreux sans formation de glace intra ou extra cellulaire.

La solution de vitrification renferme de très fortes concentrations d'un ou de plusieurs agents cryoprotecteurs de type pénétrant (25 % de glycérol et 25 % de propanediol).

La vitesse de congélation est extrêmement élevée et obtenue par immersion directe dans de l'azote liquide (250°C par minute). Compte tenu de la toxicité pour l'embryon des agents cryoprotecteurs utilisés à ces concentrations, l'équilibration constitue une étape critique de la méthode.

Enfin, l'état vitreux étant instable à des températures supérieures à -100°C, la vitesse de décongélation doit être très rapide (250°C /min) pour minimiser les risques de lésions cellulaires due à la réformation de cristaux lors de la décongélation.

c) La congélation ultrarapide

A la différence de la vitrification, ce type de congélation induit la formation de glace intra et extracellulaire. Elle implique le recours à un cryoprotecteur de type pénétrant (glycérol) et d'un cryoprotecteur non pénétrant (sucrose).

Morula et blastocyste sont refroidis jusque - 30°C à la vitesse de 12°C par minute puis plongés dans l'azote liquide. Cette méthode n'a été à ce jour appliquée qu'aux embryons de souris, rates et lapines.

5.2.3. La décongélation

Il en existe deux types qualifiés de décongélation lente et de décongélation rapide. Dans l'un et l'autre cas l'objectif est de soustraire l'embryon à l'action de l'agent cryoprotecteur utilisé pour la congélation et de le réhydrater.

a) Décongélation lente

Dans la décongélation lente (or multistep thawing) le contenu de la paillette est passé dans trois bains (5 minutes par bain) renfermant des concentrations décroissantes de glycérol (6.6 %, 3.3 % et 0 %) et constantes de sucrose (0.3 M), le quatrième bain ne renfermant que du PBS et assure la réhydratation de l'embryon. Cette méthode requiert du temps (1 à 2 heures) et un minimum

d'équipement de laboratoire. Elle peut requérir également un microscope pour observer la qualité de l'embryon décongelé.

b) Décongélation rapide

Dans la décongélation rapide (or one-step thawing) la paille est décongelée à la température ambiante (20°C). Cette décongélation rapide implique cependant l'utilisation lors du montage de la paille et donc de sa congélation l'utilisation de sucrose. Pour ce faire, l'embryon est équilibré pendant une vingtaine de minutes dans une solution de glycérol 1.36 M et de sucrose 0.25 M. Lors du montage de la paille, on aspire successivement le sucrose 0.5M (4 cm), une bulle d'air, le mélange glycérol 1.36M et sucrose 0.25M renfermant l'embryon (1 cm), une bulle d'air et le sucrose 0.5M (6cm). La décongélation de la paille assure le mélange des solutions et donc soustrait l'embryon au glycérol, la réhydratation de l'embryon étant assuré lors de sa mise en place dans l'utérus. Cette méthode offre de réels avantages sur le terrain puisqu'elle dispense le praticien d'avoir du matériel de laboratoire, le transfert ressemblant dans ce cas à une insémination classique.

5.2.4. Facteurs d'influence des résultats

- La **Qualité morphologique de l'embryon** congelé est de nature à influencer les résultats obtenus. Ainsi, il est bien démontré que les blastocystes expansés donnent moins souvent lieu à une gestation que les blastocystes ou les morulas.
- **Nature de l'embryons** : Il a été constaté que les embryons produits in vitro témoignent d'une plus grande sensibilité au processus de la congélation - décongélation.
La présence dans ces embryons d'une concentration plus élevée en gouttelettes lipidiques serait à l'origine d'une formation irrégulière de glace intracellulaire.
Des différences au niveau de la pellucide entre les embryons produits in vivo et in vitro pourraient également expliquer leur sensibilité différente à la congélation.
- **Âge de l'embryon** : Les essais de congélation d'embryons âgés de moins de 5 jours ne se sont pas accompagnés d'un franc succès. De même in vitro, il est essentiel que la première division cellulaire se réalise dans les 26 à 32 heures suivant la fertilisation. Ces embryons atteignent en effet plus tôt le stade blastocyste (J7) que si cette division apparaît plus tard. Il en résulte une meilleure tolérance du processus congélation - décongélation.

Envoyez vos questions, remarques et suggestions à : ✉ said.boukhechem@umc.edu.dz

Le document PDF est téléchargeable sur : La plateforme MOODLE de l'université des frères MENTOURI :
<http://elearn.umc.edu.dz:25000>

© Institut des Sciences Vétérinaires, Université Constantine 1 – Avril 2024.