

FOLLICULOGENÈSE ET TRANSPLANTATION EMBRYONNAIRE CHEZ LES RUMINANTS

par

J.F. BECKERS (*)

Les progrès en biologie de la reproduction sexuée ont apporté une grande amélioration des techniques d'élevage: les connaissances en la matière ont conduit à une véritable transformation des procédés de croisement et de sélection chez les animaux domestiques.

Depuis plus d'un demi-siècle l'insémination artificielle s'est implantée en élevage: elle est aujourd'hui universellement répandue et va jusqu'à intéresser, dans certains pays, 80 % et même davantage du cheptel bovin. Elle doit cette explosion à de multiples facteurs : la facilité de la récolte et de l'étude de la semence, la concentration élevée en spermatozoïdes, la mise au point de milieux de dilution adéquats, et surtout la découverte de cryoprotecteurs adaptés au sperme permettant la conservation de ce dernier pendant une période pratiquement illimitée.

La transplantation embryonnaire est d'application plus récente. Réussie par Heape chez la lapine en 1890 et reproduite en 1897, elle est expérimentée chez les espèces domestiques à partir des années 1930, réussie chez la brebis en 1932 et chez la vache en 1951. Les recherches se poursuivent alors dans divers centres, notamment à Cambridge, et à partir de 1970 la méthode s'implante vraiment dans la pratique. La naissance en 1973, du premier veau suite à l'implantation d'un embryon congelé, allait lui donner l'impulsion définitive. A l'heure présente, la méthode a été réalisée avec succès chez plus de 20 espèces animales mais son champ d'application le plus important est l'espèce bovine. A titre exemplatif, je citerai

(*) Invité par le Bureau en vertu de l'article 84 du Règlement.

quelques chiffres : en 1988 quelque 4.400 transferts embryonnaires ont été réalisés en Belgique, 21.000 en France, 26.000 en Tchécoslovaquie, plus de 200.000 aux U.S.A. et Canada. L'exportation d'embryons est devenue courante entre le Royaume-Uni, l'Australie et l'Afrique, entre les U.S.A, le Canada et l'Europe. Jusqu'ici les échanges intéressent surtout les embryons de race laitière (Holstein); nous pouvons cependant espérer, vu les qualités bouchères d'une de nos races, et lorsque la législation sera au point, que nous pourrons, à notre tour, envisager de telles exportations.

La transplantation comporte diverses étapes, à savoir :

- a) la synchronisation de l'œstrus entre donneuse et receveuse;
- b) la superovulation ou polyovulation chez la femelle donneuse;
- c) la récolte et la conservation des embryons jusqu'au moment de la transplantation;
- d) la micromanipulation et la congélation éventuelle des embryons de très bonne qualité;
- e) le transfert chez la femelle receveuse.

La plupart de ces étapes sont aujourd'hui bien mises au point; toutefois l'induction de la polyovulation n'est pas complètement maîtrisée car la réponse au traitement est imprévisible.

Une proportion non négligeable de donneuses ne répondent pas au traitement, bon nombre y répondent normalement, d'autres enfin répondent de manière excessive donnant jusque 50 ovulations et même davantage.

Ces réponses exubérantes ou excessives, c'est selon, sont finalement décevantes et non souhaitables, car elles correspondent le plus souvent à la libération d'ovules non fécondables suite à leur mauvaise qualité ou à la production d'embryons dégénérés. Or l'idéal de la superovulation est d'obtenir, à partir d'un traitement bien déterminé, un nombre relativement constant d'embryons d'excellente qualité soit pour la transplantation directe, soit pour la mise en congélation.

Chez les mammifères le nombre de gamètes femelles est déterminé et constitué une fois pour toutes au cours de la vie embryonnaire; il est représenté par la masse des follicules primordiaux, constitués par l'ovocyte I entouré de quelques cellules endothéliformes. L'ovocyte I n'est autre que l'ovogonie dont la division réductionnelle s'est interrompue au stade diplotène de la prophase I.

Les follicules primordiaux constituent la réserve dont s'échapperont progressivement les follicules destinés à se développer; parmi ceux-ci, quelques-uns arriveront à maturité, tandis que la plupart sont voués à la dégénérescence et à l'atrésie.

Maximale à la naissance, soit environ 75.000 par ovaire chez la vache, la réserve ovocytaire n'est plus que de 21.000 vers l'âge de 2 à 3 ans et de 2.500 chez les vaches âgées de 12 à 14 ans.

Sachant qu'une génisse commence sa vie génitale avec une telle réserve et que, devenue vache, elle ne produira en moyenne que 5 à 6 veaux ou moins encore, il était logique de tenter la superovulation, notamment chez les sujets de haute qualité génétique, et de transplanter les embryons recueillis chez des femelles receveuses.

Du stade primordial au stade ovulatoire, le follicule va parcourir une série d'étapes (fig. 1); sur le plan de leur régulation, on en distingue deux essentielles :

a) La première va du démarrage de la croissance au stade pré-antral. Elle comprend les stades de follicule primaire, secondaire et tertiaire ou pré-antral caractérisés par l'augmentation de taille de l'ovocyte, la multiplication des cellules de la granuleuse, la formation de la pellucide et des thèques interne et externe et l'apparition du liquide folliculaire. Les mécanismes régulateurs en sont encore mal connus, mais les facteurs intra-ovariens y jouent un rôle prépondérant, tandis que la FSH exerce un rôle modulateur.

b) La seconde étape se réalise dans un environnement où la participation des gonadotropines est déterminante. La FSH stimule la multiplication des cellules de la granuleuse et la formation de l'antrum; la LH favorise le développement du système vasculaire et entraîne la différenciation des cellules thécales en cellules stéroïdogenes sécrétant des androgènes qui, sous l'action enzymatique de l'aromatase, se transforment en 17β œstradiol. Celui-ci est le véritable témoin de la croissance folliculaire; on a montré, en effet, qu'il existe une correspondance étroite entre le taux d'œstradiol sérique et le taux d'œstradiol de la veine utéro-ovarienne. La croissance folliculaire normale est donc assurée par le 17β -œstradiol et la FSH.

En fin de croissance folliculaire, la FSH induit la formation de récepteurs LH au niveau de la granuleuse et c'est la LH qui est le facteur déterminant de l'ovulation et de la formation du corps jaune. Ces 3 hormones FSH, LH et 17β œstradiol jouent donc un

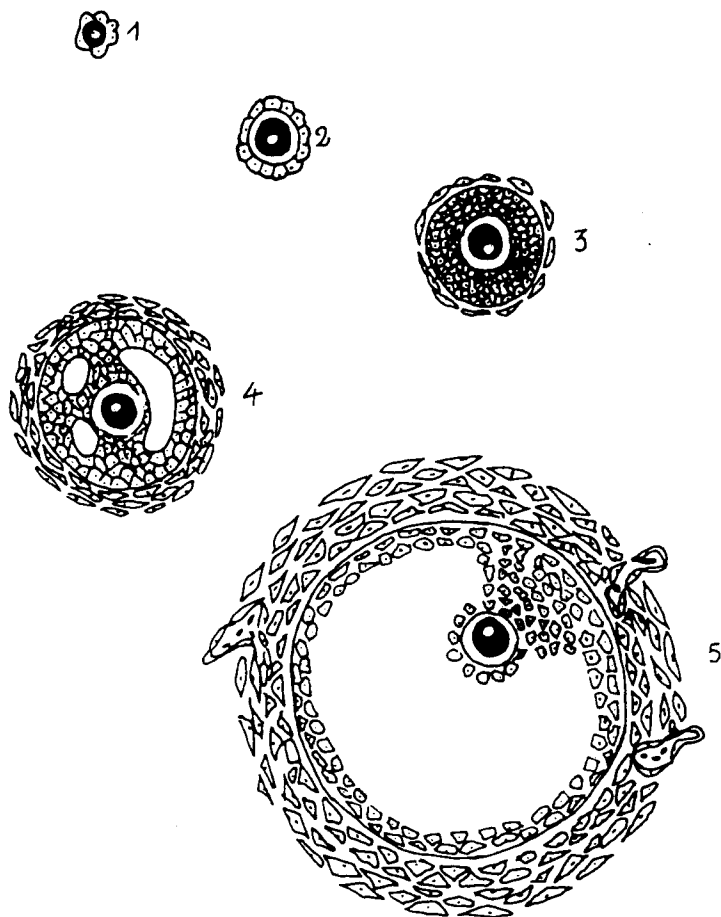


Fig. 1.

CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE DES FOLLICULES OVARIENS

Dans le follicule primordial (1), l'ovocyte est entouré de quelques cellules folliculeuses auxquelles il reste relié par des jonctions ouvertes (Gap junctions).

Dans le follicule primaire (2), l'ovocyte est entouré d'une couche complète de cellules folliculeuses; dès ce stade le développement folliculaire dépend de la FSH.

Dans le follicule secondaire (3), l'ovocyte est entouré de la zone pellucide, de plusieurs couches de cellules de granuloses; la membrane de Slavjanski se forme ainsi qu'apparaissent les premières cellules de thèque.

Dans le follicule tertiaire (4) apparaissent des cavités d'abord irrégulières puis confluentes pour former l'antrum.

Le follicule de De Graaf (1641-1673) est le follicule parfaitement constitué; toutes les cellules sont parfaitement organisées du point de vue structural et fonctionnel (synthèse d'hormone, de cybernines...). La vascularisation s'arrête au niveau de la membrane de Slavjanski.

rôle prépondérant dans la croissance et la maturation ovulaires; elles ne sont cependant pas seules à intervenir, car la progestérone, les prostaglandines, les facteurs de croissance agissent sur l'ovaire de même que certains facteurs intragonadiques intervenant par voie paracrine ou autocrine.

Recrutement, sélection, dominance sont les 3 étapes essentielles de la folliculogénèse; elles correspondent respectivement :

1. à la mise en route d'un groupe folliculaire répondant aux gonadotropines;
2. à l'atrésie d'un certain nombre de ces follicules concomitante de la croissance de quelques autres candidats à l'ovulation;
3. au mécanisme final par lequel le follicule ovulatoire échappera à l'atrésie.

Chez la vache, trois vagues de sélection folliculaire se manifestent au cours du cycle œstral normal. Les deux premières, non ovulatoires, correspondent aux jours 6-7 et jours 10-12 du cycle; la troisième coïncide avec la vague pré-ovulatoire du pro-œstrus d'où émergera le follicule dominant ovulatoire au 21^e jour.

Témoignent de ces vagues de sélection, les pics accessoires de 17 B œstradiol sérique observés au cours de ces périodes (Ectors *et al.*, 1975). Il faut cependant faire observer que des variations surviennent entre individus et chez un même sujet lors de différents cycles. On peut ainsi comprendre que l'énucléation du corps jaune ou l'administration d'agents lutéolytiques (prostaglandines) au milieu de la période lutéale s'accompagne d'une croissance folliculaire suivie, 3 à 4 jours plus tard, d'ovulation.

Le même phénomène survient dans les jours qui suivent l'arrêt d'une administration prolongée de progestérone ou de progestatifs. Il faut encore signaler que chez un certain nombre d'espèces (brebis - chèvre (Chemineau *et al.*, 1982, - truie - ratte), un pic FSH fait immédiatement suite à l'ovulation. Ce pic est vraisemblablement déterminé par les concentrations très faibles en inhibine à ce moment du cycle et à la poussée transitoire de stéroïdes provenant de la décharge ovulante. Ce pic FSH post-ovulatoire est tenu pour responsable de la sélection des follicules candidats à la dominance lors du cycle suivant (Baird, 1987).

Le principe de la superovulation repose sur la stimulation ovarienne à partir d'hormones gonadotropes administrées en période pré-ovulatoire spontanée, provoquée ou induite.

Les substances employées sont à effet FSH à savoir soit des extraits hypophysaires, soit l'hormone placentaire PMSG sécrétée au niveau des « endométriaux cups » de la jument gravide et qui se retrouve dans le sérum sanguin de cette dernière entre le 40^e et le 150^e jour de la gestation.

Le traitement, instauré en phase lutéale du cycle soit au 8^e jour, comporte l'injection à cette date de l'hormone gonadotrope, celle-ci est suivie 2 jours plus tard, soit au jour 10, de l'injection de

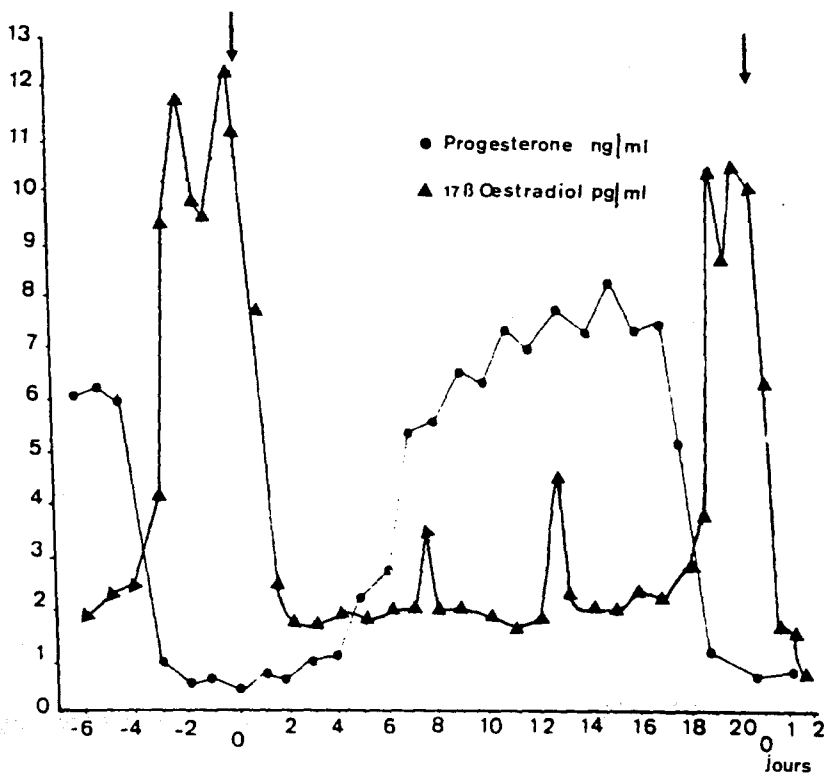


Fig. 2.

PROFILS HORMONAUX DE LA PROGESTERONE ET
DU 17 β ŒSTRADIOL AU COURS DU CYCLE CHEZ LA VACHE.

Les concentrations plasmatiques du 17 β œstradiol s'expriment en pg/ml : elles sont maximales durant les 3 jours qui précèdent l'œstrus (dont la durée est de 16 heures). Elles décroissent rapidement déjà avant l'ovulation. Le pic préovulatoire de la LH est de grande intensité 40 à 60 ng/ml mais de très courte durée (6 à 8 heures). Le pic préovulatoire de la FSH n'a pas été retrouvé par tous les auteurs; quoi qu'il en soit, il est d'intensité beaucoup plus faible. Chez les bovins, l'ovulation survient environ 10 heures après la fin de l'œstrus, soit environ 15 heures après le pic préovulatoire de la LH/FSH.

PGF2 α , substance lutéolytique. L'œstrus de superovulation survient deux jours plus tard et il est généralement d'une durée de 24 à 36 heures. L'insémination artificielle est réalisée à deux reprises et à 12 heures d'intervalle après le début de l'œstrus et la récolte embryonnaire a lieu 7 jours plus tard, soit au stade blastocyttaire.

Il s'écoule donc 5 jours entre l'initiation du traitement et la réponse superovulatoire.

L'hormone PMSG s'utilise par voie intramusculaire à la posologie de 2 à 3.000 unités. Elle présente l'avantage d'un coût peu élevé (ce qui n'est pas négligeable en économie animale) et de ne nécessiter qu'une seule intervention. Par contre, de par sa teneur élevée en hydrates de carbone (46,7 %) et en acide sialique (13,5 %), elle jouit d'une longue demi-vie (6 jours), ce qui a l'inconvénient d'entraîner la prolongation de la phase folliculaire avec comme conséquence qu'un certain nombre de follicules n'arrivent pas à maturité, persistent au niveau de l'ovaire, continuent de sécréter des œstrogènes d'où chaleurs prolongées, réduction du taux ovulatoire et déséquilibre hormonal peu favorable au rendement de la transplantation.

Pour remédier à ces effets indésirables, Dhondt *et al.*, 1978, ont préconisé l'usage d'un antisérum anti-PMSG, à la dose neutralisant 1200 à 1800 UI, administré par voie intraveineuse 60 heures après l'injection de PFG2 α . Les résultats de superovulation s'en trouvent améliorés, ils se traduisent par une meilleure récolte, un taux supérieur d'ovulations et une période de chaleurs raccourcie. L'antisérum agit par neutralisation de l'activité résiduelle du PMSG.

Les extraits pituitaires généralement d'origine porcine fournissent des résultats légèrement supérieurs à ceux obtenus avec la seule PMSG. Leur demi-vie étant de plus courte durée (environ 6 heures), il est nécessaire de multiplier les injections. La dose normalement injectée est de 32 mg (Unités Armour), fractionnés en 8 à 10 injections réparties sur une durée de 4 à 5 jours, à raison d'une injection toutes les 12 heures à dose progressivement décroissante : de 10 mg le 1^{er} jour, 8 le 2^e jour, 6 le 3^e jour et 4 aux jours 4 et 5. La prostaglandine est administrée au 3^e jour du traitement, l'insémination est pratiquée le lendemain de la dernière injection, soit 48 heures après la PGF2 α .

La méthode est relativement astreignante et coûteuse; les résultats sont légèrement supérieurs à ceux obtenus par la PMSG, mais

ils sont inconstants en raison notamment des préparations utilisées.

Les méthodes de superovulation employées jusqu'ici ont fourni des résultats intéressants puisqu'elles ont conduit à la mise en pratique courante du transfert embryonnaire. Elles présentent cependant un point faible : l'inconstance des résultats.

Devant ces faits, nous avons entrepris un travail visant, d'une part, à préparer des hormones gonadotropes très purifiées et, d'autre part, à programmer un mode de traitement susceptible d'accroître le nombre d'embryons transférables lors de chaque récolte.

Les extractions ont été opérées à partir d'hypophyses de porc. La FSH a été extraite et purifiée suivant le protocole que nous avons mis au point et publié en 1977 et qui consiste en une extraction de l'hormone à pH acide, des précipitations au sulfate d'ammonium, des chromatographies sur résine échangeuses d'ions (carbonyxyméthyl et diéthylaminoéthyl cellulose), une filtration sur tamis moléculaire, une chromatographie d'adsorption sur hydroxyl apatite et enfin une chromatographie d'affinité sur Blue-Sepharose.

L'extraction et la purification de LH ont été réalisées suivant la technique préconisée par Closset et Hennen (1975). Afin de conserver une mesure commune, la quantification de la FSH se fait en unité Armour : une unité Armour correspondant à 10 μ g de FSH pure (Demoustier *et al.*, 1988); les dosages utilisent la méthode radioimmunologique, par liaison aux récepteurs membranaires, ou encore biologique de Steelman et Pohley (1953).

Disposant de préparations purifiées de FSH et de LH et tenant compte de la spécificité d'action de chacune d'elles, nous avons recherché par divers testages quelle était la proportion idéale de chacune d'elles à incorporer dans la préparation à injecter. Il s'est avéré que l'optimum se situait autour de 40 % de LH pour 60 % de FSH; cette proportion peut subir quelques variations en plus ou moins chez les bovins, mais elle paraît devoir être respectée chez la chèvre ainsi qu'en témoignent les résultats obtenus dans cette espèce par notre collègue Holtz de Göttingen qui a fait usage de notre préparation (Tableau 1).

Chez les bovins, les résultats obtenus dans le service en partant d'une préparation à 20 % de LH sont encourageants; 184 sujets ont été traités en suivant le protocole précédemment décrit pour l'usage d'extraits hypophysaires totaux; le nombre moyen d'em-

Tableau 1.

*Induction de la superovulation chez la chèvre :
traitements par des préparations de rapport LH/FSH croissant.*

Rapport LH/FSH	Nombre d'animaux	Nombre de corps jaunes (X)	Nombre d'embryons (X)	Nombre d'embryons transférables (X)
20 %	11	8,1	5,7	3,8
40 %	14	13,0	10,7	8,8
80 %	15	10,1	6,9	4,7

bryons récoltés par sujet fut de 8,8 et 5,2 d'entre eux étaient d'excellente qualité pour le transfert. La réponse individuelle restait variable quant au nombre d'embryons récoltés en raison, sans doute, de la population folliculaire candidate à la dominance lors de l'injection; le pourcentage d'embryons de bonne qualité s'en trouvait cependant augmenté.

Il nous a paru que le pic FSH post-ovulatoire pouvait être un élément déterminant de la mise en route du développement folliculaire lors du cycle suivant. Des essais de ce genre avaient été entrepris par Guilbault *et al.*, 1988, Rajamahendran *et al.*, 1987, Ware *et al.*, 1988 mais en partant d'extraits hypophysaires bruts et les résultats obtenus furent inconstants.

Nous avons pour notre part utilisé la FSH pure à la dose de 25µg, soit 2,5 mg U.A., par voie intramusculaire, aux jours 3 et 4 du cycle. L'essai fut tenté chez 37 animaux, tandis que 30 sujets, servant de témoins, recevaient une injection de même volume de sérum physiologique (Touati *et al.*, 1989 a,b,c).

Tous les animaux furent ensuite soumis, entre les jours 8 et 10, au traitement superovulatoire, décrit précédemment, à partir de FSH/LH rapport 80/20 ou 60/40 (Tableau 2).

Tableau 2.

Induction de la superovulation avec prétraitement en début de cycle œstral chez la vache.

	Nombre de vaches	Embryons Récoltés X ± DS		Trans/Récol. Transférables X ± DS
Contrôles	30	6.4 ± 3.6	3.6 ± 3.5	56.3% ± 0.35
Prétraitées	37	11.7** ± 8.2	7.1** ± 5.2	60.7% ± 0.29

** P < 0.001

* P < 0.05

Ces essais furent menés dans le cadre des recherches expérimentales poursuivies dans le service sous les auspices de l'IRSIA.

Les résultats se sont traduits par une augmentation générale du nombre d'embryons récoltés, mais également par un nombre pratiquement doublé d'embryons de bonne qualité et transférables.

Ce pré-traitement à partir de FSH purifiée administrée en début de cycle, complété par l'induction de superovulation, à partir d'une association FSH/LH purifiée, au moment où s'installe la phase compétitive de la dominance, représente un moyen d'amplifier la sélection folliculaire.

L'administration première de FSH a vraisemblablement pour effet d'empêcher l'atrésie d'un certain nombre de follicules, de favoriser la formation d'un nombre plus élevé de dominants d'égale compétitivité pour la maturation, finalement déclenchée par l'action synergique de FSH/LH. La méthode, si elle se confirme, est susceptible d'accroître les résultats positifs de la transplantation embryonnaire dans les conditions actuelles de sa pratique courante et, par conséquent, elle pourrait donner une nouvelle impulsion à son extension.

RÉSUMÉ

Parmi les étapes conduisant à la transplantation embryonnaire, celle de la superovulation n'est pas complètement maîtrisée : la réponse au traitement, qu'il s'agisse de PMSG ou d'extrait pituitaire, reste imprévisible.

L'utilisation d'un extrait hypophysaire hautement purifié et son administration en deux temps, à savoir le produit pur et à faible dose immédiatement après le pic pré-ovulatoire de la FSH/LH puis l'administration d'une préparation LH/FSH dans un rapport 20 ou 40 % en phase lutéale, a pour résultat non seulement d'augmenter le nombre d'embryons récoltés mais surtout d'augmenter la proportion d'embryons de bonne qualité et transférables.

SUMMARY

In ruminant embryo transfer development, the limiting step remains the superovulation of the donor: using both PMSG and pituitary extracts, the superovulatory response is variable. In our research unit, FSH and LH were purified until homogeneity. Superovulatory treatment includes the administration of pure FSH the day following the preovulatory LH pulse and an administration of an LH/FSH mixture in the middle cycle. This biphasic stimulation of folliculogenesis allows superovulatory response with more and higher quality embryos.

BIBLIOGRAPHIE

- BAIRD D.T. A model for follicular selection and ovulation: lessons from superovulation. *J. steroid Biochem.*, 27, n° 1-3 : 15-23 (1987).
- CHEMINEAU P., D. GAUTHIER, J.C. POIRIER & J. SAUMANDE. Plasma levels of LH, FSH, prolactin, œstradiol 17 β and progesterone during natural and induced œstrus in the dairy goat. *Theriogenology*, 17, n° 3 : 313 (1982).
- CLOSSET J. & G. HENNEN. *Eur. j. Biochem.*, 46 : 595-602 (1975).
- DEMOUSTIER M.M., J.F. BECKERS, P. VAN DER ZWALMEN, J. CLOSSET, J.L. GILLARD & FR. ECTORS. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, 30, n° 2 : 379 (1988).
- DHONDT D., R. BOUTERS, J. SPINCEMAILLE, M. CORYN & M. VANDEPLASSCHE. *Theriogenology*, 9, (6) : 529-534 (1978).
- ECTORS F., J.F. BECKERS, P. BALLMAN & J. DERIVAUX. Transmise par M. M. HERLANT. Variation du 17 β œstradiol au cours du cycle œstral chez la vache. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 281 : 1257-1260 (1975).
- GUILBAULT L.A., G.L. ROY, F. GRASSO, D.P. MENARD & D. BOUSQUET. Ovarian follicular dynamics in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. An ultrasonographic approach. *Theriogenology*, 29 : 257 (1988).
- RAJAMAHENDRAN R., R.S. CANSECO, C.J. DENBOW, F.C. GWAZDAUSKAS & W.E. VINSON. Effect of low dose of FSH given at the beginning of the estrous cycle and subsequent superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology*, 28, n° 1 : 59 (1987).
- STEELMAN S.L. & F.M. POHLEY. Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, 53 : 604-616 (1953).
- TOUATI K., P. VAN DER ZWALMEN, F.J. ECTORS, J.F. BECKERS & F. ECTORS. Low dose of FSH early in estrous cycle enhance superovulatory response in heifers. *Theriogenology*, 31, n° 1 : 269 (1989).
- TOUATI K., M. BORMANS, F.J. ECTORS, A. DELVAL, J.F. BECKERS & F. ECTORS. Effet d'une pr estimulation ovarienne en début de cycle sur la réponse au traitement de superovulation chez la vache. *Ann. Méd. vét. (sous presse)* (1989).
- TOUATI K., F.J. ECTORS, J.F. BECKERS & F. ECTORS. Mise au point sur la folliculog nese. *Ann. Méd. vét. (sous presse)* (1989).
- WARE C.B., D.L. NORTHLEY, M.P. BOLAND & N.L. FIRST. Early cycle FSHp priming as a prelude to superovulating gonadotropin administration in ewes and heifers. *Animal reproduction science*, 16, 97 (1988).

Discussion

M. J. Derivaux. — Je remercie M. Beckers de nous avoir livr e le fruit de ses recherches.

Les contraintes d'ordre éthique et moral que connait la Médecine humaine en matière de transplantation embryonnaire ne s'appliquent pas à la Médecine vétérinaire; dès lors le champ d'application de nos activités dans l'expérimentation et la pratique est beaucoup plus vaste. Certes la « Fivete » s'est bien développée en Médecine humaine, mais vous aurez perçu qu'il existe quelques différences dans la technique de transplantation chez l'animal.

Ainsi la fécondation artificielle *in vitro*, couramment appliquée chez la femme, est de réalisation plus difficile chez les ruminants pour la raison que, chez ces derniers, la croissance embryonnaire dans les tout premiers jours requiert nécessairement la présence d'un facteur se trouvant au niveau du salpynx.

Un fait intéressant à signaler, c'est que, s'il est nécessaire de transplanter deux à trois embryons pour obtenir un résultat positif chez la femme, le transfert d'un seul embryon suffit chez les bovins et ce, avec plus de 50 % de réussites en première intervention.

M. A. Burny. — J'ai apprécié votre exposé et souhaite poser deux questions :

1. Quels sont les critères utilisés pour décréter qu'un embryon est transférable?
2. Les rapports des concentrations FSH et LH à certains moments du cycle permettent-ils de prévoir la composition idéale à employer lors des traitements superovulatoires?

M. J.F. Beckers. — Votre question est tout à fait pertinente et nous sommes conscients du fait que la transmission des maladies par l'embryon doit être prise en considération. Toutefois, il semble bien que, du moins chez les ruminants, l'intégrité de la zone pellucide représente une barrière de protection efficace contre les bactéries et les virus.

M. J. Lecomte. — M. Beckers nous propose dans le résumé qui a été présenté à l'appui de sa communication, je cite : « les prostaglandines remontent à contre-courant la veine utérine... » Je ne comprends pas ce que l'auteur veut dire. De quoi s'agit-il exactement?

M. J.F. Beckers. — Je me suis peut-être mal exprimé, mais c'est également l'expression de Mc Cracken *et al.* dans l'article qu'ils ont publié dans « Nature » en 1972. Peut-être serait-il préférable de parler de diffusion que de contre-courant.

M. J. Derivaux. — La terminologie en effet a de l'importance. Comme l'explique M. Beckers, la diffusion entre sang veineux et sang artériel est rendue possible par la disposition anatomique

particulière des vaisseaux utéro-ovariens chez les ruminants. Chez ces derniers, l'artère ovarienne tortueuse est entourée d'un véritable lacis veineux rappelant quelque peu la disposition de l'artère testiculaire et du plexus pampiniforme.

M. R. Vanbreuseghem. — J'ose à peine évoquer la raison de suspecter qu'il y aurait quelque chose d'anormal dans votre excellent exposé. Je voudrais quand même tenter de vous poser une question.

Dans vos transplantations, avez-vous le souci de ne pas transplanter autre chose que ce que vous transplantez? Et notamment en cette période où la fièvre de Malte fait des ravages, ne craignez-vous pas de transplanter notamment des bactéries? N'y a-t-il aucun danger?

M. J.F. Beckers. — L'appréciation de la qualité des embryons repose sur des critères morphologiques; l'examen se réalise à la loupe binoculaire. Jusqu'à présent, c'est le seul critère de classification, car les tests biochimiques basés sur le métabolisme des embryons manquent de sensibilité.

Sont classés comme transférables, les embryons au stade morula, jeunes blastocystes et blastocystes épanouis, et comme non utilisables, les ovules non fécondés et les embryons dégénérés.

Les embryons sont classés suivant 4 catégories :

- classe I et II sont les embryons d'excellente et de très bonne qualité, destinés à la congélation, micromanipulation, sexage,...;
- les embryons de classe III ne sont destinés qu'au transfert à frais;
- la classe IV comporte les embryons de mauvaise qualité qui sont en principe éliminés (pellucide altérée, fragmentation de l'amas interne...)

D'une manière générale, nous essayons de nous conformer aux concentrations physiologiques des hormones FSH et LH pour l'optimisation des traitements. Mais en ce qui concerne l'induction de la superovulation proprement dite (en phase de dominance folliculaire), l'expérience montre que la LH doit être associée à la FSH dès le début du traitement, et ce dans des proportions variables selon les espèces et qui ne semblent pas liées aux profils normaux.

Pour le « priming » par ailleurs, nous essayons d'amplifier le pic post-ovulatoire de la FSH, et dans ce cas nous nous conformons au profil normal de la FSH.

M. J. Leunen. — Ma réflexion va dans le même sens que celle de M. Vanbreuseghem.

Je tiens d'abord à féliciter l'orateur et son équipe pour la haute technologie qu'ils ont mise au point et je voudrais simplement mettre en garde — puisque l'on a parlé de transmission de maladie — en ce qui concerne la transmission de l'encéphalopathie spongiforme des bovins, qui pourrait se transmettre par le génome et vraisemblablement par les spermatozoïdes.

Il est certain, je le sais, que le problème en Médecine vétérinaire est un problème économique et qu'il est vraiment très important à ce point de vue-là surtout. Seulement pour améliorer la qualité des animaux, on importe et des ovules et des spermatozoïdes. Et on les importe de tous les pays, pourvu que l'origine soit la meilleure possible.

Il sévit actuellement en Angleterre cette fameuse encéphalopathie, et les autorités anglaises — cela, c'est encore une annexe à l'annexe — craignent qu'il y ait une transmission possible à l'homme. Le risque est très faible, mais les autorités anglaises l'envisagent avec angoisse parce qu'il y a, pour le moment, à peu près 100 cas par semaine en Angleterre, et je voudrais simplement mettre en garde ceux qui s'occupent de cette transplantation.

Ils doivent veiller, quand ils se fournissent en spermatozoïdes en provenance d'Angleterre, de Finlande, des Etats-Unis et du Canada, à ne pas importer une maladie exotique.

M. J. Derivaux. — Il est évident qu'une réglementation est nécessaire concernant la transplantation embryonnaire, car celle-ci s'opère déjà sur une large échelle et elle ira en augmentant. Cette réglementation existe dans certains pays; je ne sais pas qu'il en soit déjà ainsi en Belgique.

La remarque de M. Leunen, relative à l'encéphalopathie spongiforme bovine, qui sévit actuellement en Angleterre, est très pertinente.