

La production d'embryons in vivo dans l'espèce bovine

Prof. Ch. Hanzen
 Année 2015-2016
 Université de Liège
 Faculté de Médecine Vétérinaire
 Service de Thériogenologie des animaux de production
 Courriel : Christian.hanzen@ulg.ac.be
 Site : <http://www.therioruminant.ulg.ac.be/index.html>
 Publications : <http://orbi.ulg.ac.be/>
 Facebook : <https://www.facebook.com/Therigenologie>

Table des matières

1.	Objectifs	2
1.1.	Objectifs de connaissance	2
1.2.	Objectifs de compréhension	2
1.3.	Objectifs d'application	2
2.	Introduction	2
3.	La superovulation	4
3.1.	Critères de choix de la donneuse	4
3.2.	Les traitements de superovulation	4
3.2.1.	Nature des traitements hormonaux	4
3.2.2.	Schéma des traitements inducteurs	5
3.2.3.	Conséquences d'un traitement de superovulation	10
3.2.4.	Facteurs d'influence des résultats	11
4.	La récolte des embryons	14
4.1.	Matériel	14
4.2.	Méthodologie	14
4.2.1.	Méthode chirurgicale	14
4.2.2.	Méthode non chirurgicale ou collecte transcervicale	15
4.3.	Facteurs d'influence des résultats	16
4.3.1.	Données générales de l'enquête	16
4.3.2.	Résultats	16
5.	Détermination de la qualité des embryons	17
5.1.	Rappels des premiers stades du développement de l'embryon	17
5.1.1.	Premières divisions cellulaires	17
5.1.2.	Sortie de pellucide et phase d'élongation	18
5.1.3.	L'implantation	18
5.2.	Critères d'identification de la qualité des embryons	19
6.	Le transfert d'embryons	20
6.1.	Synchronisation de la donneuse et des receveuses	20
6.2.	Le transfert d'embryons : matériel et technique	21
6.3.	Facteurs d'influence des résultats	21

7.	La conservation des embryons	23
7.1.	Données générales	23
7.2.	Nature des agents cryoprotecteurs	24
7.3.	La congélation proprement dite.....	25
7.4.	La décongélation.....	26
7.5.	Facteurs d'influence des résultats	26
8.	Pour en savoir plus.....	27
9.	Tableaux.....	28

1. Objectifs

Ce chapitre présente, sous forme chronologique, la séquence d'évènements hormonaux et zootechniques permettant la production, le transfert et la conservation à court ou long terme d'embryons obtenus in vivo chez la vache. Chacune de ces étapes fait l'objet d'une description et d'une revue des facteurs d'influence potentiels.

1.1. Objectifs de connaissance

1. Énoncer quelques biotechnologies de l'embryon
2. énoncer les critères de choix d'une donneuse d'embryons
3. Énoncer les hormones utilisées dans un protocole de superovulation
4. expliquer (au besoin avec un schéma) une méthode de récolte non chirurgicale d'embryons
5. faire le schéma des divers stades de l'embryon entre la fécondation et le 7^{ème} jour de gestation
6. énoncer les diverses manipulations possibles de l'embryon une fois sa récolte réalisée
7. énoncer les principes généraux de la congélation/décongélation des embryons
8. énoncer les critères de choix d'une receveuse d'embryons
9. expliquer la méthode du transfert non chirurgical d'un embryon

1.2. Objectifs de compréhension

1. comparer les avantages et inconvénients des deux principaux traitements hormonaux permettant une superovulation
2. justifier le moment d'une récolte d'embryons au 7^{ème} jour de gestation
3. justifier le moment du transfert d'embryons au 7^{ème} jour de gestation

1.3. Objectifs d'application

1. Savoir proposer un protocole de superovulation en fonction d'une anamnèse
2. Savoir mettre en place un protocole de synchronisation d'une donneuse et de receveuses en fonction d'une anamnèse

2. Introduction

Le premier essai couronné de succès de prélèvement d'un embryon suivi de son transfert dans une lapine fut réalisé par Heape en 1891 (Voir Betteridge KJ An historical look at embryo transfer. J.Reprod.Fert.1981,62,1). C'est en 1951 que naquit le premier veau issu du transfert d'un embryon d'une donneuse sur une receveuse (Willett et al. 1951). Le premier veau né après tranfert d'un embryon congelé puis décongelé naquit en 1973 (Wilmot et Rowson 1973). Il portait le nom de Frosty II, Frosty I étant né suite à une fécondation réalisée au moyen de sperme congelé.

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. Leur essor est récent et encore à bien des égards modeste. Elles se sont développées chez les mammifères domestiques à partir des années 80, d'abord dans l'espèce bovine où la reproduction des animaux était, depuis déjà trente ans,

largement organisée autour de l'insémination artificielle. Aujourd'hui elles sont également de plus en plus largement appliquées dans d'autres espèces telles la brebis, la chèvre et la jument.

Il est classique de distinguer trois générations de biotechnologies de l'embryon (Tableau 1). *La première génération* a permis de produire des embryons in utero après stimulation hormonale des femelles donneuses (superovulation). Ce mode de production a permis le développement de la technologie du transfert d'embryons associée à leur congélation. Deux facteurs en limitent cependant l'application : le nombre relativement faible d'embryons que l'on obtient après un traitement hormonal de superovulation et la variabilité de production entre femelles traitées. En effet, aucun progrès décisif n'a été réalisé depuis plus de vingt ans dans ce domaine. Une femelle donneuse donne en moyenne 7 à 8 embryons par traitement, mais seulement 5 à 6 d'entre eux (embryons de qualité 1 et 2) ont de réelles chances de se développer à terme après transfert. 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. En effet en supposant la récolte de 5 embryons par traitement de superovulation, les frais inhérents à la technique seraient de 2500 F pour le traitement, 1000 F pour l'insémination, 5500 F pour la récolte, 2500 F par embryon supplémentaire (> 5) obtenu et 3000 F pour la congélation des embryons soit un total de 14500 F c'est-à-dire 2500 F par embryon produit.

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

Le transfert d'embryons est utilisé en pratique dans les élevages depuis le début des années 80. Cette technologie a pu voir le jour grâce aux connaissances accumulées sur la physiologie de la reproduction des mammifères domestiques, notamment à partir des progrès décisifs obtenus avec le contrôle hormonal de la croissance folliculaire et celui du moment de l'ovulation. Le transfert d'embryons, qui s'est d'abord développé par transposition des méthodes chirurgicales proposées par la recherche vétérinaire, n'est véritablement devenu une pratique d'élevage qu'avec la mise au point d'une méthode de transplantation adaptée de l'insémination artificielle, consistant à déposer l'embryon au-delà du col de l'utérus, par voie vaginale. Le nombre de transplantations d'embryons bovins connaît ces dernières années une progression régulière en Europe et en France (Tableau 2,3) mais ce nombre reste très faible par rapport à celui des inséminations artificielles (23 millions en Europe, dont 5 millions en France en 1995, Malafosse 1995). Toutefois, ce n'est pas tant le nombre de transplantations effectuées qui donne aujourd'hui son importance que la place qu'elle occupe désormais dans la filière de la sélection bovine: près de 95 % des taureaux laitiers actuellement mis en testage sont en effet issus d'embryons transplantés (le plus souvent congelés). Ce chiffre illustre bien l'impact de cette biotechnologie dans la conduite des programmes de sélection.

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. La congélation a permis une réduction du coût des interventions puisque le nombre de femelles receveuses qu'il faut préparer peut être ajusté au nombre d'embryons collectés. Elle a ouvert la voie aux échanges d'embryons entre élevages (de tous pays) et commence à être utilisée en complément du maintien d'animaux vivants pour conserver la diversité génétique des races domestiques.

Le typage génétique des embryons avant leur transplantation peut également être réalisé en prélevant

par micromanipulation 1 à 4 cellules sur des embryons au stade morula ou jeune blastocyste (J6 et J7). Le diagnostic du sexe peut être posé pour 95 % des embryons biopsiés et son exactitude est voisine de 100 %. Cependant, malgré l'engouement qu'a suscité en France le diagnostic de sexe appliqué ces dernières années à plus de 3 000 embryons bovins, son intérêt économique reste très marginal.

3. La superovulation

3.1. Critères de choix de la donneuse

Habituellement, l'éleveur choisit une génisse ou une vache de haute production laitière ou de bonne conformation viandeuse. Il convient d'en analyser les performances de fertilité et de fécondité. De même, il s'avère indispensable d'identifier la présence éventuelle de lésions du tractus génital. L'animal superovulé aura autant que faire se peut accouché normalement, n'aura pas présenté de complications puerpérales ou du post-partum telles qu'une rétention placentaire, une infection utérine, une fièvre vitulaire ou de l'acétonémie. Il aura accouché depuis 60 voire 90 jours au moins et sera en phase de bilan énergétique positif. Il aura manifesté deux ou trois chaleurs à intervalles réguliers. A l'exploration manuelle, le col et les cornes utérines seront de diamètre normal (< 5 cm). Un corps jaune sera présent sur l'ovaire. L'examen vaginal au moyen d'un spéculum éliminera la possibilité d'une infection utérine ou d'un urovagin. Certains examens complémentaires (tests de perméabilité tubaire, examen échographique) seront le cas échéant effectués. Les traitements antiparasitaires et vaccinations auront été effectués 30 jours au moins avant le traitement de superovulation.

3.2. Les traitements de superovulation

3.2.1. Nature des traitements hormonaux

3.1.2.1. La gonadolibérine (GnRH)

La GnRH s'est révélée inefficace pour provoquer une superovulation. Cependant, elle peut être utilisée en association à d'autres schémas de superovulation. En effet, certains échecs d'ovulation et de fécondation chez les animaux donneurs d'embryons ont été imputés à une absence de libération (Saumande 1980, Bevers et Dieleman 1987, Petr et al. 1991) ou à une libération anormale (Greve et al. 1984) de l'hormone LH lors de l'œstrus suivant un traitement de superovulation à base de PMSG. Cette situation est de nature à entraîner une plus grande disparité dans les ovulations observées lors de superovulation respectivement dans 45 et 91 % des cas au cours des 24 et 48 heures suivant le début de l'œstrus. Aussi, le recours à des traitements de synchronisation des ovulations tels que l'hormone LH, l'hCG ou la GnRH a-t-il été envisagé pour pallier à certains échecs de traitements de superovulation.

Les résultats obtenus après injection de la GnRH en phase œstrale ou 48 à 52 heures après l'injection d'une prostaglandine sont contradictoires. Alors que certains auteurs observent l'effet bénéfique de son injection après un traitement de superovulation à base de PMSG (Guay et Bedoya 1981, Takahashi et Kanawaga 1984) ou de FSHp (Wubishet et al. 1986), d'autres au contraire remettent en question l'opportunité d'un tel traitement (Newcomb 1980, Prado-Delgado et al. 1989), constatant même dans certains cas un effet négatif de la GnRH sur le pourcentage d'ovocytes fécondés (Walton et Stubbings 1986, Savage et al. 1987, Posadas et al. 1991) et d'embryons transférables (Walton et Stubbings 1986, Savage et al. 1987).

Les échecs observés ont été imputés à un manque de sensibilité de l'hypophyse chez certains animaux traités à la PMSG. Le cortisol, la prolactine et la PMSG n'en seraient pas responsables. L'hypothèse du rôle d'un facteur inhibiteur de la libération de l'hormone LH a été proposée chez la truie (Danforth et al. 1987).

a. La Pregnant Mare Serum Gonadotrophin

La PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) extraite du sérum de jument gravide entre le 42^{ème} et le 100^{ème} jour de gestation possède une activité biologique correspondant classiquement à un mélange

de 2/3 de FSH et de 1/3 de LH. Ce rapport 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. La PMSG est douée d'une double activité à la fois de type FSH et LH avec un rapport constant FSH/LH égal à 0.2.

Elle est injectée par voie IM à une dose comprise entre 2.000 et 3.000 UI. La réponse au traitement augmente avec la dose injectée. De même, on observe une augmentation du risque d'anovulations et d'embryons de moins bonne qualité avec la dose administrée. La race Jersey est plus sensible que la Charolaise qui l'est davantage que la Pie-Noire.

La PMSG a une demi-vie particulièrement longue (120 heures) imputable à sa richesse en acide sialique (13 %) qui la protège de la dégradation hépatique et rénale. Aussi est-il indispensable de lui adjoindre l'injection de 1800 UI d'anticorps anti-PMSG (obtenus sur moutons) 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.

La répétition des injections de PMSG à 1 voire deux mois d'intervalle est susceptible de réduire l'efficacité du traitement étant donné la réaction antigénique possible.

b. La Human Menopausal Gonadotrophin

L'hMG (Human Menopausal Gonadotrophin) fournit des résultats comparables à ceux de la PMSG mais son coût est plus élevé.

c. Les extraits hypophysaires

Les extraits hypophysaires (d'origine porcine le plus souvent, pFSH, mais aussi bovine, bFSH, ou ovine : la FSH bovine est moins active que la FSH porcine) sont de plus en plus largement utilisés. Possédant une demi-vie plus courte (5 à 6 heures) que la PMSG, étant donné leur moindre richesse en acide sialique (5 %) 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. La société Merial (Bd Sylvain Dupuis 143 1070 Bruxelles) commercialise le Stimufol. Ce produit contient 500 mcg de FSH porcine et 100 mcg de LH porcine. Il est fabriqué par le laboratoire de Physiologie de la Reproduction de la Faculté de Médecine Vétérinaire.

Les doses sont comprises entre 32 et 50 UA (Unité Armour) administrées de manière fractionnée et décroissante en doses bijournalières (matin et soir) pendant 4 jours, la dose de 32 UA (6 UA, 5 UA, 3 UA, 2 UA) étant le plus souvent recommandée chez la vache laitière et celle de 40 UA chez la vache viandeuse. Les doses de FSH sont exprimées en mcg Armour : une unité Armour est équivalente à 10 mcg de FSH pure. Les FSH sont présentées sous forme lyophilisées et reconditionnées avant l'emploi au moyen de sérum physiologique. Une fois les dilutions réalisées, les flacons préparés sont congelés. La FSH décongelée se conserve sans dommage au réfrigérateur (4°C) pendant le traitement. Une fois décongelée, la solution ne peut être recongelée. Comme la BST, la FSH compte tenu de sa dégradation rapide dans l'intestin de l'homme ne présente aucun risque pour la santé humaine. La FDA américaine ne préconise aucun délai de retrait de lait ou d'abattage des animaux ainsi traités.

3.2.2. Schéma des traitements inducteurs

● **Chaleur de référence**

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 de retour en chaleurs de l'animal, il est plus aisé de mettre en place le traitement de superovulation 9 à 15 jours (voir ci-dessous facteurs d'influence) après une chaleur dite de référence, que celle-ci ait été observée par l'éleveur ou induite par un traitement dit de presynchronisation au moyen d'une ou mieux de deux prostaglandines à 14 jours d'intervalle. Une solution alternative consiste chez les femelles non cyclées à réaliser un traitement de superovulation au cours de la phase d'induction d'une chaleur au moyen d'un progestagène (spirale ou implant). Le recours à ce traitement de presynchronisation au moyen de prostaglandines serait davantage appliqué chez les animaux de race à viande que laitière. Par ailleurs, le nombre d'embryons totaux et transférables obtenus est comparable après une chaleur de référence

dite naturelle ou induite (9.9 vs 10.4 et 5.1 vs 5.2) (Govignon et al. AETE 16th scientific meeting 2000,158).

- Chaleur de « superovulation »

Celle-ci sera le plus souvent obtenue par l'injection unique ou répétée (2 voire 3 injections) d'une prostaglandine naturelle ou synthétique 48 heures en général après le début du traitement au moyen de PMSG ou de pFSH (Tableau 11). En général, les doses de prostaglandines sont doublées par rapport aux doses recommandées par le fabricant. En terme de résultats, il ne semble pas y avoir de différences entre les prostaglandines naturelles et de synthèse. La voie IM est la voie la plus couramment utilisée. Seule le fenprostalène est utilisée en injection sous-cutanée. La voie IV permet l'obtention de résultats équivalents à la voie IM. La voie intravulvaire en sous-muqueux n'a pas été évaluée dans le cadre de la superovulation.

Des injections répétées ont été préconisées pour compenser la demi-vie courte de certains analogues et optimiser la chute de la progestéronémie et donc secondairement la croissance folliculaire. Ainsi des injections répétées (2 voire 3) ont-elles été conseillées en ce qui concerne le dinoprost (Donaldson Theriogenology 1983,20,279-285 ; Looney et al. Theriogenology 1985,23,206) .

Une chaleur de superovulation peut également être obtenue par le retrait d'un corps jaune artificiel (implants ou spirales vaginales : voir références d'essais dans Ponsard et Humblot In Livre des prostaglandines 2002) . Ces traitements sont généralement associés à une voire deux injections de prostaglandines pour permettre la lyse du corps jaune naturel éventuellement en place ou en développement lors du traitement au moyen du progestagène. Selon ce schéma, l'implant ou la spirale peuvent être mis en place quelque soit le moment du cycle éventuellement présent. Il n'est donc pas nécessaire dans ce cas de tenir compte d'une chaleur dite de « référence ». L'implant de norgestomet est laissé en place pendant 9 à 10 jours et la spirale pendant 7 à 12 jours. Le traitement de superovulation débute entre le 4^{ème} et le 7^{ème} jour suivant le début du traitement par un progestagène.

En cas de recours à la PMSG, l'injection de PGF2a est réalisée en même temps que l'injection de PMSG soit 48 heures avant le retrait du progestagène (Almeida Theriogenology 1987,27-331-335) . Si le traitement de superovulation utilise de la FSH, l'injection de PGF2a est réalisée à la troisième injection ou plus souvent à la 5^{ème} injection de FSH soit 12 à 48 heures avant l'arrêt du traitement par le progestagène. En cas d'injection répétée de PGF2a, les injections sont réalisées simultanément à la 5^{ème} et 6^{ème} injection ou à la 7^{ème} et 8^{ème} injection de FSH (Références In Ponsard et Humblot In Livre des prostaglandines 2002) . Les doses totales de PGF2a injectées sont respectivement de 0.5 mg à 1 mg de cloprostenol, de 22.5 mg de dinoprost ou de 15 mg de luprostiol.

Une autre alternative a été plus récemment décrite. Elle consiste en un traitement dit court mis en place entre le 7^{ème} et le 11^{ème} jour suivant la chaleur de « référence », et laissé pendant 5 jours. Le traitement de superovulation débiterait 1 à 3 jours après le début du traitement au moyen du progestagène de manière à arrêter le traitement du progestagène à la 6^{ème} voire 7^{ème} injection de FSH.

Il semblerait que l'efficacité des traitements inducteurs à base de progestagènes soit plus grande quand le cas échéant, ils sont initiés entre le 6^{ème} et le 9^{ème} jour du cycle que entre le 1^{er} et le 3^{ème} ou entre le 14^{ème} et le 16^{ème} jour du cycle (Références In Ponsard et Humblot In Livre des prostaglandines 2002) . L'augmentation du nombre d'injection de PGF2a ou de leur dose totale ne semblerait pas exercer un effet déterminant sur la qualité des résultats.

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'oestrus. Si elles sont pratiquées de manière systématique, on recommandera d'inséminer 36 et 48 heures après le retrait du progestagène si la PGF2 est injectée 48 heures avant le retrait et 48 et 60 heures ou 56 et 72 heures après le retrait si l'intervalle entre le PGF2 et le retrait est de 12 heures (Références In Ponsard et Humblot In Livre des prostaglandines 2002) .

- Chaleur de « récolte »

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. En l'absence d'injection d'une prostaglandine et de gestation, le cycle suivant a une durée comprise entre 22 et plus de 30 jours (Lucy et al. Theriogenology 1990,34,7-19). Ce délai dépend du nombre de corps jaunes présents et donc indirectement de l'importance du retrocontrôle négatif exercé sur l'hormone LH par la progestérone endogène. Deux stratégies sont possibles. La première consiste à injecter une PGF2a le jour de la récolte. La seconde est de différer cette injection d'une semaine ou deux. Dans l'un et l'autre cas on observe une augmentation de l'intervalle entre l'injection et l'oestrus (4,3 à 8,8 jours et parfois plus de 11 jours). Ce retard est imputable à un nombre de petits follicules (< 5 mm) plus réduits lors de l'injection, phénomène résultant d'une progestéronémie élevée (Lucy et al. Theriogenology 1990,34,7-19) . Ni la dose injectée ni le nombre d'injections ne semblent influencer les résultats. Le cycle faisant suite à cette chaleur de « récolte » ayant une durée normale, il peut être utilisé pour induire un nouveau traitement de superovulation.

Traitement de superovulation au moyen d'une prostaglandine

Jour	Traitement PMSG	Traitement pFSH
	2500 à 3000 UI	32 UA (Races laitières) 40 UA (Races viandeuses)

J0 : chaleur de « référence » (J9 à J15)		
J10	Matin PMSG (une injection)	FSH/LH (6 ou 8 UA)
	Soir	FSH/LH (6 ou 8 UA)
J11	Matin	FSH/LH (5 ou 6 UA)
	Soir	FSH/LH (5 ou 6 UA)
J12	Matin PGF	FSH/LH (3 ou 4 UA)
	Soir PGF	FSH/LH (3 ou 4 UA)
J13	Matin	FSH/LH (2 UA)
	Soir	FSH/LH (2 UA)

J14 (J0)	Matin IA 1	IA 1
	Soir IA 2	IA 2
	Anti-PMSG (1800 UI)	

(J7)	Récolte et PGF	Récolte et PGF

Traitement de superovulation au moyen d'un implant

Jour	Traitement PMSG	Traitement FSH
J0	Mise en place de l'implant	Mise en place de l'implant
J7	Matin PMSG	FSH/LH
	Soir	FSH/LH
J8	Matin	FSH/LH
	Soir	FSH/LH
J9	Matin Retrait implant	Retrait implant, FSH/LH
	PGF PGF	
	Soir	FSH/LH
J10 (J0)	Matin	FSH/LH
	Soir	FSH/LH

J11 (J0)	Matin IA1	IA1
	Soir IA2	IA2
	Anti PMSG	

(J7)	Récolte et PGF	Récolte et PGF

Traitement de superovulation au moyen d'une spirale

Jour	Traitement PMSG	Traitement FSH
J0	Mise en place de la spirale	Mise en place de la spirale
J10	Matin PMSG FSH/LH Soir FSH/LH	
J11	Matin FSH/LH Soir FSH/LH	
J12	Matin Retrait de la spirale PGF (ou 48 heures avant) ou à la 5 ^{ème} et 6 ^{ème} injection de FSH) FSH/LH Soir FSH/LH	Retrait de la spirale PGF (1 ou 2 injections à la 3 ^{ème} et/ou 5 ^{ème} ou à la 7 ^{ème} et 8 ^{ème}) FSH/LH
J13	Matin FSH/LH Soir FSH/LH	
J14 (J0)	Matin IA1 IA1 Soir IA2 IA2 Anti PMSG	
(J7)	Récolte et PGF	Récolte et PGF

Traitement dit court de superovulation au moyen d'une spirale ou implant

Jour	Traitement FSH
J0	chaleur de « référence »
J10 (J7 à J11)	Mise en place de la spirale/implant
J11	
J12	Matin FSH/LH Soir FSH/LH
J13	Matin FSH/LH Soir FSH/LH
J14	Matin FSH/LH PGF Soir FSH/LH
J15	Matin Retrait de la spirale/implant Matin FSH/LH Soir FSH/LH
J17 (J0)	Matin IA1 (12 heures après début des chaleurs) Soir IA2 (24 heures après début des chaleurs)
(J7)	Récolte et PGF

3.2.3. Conséquences d'un traitement de superovulation

3.3.2.1. Nombre d'embryons produits

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. Le nombre de corps jaunes peut aisément être estimé après abattage de l'animal. Par endoscopie, la corrélation est de 0.89 et de 0.6 quand le diagnostic est réalisé par palpation manuelle des ovaires. On estime à 7.8 le nombre total moyen d'embryon produits après superovulation. Le nombre moyen d'embryons transférables est de 5.6 soit 72 %, 71 % étant de qualité 1 et 29 % de qualité 2 (Colleau et al. 1998).

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.. Une récolte sur 3 ne produit aucun embryon transférable et 70 % des embryons transférés proviennent de 30 % des récoltes réalisées. Semblables résultats ont été observés chez la vache laitière. Selon certains auteurs, 70 % de la variation des réponses observées peuvent être imputées à des facteurs intrinsèques liés au statut ovarien de l'animal ou à la nature et au rythme d'injection des substances utilisées.. Les causes peuvent en être trouvées d'une part dans les effets du traitement de superovulation sur la croissance folliculaire ou d'autre part, dans le manque de synchronisme entre le début du traitement de superovulation et le statut ovarien susceptible d'interférer avec un recrutement folliculaire optimal. Thibier et Nibert (Theriogenology 1995,43,73-80) ont procédé à une évaluation des résultats de récolte et transfert d'embryons frais, congelés et/ou sexés. Selon les manipulations effectuées, le nombre de veaux obtenus varie d'un facteur 1 à 6 (Tableau 4)

3.3.2.2. Caractéristiques morphologiques et hormonales du follicule

L'effet des traitements de superovulation sur la morphologie et la physiologie hormonale des follicules a fait l'objet de plusieurs recherches dans l'espèce ovine. Ainsi, chez certaines races de brebis connues pour leur prolificité (Booroola, Romanov et Finn), l'augmentation du taux d'ovulation est habituellement associée à des altérations morphologiques et fonctionnelles des follicules ovulatoires: la taille des follicules est diminuée de 20 à 50 %, le nombre de cellules de la granuleuse est réduit de 30 %, la concentration en oestrogènes et en inhibine des follicules est réduite respectivement de 30 et 50 %. De même, l'administration de PMSG ou de pFSH induit une réduction de la taille des follicules ovulatoires.

- Oestrus

L'œstrus apparaît 35 à 48 heures après l'injection d'une prostaglandine soit environ 24 heures plus tôt que l'œstrus ainsi induit chez des animaux non superovulés. Ainsi, le début des chaleurs de superovulation est observé en moyenne 36 à 44 heures après l'injection d'une PGF suite à celle de PMSG et entre 33 et 48 heures si la superovulation a été induite au moyen de pFSH (Ponsart et Humblot 2002 In Livre des Prostaglandines) . Les pics de LH et d'oestradiol sont également plus précoces. Idéalement, l'intervalle entre l'injection de PMSG et l'œstrus doit être égal à 4 jours et en tout cas ne peut excéder 5 jours.

La connaissance du moment exact des *ovulations* est difficile. Des recherches endoscopiques ont néanmoins déterminé que les ovulations commencent 24 heures environ après le pic de LH et durent une douzaine d'heures environ, 75 % des ovulations s'observant au cours des 4 premières heures de la période d'ovulation (Laurincik et al. Theriogenology 1993,39,537-544).

- Effets hormonaux

La sécrétion de l'hormone LH ne se trouve normalement pas modifiée par les traitements de superovulation. Le pic de LH s'observe en moyenne 2 à 6 heures après le début des chaleurs. Il peut être retardé dans des conditions subtropicales Le cas échéant cependant, une modification du profil de la LH peut entraîner l'absence d'ovulation ou interférer avec la qualité des embryons. Des traitements complémentaires à base de GnRH ou d'hCG ne semblent pas être de nature à améliorer les résultats

obtenus.

La concentration de l'*oestradiol* augmente 24 heures environ après le début du traitement de superovulation. Cette augmentation s'accélère après l'injection de la prostaglandine et atteint une valeur maximale 34 à 50 heures plus tard.

On peut distinguer trois phases d'évolution de la *progestérone*. La première phase comprend la période située entre le début du traitement de superovulation et l'injection de la prostaglandine : une légère augmentation de la progestéronémie peut être observée. Elle est imputable à l'activité LH de la PMSG ou des extraits hypophysaires injectés (Bevers J.Reprod.Fert.1989, 87,745-754) . La seconde fait suite à l'injection d'un agent lutéolytique : la progestéronémie atteint 25 % de sa valeur initiale en 12 heures et sa valeur seuil après 24 heures. Dans 10 à 36 % des cas la progestéronémie diminue pas sous le seuil de 1 ng dans les 48 heures suivant l'injection de l'agent lutéolytique (Ponsart et Humblot 2002 In Livre des prostaglandines) . La dose de prostaglandine injectée est sans influence sur la vitesse de la lutéolyse. L'effet lutéolytique est donc comparable chez les femelles superovulées et non superovulées (Yadav et al. Theriogenology, 1986,26,509-521 ; Nibart et al. Elevage et Insemination 1988,226,11-30) et ne dépend ni de la prostaglandine (Desaulniers et al. Theriogenology 1990,34,667-682) ni de la dose (Leon thèse ENV Nantes, 1988) injectée. En phase œstrale proprement dite, la progestéronémie est supérieure à celle observée chez des animaux non superovulés. Elle n'est pas imputable à une lutéolyse incomplète mais résulte du fait que les follicules qui se sont développés en grand nombre sécrètent toujours un peu de progestérone, certains d'entre eux se sont par ailleurs en partie lutéinisés sous l'effet de la composante LH des hormones de superovulation. Une progestéronémie excessive pourrait être liée à des ovulations prématurées, phénomène plus souvent rencontré chez les génisses (Callessen et al. Theriogenology 1987,28,155-166) . Au cours de la troisième phase comprise entre les chaleurs et le moment de la récolte, l'augmentation de la progestérone est plus rapide que chez les animaux non superovulés. En effet des valeurs de 4 à 9 ng sont atteintes dès le 3^{ème} jour suivant l'œstrus. Une augmentation plus lente de la progestéronémie peut être considérée comme anormale. En effet, le plus souvent, les animaux présentant une bonne réponse témoignent d'une progestéronémie plus élevée trois jours après l'insémination. Le jour de la récolte des concentrations comprises entre 16 et plus de 60 ng ont été observées (Ponsart et Humblot 2002 In Livre des prostaglandines) . Elles sont corrélées avec le nombre d'ovulations.

Deux types de profils anormaux de la progestéronémie ont été décrits. Le premier correspond à une lutéolyse incomplète. Elle est responsable d'anomalies de l'ovulation. L'augmentation de la dose de PGF ne permet pas d'éviter ce phénomène. Il peut également arriver que les corps jaunes induits régressent prématurément 5 à 16 jours après le traitement de superovulation. Ce fait serait imputable aux quantités d'importantes d'oestrogènes résultant de l'activité prolongée de PMSG. L'utilisation d'antisérum anti-PMSG n'est pas de nature à résoudre le problème.

3.2.4. Facteurs d'influence des résultats (IPE 25)

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 de l'animal et des traitements de superovulation.

3.4.2.1. 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-t-elle 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-elle 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 entre *racés* ont également été rapportées (4.6 dans les races Holstein, Normande et Charolaise, 3.9 en Blonde d'Aquitaine, 6.6 dans les races Brangus et Simmental, 3.6 en race BBB).

3.4.2.2. Nature du traitement de superovulation

Il a été démontré dans notre laboratoire que les préparations hypophysaires ayant un rapport LH/FSH de 20 (chez les vaches laitières) et 40 % (chez les vaches viandeuses) ainsi que les traitements s'accompagnant d'une concentration croissante en LH donnaient des valeurs exprimées en nombre d'embryons récoltés supérieures à des rapports de 10 et 80 %.

3.4.2.3. Moment de mise en place du traitement de superovulation

Classiquement, un traitement de superovulation débute entre le 9ème et le 15ème jour du cycle. Aucune différence significative du taux d'ovulation n'a été observée entre les traitements mis en place au cours de cette période (Hasler et al. 1983, Donaldson et al. 1984). La théorie des vagues de croissance folliculaire (Adams et al. 1992a) et le rôle inhibiteur exercé par le follicule dominant sur la croissance folliculaire (Pierson et Ginther 1988, Saumande et al. 1978, Grasso et al. 1989a, Guilbault et al. 1991, Bungartz et Niemann 1994 583) ont incité certains chercheurs à proposer des solutions alternatives visant à faire coïncider davantage le début du traitement avec le moment d'émergence d'une vague de croissance folliculaire. C'est pourquoi des traitements de superovulation en début de cycle ont été évalués. Le choix de ce moment du traitement était dicté par le fait qu'il était plus facile d'identifier par rapport à l'œstrus précédent le moment d'émergence de la première vague que de la deuxième vague folliculaire, celle-ci apparaissant par ailleurs 1 à 2 jours plus tôt si le cycle comportait trois vagues de croissances folliculaires (Ginther et al. 1989 223, Adams et al. 1992 177).

A l'exception de l'un d'entre eux (Redmer et al. 1991 129), la majorité des auteurs s'accorde à observer une réduction de la réponse à un traitement de superovulation mis en place entre le 2ème et le 7ème jour du cycle (Lindsell et al. 1986, Calder et al. 1992 1163, Goulding et al. 1990). Ce schéma thérapeutique s'accompagne en effet davantage d'une augmentation du développement folliculaire que de l'augmentation du nombre d'ovulations (Roberts et al. 1994 917, Nasser et al. 1993 713). Cette réduction du nombre d'ovulations a été imputé à l'absence de lutéolyse (Roberts et al. 1994 917, Redmer et al. 1991 129, Calder et al. 1992 1163). Cette explication ne peut cependant pas être définitive puisque certains auteurs ne l'ont pas constaté après avoir utilisé une double injection de prostaglandines à 12 heures d'intervalle (Nasser et al. 1993 713). D'autres alternatives peuvent être envisagées. Une étude n'a en effet pas constaté de diminution de la réponse à un traitement de superovulation mise en place la veille ou le jour de l'ovulation (Nasser et al. 1993 713).

3.4.2.4. Traitements d'amélioration du recrutement folliculaire

a. Le priming

Un prétraitement au moyen de FSH au cours des premiers jours du cycle (priming) vise à augmenter le nombre de follicules recrutés susceptibles de répondre au traitement de superovulation proprement dit mis en place en milieu de cycle. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les résultats contradictoires observés: positifs pour certains auteurs (Rajamahendran et al. 1987, Ware et al. 1987, Touati et al. 1991, Ware et al. 1988, Petr et al. 1990), absents (Gray et al. 1992, Rieger et al. 1988), voire négatifs pour d'autres (Lussier et Carruthers 1989, Grasso et al. 1989b, Guilbault et al. 1992).

Il est possible que l'intervalle entre le priming et le traitement de superovulation proprement dit ne soit pas adapté au rythme de croissance des follicules préantraux (Armstrong 1993b), ceux-ci requérant pratiquement deux cycles pour atteindre le stade préovulatoire (Lussier et al. 1987). Les effets négatifs pourraient selon certains auteurs être imputés au fait que le priming retarde l'atrésie du follicule dominant et ce faisant prolonge son effet inhibiteur sur la croissance des follicules sélectionnés dont l'apparition est retardée (Grasso et al. 1989b). Il a également été démontré que le priming s'accompagnait plus fréquemment de l'atrésie des follicules de taille comprise entre 5 et 9 mm (Goulding et al. 1991 1049). Pour d'autres, le priming s'accompagnerait d'une réduction des concentrations plasmatiques en FSH résultant d'une synthèse accrue par les follicules sélectionnés d'oestradiol et d'inhibine (Lussier et Carruthers 1989). Il est par ailleurs bien connu qu'une diminution

différée de la progestéronémie après l'injection d'une prostaglandine à des animaux superovulés constitue un facteur limitant à l'obtention de résultats optimaux (Callesen et al. 1988). Il est enfin possible de penser que le priming au moyen de préparations insuffisamment purifiées et dès lors également douées de propriétés LH induisent une lutéinisation précoce des follicules et dès lors entravent la lutéolyse (Monniaux et al. 1983, Guilbault et al. 1992).

b. L'insulin growth factor

Le développement des follicules préantraux ne semble pas dépendre des mêmes facteurs de croissance que les follicules antraux (Monget 1993). Parmi d'autres, l'IGF1 apparaît jouer un rôle clé dans la régulation de cette phase de croissance. Il a été pressenti pour être le facteur médiateur de la PMSG (Hammond et al. 1988) et de l'hormone de croissance (GH, bST).

Plusieurs faits ont démontré l'implication potentielle de cette hormone dans la régulation de la croissance folliculaire. La concentration plasmatique de cette hormone augmente au moment de la puberté chez le rat (Ojeda et Jameson 1977). L'immunisation de la vache contre cette hormone supprime la croissance folliculaire et retarde la puberté (Stanko et al. 1992). Son administration prolongée chez la vache augmente la fréquence des accouchements gémellaires (Butterwick et al. 1988). Les concentrations en IGF1 du plasma et du liquide folliculaire sont plus élevées chez les vaches ayant donné naissance à des jumeaux (Echternkamp et al. 1990).

c. Suppression de l'effet inhibiteur du follicule dominant

L'absence d'effets (Gray et al. 1992 631, Wehrman et al. 1992 253) ou des effets négatifs (Guilbault et al. 1991 81, Huhtinen et al. 1992 457) ont été rapportés à l'encontre du follicule dominant sur la réponse à un traitement de superovulation mis en place en phase dioestrale. Etant donné ces résultats contradictoires imputables peut-être au manque de définition précise du follicule dominant identifié au début du traitement de superovulation, différentes études ont été consacrées aux effets potentiels de traitements chirurgicaux ou hormonaux pour supprimer cette dominance et optimiser ainsi la croissance folliculaire subséquente.

- Les traitements hormonaux

Chez la vache, l'injection de GnRH peut induire l'ovulation ou la lutéinisation du follicule dominant présent. Administré au hasard durant le cycle, cette injection de GnRH induirait une ovulation dans 44 à 85 % des cas chez la vache laitière et 54 % chez la génisse (In Bo et al. 2008). Il semblerait que l'injection de pLH (Lutropin-V) induirait un % d'ovulations plus élevé. L'intervalle entre ces traitements et l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire sont cependant trop inconsistants que pour les envisager dans le cadre de protocoles de superovulation. Une solution alternative serait d'être sûr qu'un follicule dominant soit présent au moment de l'injection de la GnRH ou de la pLH. C'est le but des pretraitements au moyen de prostaglandines.

Les études relatives aux effets des *oestrogènes* sur la dynamique de la croissance folliculaire sont encore peu nombreuses. Administré au début d'une phase de croissance folliculaire, le valérate d'oestradiol inhibe la croissance du follicule dominant et accélère l'émergence d'une seconde vague de croissance folliculaire. Cet effet inhibiteur est momentané. En effet, l'apparition de la seconde vague sera différée si l'injection du valérate d'oestradiol est réalisée au milieu (J3) ou à la fin (J6) de la vague de croissance folliculaire précédente (Bo et al. 1993 225). L'effet inhibiteur du valérate d'oestradiol est amplifié lorsqu'il est administré simultanément à un progestagène tel que le norgestomet. Dans ce cas cependant, le moment d'apparition de la vague de croissance folliculaire suivante n'est pas modifiée et s'avère beaucoup moins variable (Bo et al. 1994 1555).

Les effets de la *progestérone* ou des *progestagènes* sur la croissance et la cinétique folliculaire ont également été étudiés (Bo et al. 1991, Bo et al. 1993, Adams et al. 1994b). Administrée pendant la phase de croissance du follicule dominant, la progestérone en inhibe le développement de manière dose-dépendante (Adams et al. 1992a, Sirois et Fortune 1990). Cette régression prématurée du follicule dominant induite par l'inhibition progestéronique de la LH (Savio et al. 1993, Stock et Fortune 1993) est suivie d'une nouvelle libération de FSH et d'une nouvelle vague de croissance folliculaire. C'est dans le

même but qu'a été évaluée l'administration d'hCG quelques jours avant le traitement de superovulation en vue de lutéiniser le follicule dominant présent . Cette méthode n'a pas eu d'effets significatifs sur le nombre d'embryons obtenus sans doute en raison de la lutéinisation des follicules dominés (Rajamahendran et Sianangama 1992 29 in Armstrong).

- Les traitements chirurgicaux

La destruction du follicule dominant par cautérisation (Ko et al. 1991, Adams et al. 1992b 177), par ablation chirurgicale d'un ovaire (Staigmiller et England 1982), par éclatement manuel ou par ponction échoguidée (Adams et al. 1993a, Bergfelt et al. 1994, Hahn 1992) constituent des alternatives intéressantes au vu des effets positifs dont elles s'accompagnent (meilleure synchronisation des retours en chaleurs, augmentation du nombre de follicules recrutés, apparition plus rapide d'une nouvelle vague de croissance folliculaire) . Etant donné sa facilité de réalisation et l'absence de complications locales telles que des adhérences induites par l'éclatement manuel du follicule, la ponction échoguidée du follicule dominant réalisée 2 jours avant le traitement de superovulation devrait dans ce contexte constituer une méthode de choix (Bungartz et Niemann 1994).

4. La récolte des embryons

4.1. Matériel

Il se composera des éléments suivants :

Sondes 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. La *première* à trois voies est la sonde IMV (Cassou).INRA. 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 présente à son extrémité proximale des graduations qui permettent de juger du degré de pénétration dans la corne utérine. Il est percé dans sa partie terminale d'orifices. La *seconde* sonde est à deux voies (sonde de Han ; modèle allemand). 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.

- 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.

4.2. Méthodologie

4.2.1. Méthode chirurgicale

Initialement, la récolte des embryons se faisait par voie chirurgicale sous anesthésie générale le plus souvent au niveau de la ligne blanche en avant du pis. 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 Folley). 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. Cette technique offrait l'avantage d'un taux de récupération élevé des embryons (70 à 80 %), de pouvoir juger de la réponse ovarienne au traitement de superovulation. Elle fut pratiquement abandonnée étant donné l'infrastructure de mise en place requise mais aussi la difficulté de répéter souvent l'intervention sur le même animal.

4.2.2. Méthode non chirurgicale ou collecte transcervicale

4.2.2.1. Principes de base (sonde de Cassou à trois voies)

- L'animal placé dans un travail de contention pour en limiter les déplacements est éventuellement prémédité au moyen d'un tranquillisant (animaux rétifs mais risque de décubitus), d'une épidurale (3ml de xylocaïne à 2 % : manipulation plus aisée du tractus génital mais risque accru de pneumo-rectum, à éviter si l'utérus est abdominal) 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 le dilatateur 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.
- Le flacon de récupération sera placé en contrebas de l'utérus pour favoriser la récolte du liquide de perfusion.
- La sonde de récolte sera préalablement rincée au moyen de sérum physiologique. Recouverte d'une chemise sanitaire, elle est 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 (respecter autant que faire se peut le même choix pour éviter de perfuser deux fois la même 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, une position plus antérieure du ballonnet est de nature à améliorer la qualité de la récolte. 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. Un ballonnet trop gonflé risque d'endommager la muqueuse utérine et d'entraîner la présence de sang dans le liquide de récolte. 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 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.
- 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. Une surpression risque de faire reculer le ballonnet ou de créer une lésion de l'oviducte. Inversement, si l'injection est trop lente, la corne risque de se vider et d'aspirer la muqueuse utérine contre les orifices du flexible. L'arrêt du retour est souvent observé lors du changement de seringue. 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 ce faisant 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 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.

4.2.2.2. 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 contra latérale. Parfois l'absence du retour est du à l'éclatement du ballonnet.

4.2.2.3. Particularités de la sonde à deux voies (sonde de 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. Ceci explique peut-être la diminution relative du nombre d'embryons récupérés au moyen de cette sonde.

4.3. Facteurs d'influence des résultats

Une enquête récente a été conduite à partir des informations relatives à 2500 récoltes d'embryons réalisées dans 376 exploitations différentes sur 1238 vaches et génisses au cours de la période de 24 mois comprise entre novembre 1995 et novembre 1997 par une équipe de 4 vétérinaires du centre Gestion Elevage et Reproduction (GER) de Ciney.

4.3.1. Données générales de l'enquête

La majorité des récoltes (94 %) ont été effectuées sur des animaux de race Blanc Bleu Belge. Les inséminations ont été réalisées avec 299 taureaux différents, les 5 taureaux de race Blanc Bleu Belge les plus utilisés étant dans l'ordre Inexes (n=141), Ministre (n=138), Galopeur (n=134), Guliver n=110) et Breugel (n = 107).

Le nombre moyen d'embryons totaux et transférables obtenus est respectivement de 6.0 et de 4.4. Il est respectivement de 7 et de 5.1 si ne sont prises en considération que les seules récoltes ayant permis d'obtenir des embryons. Le nombre maximal d'embryons totaux et transférables a été respectivement de 34 et 23. On observe une large variation du nombre d'embryons transférables obtenus par récolte. Une fois sur cinq, elle ne permet d'obtenir aucun embryon transférable. Dans la même proportion des cas, elle permet l'obtention de 8 à 23 embryons transférables (Tableau 5). Au cours de la période de 24 mois considérée, 77 % des vaches et génisses n'ont été récoltées qu'une seule (56 %) voire deux fois (21 %). Seules 2 % des vaches ont été récoltées 8 à 11 fois. Le nombre moyen de récolte par exploitation est de 6.3 soit une récolte tous les 4 mois environ. Il existe de larges variations entre exploitations puisqu'en effet 54, 29 et 17 % des exploitants réalisent respectivement 1 à 3, 4 à 10 et 11 à 110 récoltes par 24 mois.

4.3.2. Résultats

L'analyse de la *distribution mensuelle* du nombre moyen d'embryons transférables obtenus (4.4) en

révèle pour l'ensemble de la période l'augmentation pendant le mois d'avril (5.2) et sa diminution pendant le mois d'août (3.6).

Le *traitement de superovulation* appliqué n'est pas étranger au nombre d'embryons transférables obtenus. Il consiste dans 79 % des cas en l'administration de 40 UA à 40 % de FSH en 8 injections. Dans 10 % des cas ce traitement a été précédé de 3 injections de FSH (priming). Le nombre moyen d'embryons transférables a été respectivement de 4.6 et de 3.7.

Le *nombre moyen de lactations* des animaux récoltés a été de 2.5. 93 % des récoltes ont concerné des vaches primipares (20 %) ou pluripares (73 %). Le nombre moyen d'embryons transférables obtenu s'est avéré supérieur pour les vaches en 2^{ème} (4.6) voire 3^{ème} lactation (4.9) que pour les génisses (4.1), primipares (4.1) ou les vaches plus âgées (3.8 à 4.8).

L'*intervalle moyen entre les récoltes* a été de 111 jours. L'analyse de la distribution des intervalles entre récoltes fait apparaître une différence dans le nombre d'embryons transférables récoltés (Tableau 6).

L'*intervalle entre le vêlage et la récolte* ne semble pas influencer le nombre moyen d'embryons transférables obtenus. Il est intéressant de noter que une récolte sur cinq (20 %) et une récolte sur quatre sont réalisées respectivement 90 à 129 jours et 130 à 209 jours post-partum.

La *cotation linéaire moyenne* des vaches récoltées et des taureaux utilisés était respectivement de 88 et 90, 72 et 56 % des animaux se situant dans l'intervalle 86 à 90. Aucun effet majeur de la valeur de la cotation linéaire sur le nombre d'embryons transférables obtenus n'a été observé.

On observe une large variation (3.5 à 6.3) du nombre d'embryons transférables obtenu en fonction du *taureau utilisé*

5. Détermination de la qualité des embryons

5.1. Rappels des premiers stades du développement de l'embryon

L'ovulation survient chez la vache une trentaine d'heures environ après le début de l'œstrus. Il en résulte l'émission d'un ovocyte qui entre-temps a expulsé son premier globule polaire et se trouve bloqué au stade métaphase 2. La rapidité d'expulsion (dans les 16 à 20 heures) de ce premier globule polaire sous l'effet de la LH semble, selon certains auteurs, déterminante pour le développement futur de l'embryon. Cette phase de maturation ovocytaire est atteinte in vitro par 85 % des ovocytes mis en culture.

La chronologie du développement de l'embryon bovin est rappelée dans le tableau 7

5.1.1. Premières divisions cellulaires

L'ovocyte est pénétré par le spermatozoïde dans les deux heures suivant l'ovulation. Cette pénétration déclenche l'expulsion du second globule polaire, la reprise de la division cellulaire et la formation de deux blastomères 24 à 48 heures environ après la fécondation. In vitro, cette reprise du développement est quelque peu retardée, la première division cellulaire s'observant 44 heures en moyenne après la mise en contact des ovocytes avec des spermatozoïdes capotés. Cette reprise de la division cellulaire est considérée comme critique pour le développement ultérieur de l'embryon. Ainsi, les embryons qui atteignent le stade 2 cellules 36 heures après la fécondation voire le stade 4 cellules 48 heures après la fécondation ont davantage que les autres la possibilité d'atteindre le stade blastocyste. Au stade unicellulaire, l'embryon de mammifère est une cellule relativement grosse dont la taille est comprise entre 70 et 140 microns. Il est entouré d'une zone pellucide. Celle-ci non seulement maintient les blastomères ensemble mais leur assure un milieu périvitellin adéquat. Les divisions cellulaires ultérieures présentent deux caractéristiques: non seulement elles sont asynchrones, certaines apparaissant plus précocement que d'autres, mais elles aboutissent à la formation de deux populations cellulaires, l'une de petite taille et l'autre de grande taille. Les premières, résultant d'une division plus précoce, donnent naissance au bouton embryonnaire (ICM : Inner Cell Mass) et les secondes au trophoctoderme, futur placenta. Il est intéressant de noter le caractère totipotent et donc non différencié que présentent les cellules jusqu'au stade 8.

Au 4^{ème} jour suivant l'insémination d'animaux super ovulés, 72 % des embryons normaux récoltés après abattage sont au stade de 8 cellules. Au 5^{ème} et 6^{ème} jour de gestation 78 et 81 % d'entre eux sont respectivement au stade 16 et plus de 16 cellules. En général, l'embryon passe dans l'utérus vers le 5^{ème} jour de gestation. Des récoltes séquencées réalisées après abattage de vaches super ovulées ont permis de préciser que 4, 5 et 6 jours après l'insémination, respectivement 60 % des embryons sont dans l'oviducte et 80 et 91 % dans l'extrémité de la corne utérine.

Ces divisions cellulaires aboutissent à la formation d'une morula (32-64 cellules) qui va être l'objet du phénomène de la compaction. La compaction consiste en la formation de zones de contact entre les blastomères aboutissant à la formation d'une cavité blastocoelique et à l'expansion du blastocyste. Celle-ci résulte de la présence d'un gradient ionique différent entre les parties internes et externes du blastocyste ce qui a pour résultat d'induire par osmose une accumulation de liquides dans la morula. Sa formation indique que l'embryon a franchi avec succès la phase de blocage observé in vitro au stade 8-16 cellules (4^{ème} division cellulaire) chez la plupart des embryons de mammifères à l'exception des primates et de la lapine. Ce blocage implique que soient davantage maîtrisés in vitro les facteurs qui en seraient responsables et qui encore à ce jour imparfaitement connus.

C'est également au cours des premières divisions cellulaires (stade 2 dans l'espèce caprine, stade 4 dans les espèces porcine et humaine, stade 8 dans l'espèce bovine et stade 16 dans l'espèce ovine) que le contrôle du développement embryonnaire passe du génome maternel au génome de l'embryon lui-même.

5.1.2. Sortie de pellucide et phase d'élongation.

Le jeune blastocyste comprend environ une centaine de cellules. Son diamètre est de 160 microns et l'épaisseur de sa zone pellucide de 12 microns. L'accumulation de liquides dans le blastocyste est responsable de l'expansion du blastocyste. Celle-ci se traduit par une augmentation de 60 % de son diamètre qui passe abstraction faite de l'épaisseur de la zone pellucide, d'un diamètre de 400 à 700 microns. Il en résulte également un amincissement de la pellucide ce qui explique que sa rupture peut se produire à n'importe quel endroit. L'éclosion c'est-à-dire la sortie du blastocyste hors de sa pellucide (hatching) vers le 9^{ème}-10^{ème} jour suivant la fécondation ne résulte pas d'une lyse enzymatique, des membranes pellucides intactes peuvent être retrouvées dans l'utérus, mais de la formation d'un point de perforation. Ce processus a une durée moyenne de 12 heures. Diverses modalités en ont été décrites : la phase d'expansion est continue et suivie de l'éclosion ; elle peut-être discontinue et être entrecoupée de quelques phases de contraction se terminant ou non par une éclosion normale. Cette phase d'extrusion blastocytaire au travers d'une zone pellucide incomplètement perforée pourrait expliquer la formation de vrais jumeaux.

Vers le 11^{ème}-12^{ème} jour de gestation, le blastocyste se compose de 1000 cellules environ 25 % d'entre elles seulement constituant le bouton embryonnaire recouvert jusqu'à ce moment par le trophoctoderme

De sphérique, le blastocyste prend progressivement un aspect ovoïde avant d'entamer vers le 12^{ème}-14^{ème} jour sa phase d'élongation. Le début de cette phase varie entre espèces et entre individus, le cas le plus extrême étant celui de la diapause présentée par le chevreuil. Elle peut également être très rapide puisque dans l'espèce porcine, le blastocyste s'allonge de 30 à 45 mm par heure entre le 12^{ème} et le 14^{ème} jour de gestation. Le trophoblaste différencié vers le 5^{ème}-6^{ème} jour de gestation est un tissu dont la croissance est très rapide. Constitué de l'endoderme et du trophoctoderme, il forme le chorion et est à l'origine des cotylédons. Il débute à ce moment sa phase d'élongation jusqu'à atteindre une longueur de 2.5 cm en moyenne au 16^{ème} jour de gestation. D'importantes variations individuelles ont été décrites à ce stade de gestation. L'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme sont à ce moment bien différenciés et le trophoblaste est environ 50 fois plus long que le disque embryonnaire proprement dit.

5.1.3. L'implantation

Le trophoblaste différencié vers le 5^{ème}-6^{ème} jour de gestation est un tissu dont la croissance est très rapide. Constitué de l'endoderme et du trophoctoderme, il forme le chorion et est à l'origine des cotylédons. Il débute à ce moment sa phase d'élongation jusqu'à atteindre une longueur de 2.5 cm en

moyenne au 16^{ème} jour de gestation. D'importantes variations individuelles ont été décrites à ce stade de gestation. (Betteridge et Flechon 1988). L'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme sont à ce moment bien différenciés et le trophoblaste est environ 50 fois plus long que le disque embryonnaire proprement dit.

Les premiers contacts tissulaires entre le trophoblaste et la surface utérine s'observeraient selon les auteurs entre le 11^{ème} jour de gestation (Winters et al. 1942) et le 90^{ème} jour (Kingman 1948). Des études plus spécifiques ont confirmé qu'en fait, c'est vers le 20^{ème}-30^{ème} jour de gestation qu'un processus d'adhésion entre les structures maternelles et embryonnaires se mettrait en place (Leiser 1975, Cook et Hunter 1978, King et al. 1979, King et al. 1980).

5.2. Critères d'identification de la qualité des embryons

Les embryons récoltés après superovulation ou fécondation in vitro se présentant sous des aspects morphologiques divers, il est important d'en apprécier la qualité avant leur transfert ou autres manipulations biotechnologiques éventuelles. 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. Des valeurs de diamètre externe de l'embryon et de l'épaisseur de la pellucide ont dans ce but été déterminées (Tableau 8) D'autres moins couramment utilisés se basent sur le nombre de cellules identifiées à un stade de développement donné, l'activité enzymatique (test à la FDA : Fluorescéine Diacétate transformé sous l'action d'estérases présentes dans les cellules vivantes en un composé non fluorescent) ou métabolique (consommation de glucose en culture, synthèse de lactate deshydrogénase) 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) et 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).

Morphologiquement, il est possible de distinguer les divers stades de développement de l'embryon sur base des critères suivants (Lonergan 1992). Au stade *morula*, il est difficile de bien distinguer les différents blastomères. Le tissu embryonnaire occupe la majorité de l'espace périvitellin. Dans le cas d'une *morula dite compacte*, l'embryon occupe 60 à 70 % de l'espace périvitellin. Le *jeune blastocyste* est un embryon présentant un début de cavité (blastocoele) : il a un aspect de chevalière. L'embryon occupe 70 à 80 % de l'espace périvitellin. A ce stade, il est possible de distinguer la masse embryonnaire et le trophoblaste. Au stade *blastocyste*, il devient très aisé de distinguer la masse des cellules embryonnaires et le trophoblaste. La cavité blastocoelique est nettement identifiable. L'embryon occupe pratiquement tout l'espace périvitellin. Au stade de *blastocyste expansé*, le diamètre de l'embryon a brutalement augmenté (x 1.2 à 1.5) tandis que l'épaisseur de la pellucide s'est réduite de 2/3.

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).

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 : aspect symétrique, blastomères polygonaux formant une masse compacte au stade morula

- - **Classe 2** (bon)

Aspect semblable aux embryons de classe 1 mais 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. Les limites cellulaires sont indistinctes.

- - **Classe 5** (dégénérés)

La dégénérescence peut parfois être, à ce point évidente, qu'il n'est plus possible de reconnaître le stade de développement. L'embryon prend parfois une configuration anormale.

6. Le transfert d'embryons

6.1. 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. Une étude menée en 1994 (Janowitz Animal Breeding Abstract 1994, 63, 402) a précisé les pourcentages de gestation observés après transfert de 2478 embryons sur des receveuses qui étaient venues en chaleurs respectivement 48 h, 24 h avant la donneuse, en même temps et 24h et 48 h après la donneuse. Les pourcentages de gestation ont été respectivement de 24, 52, 58, 50 et 44 %.

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 7^{ème} jour de développement sont de meilleure qualité que les autres. Aussi n'est-il pas recommandé d'adopter une stratégie différente de synchronisation et donc de transfert des embryons obtenus in vivo et in vitro.

Les traitements hormonaux de synchronisation de la donneuse et des receveuses sont de nature diverse. Ils peuvent être utilisés seuls ou en association. Leur employabilité dépend d'une part du degré de synchronisation qu'ils permettent et d'autre part de la possibilité qu'ils offrent de ne pas nécessairement détecter l'oestrus. On insistera néanmoins sur le fait qu'une détection de qualité autorise un transfert au meilleur moment. Par ailleurs, le résultat du transfert va également dépendre du degré d'exactitude du corps jaune éventuellement présent au moment du transfert. Ce degré d'exactitude tiendra compte du fait qu'en moyenne 25 à 35 % des receveuses sont éliminées. Les traitements potentiels ont fait l'objet d'une description détaillée dans le chapitre relatif à l'anoestrus. Nous nous limiterons ici à rappeler des essais plus spécifiques réalisés dans le cadre du transfert d'embryons.

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 après respectivement 9 et 12 jours de mise en place

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

Le protocole Ovsynch : On a comparé les pourcentages de gestation obtenus après transfert d'embryons congelés sur des vaches synchronisées au moyen de PGF2alpha ou du protocole Ovsynch. Le transfert était réalisé 7 jours après la détection de l'oestrus ou la seconde injection de GnRH pour autant qu'un corps jaune de diamètre supérieur à 10 mm ait été détecté par palpation manuelle ou par échographie. Cette comparaison démontra un effet favorable du protocole Ovsynch (39,1 % et 31,3 % de gestation sur respectivement 266 et 310 receveuses) (Kastelic et al. Canadian Embryo Transfer association, Convention proceedings 2002). D'autres études sont venues confirmer la possibilité de réaliser un transfert d'embryons sur des vaches ou génisses sans qu'au préalable elles aient été vues en chaleurs. Ainsi un taux de gestation de 59,9 % a été obtenu après synchronisation de 1637 receveuses au moyen d'un protocole de type Ovsynch joint à la mise en place pendant 7 jours d'un implant ou d'un CIDR (Beal et al. AABP congress Vancouver 2001) .

6.2. Le transfert d'embryons : matériel et technique

Au début, les transferts d'embryons furent 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.

Plus classiquement, le transfert d'embryon est réalisé à l'heure actuelle par voie transcervicale au moyen de pistolet de transfert (« inovulateur de Cassou ») de diamètre de 3 mm pour les génisses ou de 4 mm plus rigide pour les vaches.

6.3. Facteurs d'influence des résultats

● Etat hormonal de l'animal receveur

La progestérone joue un rôle majeur sur le statut physiologique de l'utérus le jour du transfert. Une concentration minimale est indispensable. Il est possible de s'en assurer par l'identification manuelle d'une structure lutéale normale sur l'ovaire. Cette méthode a ses limites et le degré d'exactitude dépend et notamment de l'expérience du clinicien (Voir chapitre relatif à la propédeutique du tractus génital). Un dosage de progestérone réalisé la veille ou un examen échographique effectué le jour même sont de nature à augmenter le degré d'exactitude de cette structure ovarienne.

● Nombre de transferts

Il a été fait état d'une réduction des chances de gestation après un second ou troisième transfert (suivis de gestation) à un même animal receveur (Cargill 1992). Cet avis mériterait d'être confirmé.

● Effet de la saison

Les résultats de 1124 transferts d'embryons réalisés par une équipe de 6 vétérinaires dépendant du centre Gestion, Elevage et Reproduction (GER) de Ciney au cours d'une période de 24 mois comprise entre les mois de novembre 1995 et de novembre 1997 ont été analysés. Il s'avère que quelque soit l'année, le pourcentage de réussite de gestation est supérieur au mois de juin et compris entre 64 et 76 %.

- Effet de la race de la receveuse

Les embryons sont transférés en proportion pratiquement égale sur des receveuses de race Blanc Bleu Belge (38.5 %) et Pie Noire (40 %). On observe un taux de réussite supérieur chez les receveuses de race Pie Noire (48 %) que Blanc Bleu Belge (40 %) (voir étude citée). Le choix de certaines races peut s'accompagner d'un risque accru de césariennes.

- Effet de l'âge de la receveuse

Les génisses offrent l'avantage d'avoir un risque plus faible d'infections utérines et une manipulation plus aisée du tractus génital. Par ailleurs leurs besoins sont limités à leur croissance. A l'inverse cependant, les vaches présentent un col plus facile à cathétériser. En effet, il a été estimé que 10% des génisses présentait un col dont le franchissement était difficile. Les pluripares doivent être préférées aux primipares.

Dans l'étude citée, l'âge moyen des receveuses utilisées était de 32 mois. On peut constater une tendance à la diminution du taux de réussite avec l'âge de l'animal au moment du transfert (Tableau 9)

- Facteurs de stress

Il faudra éviter de traiter préventivement (vaccinations, traitements antiparasitaires...) les animaux au cours des trois semaines précédant le transfert. De même, tout changement brutal de la ration sera évitée au cours du mois précédant et suivant le transfert. La manipulation des animaux lors du transfert se fera de manière prudente le jour du transfert. Au besoin on aura recours à une anesthésie loco-régionale surtout si le vétérinaire responsable du transfert n'en a pas une grande expérience.

- Thérapeutiques hormonales complémentaires

Les essais d'administration de *progestagènes* (implants, spirales vaginales, CIDR mis en place pendant 6 à 13 jours 6 à 10 jours après l'insémination artificielle) n'ont pas apporté de résultats unilatéralement concluants. D'autres auteurs ont enregistré un effet favorable d'une injection de 1500 UI d'*HCG* 5 à 7 jours après l'insémination serait de nature à augmenter le pourcentage de gestation. A notre connaissance aucune étude standardisée n'a été conduite avec des animaux receveurs.

La *GnRH* a également été évaluée chez les animaux receveurs. Son injection à la dose de 8 mcg le jour du transfert de l'embryon soit au 7ème ou 8ème jour du cycle ou 4 à 6 jours après le transfert soit entre le 11ème et le 15ème jour du cycle n'entraîne aucune différence significative dans le pourcentage de gestation obtenu. Elle est également dépourvue d'effet lors du transfert d'un embryon de moindre qualité ou si le taux de progestérone de la receveuse est insuffisant (Ellington et al. 1991). Il ne semble donc pas qu'une seule injection puisse pallier au manque de synchronisme éventuel entre la donneuse et la receveuse, facteur impliqué dans les échecs observés après transfert d'un embryon. Dans ce cas, des injections répétées de GnRH administrées tous les trois jours à partir du 12ème jour du cycle à des receveuses asynchrones par rapport aux donneuses sont plus à même de maintenir la gestation. Ce traitement permettrait à des embryons présentant un retard de développement d'avoir le temps nécessaire pour être capable de synthétiser leur protéine trophoblastique responsable du blocage lutéolytique et donc du maintien de la gestation (Thatcher et al. 1989). Cette étude ne semble pas avoir été à ce jour confirmée.

Les *interférons* sont dotés de propriétés antivirales. Ils stimulent la synthèse d'anticorps et l'activité antimicrobienne des macrophages et neutrophiles. Synthétisés notamment par le trophectoderme dès le 12^{ème} jour de gestation, ils sont largement impliqués dans le mécanisme au demeurant complexe du maintien de la gestation. Quelques essais préliminaires d'utilisation d'interférons recombinés (rboIFN recombinant bovine interféron) ont été réalisés avec succès chez la brebis. Ils sont en attente de confirmation chez la vache.

D'autres méthodes ont également été envisagées : co-transfert de vésicules trophoblastiques, d'embryons hybrides (bovin x ovin) (helper embryo), d'embryons de moindres qualités dont le bouton embryonnaire aurait été détruit par LASER ou encore d'ovocytes parthénogénomiques.

7. 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.

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 remplacer régulièrement le milieu. Il est également possible de stocker les embryons au réfrigérateur (4°C) pour une période de 12 à 24 heures. D'une manière générale cependant, les résultats obtenus seront d'autant meilleurs que l'embryon est rapidement transféré à l'animal receveur (< 3 heures). Une remarque s'impose. 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.

Pour une conservation à plus long terme, une *congélation* de l'embryon sera requise. Mise au point sur des embryons de souris (Wittingham 1971), la méthode aboutit en 1973 à la naissance du premier veau né après congélation de l'embryon (Wilmut et Rowson 1973). 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 ce faisant permis de dissocier dans l'espace et dans le temps la production et le transfert des embryons. Elle a néanmoins nécessité de nombreuses étapes visant à déterminer les critères de choix de l'agent cryoprotecteur ainsi que les méthodes de congélation et de décongélation. En une vingtaine d'années, elle a été appliquée dans la plupart des espèces animales (Tableau 10).

7.1. Données générales

- Une petite histoire

A l'entrée du terrible hiver de 1942, par un froid de loup, des soldats finlandais, dans l'isthme de Carélie, mirent le feu à la forêt de Raikkola, où s'était concentrée l'artillerie soviétique - hommes, bêtes et canons. Réveillés en sursaut, entourés de clameurs, pris de panique, un millier de chevaux, derrière leurs chefs de file, coururent se jeter dans le lac Ladoga pour échapper à la fournaise. Ils essayèrent de nager vers l'autre rive, la tête tendue hors de l'eau, farouchement cabrés, grelottant de froid et de peur. Soudain, avec le bruit sec d'une vitre qu'on brise, l'eau qui les protégeait gela, les saisit, les emprisonna. A l'aube; à travers la forêt calcinée, les Finlandais découvrirent émergeant d'une plaque d'albâtre qui s'étendait à perte de vue, des centaines et des centaines de têtes de chevaux. Le givre les avait recouvertes d'un manteau bleuté. Dans les yeux dilatés, la terreur brillait comme une flamme. Tout le long de l'hiver, elles demeurèrent ainsi, "ces têtes mortes à la crinière glaciale, dures comme du bois, les lèvres contractées par un hennissement désespéré". Cette vision digne de Jérôme Bosch, chacun peut, comme à tout tableau lui donner une signification personnelle. Pour Malaparte, ces chevaux sont le symbole de la vieille Europe chrétienne et paysanne - désemparée et suicidaire. Peut-être verrez-vous en eux le symbole d'un mal plus permanent, qui guette tout homme et toute société : le saut d'un excès dans un autre, le manichéisme, le renversement dialectique, le vertige du tout ou rien, du blanc et du noir.

Ces chevaux qui, par crainte du mur de flammes, s'enferment jamais dans un mur de glace, ils auraient pu, entre l'enfer du brasier et l'enfer de la banquise, se frayer une troisième voie, s'élancer à la file le long de la rive, en galopant sur la grève là où l'incendie ne menaçait pas, en trempant les sabots dans le lac si les flammes s'avançaient. Ils auraient évités à la fois d'être brûlés vifs et d'être pétrifiés. Mais le

réflexe d'un être apeuré ou fougueux, surtout en groupe, le pousse à bondir d'un extrême à l'autre. C'est en voulant se soustraire à la mort par le feu que les chevaux russes ont trouvé la mort par le gel.

Mais pourquoi la glace a-t-elle pris tout à coup ? A première vue, un millier de chevaux brillants qui se précipitent dans un lac sur le point de geler devraient réchauffer l'eau, donc retarder le moment où celle-ci se changera en glace. Malaparte fait intervenir d'autorité, juste à ce moment-là, une bise fortuite. A l'instant précis où le troupeau trouve refuge dans les flots, le vent du nord se lève "comme un Ange, en criant, et la terre meurt brusquement. La mer, les lacs, les fleuves gèlent brusquement. Même l'eau de mer s'arrête au milieu de l'air, devient une vague de glace courbée et suspendue dans le vide"

Malaparte n'aurait pas eu à faire appel au merveilleux, s'il avait connu le phénomène physique désigné sous le nom de surfusion. La thermodynamique enseigne qu'une eau très pure, comme celle des lacs glaciaires, ne gèle pas. A 0°C : elle se maintient à l'état liquide jusqu'à dix ou vingt degrés au-dessous de zéro. Mais l'immersion soudaine de corps étrangers déclenche la cristallisation de l'ensemble. L'équilibre thermique bascule en quelques secondes. De proche en proche, toutes les molécules d'eau se transforment en cristaux de glace. Ce sont les chevaux qui provoquent eux-mêmes le gel du lac. Cet équilibre précaire d'une eau en surfusion évoque la fragilité invisible de la société complexe dans laquelle nous baignons.

In : Alain Peyrefitte, Les chevaux du lac Ladoga, Plon

1981.

- 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.

- 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.

7.2. Nature des agents cryoprotecteurs

En l'absence d'agent cryoprotecteur, les cellules de mammifères ne survivent pas à une température inférieure à -20°C. Ayant la propriété de fixer les molécules d'eau, les agents cryoprotecteurs abaissent le point de cristallisation des cellules. Par ailleurs, ils réduisent la quantité de glace qui se forme au cours de la congélation mais contribuent également à en modifier la forme de ses cristaux. Ils ne sont cependant pas dépourvus d'effets délétères d'ordre biochimique, osmotique ou cellulaire (lésions de l'acrosome dans le cas des spermatozoïdes).

Il en est de trois types. Au *premier groupe* appartiennent ceux qui pénètrent dans la cellule

(diméthylsulfoxyde c'est-à-dire DMSO, glycérol, propanediol, méthanol, éthylène glycol, ce dernier étant de plus en plus couramment utilisé et semblerait garantir de meilleurs résultats. La cause pourrait en être trouvée dans son poids moléculaire plus faible et par conséquent sa perméabilité plus élevée) : ils agissent essentiellement en la déshydratant et en réduisant la taille des cristaux lors du refroidissement. Au *second groupe* appartient le sucrose (saccharose), galactose ou encore saccharose. Non perméables, ils augmentent la pression osmotique extracellulaire et ce faisant déshydratent la cellule sans y pénétrer. Le *troisième groupe* enfin comporte des substances de poids moléculaire plus élevé (polyvinylpyrrolidone, dextran, serum, serum albumine, lipoprotéines présentes dans le jaune d'œuf) qui ne pénètrent pas dans la cellule : ils agissent essentiellement au niveau membranaire (protection et réparation). 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 (celui-ci dépend du stade de développement de l'embryon : les morulas résistent davantage à la congélation que les jeunes blastocystes ou les blastocystes expansés, et de l'espèce) au cryoprotecteur, le gradient existant entre les concentrations intracellulaires et extracellulaires de l'agent cryoprotecteur et la température de surface de l'embryon. Leur addition en plusieurs ou une seule étapes pendant ce qu'il est convenu d'appeler le temps d'équilibration semble donner les mêmes résultats (Niemann Theriogenology, 1985,23,369).

7.3. 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-il de nature fort diverse, certains fonctionnant à l'éthanol pur ou à l'azote liquide.

- Etapes 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°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.

- 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) (Van der Zwalm et al., Theriogenology 1989, 31,270). 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.

Récemment, une nouvelle méthode de vitrification appelée OPS (Open Pulled Straw) a été proposée (Vajta et al. Molecular Reproduction and development 1998,51 :53-58). Les minipaillettes de 0.25 ml sont traitées à la chaleur pour en réduire de moitié le diamètre externe (0.8 mm vs 1.7 mm) et

l'épaisseur de leur paroi (0.07 vs 0.15 mm). Les embryons sont incubés successivement dans deux solutions de concentrations croissantes d'éthylène glycol et de DMSO et de sucrose 0.5M. puis aspirés (1 à 2 microlitres) dans la paillette par simple capillarité. Une fois conditionnées, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide. Leur décongélation s'opère en plongeant les paillettes dans un milieu à 37°C. Ce système s'avère applicable pour congeler des ovocytes ou des embryons de J3 à J7 mais pas aux embryons de J1 ou J2.

- 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.

7.4. La décongélation

Il en existe de 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. 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. Dans la *décongélation rapide* (or 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 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.

7.5. Facteurs d'influence des résultats

Il semble bien démontré que les *embryons produits in vitro* témoignent d'une plus grande sensibilité au processus de la congélation-décongélation. Certains auteurs ont établi un parallélisme avec les embryons de porcs connus pour leur sensibilité au refroidissement à des températures inférieures à 15°C. 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.

La *qualité morphologique* de l'embryon congelé est également 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. 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.

8. Pour en savoir plus

Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. CAB International 1994.

Niemann H Cryopreservation of ova and embryos from livestock : current status and research needs. Theriogenology, 1991,35,109-124.

http://www.oie.int/fr/normes/mcode/F_00127.htm : réglementations de l'OIE en matière de récolte et transfert d'embryons

9. Tableaux

Tableau 1: Principales étapes des biotechnologies de l'embryon

1951	Identification du phénomène de capacitation	Austin 1951
1951	Premier transfert d'embryon dans l'espèce bovine	Willett et al . 1951
1959	Naissance du premier lapereau obtenu par fécondation in vitro	Chang 1968
1970	Premiers essais de fécondation in vitro chez la vache	Sreenan 1970
1970	Première réussite de fécondation in vitro d'un ovocyte bovin	Niwa 1977
1973	Naissance du 1er veau après transfert d'un embryon congelé	Wilmut et Rowson 1973
1981	Naissance du premier veau obtenu par fécondation in vitro d'ovocyte mûri in vivo	Brackett et al. 1982
1986	Naissance du premier agneau obtenu par IVM/IVF	Cheng et al. 1986
1986	Naissance du premier porcelet obtenu par IVF	Cheng et al. 1986
1987	Naissance du premier veau obtenu par fécondation in vitro d'ovocyte mûri in vitro	Lu et al. 1987
1989	Naissance du premier porcelet obtenu par IVM/IVF	Mattioli et al. 1989
1990	Naissance du premier poulain obtenu par IVF	Palmer et al. 1990
1992	Naissance du premier buffle obtenu par IVM/IVF	Jiang et al. 1993
1993	Naissance du premier chevreau obtenu par IVM/IVF	Crozet et al. 1993

Tableau 2 : Importance de la récolte et du transfert d'embryons dans le monde en 1992 (Annon 1993: Embryo Transfer Newsletters 1993,11:10-13.

Pays	Récoltes	Embryons transférables	Embryons transférés
Maroc, Afrique du Sud et Zimbabwe	1.837	10.660	9.707
Canada et USA	34.413		126.587
Argentine et Brésil	5.009	21.164	20.245
Corée, Japon, Thaïlande, Chine, Inde	10.368	4.071	28.829
Europe	22.699	109.559	96.300
Nouvelle Zélande	330	2.297	986
Total	74.656	147.751	282.654

Tableau 3 : Evolution de l'activité du transfert d'embryons bovins en Europe et en France (AETE 1993-1996)

	1993	1994	1995	1996
N femelles collectées	21.542	22.557	25.075	24.133
France	6.680	5.890	6.680	6.657
Belgique	1512	1420	1378	1639
N d'embryons collectés	176.470	194.589	215.046	214.293
France	50.270	55.249	60.298	56.797
Belgique	12352	10636	11438	11403
N d'embryons transplantés (a)	96.470	102.887	112.531	117.942
N d'embryons congelés (b)	42.263	54.485	60.848	55.786
% d'embryons congelés (c)	48	53	54	47
France (a)	22.744	24.288	27.260	28.793
France (b)	9.915	10.664	12.505	13.105
France (c)	44	44	46	46
Belgique (a)	6492	5195	5542	5591
Belgique (b)	4177	3416	3484	2725
Belgique (c)	64	66	63	49

Tableau 4 : Résultats de transferts d'embryons
(Thibier et Nibert (Theriogenology 1995,43,73-80)

Type d'embryon	Taux de gestation	Taux de mise bas	N de veaux (1)
Frais	60	56	3.1
Congelé	50	46	2.6
Frais et sexé	45	41	2,2
Sexé et congelé	28	24	1,0

(1) nombre moyen d'embryons produits (5.6) multiplié par le taux de mise-bas

Tableau 5 : Distribution des récoltes en fonction du nombre d'embryons transférables obtenus (Données GER 1995-1997)

N embryon	N récoltes	%
0	539	21
1 à 3	763	29
4 à 7	794	30
8 à 23	535	20

Tableau 6 : distribution du nombre moyen d'embryons transférables obtenus en fonction de l'intervalle entre les récoltes

Jours	N récoltes	%	N embryons
30 à 49	79	7	3.4
50 à 69	221	19	5.2
70 à 89	290	25	4.7
90 à 109	178	15	4.9
110 à 129	113	9	4.8
130 à 149	69	6	4.0
150 à 169	47	4	3.5
170 à 199	45	4	3.2
200 à 249	46	4	3.5
250 à 299	22	1	4.6
300 à 730	42	4	3.3
111 jours	1173	100	4.1

Tableau 7 : Chronologie du développement de l'embryon bovin

Jour	Heures	Evénements	Taille
0	0	Début des chaleurs	
0	7	Libération de LH (pendant 8 à 12 heures)	
0	15	Insémination	
1	30	Ovulation	160
1	35	Fécondation	
2	50	Stade deux cellules	160
2	55	Stade 4 cellules	160
3	75	Stade 8 cellules	
4	100	Stade 16-32 cellules	
5	120	Passage de l'embryon dans l'utérus	
6	130	Stade 30-64 cellules (morula)	
7	150	Stade jeune blastocyste	140-170
8	200	Stade blastocyste	170-210
10		Sortie de pellucide	150-350
11		Début de la phase d'élongation	150 à 3 cm
22		Premiers accolements entre le conceptus et l'endomètre	
35		Implantation	
40-50		Fin de l'organogénèse	

Tableau 8 : Diamètres externe (DE) (micron) et épaisseur de la pellucide (EP) (micron) d'embryons bovins en fonction du stade de développement embryonnaire (D'après Lonergan 1992)

Stade de développement	N	DE	EP
2 cellules	13	148	13.7
4 cellules	31	149	14.1
8 cellules	15	149	13.4
J6 morula	37	150	14.5
J6 morula/jeune blastocyste	18	150	13.1
J7 jeune blastocyste	18	158	11.7
J7 blastocyste	30	167	9.6
J8 blastocyste	46	182	7.9
J 9 blastocyste	56	200	5.6
J9 blastocyste sorti de sa pellucide	14	272	5.8

Tableau 9 Taux de réussite du transfert d'embryon en fonction de l'âge de la receveuse

Age (mois)	N transferts	%	% de gestation
10 à 15	273	16	48
16 à 20	725	44	46
21 à 35	244	15	40
36 à 40	302	18	44
> 40	124	7	40
Moyenne (32)	1668	100	

Tableau 10 : Chronologie des premières naissances après congélation d'embryons

Espèce	Année	Référence
Souris	1971	Whittingham 1971
Vache	1973	Wilmut et Rowson 1973
Lapine	1974	Bank et Amurer 1974
Brebis	1974	Willadsen et al. 1974
Rate	1975	Whittingham 1975
Chèvre	1976	Bilton et Moore 1976
Cheval	1982	Yamamoto et al. 1982
Femme	1983	Trounson et Mohr 1983
Truie	1991	Kashiwazaki et al. 1991

Tableau 11 : Induction d'une chaleur dite de "superovulation" au moyen de prostaglandines

Prostaglandine	Dose totale (mg)	N	Intervalle (h)/FSH ou PMSG
Dinoprost	15	1	48
	22.5	1	48
	25	1	48
	30	1	48
	30	3	72 78 84
	40	2	72 84
	50	2	60 72
	50	2	48 60
	65	3	48 54 60
	Cloprosténol	0.5	1
0.5		1	60
0.5		1	108
0.63		1	108
0.75		1	48
0.75		1	72
0.75		2	48 60
1		2	56 72
1		2	60 72
Fenprostalène	1	1	60
Luprostiol	15	1	48
	22.5	1	48
	30	1/2	48