

Biotechnologies de l'embryon

La Superovulation

- 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 technologies 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 a permis 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.

- 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 postpartum (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 ³ 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.

- **La Superovulation**

- La **superovulation** est une technique de reproduction assistée consistant à stimuler pharmacologiquement l'ovaire afin d'obtenir plusieurs ovulations au cours d'un même cycle œstral.
- Elle constitue une étape clé du transfert embryonnaire, permettant d'augmenter fortement la productivité des femelles de haute valeur génétique.
- En conditions naturelles : 1 ovocyte (rarement 2)
- Après superovulation : 5 à 15 ovocytes ou plus selon la réponse

- **BASES PHYSIOLOGIQUES**

Cycle œstral chez les ruminants

- Durée moyenne Vache : 21 jours avec 02 Phases :
- **Phase folliculaire** (3–5 jours)
- **Phase lutéale** (15–17 jours)

La superovulation agit principalement sur :

- la croissance folliculaire
- la sélection du follicule dominant

Dynamique folliculaire

- Le développement ovarien se fait en **vagues folliculaires** :
 - Recrutement d'un groupe de follicules
 - Sélection d'un follicule dominant
 - Atrésie des autres
- Problème : Le follicule dominant inhibe les autres via :
 - œstradiol
 - inhibine
- Solution en superovulation :
 - Stimuler simultanément plusieurs follicules
 - Empêcher la dominance folliculaire

PRINCIPE DE LA SUPEROVULATION

La technique consiste à :

- Stimuler la croissance de nombreux follicules
- Empêcher la sélection dominante
- Induire une ovulation multiple
- Réaliser une fécondation (IA)
- Collecter les embryons
- Objectif final : Obtenir un maximum d'embryons transférables

*** fenêtre de recrutement:**

La superovulation est efficace si elle débute au moment où plusieurs follicules sont sensibles à la FSH

- **MÉCANISMES D'ACTION DES TRAITEMENTS**

- **FSH exogène**

- Augmente la cohorte folliculaire recrutée
- Maintient la croissance des follicules subordonnés
- Empêche l'atrésie
- Demi-vie courte → injections répétées nécessaires

- **eCG (PMSG) = eCG (equine Chorionic Gonadotropin)**, anciennement appelée **PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin)**, est une hormone glycoprotéique produite par les **cellules endométriales des juments gestantes**

- Activité FSH + LH
- Demi-vie longue (~3 jours)

Effet :

- stimulation prolongée
- risque de follicules persistants

- **PGF2 α**

- Lyse du corps jaune
- Chute de progestérone
- Déclenchement de l'œstrus

- **GnRH**

- Induit ovulation follicule dominant
- Synchronise une nouvelle vague

Schéma du traitement :

J0 : Pose CIDR (progestérone)

J8 :

Début FSH (matin + soir)

Exemple total : 200–400 mg NIH-FSH-P1

Répartition typique :

J8 : 40 + 40 mg

J9 : 30 + 30 mg

J10 : 20 + 20 mg

J11 : 10 + 10 mg

J10 :

Injection PGF₂ α (25 mg dinoprost)

J11 :

Retrait CIDR

J12–13 :

Détection chaleurs

IA :

12 h et 24 h après début chaleur

- Doses ajustées selon poids et race
- Diminution progressive = mimétisme physiologique

SUIVI ÉCHOGRAPHIQUE

Objectifs

- Compter les follicules
- Détecter follicule dominant
- Adapter traitement

Interprétation

- Bonne réponse : 8–20 follicules de 6–10 mm
- Mauvaise réponse : < 4 follicules
- Hyperstimulation : 25 follicules → risque qualité faible

II. La récolte des embryons

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.

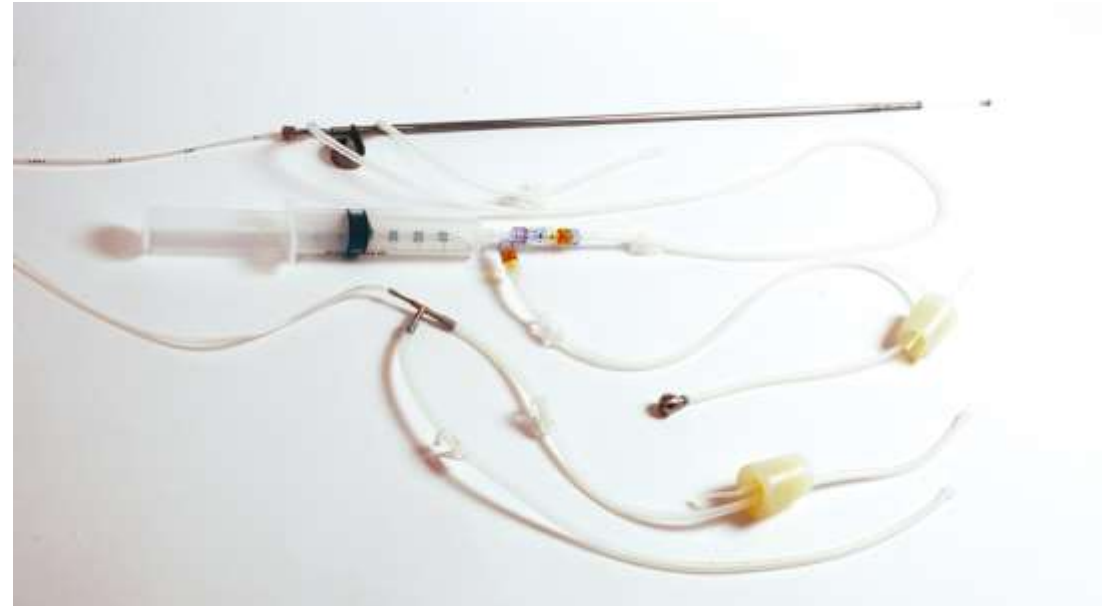
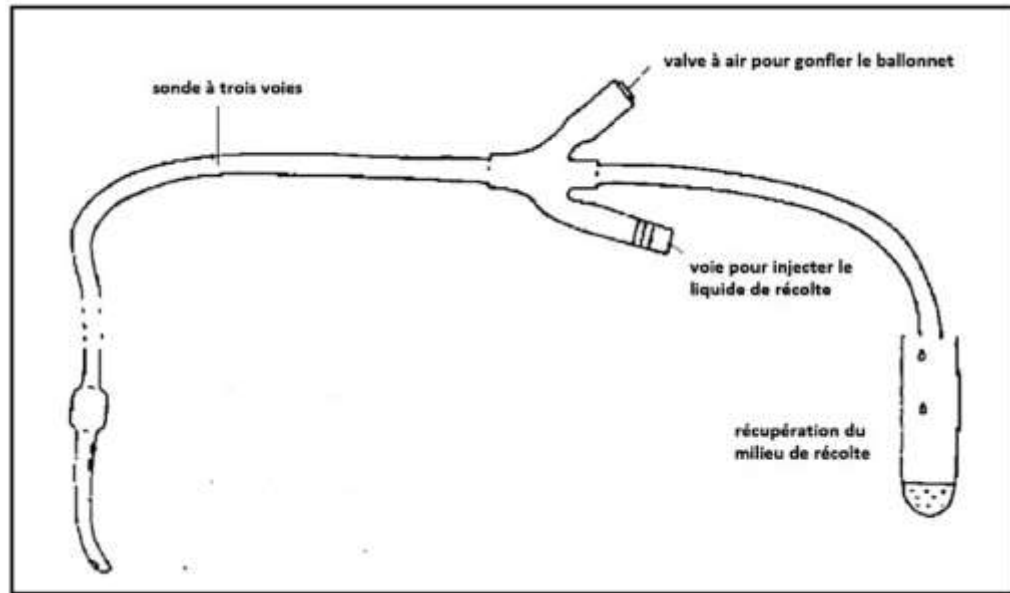


Schéma d'une sonde a 3
voies

- ✓ 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 recolte des embryons. La sonde a une longueur de 70 cm et un diametre de 6 a 7 mm. Elle est munie d'un mandrin interne pour la rendre plus rigide et faciliter ainsi sa mise en place dans l'uterus.

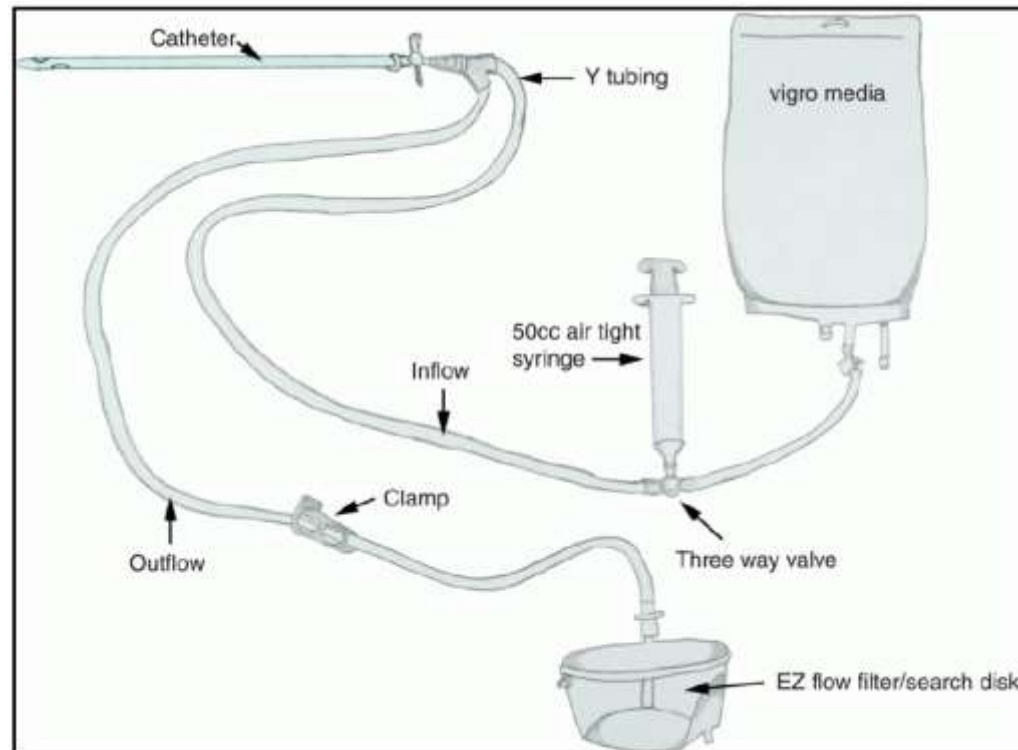


Schéma d'une sonde à deux voies

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

2.Méthodologie

- 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.

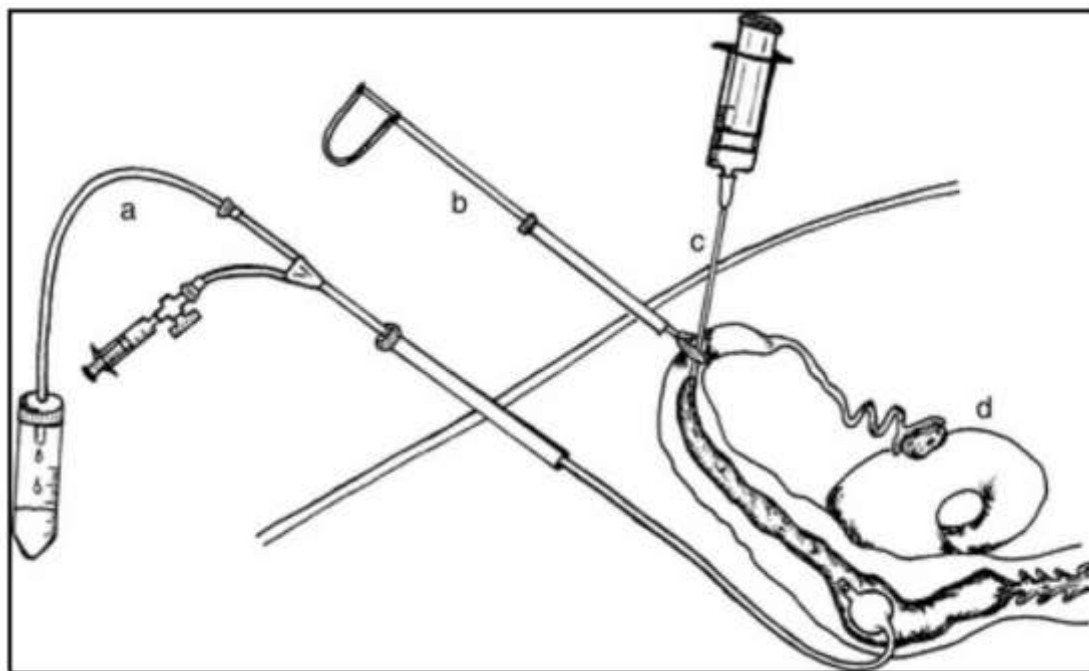


Schéma de récolte d'embryons par laparoscopie chez une chèvre.

- **2.2. Collecte transcervicale (Méthode non chirurgicale)**

- **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 prémedité 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 3ème anneau franchi.

- La sonde de recolte sera prealablement rincee au moyen de serum physiologique, recouverte d'une chemise sanitaire et introduite dans le vagin en en longeant le plafond pour eviter le meat urinaire.

Une fois arrivee au col, la chemise sanitaire sera rompue. Le col est alors manuellement ramene vers l'arriere et vient coiffer l'extremite de la sonde. La progression de la sonde dans le col est assuree en prenant le col en avant de la sonde et en le manipulant de bas en haut et de gauche a droite. Une fois le col franchi, la sonde est alors introduite dans l'une ou l'autre corne.

- La corne est alignee sur la sonde en la prenant par en-dessous et en la faisant progressivement glisser sur la sonde.

- - Le ballonnet sera place trois travers de doigts environ en avant de la bifurcation des cornes. Parce qu'elle reduit le volume mort de liquide dans la corne. Le gonflement du ballonnet a pour but de fixer la sonde dans la lumiere de la corne et d'eviter que le liquide de perfusion ne reflue vers l'arriere. Le volume d'aire necessaire sera de 10 a 12 cm³ pour une genisse et de 14 a 18 cm³ pour une vache.

- Le flacon de recuperation sera place en contrebas de l'uterus pour favoriser la recolte du liquide de perfusion.

- 20 a 30 ml de liquide de perfusion seront injectes avant d'ouvrir la voie de retour.

Normalement, le liquide commence a s'ecouler instantanement. L'aide ajustera le debit d'injection de maniere a maintenir en permanence 30 a 50 ml de liquide dans la corne.

Pendant

la perfusion (200 ml par corne), l'operateur agite et deplie la corne uterine tout en evitant de la manipuler pendant les phases de contractions du rectum.

- Une fois la corne perfusee, on injectera dans la sonde un volume d'air suffisant pour en chasser le liquide et etre sur de recuperer l'entierete des embryons. Il faut ensuite devisser le bouchon

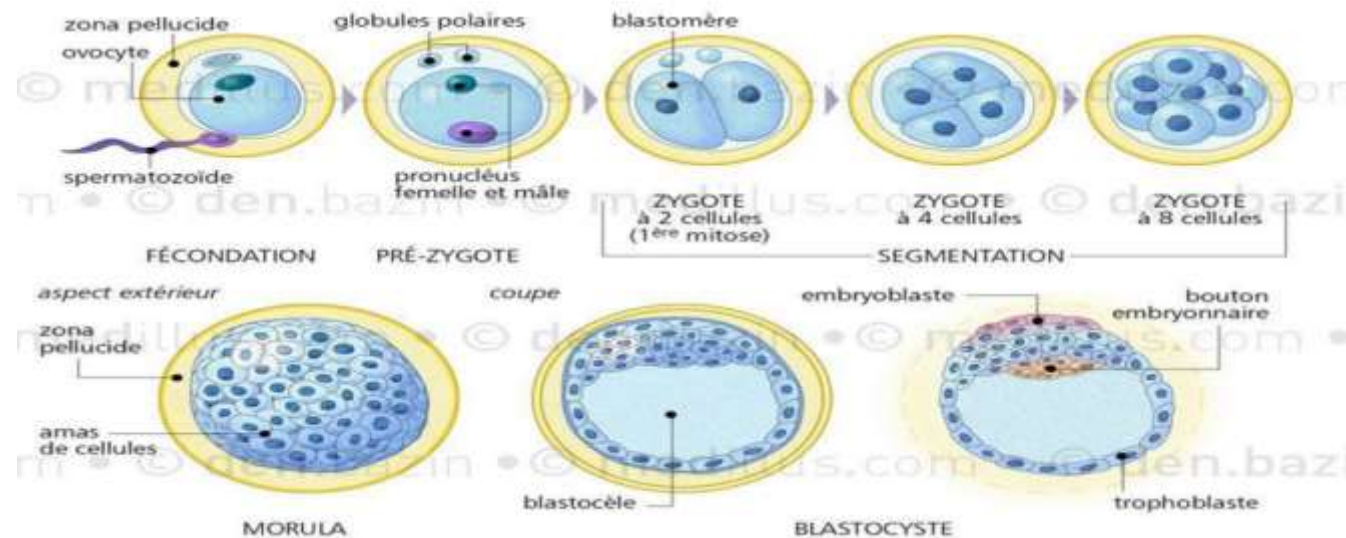
d'etancheite et ramener le flexible tout en continuant de recuperer le liquide. Une fois le flexible retire, on obture la voie de retour et on degonfle le ballonnet. Le corps de la sonde est retire de maniere a eviter le voile intercornual avant d'introduire la sonde dans l'autre corne.

- L'intervention sera completee par l'instillation d'une solution d'antibiotiques dans l'uterus et l'injection d'une prostaglandine pour eviter le developpement d'une gestation multiple qui s'accompagne frequemment d'avortement.

- **Détermination de la qualité des embryons**

1. Identification des embryons

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



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 blastocœlique)

- 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 donnée, 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. 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, blastomeres

polygonaux formant une masse compacte au stade morula.

- **Classe 2 (bon)** : Aspect semblable aux embryons de classe 1 mais présence de quelques imperfections visibles : embryons de forme asymétrique pouvant contenir des blastomeres 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.

- 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). 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.