

Le transfert embryonnaire

Le transfert d'embryons

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 ($BCS \geq 3$). *Body condition score

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'uterus 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 blastocytaire au 7eme jour de développement sont de meilleure qualité que les autres.

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

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.

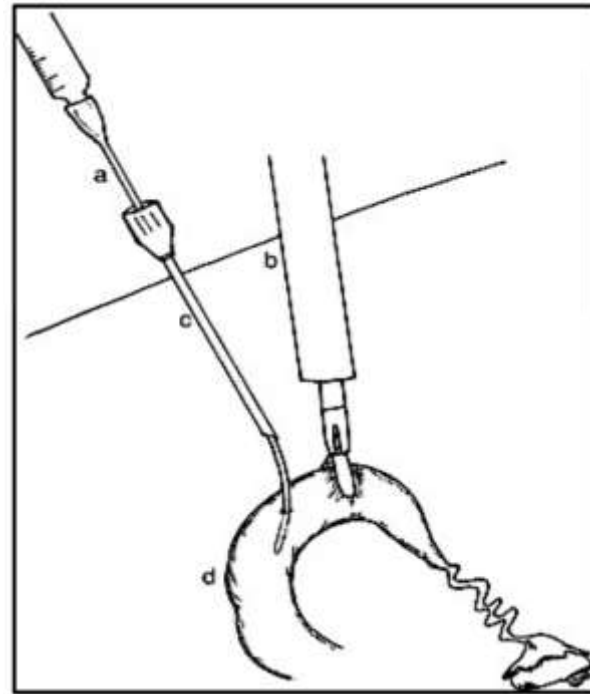


Schéma du transfert d'embryon par voie chirurgicale chez une chèvre.

- 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.

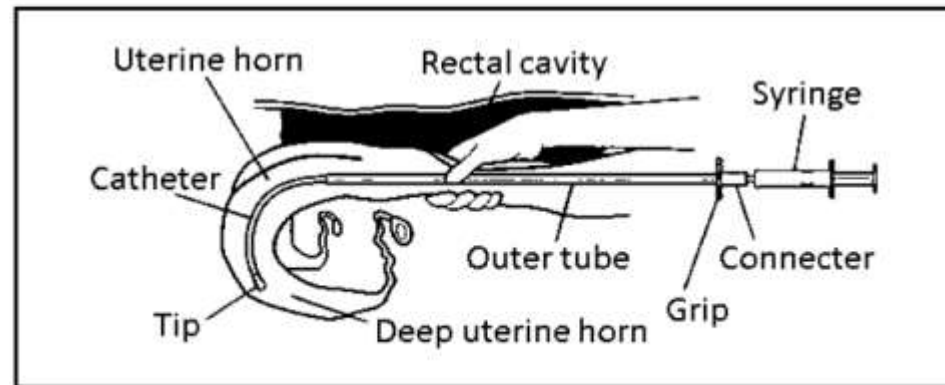
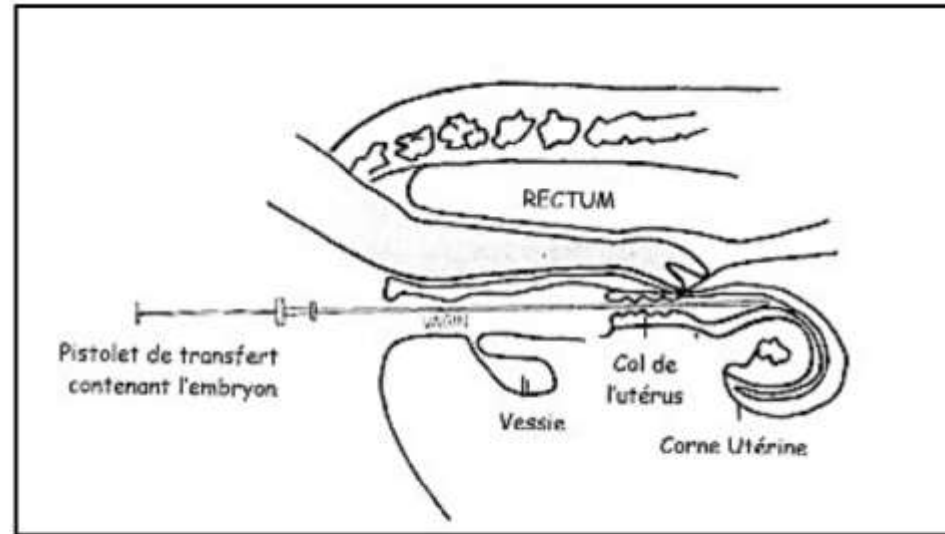


Schéma de pose d'un embryon sur une vache receveuse

- 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. 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 transférables) 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.

5. 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 foetal de veau (FCS) ou de BSA (Bovine Serum Albumine) conviennent 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).

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 ($> 2^{\circ}\text{C}$) 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.

d) Étapes classiques de la congélation :

- La première étape de la congélation consiste à équilibrer l'embryon dans sa solution de PBS (renfermant 10 % de serum foetal 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-glycerol 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 jusqu'à -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 .

e) 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 reformation de cristaux lors de la décongélation.

f) 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.

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 (ou 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 (ou one-step thawing) la paillette est décongelée à la température ambiante (20°C). Cette décongélation rapide implique cependant l'utilisation lors du montage de la paillette 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 paillette, 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 paillette assure le mélange des solutions et donc soustrait l'embryon au glycérol, la réhydratation de l'embryon étant assurée 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 insemination classique.

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 expanses 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.

Merci pour votre attention