

## **Chapitre : Biotechnologies de l'embryon**

### **G2 : La production d'embryons in vitro**

#### **Introduction**

Estimée à 100.000 ovocytes, la réserve ovocytaire ne conduit en fait à la production moyenne que d'une centaine d'embryons sur la vie d'un animal soumis à des traitements de superovulation et récolte d'embryons. Il existe donc un gaspillage énorme du potentiel génétique femelle susceptible d'être mis à profit pour la production d'embryons.

C'est pourquoi, des techniques de récupération d'ovocytes et des méthodes de fécondation in vitro ont été mises au point. Celles-ci apparaissent d'autant plus justifiées que différentes recherches ont confirmé la continuité du processus de croissance folliculaire sous forme de vagues tant chez les animaux gestants que non-gestants.

Dans l'espèce humaine, le premier enfant né après fertilisation in vitro d'un ovocyte fut Louise Brown, né le 25 juillet 1978 au Royaume-Uni.

Le premier veau né après maturation in vitro (MIV), fécondation in vitro (FIV) et transfert non chirurgical de l'embryon est né en 1981.

La production d'embryons in vitro chez la vache (PIV) vise à produire à partir des ovocytes d'une vache de haute valeur génétique des embryons. Elle comprend quatre étapes :

- La récolte d'ovocytes.
- La maturation in vitro des ovocytes (MIV).
- La fécondation in vitro (FIV).
- Le développement in vitro de l'embryon (DIV).

#### **I. Prélèvement des ovocytes**

##### **1.1. Prélèvement *in vitro***

Le prélèvement in vitro des ovocytes est effectué après prélèvement des ovaires à l'abattoir. Il est important de réduire le temps de stockage des ovaires et de veiller à respecter des conditions de température optimales. Les ovaires doivent être prélevés dans les deux heures suivant l'abattage de l'animal. Ils seront stockés à une température comprise entre 24 et 30°C. Le prélèvement des ovocytes sera effectué dans les 4 heures suivant le prélèvement des ovaires.

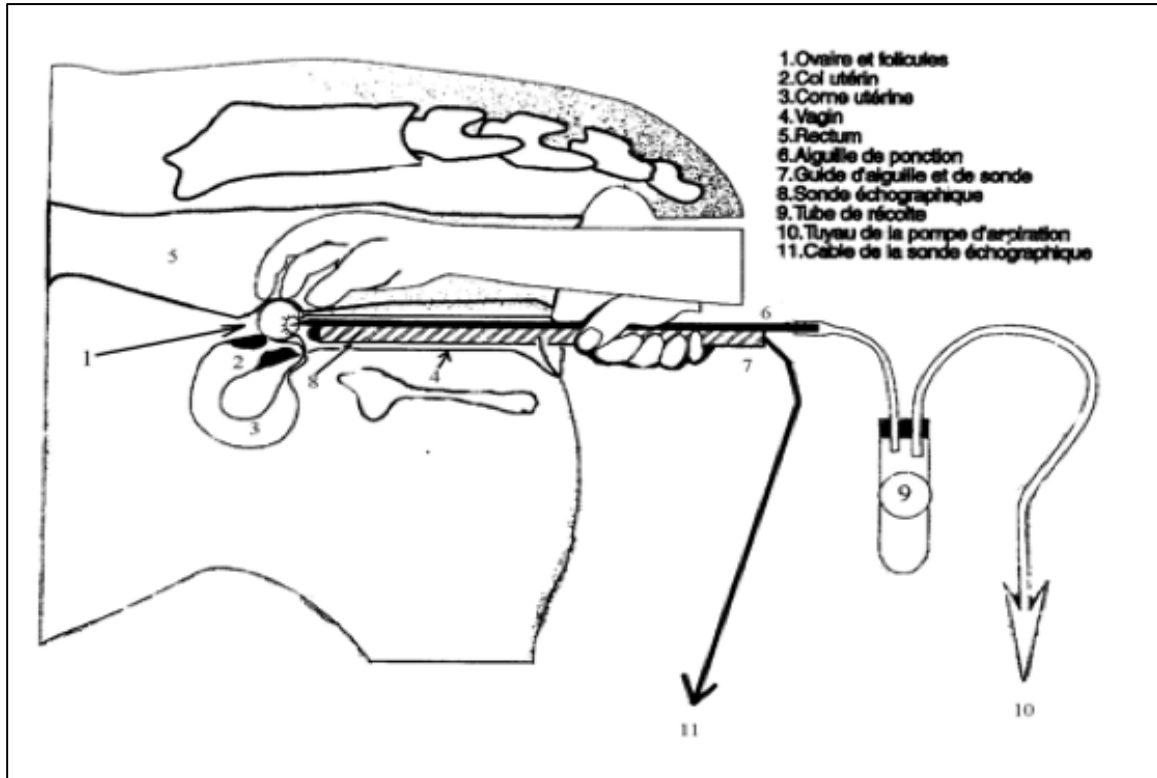
Le prélèvement des ovocytes par :

- Aspiration (trompe à eau : 1 à 2 cm de Hg) du liquide folliculaire au moyen d'une aiguille (19G à biseau court) est une des méthodes les plus anciennes. Elle permet en moyenne de récupérer 9 à 16 ovocytes par ovaire soit 30 à 60 % des follicules ponctionnés.
- La dissection préalable des follicules permet l'obtention de 16 à 17 follicules par ovaire. Cette seconde méthode offre l'avantage d'augmenter le pourcentage d'ovocytes morphologiquement normaux (60 à 63 % vs 31 à 80 %), conséquence possible du fait que la dissection permet de mieux identifier les follicules non atrétiques. Elle est cependant plus lente que la première.
- La découpe de l'ovaire en tranches (slicing ovary) offre pour avantage d'augmenter le nombre d'ovocytes récupérés (20 à 55 par ovaire).
- D'autres méthodes ont également été envisagées comme celle impliquant la digestion préalable de l'ovaire au moyen de la trypsine (221 ovocytes par ovaire).

### **1.2.Prélèvement *in vivo* : l'Ovum Pick Up (OPU)**

La technique d'OPU dérive directement de la méthode de prélèvement d'ovocytes utilisée dans l'espèce humaine. La récolte consiste à ponctionner les follicules à l'aide d'une aiguille positionnée dans une gaine fixée à la sonde échographique et introduite dans le vagin.

- Avant la récolte, une anesthésie épidurale est réalisée pour limiter les contractions péristaltiques.
- Évacuation des matières fécales et de l'urine.
- Désinfection région vulvaire.
- La sonde échographique est introduite dans le vagin et permet de visualiser les follicules ovariens qui seront ensuite ponctionnés un à un.
- L'ovaire est maintenu par voie transrectale puis positionné en regard de l'aiguille de ponction (Figure 1).
- L'aspiration du liquide folliculaire permet de récupérer les complexes cellules du cumulus-ovocytes (COC), qui sont recueillis dans un milieu spécifique contenant du PBS (Tampon Phosphate contenant du chlorure de sodium) et de l'héparine.



**Figure 01.** Technique de prélèvement d'ovocyte par OPU chez la vache (Hanzen, 2009).

Les ovocytes peuvent être collectés deux fois par semaine, pendant plusieurs semaines sans effet secondaire sur les donneuses. Une récolte permet d'obtenir en moyenne 4 à 5 ovocytes utilisables. Les follicules ponctionnés sont ceux mesurant 2 à 8 mm de diamètre, ils contiennent des ovocytes immatures (première division de méiose). Pour les génisses impubères, la récolte se fait comme chez les petits ruminants, par laparoscopie.

Il est possible de stimuler, quelques jours avant la récolte, la croissance folliculaire avec de la FSH, qui permet d'augmenter le nombre d'ovocytes prélevés par récolte.

### Avantages de l'OPU

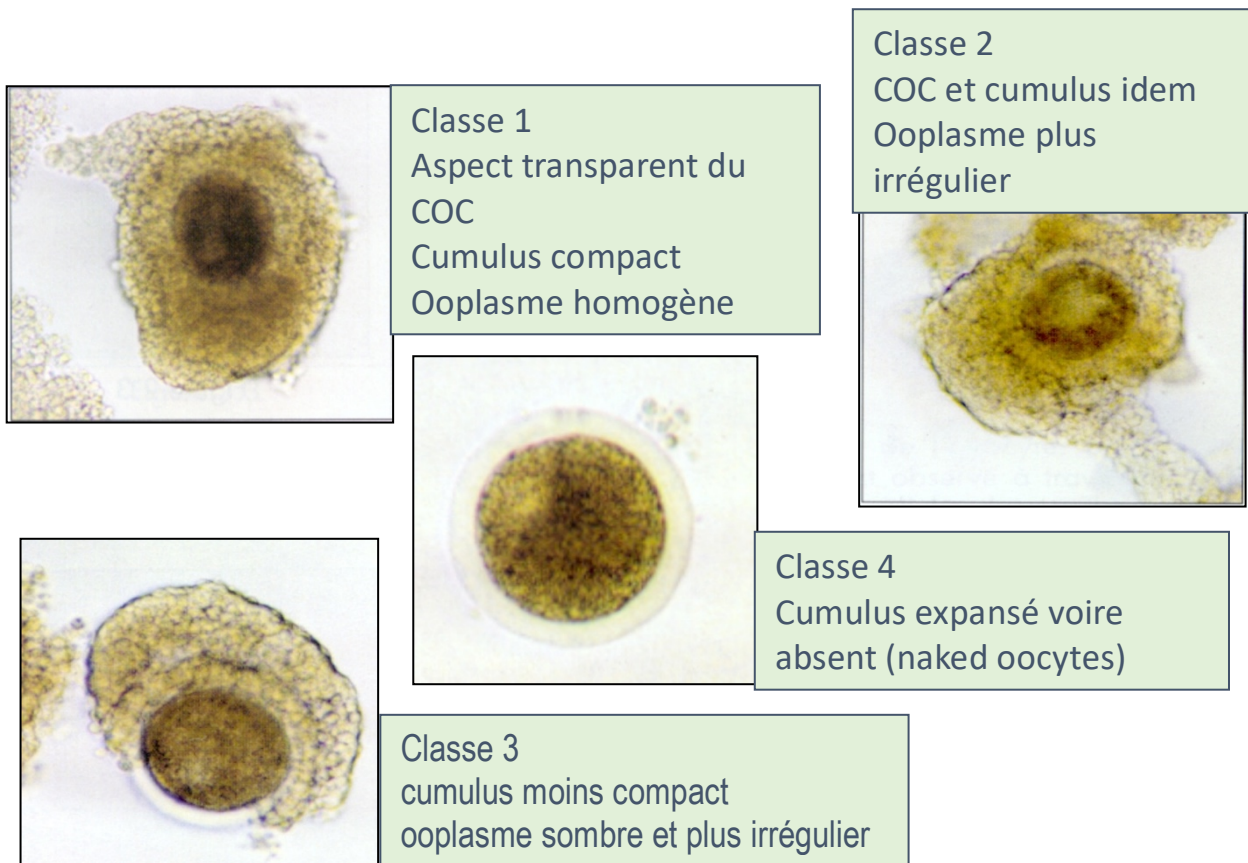
- Augmentation du nombre d'embryons produits par unité de temps (par rapport à la superovulation).
- Réduction de la consanguinité par l'utilisation de taureaux différents lors de chaque séance de FIV.
- Reproduction des animaux qui ne répondent plus à la superovulation.
- Prélèvement des donneuses sans interférence avec l'intervalle entre vêlages.
- Réalisation possible en ferme.

### 1.3. La qualité des ovocytes

La sélection des ovocytes repose essentiellement sur des critères morphologiques (microscope optique) ou ultrastructuraux (microscope électronique) du Cumulus Oocyte Complex (COC). Les ovocytes bovins immatures peuvent être répartis en 4 catégories selon le degré de compacité des cellules du cumulus et de transparence de l'ooplasm.

Il semble évident que les différences éventuellement identifiées lors de l'examen peuvent être attribuées à des stades divers de maturation, celle-ci s'accompagnant d'importantes modifications de surface et donc de contact entre l'ovocyte proprement dit et les cellules du cumulus :

- **Classe 1** : Le COC a un aspect transparent. Le cumulus (cellules de la granuleuse) est compact et entoure complètement l'ovocyte. L'ooplasm ovocytaire a un aspect homogène ;
- **Classe 2** : Le COC a le même aspect que dans la classe 1 mais l'ooplasm a un aspect plus irrégulier, une zone plus sombre pouvant être visible à sa périphérie ;
- **Classe 3** : L'ensemble du COC est sombre, le cumulus est moins compact, l'ooplasm est plus irrégulier et présente des amas plus sombres ;
- **Classe 4** : Le cumulus est complètement expansé voire absent (ovocytes nus : naked oocytes).



La présence du cumulus pendant au moins 12 heures est plus essentielle à la maturation cytoplasmique de l'ovocyte qu'à sa maturation nucléaire. Une preuve indirecte en est donnée par l'effet positif exercé par l'addition de cellules de la granuleuse au milieu de maturation des ovocytes. À l'inverse, les ovocytes nus sont beaucoup moins fertiles.

## II. La maturation in vitro (MIV)

L'ovocyte bloqué au stade vésicule germinale nécessite une étape de maturation pour acquérir la capacité à être fécondé.

La maturation s'effectue à plusieurs niveaux :

- **La maturation nucléaire** : conduisant au stade métaphase II de la méiose et caractérisée par l'émission du premier globule polaire.
- **La maturation membranaire** : qui permet à la zone pellucide de reconnaître spécifiquement les spermatozoïdes de la même espèce, grâce à des glycoprotéines spécifiques, la ZP3 pour la reconnaissance et la ZP2 pour la fixation spermatique.
- **La maturation cytoplasmique** : qui comprend la migration des granules corticaux vers la périphérie, la synthèse de l'ovoperoxydase qui permet d'éviter la polyspermie, et les synthèses protéiques nécessaires au bon déroulement du développement de l'embryon.

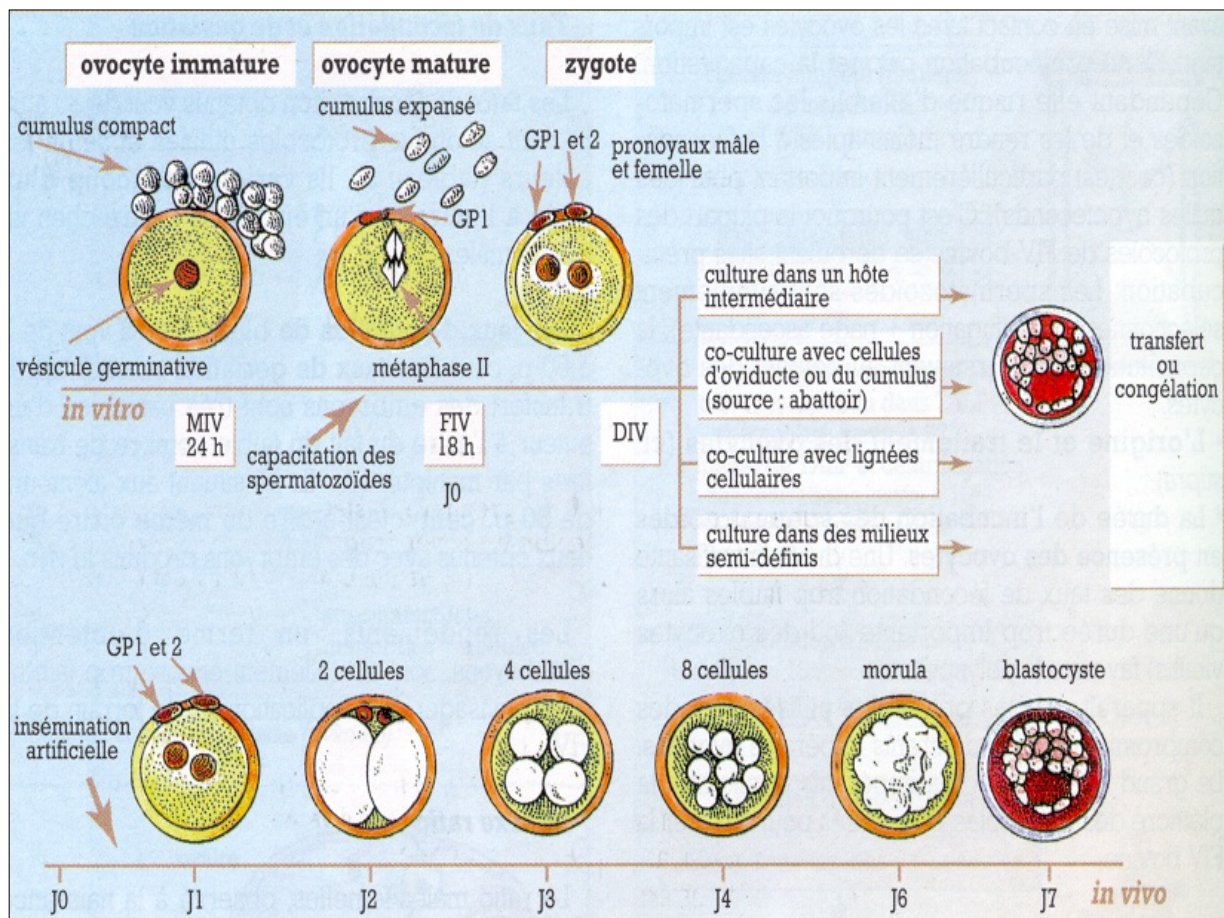
La maturation nucléaire est relativement bien maîtrisée, le taux d'ovocytes en Métaphase II après la MIV dans des conditions optimales est d'environ 85 à 90% chez la vache. En revanche, la maturation cytoplasmique in vitro représente le facteur limitant de la production d'embryons in vitro. Le taux de blastocystes est plus élevé lorsque l'ovocyte est mûré in vivo comparativement à la maturation in vitro. C'est la raison pour laquelle le concept de « pré-maturation » in vitro constitue actuellement un axe de recherche majeur pour mieux comprendre la maturation cytoplasmique ovocytaire et ainsi pouvoir améliorer les rendements de la production d'embryons.

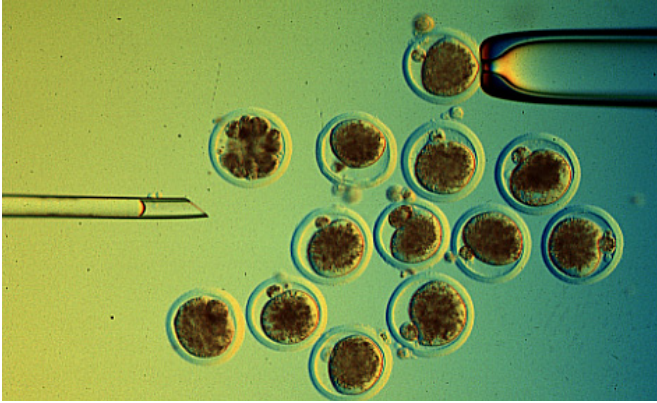
L'objectif est de maintenir les ovocytes collectés au stade vésicule germinale pour leur permettre de terminer la maturation cytoplasmique, c'est-à-dire la synthèse d'ARNm nécessaires au développement embryonnaire. En effet, dès lors que la maturation nucléaire est initiée, avec un ovocyte en MII, l'ADN est condensé et les transcriptions sont bloquées. Le principe de pré-maturation est de bloquer la reprise de la méiose avec des inhibiteurs du facteur de promotion de la phase M (MPF). Cependant, ce blocage de la méiose pendant 24 à 48h n'a pas permis d'augmenter la compétence ovocytaire au développement embryonnaire.

Plus récemment, une méthode de stimulation physiologique de la maturation ovocytaire (SPMO) a

été testée. Elle consiste à bloquer la méiose pendant 12h par des molécules qui augmentent le taux d'AMPC ovocytaire et la stimulation de la maturation par la FSH. A ce jour, 22 études ont évalué l'efficacité de cette technique, mais les résultats en termes de taux de blastocystes sont discordants et peuvent être expliqués par des différences de composition du milieu de maturation.

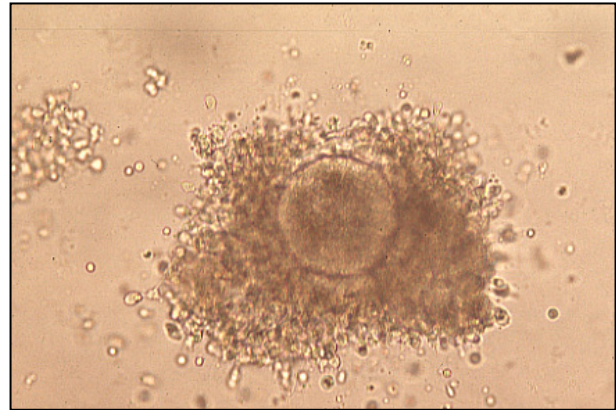
En pratique, la MIV est réalisée à 38,5°C qui correspond à la température centrale chez la vache, sous une atmosphère enrichie de 5% de CO<sub>2</sub> saturée en humidité, et pour une durée de 24h. La MIV se fait dans un milieu qui contient tous les éléments nécessaires au développement des COC (sels minéraux, acides aminés, glutamine, pyruvate, etc.). À ce milieu de base sont ajoutés différents constituants, avec une composition particulière pour chaque laboratoire. Le sérum de veau fœtal peut être ajouté car il empêche l'adhésion des COC. D'autres facteurs sont classiquement utilisés comme l'EGF (facteur de croissance épidermique) qui améliore la maturation nucléaire et cytoplasmique, mais aussi des hormones gonadotropes comme la FSH qui permet une meilleure expansion des cellules du cumulus ou de la LH qui a une action directe sur le métabolisme de l'ovocyte. La GH (Growth Hormone) est également utilisée car elle accélère la maturation nucléaire, stimule l'expansion du cumulus et améliore le taux de développement de blastocyste.





Ovocyte et cellules  
folliculaires (= COC)

Ovocytes avec globule  
polaire expulsé

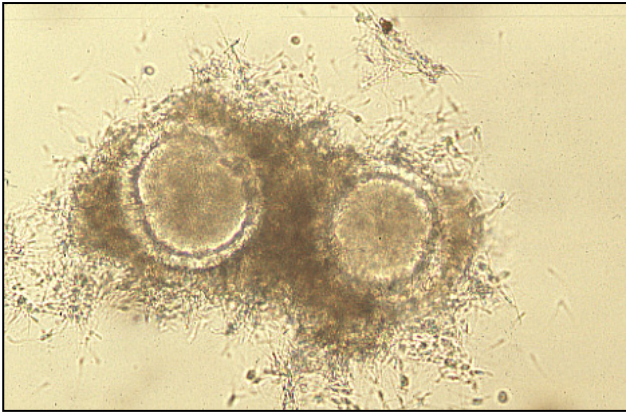


### III. La fécondation in vitro

La fécondation est l'étape qui permet d'aboutir à la formation d'une cellule, le zygote. Avant d'être mis au contact des ovocytes, les spermatozoïdes sont sélectionnés sur des critères précis (vitesse, motilité, morphologie, index de linéarité, concentration). Les spermatozoïdes sont ensuite capités dans un milieu appelé TALP pour Tyrode, albumine, lactate de sodium et pyruvate de sodium, complétementé avec de l'héparine.

Les conditions utilisées pour la FIV sont les mêmes que pour la MIV c'est-à-dire à 38,5°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO<sub>2</sub> pour une durée de 18 à 24h. Le taux de fécondation est mesuré par l'expulsion du 1er globule polaire ou par le taux de clivage 48h post-insémination. Chez la vache le taux de fécondation moyen atteint 70-85%.

Les semences utilisées peuvent être des semences sexées ce qui permet de produire des embryons du sexe souhaité. Cependant l'utilisation de la semence sexée lors de la PIV réduit le taux de blastocystes.



Ovocytes (COC) en fécondation



Ovocytes et expulsion des deux globules polaires

#### IV. Le développement embryonnaire in vitro (DIV)

Le développement pré-implantatoire de l'embryon se fait en étroite relation avec le milieu tubaire. Historiquement, le développement de l'ovocyte fécondé était réalisé in vivo dans les oviductes de lapines, car on ne savait pas reproduire le milieu tubaire.

In vitro, l'étape limitante du développement embryonnaire chez la vache est le blocage au stade 8-16 cellules. Ce blocage est expliqué par la mauvaise synchronisation entre la chute des ARNm d'origine maternelle (contenus dans le cytoplasme de l'ovocyte) et l'activation de la transcription d'ARNm à partir du génome de l'embryon.

Afin d'éviter ce blocage, différentes conditions ont été développées pour optimiser le développement embryonnaire, comprenant :

- Des milieux définis contenant des sécrétions de cellules tubaires (SOF : Synthetic oviductal fluid) ou des milieux dont la composition est modifiée en fonction du stade de développement de l'embryon.
- La co-culture sur des cellules trophoblastiques tubaires, ou sur des cellules somatiques (foie et rein).



Le DIV dure 7 jours jusqu'au stade blastocyste. Le taux de blastocystes obtenus par OPU-FIV se situe entre 20-40%. Ce taux limité s'explique par la maturation cytoplasmique incomplète des ovocytes, des conditions de cultures des embryons inadéquates entraînant une altération de l'activation du génome embryonnaire au stade 8-16 cellules.

Après avoir atteint le stade de blastocyste, la qualité de l'embryon est évaluée sur des critères morphologiques définis par la Société Internationale de Transfert Embryonnaire (IETS) (symétrie de la masse embryonnaire, couleur et densité, zone pellucide lisse), selon 4 grades, bon, moyen, mauvais, et mort ou dégénéré.

A l'instar de la production d'embryons in vivo, l'embryon est soit congelé, soit transféré en frais.

### **V. Intérêts de la technique de production d'embryons in vitro chez la vache**

Chez l'Homme la technique de production d'embryon in vitro est utilisée par les couples infertiles comme aide à la procréation. Chez la vache, l'objectif principal est de multiplier le nombre de descendants de femelles de haute valeur génétique.

En effet, le prélèvement d'ovocytes par OPU permet la diffusion du potentiel génétique par la voie femelle. Par ailleurs, l'OPU peut être réalisée chez les femelles avant la puberté et même pendant la gestation (jusqu'à 3 mois) si les ovaires restent accessibles.

De plus la cryoconservation des ovocytes ou des embryons produits in vitro permet de conserver la génétique de la femelle même après sa mort.

Cette biotechnologie combinée avec l'utilisation de la semence sexée et avec des techniques de sélection génétique assistée par marqueurs réalisées à partir d'une biopsie de quelques cellules trophoblastiques, permet de sélectionner les embryons d'intérêt génétique et de décider ou non leur transfert dans une receveuse.

---

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