

La production d'embryons in vitro

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/Theriogenologie>

Table des matières

1.	Objectifs	2
1.1.	Objectif général	2
1.2.	Objectifs spécifiques	2
1.2.1.	Objectifs de connaissance	2
1.2.2.	Objectifs de compréhension	2
2.	Introduction générale	2
3.	Prélèvement in vitro des ovocytes	3
4.	Le prélèvement in vivo : l'Ovum Pick Up (OPU)	4
4.1.	Le matériel.....	4
4.1.1.	Le matériel échographique	4
4.1.2.	Les aiguilles de ponction	4
4.1.3.	Le rinçage de la cavité folliculaire	5
4.1.4.	Les tubulures de connexion	5
4.1.5.	La pression d'aspiration	5
4.1.6.	Le milieu de récolte	6
4.2.	La méthode de ponction intravaginale.....	6
4.3.	Résultats potentiels (.....	6
4.3.1.	Données générales	6
4.3.2.	Facteurs d'influence	7
4.4.	Conséquences possibles.....	8
4.4.1.	Autres champs d'applications potentiels	9
4.5.	Intérêt de l'OPU	10
5.	La qualité des ovocytes	11
5.1.	Critères de détermination.....	11
5.2.	Facteurs d'influence (.....	11
5.2.1.	L'animal donneur	12
5.2.2.	L'ovaire et le follicule	12
6.	La maturation des ovocytes.....	14
6.1.	Processus de la maturation in vivo : rappels.....	14
6.2.	La maturation in vitro (MIV).....	15
6.3.	Evaluation de la maturation ovocytaire.....	16
6.4.	Particularités d'espèces	16
7.	Capacitation des spermatozoïdes et FIV	16
7.1.1.	Quelques rappels physiologiques	16

7.1.2. Méthodologie de la FIV	17
8. La culture des embryons.....	19
8.1. Culture de l'embryon in vivo	19
8.2. Culture de l'embryon in vitro	19
9. Conséquences de la fécondation in vitro	20
9.1. Manifestations du LOS	20
9.2. Etiologie du LOS	21
10. Pour en savoir plus.....	22
11. Tableaux.....	23
12. Annexe	24

1. Objectifs

1.1. Objectif général

Sous une forme chronologique, ce chapitre présente les différentes étapes entre la collecte d'ovocytes et l'obtention in vitro d'embryons transférables à savoir : la ponction transvaginale échoguidée (OPU) des ovocytes (Ovum Pick Up : OPU), l'évaluation de leur qualité, leur maturation et fécondation in vitro, la préparation des spermatozoïdes puis la culture des embryons obtenus. Le chapitre se conclut par une brève présentation des conséquences possibles de cette biotechnologie de l'embryon.

1.2. Objectifs spécifiques

1.2.1. Objectifs de connaissance

1. Enoncer le matériel nécessaire à la réalisation de l'OPU
2. Enoncer les critères de prélèvement des ovocytes d'une vache
3. Enoncer les champs d'application potentiels de la méthode transvaginale
4. énoncer de manière chronologique les différentes étapes conduisant au transfert de l'embryon obtenu in vitro.
5. énumérer les divers aspects de la maturation ovocytaire
6. énoncer les signes de la capacitation des spermatozoïdes et l'agent responsable de son induction in vitro
7. énoncer les critères de fécondation
8. définir la coculture et ses moyens de réalisation
9. définir le LOS

1.2.2. Objectifs de compréhension

1. décrire la méthode dite OPU de prélèvement des ovocytes
2. Comparer avantages et inconvénients de la FIV par rapport à la production in vivo d'embryons

2. Introduction générale

Depuis de nombreuses années déjà, l'attention des généticiens s'est focalisée sur la sélection tant en qualité qu'en quantité de vaches génétiquement supérieures. Par ailleurs, les impératifs économiques de l'élevage bovin obligent davantage que par le passé les éleveurs à optimiser le potentiel de production de leur troupeau, notamment par une réduction de l'intervalle entre vêlages ou par une augmentation du nombre de veaux produits annuellement par ces mêmes vaches, sachant que la saillie naturelle ou l'insémination artificielle ne permettent la production dans le meilleur des cas que d'un seul veau par an et par vache. Ces objectifs génétiques et économiques ont été à la base du développement des biotechnologies de la reproduction telles que MOET ou la fécondation in vitro.

La méthode dite MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer) implique le traitement des animaux avec des hormones gonadotrophiques (PMSG, FSH). Ces traitements de superovulation ont ainsi permis d'augmenter de 1 à 10 le nombre d'ovules libérés par cycle. Répétable en moyenne cinq fois par an et par vache, cette procédure n'est cependant pas exempte d'inconvénients puisqu'en effet, elle allonge de deux mois environ le délai nécessaire à l'obtention d'une gestation et peut s'accompagner, surtout si elle est répétée chez le même animal, de réactions iatrogènes ou de kystes ovariens voire d'infections utérines.

Estimée à 100.000 ovocytes, la réserve ovocytaire ne conduit en fait à la production moyenne que d'une centaine d'embryons sur la vie d'un animal soumis à des traitements de superovulation et récolte d'embryons. Il existe donc un gaspillage énorme du potentiel génétique femelle susceptible d'être mis à profit pour la production d'embryons. C'est pourquoi furent mises au point des techniques de récupération d'ovocytes et des méthodes de fécondation in vitro. Celles-ci apparaissent d'autant plus justifiées que différentes recherches sont venues confirmer la continuité du processus de croissance folliculaire sous forme de vagues tant chez les animaux gestants que non-gestants.

Dans l'espèce humaine, le premier enfant né après fertilisation in vitro d'un ovocyte fut Louise Brown. C'était en 1978 (Edwards et Stetoe. Lancet 1978, 2, 366) . Depuis lors bien des progrès ont été accomplis dans cette espèce. Ils se sont accompagnés de la création dans les divers pays de comités d'éthique. On lira en annexe les réflexions générales du collègue Foidart de la Faculté de Médecine de l'ULg énoncées à l'occasion d'un colloque organisé à Liège en janvier 2003.

Le premier veau né après maturation in vitro (MIV), fécondation in vitro (FIV) et transfert non chirurgical de l'embryon ainsi obtenu est né en 1981 (Brackett et al. 1982). C'est cependant au cours des années suivantes que se développe la fécondation in vitro d'ovocytes prélevés sur des ovaires obtenus après abattage des animaux, les ovocytes étant récupérés soit par aspiration du liquide folliculaire, par section de l'ovaire en tranches ou par dissection. Cette méthode de collecte des ovocytes est encore largement utilisée dans le cadre de recherches fondamentales sur la fécondation in vitro ou plus occasionnellement dans le cas d'animaux réformés pour des raisons sanitaires ou abattus d'urgence. Elle permet en moyenne l'obtention de 25 à 30% d'embryons transférables. Irréversible, elle n'est par ailleurs pas exempte de difficultés liées non seulement à l'état sanitaire ou au statut génétique de l'animal donneur prélevé à l'abattoir mais également à la méthode de prélèvement qui interrompt de manière brutale et parfois prolongée les mécanismes physiologiques et biochimiques présidant au développement ovocytaire.

Le caractère irréversible du prélèvement in vitro et son intérêt génétique limité ont conduit à la mise au point de méthodes laparoscopiques ou échographiques offrant la possibilité d'un prélèvement d'ovocytes in vivo. La laparoscopie ventrale, paralombaire ou transvaginale a été expérimentée dans l'espèce bovine. Elle est applicable de manière répétée sur le même individu et n'entraîne qu'occasionnellement des complications péritonéales telles que des adhérences. Son utilisation hebdomadaire voire bihebdomadaire ne peut selon certains auteurs être prolongée plus de 5 semaines. Bien qu'elle permette chez la vache d'obtenir un pourcentage de récupération des ovocytes compris entre 50 et 84 %, elle a pour des raisons pratiques telles que la mise à jeun de l'animal, la nécessité d'induire une distension abdominale, l'allongement de l'intervalle entre deux ponctions...), été progressivement remplacée par des méthodes de ponction ayant recours à l'échographie. D'abord utilisée par voie transcutanée au niveau de la région sacroischiatische, la ponction échoguidée des follicules ovariens (OPU: Ovum Pick-Up) est communément utilisée à l'heure actuelle par voie transvaginale chez la vache. Cette méthode sera développée dans un chapitre spécifique.

3. Prélèvement in vitro des ovocytes

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

des ovocytes sera effectué dans les 4 heures suivant le prélèvement des ovaires.

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

4. Le prélèvement in vivo : l'Ovum Pick Up (OPU)

4.1. Le matériel

Simple en apparence, la méthode de ponction échoguidée suppose néanmoins la parfaite maîtrise de divers aspects pratiques parfois différents selon les équipes.

4.1.1. Le matériel échographique

Il se caractérise tout à la fois par la configuration et la fréquence de la sonde utilisée. Habituellement sectorielle, la sonde peut néanmoins être semi-courbe (finger type) ou linéaire. Sa fréquence s'échelonne entre 3.5 et 7.5 MHz (Pieterse et al 1988, Van der schans et al 1991, Pieterse et al. 1991b, Kruip et al 1994, Bergfeldt et al. 1994, Gibbons et al. 1994). Cependant, parce qu'elle offre une meilleure résolution, une sonde de 7.5 MHz s'avère optimale pour visualiser la population folliculaire ponctionnable. Déterminée in vitro par échographie, celle-ci se compose de follicules de diamètre compris entre 2 et 4 mm (92 %) , entre 5 et 10 mm (6 %) et supérieur à 10 mm (2 %) (Fry et al. 1993). Comparée à d'autres méthodes, l'échographie sous-évalue cependant le nombre de follicules ponctionnables réellement présents sur l'ovaire. Ainsi, comparant la détermination antemortem par échographie et postmortem par dissection du nombre de follicules présents sur les ovaires, Gong démontre que l'échographie n'identifie que 19 et 44 % des follicules de taille respectivement inférieure à 5 mm et comprise entre 5 et 10 mm (Gong et al. 1993). Cette observation fut confirmée à l'occasion d'une autre étude au cours de laquelle un follicule sur trois (34 %) détecté par dissection fut identifié par échographie (Pieterse et al. 1990).

4.1.2. Les aiguilles de ponction

Selon les équipes, quatre types d'aiguilles de ponction sont utilisés. Le premier type d'aiguille est constitué d'une seule pièce d'une longueur de 50 à 60 cm et biseautée à son extrémité. Son utilisation répétée en entraîne l'émoussement. Quoique possible, un nouvel aiguillage de ces aiguilles ne leur restitue cependant pas leur tranchant initial. Elles sont par ailleurs fort coûteuses (Pieterse et al. 1988, Simon et al. 1993, Gibbons et al. 1994, Looney et al. 1994). Une amélioration a été apportée par l'utilisation d'aiguilles d'injection jetables fixées par collage ou soudure à une tubulure métallique d'un diamètre équivalent. Une réduction de l'espace mort entraîné par ces deux premiers types d'aiguilles a été obtenue en raccordant l'aiguille jetable à une tubulure en silicium passant au travers du tube métallique (Rath 1993, Bols et al. 1995). Le dernier type d'aiguille comporte un double conduit. Cette adaptation technique offre la possibilité d'injecter du liquide dans la cavité folliculaire (Fry et al 1993).

Le tranchant et l'échogénicité sont deux caractéristiques essentielles des aiguilles de ponction. Une attention particulière sera également réservée à la nature du matériel (métal, inox), au biseau (25° à 45°), à la longueur totale (40 à 60 cm) ainsi qu'aux diamètres interne (0,6 à 1,2 mm) et externe (0,8 à 1,6 mm) des aiguilles de ponction. Le diamètre interne (0,6 à 1,2 mm) ne semble pas influencer le taux de

récupération des ovocytes (Baltussen et al. 1990). Sa réduction offre l'avantage de pouvoir ponctionner les follicules de petit diamètre (2 mm). La réduction du diamètre évite par ailleurs la contamination éventuelle des tubes de récolte par du sang mais augmente le risque de lésion du cumulus oophorus des ovocytes lors de l'aspiration et par conséquent leur potentiel de fécondation future. A l'inverse, l'augmentation du diamètre externe entraîne plus de lésions de la paroi vaginale, de l'ovaire et des follicules mais contribue à augmenter le pourcentage de récupération des ovocytes (Fry 1993).

4.1.3. Le rinçage de la cavité folliculaire

Réalisé au moyen de PBS (Phosphate Buffered Saline), il augmente (Fry et al. 1994) ou non (Baltussen et al. 1990) chez la vache, le taux de récupération des ovocytes. Chez la jument (Vogelsang et al. 1988), son effet favorable a été reconnu. Il nécessite cependant l'augmentation du diamètre de l'aiguille et contribue par ailleurs à allonger le temps nécessaire à la ponction (Pieterse et al. 1988). Réalisé sous trop forte pression, le rinçage de la cavité folliculaire peut en entraîner la rupture et la perte de l'ovocyte (Pieterse et al. 1988). Certains systèmes sont équipés d'une tubulure de rinçage permanent de l'aiguille d'aspiration (Simon et al. 1993). Cette adaptation évite l'obturation du canal de l'aiguille par de petits caillots de sang, phénomène plus fréquemment observé si l'ovaire est porteur d'un corps jaune fonctionnel.

Le dépôt par trempage d'un film de BSA (Bovine Serum Albumine) sur la face interne des aiguilles ainsi que des tubulures de connexion ne semble pas améliorer le taux de récupération des ovocytes (Baltussen et al 1990).

4.1.4. Les tubulures de connexion

Elles doivent être conçues de manière à éviter autant que possible les turbulences susceptibles de léser les ovocytes ou de réduire le pourcentage de récupération. Leur diamètre est habituellement supérieur au diamètre interne de l'aiguille de ponction et leur rigidité assure une résistance au vide d'aspiration appliqué par la pompe aspirante. Elles sont au préalable rincées au moyen du liquide de récolte (PBS).

4.1.5. La pression d'aspiration

Elle constitue un des principaux facteurs influençant le taux de récupération des ovocytes. Habituellement exprimée en mm de Hg, la pression d'aspiration réellement observée à l'extrémité de l'aiguille est comprise selon les auteurs entre 40 et 150 mm de Hg (Bungartz et al. 1995, Van der Schans et al. 1991, Lindsey et al. 1994, Kruip et al. 1994, Fry et al. 1993, Looney et al. 1994, Meintjes et al. 1995, Brogliatti et Adams 1996, Gibbons et al. 1994, 1995, Bols et al. 1995, Moyo et Dobson 1995). Elle est néanmoins dépendante de différents facteurs tels que le diamètre et la longueur de l'aiguille ou le système de ponction utilisé. Cette pression d'aspiration est parfois exprimée en terme de ml d'eau aspiré en une minute par la pompe d'aspiration. Ainsi, une pression d'aspiration de 110 mm Hg permet d'aspirer respectivement 37 et 46 ml d'eau par minute au moyen d'aiguilles de 19 et 18 G (Bols et al. 1994). Des pressions permettant l'aspiration de 4 à 60 ml d'eau par minute sont habituellement recommandées (Pieterse et al. 1991b, Rath 1993, Bols et al. 1994, Bols et al. 1995, Bungartz et al. 1995, Looney et al. 1995, Brogliatti et Adams 1996, Pieterse et al. 1988, Scott et al. 1994, Vos et al. 1994). La pression d'aspiration doit être à la fois constante et non excessive. Les turbulences induites au niveau des points de jonction entre l'aiguille et le système tubulaire par des variations de la pression d'aspiration ou l'augmentation de la pression d'aspiration qui accélère la progression des ovocytes peuvent contribuer à la perte de cellules de la granuleuse. A l'inverse, une pression d'aspiration trop faible réduira le taux de récupération des ovocytes. Une étude plus spécifique réalisée in vitro a démontré que l'augmentation de la pression d'aspiration de 25 à 100 mmHg contribue à accroître le taux de récupération des ovocytes. Cependant le pourcentage d'ovocytes utilisables pour la fécondation est optimal pour des pressions comprises entre 25 et 50 mm Hg (Fry et al. 1993). Semblable observation a été réalisée par d'autres auteurs. Indépendamment du diamètre de l'aiguille utilisée, une augmentation de la pression d'aspiration de 20 à 56 ml par minute augmente le nombre d'ovocytes

dénudés et diminue celui d'ovocytes compacts (Bols et al. 1994).

4.1.6. Le milieu de récolte

C'est un milieu tamponné au phosphore (PBS) pouvant ou non contenir du sérum foetal ou des antibiotiques. L'addition d'héparine (2 à 5 UI/ml) contribue à limiter la coagulation dans les tubulures et le tube de récolte (Simon et al 1993, Kruip et al 1994, Meintjes et al. 1995). Cependant, le contact prolongé (plus de 60 minutes) des ovocytes avec ce milieu est de nature à en réduire le potentiel de développement. Il convient donc de les placer dès que possible dans un milieu non hépariné.

4.2. La méthode de ponction intravaginale

La position anatomique des ovaires de la vache, situés au bord antérieur du bassin à une largeur de main du col de l'utérus facilite l'utilisation de la méthode dans cette espèce. L'animal placé dans un travail de contention est éventuellement tranquillisé par une injection d'hydrochloride de détomidine (1 mg / 100kgs) (Domosedan RD) ou de xylazine (Rompun RD). Une anesthésie locale (épidurale) permet de réduire les efforts expulsifs de l'animal. Une relaxation plus complète du rectum peut être obtenue par une injection de 4 mg / 100 kgs d'hyoscine-N-butylbromide (Buscopan RD).

Les matières fécales sont évacuées du rectum. Au besoin, la vessie est vidée au moyen d'une sonde de Foley. La région vulvaire est lavée et désinfectée pour éviter tout risque de contamination des ovocytes prélevés. La sonde échographique est guidée au travers de la cavité vaginale jusqu'à son extrémité antérieure paracervicale au moyen d'un guide métallique (Figure 1). L'ovaire manipulé par voie transrectale est amené sur l'extrémité de la sonde échographique. Les follicules présents sur l'ovaire apparaissent sur l'écran de l'échographe sous la forme de zones noires anéchogènes. Le déplacement de l'ovaire et / ou de la sonde permet d'ajuster la position du follicule à ponctionner sur le trajet de l'aiguille de ponction identifié par une ligne sur l'écran de l'échographe. L'aiguille est poussée vers l'avant de manière à traverser successivement la paroi vaginale puis celle du follicule. Une fois la pointe de l'aiguille identifiée aux abords de la cavité folliculaire, l'aspiration est déclenchée: elle se traduit par la disparition progressive de la zone anéchogène folliculaire. Certains auteurs (Pieterse et al. 1988, Scott et al. 1994) ont recommandé de cureter la cavité folliculaire en imprimant des mouvements circulaires à l'aiguille de ponction. Après la ponction, le contenu de chaque tube de récolte est maintenu à une température de 35 à 38°C. Il est filtré et examiné pour isoler et mettre en maturation les ovocytes récupérés.

4.3. Résultats potentiels

Ils sont exprimés par divers paramètres tels que le pourcentage moyen d'ovocytes récupérés par rapport au nombre de follicules ponctionnés, par le nombre moyen d'ovocytes obtenus par session de ponction ou encore par le pourcentage d'embryons obtenus par rapport au nombre d'ovocytes mis en maturation. Les résultats dépendent de multiples facteurs susceptibles d'influencer les manipulations réalisées non seulement *in vivo* mais également *in vitro*. Parmi d'autres, il convient d'insister sur le rôle de l'expérience de l'opérateur, du rythme de prélèvement, de la fréquence de la sonde et donc de son pouvoir de résolution, de l'animal et notamment de son statut génétique et physiologique, des éventuels traitements hormonaux réalisés avant la ponction et d'autres aspects plus techniques déjà évoqués. Les facteurs plus spécifiques influençant la qualité des ovocytes récupérés et donc la possibilité d'en obtenir après fécondation des embryons seront développés dans un chapitre plus spécifique (voir point 26.3.2.).

4.3.1. Données générales

Par rapport au nombre de follicules ponctionnés, le *pourcentage moyen d'ovocytes* récoltés est de 57 % mais varie selon les auteurs entre **19 et 70 %** (Tableau 1)

Selon les auteurs, le *nombre moyen d'ovocytes récupérés par session* de ponction échoguidée *in vivo* est

compris entre 2.8 et 9.7. Appliquée à 200 vaches laitières et à viande, la technique a permis de récupérer en moyenne 6.3 ovocytes par vache dans 98 % des 1006 séances de ponction effectuées. Plusieurs auteurs s'accordent à dire qu'il existe davantage de variations du nombre de follicules ponctionnés (8 à 20) et d'ovocytes récoltés (4 à 11) entre animaux qu'au cours du temps pour un animal donné.

La ponction échoguidée des follicules ne constitue qu'une étape à l'obtention d'embryons. Les ovocytes doivent en effet être mis en maturation puis être fécondés. En moyenne, 82 % des ovocytes récupérés peuvent être mis en maturation (Tableau 2). Selon les auteurs, ce pourcentage est compris entre 41 et 100 %. Il en résulte la maturation d'un ovocyte sur deux en moyenne (49 %) (Tableau 2).

En moyenne, 15 % (3 à 41 % selon les auteurs) des ovocytes mis en maturation atteignent le stade de *morula ou de blastocyste* (Tableau 2). Kruip estime à 2.1 le nombre d'embryons produits par animal et par semaine sur base d'une ponction bihebdomadaire, ce qui représente un nombre annuel moyen 4 fois supérieur à celui autorisé par la superovulation (Kruip et al. 1994). D'une expérience réalisée au moyen de vaches infertiles et après transfert de 813 embryons à des receveuses, Looney obtient 325 gestations soit respectivement 5.1 % de gestations par rapport au nombre de follicules ponctionnés et 39.9 % par rapport au nombre de morulas ou blastocystes obtenus. D'une expérience comparée menée dans le même laboratoire, il ressort que respectivement 30 et 41 % d'embryons ont été obtenus après fécondation d'ovocytes récoltés in vitro et in vivo.

4.3.2. Facteurs d'influence

Differentes fréquences de ponction ont été évaluées. Réalisée en début (J3-J4), au milieu (J9-J10) et en fin de cycle (J15-J16), la technique permet de ponctionner en moyenne 13 follicules par cycle. Le nombre moyen de follicules ponctionnés en début de cycle (4.9) est plus élevé que celui obtenu au milieu (3.4) ou en fin (3.9) de cycle, le taux de récupération des ovocytes étant sensiblement le même et compris entre 50 et 53 % (Pieterse et al. 1991b).

Par rapport à une ponction hebdomadaire, la ponction bihebdomadaire ne réduit ni le nombre de follicules ponctionnables de diamètre supérieur à 2 mm, ni le nombre d'ovocytes récupérés par ponction (Van der Schans et al. 1991, Gibbons et al. 1994, Kruip et al. 1994). Elle offrirait au contraire l'avantage de pouvoir ponctionner une population folliculaire relativement plus homogène. Selon certains auteurs, par rapport à une ponction réalisée toutes les 96 heures, une ponction réalisée toutes les 48 heures augmente le pourcentage d'ovocytes récupérés et celui d'ovocytes morphologiquement intacts (52.6 vs 38.2). Cependant, ce rythme de ponction s'accompagne d'une diminution de la qualité des ovocytes au cours des 2 mois de ponction (Simon et al. 1993). Réalisée par laparoscopie transvaginale, la ponction bihebdomadaire permet par rapport à une ponction hebdomadaire de doubler le nombre d'ovocytes récoltés par semaine (12.2 vs 5.2) (Reichenbach et al. 1994).

L'effet d'une stimulation de la croissance folliculaire au moyen de PMSG ou de FSH a été étudié. Bien qu'elle s'accompagne d'une augmentation du nombre de follicules ponctionnables, elle n'augmente ni le nombre ni le pourcentage d'ovocytes récoltés par rapport au nombre de follicules ponctionnés (Pieterse et al. 1992, Walton et al. 1993, Bungartz et al. 1995). Cependant, selon Looney et al. (1994) , un traitement au moyen de FSH serait plus bénéfique s'il était appliqué à des animaux subfertiles. Elle est par ailleurs sans effet sur le nombre d'ovocytes fécondés ou le nombre d'embryons obtenus (Looney et al. 1994, Bungartz et al. 1995). Ces observations sont sans doute liées au fait que le pourcentage de récupération des ovocytes diminue lorsque le diamètre du follicule ponctionné augmente (Pieterse et al. 1991a). Ainsi des taux de récupération de 58, 53 et 37 % ont été obtenus après ponction de follicules de diamètre respectivement compris entre 3 et 5 mm, 6 et 10 mm ou supérieur à 10 mm (Pieterse et al. 1991b). De même, Van der Schans constate qu'après un traitement au moyen de PMSG, 91.4 % des ovocytes récoltés proviennent de follicules de diamètre compris entre 2 et 5 mm (Van der Schans et al. 1991). Cette observation a été confirmée après ponction in vitro d'ovaires prélevés à l'abattoir. Des taux de récupération de 53 %, 43 % et 47 % ont été obtenus après ponction de follicules de diamètre respectivement compris entre 2 et 4 mm, 5 et 10 mm ou supérieur à 10 mm (Fry et al. 1993). La cause

peut en être trouvée dans le fait qu'une fois ponctionné, la paroi du follicule tend à s'affaisser et à former des replis susceptibles d'emprisonner l'ovocyte (Baltussen et al. 1990) ou de coiffer l'extrémité de l'aiguille ce qui supposerait l'utilisation d'une pression d'aspiration plus élevée lors de ponction de follicules de plus grand diamètre (Vos et al. 1994). Après un traitement de superovulation, le pourcentage de récupération des ovocytes est d'autant plus élevé que la ponction est réalisée tardivement après le pic de l'hormone lutéotrope (LH) (Vos et al. 1994, Stubbings et al. 1990, Callessen et al. 1987). Cette observation a été imputée à la réduction du degré d'adhésion du cumulus proliger à la paroi folliculaire dans les follicules prêts à ovuler (Vos et al. 1994) ou en voie d'atrésie (Pieterse et al. 1988).

D'autres *traitements* ont été évalués. Ainsi, lors de ponction hebdomadaire, l'injection d'une prostaglandine en cas de présence d'un corps jaune, permet l'obtention d'un plus grand nombre d'ovocytes mais réduit leur qualité. Le nombre d'ovocytes reste néanmoins inférieur à celui obtenu lors de ponctions bihebdomadaires (Reichenbach et al. 1994). La suppression de l'effet inhibiteur du follicule dominant par une vaccination contre l'inhibine, ne modifie pas le nombre d'ovocytes obtenus (Fry et al. 1994). Il est possible que l'hormone de croissance (GH: growth hormone) connue pour augmenter le nombre d'embryons transférables après un traitement de superovulation (Gong et al. 1196) puisse offrir de nouvelles perspectives dans le cadre de la fécondation in vitro d'ovocytes prélevés par ponction échoguidée (Bols et al. 1997).

L'effet du *stade de reproduction* a également été étudié. Comparant des génisses et des vaches en lactation, taries ou gestantes, Bungartz observe un nombre moyen de follicules ponctionnables significativement plus élevé chez les vaches en lactation (10.6) et taries (9.3) que chez les vaches gestantes (7.3) ou les génisses (8.1). Le nombre d'ovocytes récoltés n'est cependant pas significativement différent (5.7 à 7.2). Le pourcentage d'ovocytes récoltés est significativement plus élevé chez les vaches taries (74.4 vs 66.3 à 69.9). Enfin, le pourcentage d'embryons obtenus n'est pas significativement différent (11.9 à 22.7 %) entre les quatre groupes comprenant il est vrai un nombre limité d'animaux (4 à 6) (Bungartz et al. 1995).

4.4. Conséquences possibles

A *court terme*, les effets de la ponction sur le cycle oestral apparaissent dépendre de sa fréquence. A la différence d'une ponction bihebdomadaire, la ponction hebdomadaire n'interfère pas avec la cyclicité de l'animal (Gibbons et al. 1994). Réalisée trois fois par cycle, la ponction n'en entraîne l'allongement que dans 7 % des cas (Pieterse et al 1991b). La raison peut en être trouvée dans le fait qu'à la différence de l'électrocautérisation (Villa-Godoy et al. 1985), la ponction folliculaire ne lèse pas les cellules de la granuleuse et par conséquent n'interfère pas avec les mécanismes hormonaux de la lutéolyse et du développement lutéal. Cependant, réalisée à intervalles inférieurs à 5 jours (ponction bi-hebdomadaire), elle s'accompagne d'un état d'anoestrus de l'animal pendant la durée de la ponction (Gibbons et al. 1994, Kruip et al. 1994). Par ailleurs, un effet indirect de la ponction sur le rythme de croissance folliculaire n'est pas à exclure. En effet, le nombre de cycles présentant 3 vagues de croissance folliculaire se trouve significativement augmenté après ponction (Pieterse et al. 1991b). De même, parce qu'elle empêche l'émergence du follicule dominant, la ponction bihebdomadaire favoriserait le recrutement d'une population plus homogène de petits follicules (Bungartz et al. 1995).

A *moyen terme*, après application sur le même animal pendant 5 mois, la ponction bihebdomadaire est sans effet sur la cyclicité ultérieure de l'animal qui par la suite peut encore donner naissance à des veaux (Kruip et al. 1994). Semblable observation a été effectuée après ponction de génisses prépubères (Looney et al. 1995).

Les conséquences sur l'ovaire lui-même sont également mineures puisque seul un épaisseissement de la capsule ovarienne a été décrit même après 3 à 5 mois de ponctions bihebdomadaires (Pieterse et al 1991b, Van der Schans et al 1991, Simon et al 1993, Kruip et al. 1994, Meintjes et al. 1995). Certains auteurs ont identifié la formation possible d'un hématome au sein des follicules ponctionnés surtout si leur diamètre était égal ou supérieur à 11 mm (Bergfelt et al. 1994). Il est intéressant de noter

également qu'à la différence de la jument (Carnevale et al. 1987), la lutéinisation du follicule ponctionné n'est habituellement pas observée chez la vache (Pieterse et al. 1988, Pieterse et al. 1991a,b , Bergfelt et al. 1994).

De manière plus spécifique, la ponction réalisée de manière répétée au cours de l'oestrus provoqué par l'administration d'une prostaglandine à des animaux superovulés, n'induit aucune variation du délai d'apparition du pic de LH (Vos et al. 1994). Cette observation exclut la possibilité d'un effet stressant de la ponction médié par les corticoïdes (Edwards et al. 1987).

4.4.1. Autres champs d'applications potentiels

Bien qu'appliqué en priorité à des animaux cyclés, le prélèvement d'ovocytes a également été réalisé chez des *animaux prépubères* soit par laparoscopie chez des veaux âgés de 3 à 9 semaines (Armstrong et al. 1991, Armstrong et al. 1992, Armstrong et al. 1994) ou par échographie sur des veaux âgés de 6 à 16 semaines (Brogliatti et Adams 1996) ou de 6 à 9 mois (Looney et al. 1995). Il a également été appliqué chez des animaux gestants tant par laparotomie (Ryan et al 1990, Ryan et al 1993) que par ponction échoguidée (Ryan et al.1990, Ryan et al.1993, Meintjes et al 1993).

Le prélèvement d'ovocytes à des animaux prépubères offre l'avantage de contribuer à réduire l'intervalle entre générations et donc d'améliorer le gain génétique annuel. Il pose néanmoins le double problème d'adapter le système de ponction à l'anatomie vaginale de l'animal et de réaliser une ponction sans pouvoir fixer l'ovaire. Moyennant l'adaptation d'une sonde de 5 MHz convexe à usage humain, de diamètre de 2.5 cm et d'une longueur de 39 cm, certains auteurs sont cependant parvenus en plaçant l'animal en position debout ou en décubitus dorsal à prélever des ovocytes avec ou sans stimulation ovarienne préalable. Des essais de fixation des ovaires au moyen d'une cuillère à usage transrectal ou de forceps transvaginaux se sont révélés infructueux. La méthode requiert une expérience certaine mais peut être appliquée aux brebis, chèvres et lamas. Par ailleurs, l'impossibilité de fixer les ovaires suppose l'emploi d'aiguilles particulièrement bien aiguisées. Il est vrai qu'en décubitus dorsal, une pression exercée sur l'abdomen de l'animal contribue à immobiliser les ovaires (Brogliatti et Adams 1996). Il semblerait cependant qu'en l'état actuel des connaissances (Duby et al. 1996), la technique de la FIV (Fécondation In Vitro) doive davantage être réservée aux animaux âgés de plus de 6 mois. En effet, plusieurs différences physiologiques ont à ce jour été observées entre les veaux de moins de 6 mois et les animaux plus âgés. Elles concernent le synchronisme du développement de la population folliculaire, l'apparition des compétences cytoplasmiques et/ou nucléaires des ovocytes, la libération des hormones hypophysaires LH et FSH et la libération du Ca, second messager impliqué dans le mécanisme de la fertilisation.

Par rapport à un schéma de superovulation et de récolte d'embryons in vivo, la ponction des follicules chez les *animaux gestants* offre l'avantage de ne pas interférer avec l'intervalle entre vêlages. Elle peut être réalisée après une stimulation ovarienne puisqu'il fut démontré que des traitements avec de la FSH (Ryan et al. 1993) ou avec de la PMSG (Casida et al. 1943) n'interfèrent pas avec la longueur de gestation ou la fonction hormonale progestéronique. De fait, après un traitement au moyen de 40 UA (Unite Armour) de FSH, le nombre de follicules ponctionnables (de diamètre supérieur ou égal à 2 mm et d'ovocytes de qualité s'est avéré être équivalent chez des vaches non-gestantes ou gestantes de 60 à 95 jours (Meintjes et al. 1995). Appliquée pendant le 1^{er} trimestre de la gestation, elle ne s'est accompagnée d'aucun risque d'avortement ou de néomortalité (Meintjes et al. 1995).

Bien que la ponction échoguidée soit à l'heure actuelle principalement utilisée en vue de la récupération des ovocytes, cette méthode est susceptible de connaître des *applications cliniques* plus étendues dont les plus importantes à ce jour sont l'étude hormonale des liquides folliculaire (Vos et al. 1994), allantoïdien ou amniotique, l'amélioration de la réponse aux traitements de superovulation, l'optimisation de la régulation du cycle sexuel ou le sexage de l'embryon et du foetus.

Par rapport à d'autres méthodes de ponction réalisées par laparotomie (Leibo et Rall 1990) ou par la voie transsacroischiatische, transischiorectale (Eaglesome et Mitchell 1977) ou transvaginale (Sprecher et Kaneene 1992), la ponction échoguidée offre l'avantage de pouvoir prélever de manière répétitive

jusqu'au 3^{ème} mois de gestation du liquide allantoïdien ou amniotique dès respectivement le 32^{ème} et le 44^{ème} jour de gestation (Vos et al. 1990) et de réduire les risques de mortalité embryonnaire ou d'avortement que peuvent entraîner ces prélèvements. Il n'est pas illusoire de penser que cette méthode puisse constituer une alternative intéressante au sexage de l'embryon par échographie.

Plusieurs recherches ont identifié le rôle inhibiteur du follicule dominant de chaque vague folliculaire sur la croissance des autres follicules et donc sur la réponse aux traitements de superovulation (Guilbaut et al. 1991, Huhtinen et al. 1992, Bungartz et Niemann 1994). Réalisée initialement par ovariectomie unilatérale (Staigmiller et al 1982) ou par électrocautérisation (Ko et al 1991), la suppression de l'activité inhibitrice du follicule dominant a par la suite été effectuée par sa ponction échoguidée (Bungartz et Niemann 1994), méthode moins invasive et plus répétable que les précédentes. Cette intervention se traduit selon plusieurs auteurs par une augmentation du nombre d'embryons chez des vaches superovulées qui ne répondaient que faiblement aux traitements (Adams 1994, Lindsey et al 1994).

Les variations de l'intervalle entre l'injection d'une prostaglandine et l'ovulation ont été attribuées au statut folliculaire présent lors du traitement inducteur (Sirois et Fortune 1988, Savio et al. 1990, Kastelic et Ginther 1991). Ainsi, si la lutéolyse est induite avant que le follicule dominant ne devienne atrétique, l'ovulation apparaît-elle plus précocement. A l'inverse, elle sera différée si l'injection de prostaglandine est réalisée après que le follicule dominant ait entamé son atrésie. Elle résulte vraisemblablement dans ce cas de l'ovulation du follicule dominant issu de la vague folliculaire suivante (Savio et al. 1990, Kastelic et Ginther 1991, Ko et al. 1991).

De même, selon certains auteurs, la ponction des follicules de diamètre supérieur ou égal à 5 mm 4 jours avant l'injection d'une prostaglandine entraîne une meilleure synchronisation des génisses ainsi traitées (81 % d'ovulation dans les 5 jours contre 53 % chez les génisses non ponctionnées). De même, quel que soit le stade du cycle auquel la ponction a été réalisée, on observe une nouvelle vague de croissance folliculaire dans les deux jours suivant la ponction des follicules de diamètre égal ou supérieur à 5 mm (Bergfelt et al 1994).

Il a été également démontré que la ponction échoguidée constituait une méthode alternative intéressante pour la production d'animaux transgéniques étant donné qu'elle offre la possibilité de mieux contrôler le statut sanitaire et génétique des animaux prélevés *in vivo* (Gibbons et al. 1995).

Enfin, la ponction échoguidée est également progressivement appliquée à *d'autres espèces animales* telles que la jument (Hinrichs et Kenney 1987, Bruck et al. 1992, Cook et al. 1992, Bracher et al. 1993, Gastal et Ginther 1995) et la chèvre (Graff et 1995).

4.5. Intérêt de l'OPU

La technique de 1'OPU-FIV présente trois intérêts principaux pour la sélection. A raison de deux sessions d'OPU par semaine et d'environ 1,5 embryon transférable par session, le nombre de veaux qui peut être obtenu par unité de temps est pratiquement multiplié par 4 par rapport au nombre de veaux produits après superovulation et collecte classique. L1 devient donc possible d'augmenter encore la pression de sélection sur les mères à taureaux. Le deuxième intérêt est d'améliorer l'efficacité de la sélection même en raisonnant à niveau constant de prolificité. En effet, l' OPU-FIV permet de réaliser des « accouplements in vitro » et donc de mieux planifier le choix des reproducteurs mâles (à la limite ovocyte par ovocyte). On peut en particulier augmenter considérablement le nombre de mâles accouplés à une même femelle, nombre qui n'est pas très élevé en superovulation classique (égal au maximum au nombre de collectes). Ceci a pour effet d'améliorer la précision des index de sélection (meilleure « connexion » entre reproducteurs) et surtout de diminuer la parenté moyenne entre les produits de la génération suivante, ceux-ci ayant plus rarement leurs deux parents communs. De ce fait, le taux de consanguinité à long terme est diminué et avec lui le risque de voir apparaître une fixation fortuite de gènes à effets défavorables. Wooliams (1989) montre déjà avec la superovulation classique, qu'on a tout intérêt à changer de taureau à chaque collecte. Un troisième intérêt potentiel de 1'OPU-FIV est l' devient possible d'obtenir des descendants des femelles qui ne répondent pas à la superovulation. On ne dispose toutefois pas encore de données suffisantes sur les performances de telles femelles pour la

production d'embryons in vitro. En cumulant tous les effets positifs de l'OPU-FTV pour la sélection (et en anticipant sur son intérêt potentiel), Leitch et al (1995) trouvent que le rythme de progrès génétique annuel avec un schéma OPU-FIV est supérieur de 10 à 30 % à celui d'un schéma avec superovulation et fécondation in vivo, les donneuses ayant le même âge dans les deux cas. L'OPU-FTV permet aussi de diminuer l'âge des donneuses par rapport à la production d'embryons in vivo car il est possible d'effectuer des ponctions répétées d'ovocytes dès l'âge de 9 mois. Ceci pourrait être considéré comme un avantage pour la réduction de l'intervalle de génération dans un programme de sélection. Mais même en admettant que de tels ovocytes aient des probabilités de fécondation non diminuées, ce qui fait encore l'objet de données contradictoires (Reve et al. 1995, Lazzari et al 1996), l'effet d'un tel raccourcissement de l'intervalle de génération serait nul sur le progrès génétique annuel. En effet, les descendants naîtraient beaucoup trop tôt par rapport à la connaissance des performances de la donneuse (lactation notamment) et celle-ci serait donc insuffisamment sélectionnée, parce qu'évaluée avec une précision trop faible. L'OPU-FTV est incontestablement une technique dont peuvent bénéficier les schémas d'amélioration génétique des reproducteurs. Il importe maintenant de définir les conditions de mise en œuvre pour son développement, notamment en ce qui concerne les normes techniques et sanitaires à respecter lors des sessions de ponction. Il reste aussi à confirmer qu'une organisation efficace d'un atelier de production d'embryons in vitro permet bien de ramener le coût du veau à celui que l'on obtient aujourd'hui en transplantation embryonnaire classique. Mais il faudra pour cela améliorer les méthodes de congélation de ces embryons, dont les taux de survie après décongélation sont aujourd'hui encore largement inférieurs à ceux des embryons produits in vivo.

5. La qualité des ovocytes

5.1. Critères de détermination

La *sélection des ovocytes* repose essentiellement sur des critères morphologiques (microscope optique) ou ultrastructurels (microscope électronique) du Cumulus Oocyte Complex (COC). Les ovocytes bovins immatures peuvent être répartis en 4 catégories (de Loos Gamete Research 1989,24,197-204) selon le degré de compacité des cellules du cumulus et de transparence de l'ooplasme. Il semble évident que les différences éventuellement identifiées lors de l'examen peuvent être attribuées à des stades divers de maturation, celle-ci s'accompagnant d'importantes modifications de surface et donc de contact entre l'ovocyte proprement dit et les cellules du cumulus (Suzuki et al. Theriogenology,1994,41,303):

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

La présence du cumulus pendant au moins 12 heures est plus essentielle à la maturation cytoplasmique de l'ovocyte (Chian et Niwa Theriogenology,1994,41,176) qu'à sa maturation nucléaire (Kim et al. Theriogenology,1996,45,278). Une preuve indirecte en est donnée par l'effet positif exercé par l'addition de cellules de la granuleuse au milieu de maturation des ovocytes (Konishi et al. Theriogenology,1996,45,573-581). A l'inverse, les ovocytes nus sont beaucoup moins fertiles (Liu et al. Theriogenology,1995,43,267).

5.2. Facteurs d'influence

Les facteurs d'influence de la qualité ovocytaire se situent à trois niveaux (Bols et de Kruif 1998): l'animal donneur lui-même c'est-à-dire sa race, son âge, le stade du cycle auquel il a été ponctionné, son état corporel ; l'ovaire à savoir le stade de la dynamique folliculaire au moment de la ponction et le type

de follicule ponctionné et enfin le follicule lui-même c'est-à-dire son environnement hormonal interne.

5.2.1. L'animal donneur

Le développement des ovocytes semble dépendre du *stade du cycle* auquel ils ont été obtenus. Ainsi, le pourcentage de blastocystes est significativement plus élevé après fécondation d'ovocytes obtenus entre les jours 14 et 16 du cycle (24 %) qu'entre les jours 7 et (13 %) ou 19 et 20 (7 %). Leur développement est également plus rapide s'ils proviennent de follicules ponctionnés entre les jours 14 et 16 (Machatkova et al. Theriogenology 1995,44,801-810 ; Boediono et al. Theriogenology 1995,43,169).

L'effet du *stade de reproduction* a été étudié. Selon certains auteurs (Moreno et al. Theriogenology 1993, 39,271) mais pas pour d'autres (Thonon et al. Theriogenology 1993,39,330), la qualité des ovocytes prélevé chez animaux gestants seraient supérieure à celle des ovocytes obtenus sur des animaux non-gestants. La cause pourrait en être trouvée dans la présence d'une population folliculaire différente. Ainsi, lors de gestation, le nombre de follicules de taille moyenne (5 à 9 mm) ou de grande taille (> 10 mm) serait moindre, le nombre de petits follicules étant la même (Dominguez Theriogenology 1995,43,1405-1418). La présence d'un corps jaune sur l'ovaire ponctionné pourrait avoir (Thonon et al. Theriogenology, 1993, 39,330) ou serait sans influence (Fukui et Sakuma Biol.Reprod.1980, 22,669-673) sur la maturation des ovocytes obtenus. Ainsi le taux de développement des ovocytes diminue-t-il selon qu'ils proviennent d'ovaires porteurs d'un corps jaune cyclique, d'ovaires provenant d'animaux cyclés mais non porteurs de corps jaune, de génisses prépubères ou d'animaux gestants (Thonon et al. 1993). Comparant des génisses et des vaches en lactation, taries ou gestantes, Bungartz n'observe pas de différences significatives du pourcentage d'embryons obtenus (11.9 à 22.7 %) entre les quatre d'animaux qui étaient il est vrai en nombre limité (4 à 6).

Un état corporel insuffisant (inférieur à 3) réduit les chances de maturation des ovocytes d'obtention de blastocystes (Lopez-Ruiz et al. Theriogenology 1996,45,292). De même une augmentation du score corporel s'accompagne-t-elle de celle du nombre d'ovocytes normaux et de celui de petits follicules (Dominguez Theriogenology 1995,43,1405-1418).

L'effet de la *race* a été peu étudié. Les races européennes ont significativement plus de gros follicules que les Zébus ou que les animaux issus de croisement (Dominguez Theriogenology 1995, 43,1405-1418). La race Holstein donne davantage de COC par ovaire que les Zébus mais leur taux de clivage est inférieur (de Armas et al. 1994, Theriogenology,199441,186).

L'effet potentiel de *l'âge* a également été envisagé. Le nombre de follicules et la qualité des COC obtenus seraient similaires entre des vaches âgées de 3 à 8 ans ou de 9 à 17 ans (Katska et SmoragAnim.Reprod.Sci.,1984,7,451-460). Par contre il est bien démontré que le nombre de blastocystes et le pourcentage de gestation après le transfert d'ovocytes prélevés sur des veaux est bien moindre que ceux enregistrés avec des ovocytes obtenus sur des animaux adultes (Revel et al. J.Reprod.Fert.,1995,103,115-120 ; Rick et al. 1996,45,356 ; Brogliatti et al. Theriogenology,1995,43,177).

L'absence de réponse à des traitements de superovulation ne laisse présumer en rien un échec éventuel lors de la ponction de l'animal. En effet, récemment il a été prouvé que le taux de blastocystes transférables obtenus après ponction de 200 donneuses d'embryons n'ayant plus répondu depuis au moins un an à des traitements de superovulation était comparable à celui obtenu chez des animaux normalement cyclés. Semblable conclusion a été apportée après application de la technique à des animaux infertiles (Looney et al. Theriogenology, 1994,41,67-72).

5.2.2. L'ovaire et le follicule

La capacité de l'ovocyte à accomplir sa maturation nucléaire et cytoplasmique s'acquiert progressivement au cours du développement folliculaire. Il est donc essentiel de pouvoir juger de la qualité des follicules dont proviennent les ovocytes. Cette qualité est le plus souvent évaluée sur base de critères morphologiques, qu'ils soient de nature anatomique (diamètre, aspect macroscopique..) ou

histologique ou sur base de critères hormonaux. On comprend aisément que le choix de l'un ou l'autre critère dépend étroitement des conditions de prélèvement (in vivo ou in vitro) des ovocytes.

Physiologiquement, trois types de follicules peuvent être distingués : les *follicules non-atréтиques*. Ils se caractérisent par l'absence de signes de dégénérescence, une abondance de figures mitotiques dans le cumulus oophorus, une membrane basale continue et la présence d'un ovocyte normalement développé. Au microscope, ces follicules apparaissent uniformément brillants, transparents, bien vascularisés et possédant une couche de cellules granuleuses uniforme sans que des particules flottantes ne puissent être identifiées dans le liquide folliculaire. Des signes de dégénérescence et une réduction du nombre de mitoses sont visibles dans les *follicules dit légèrement atrétiques*. Dans les *follicules atrétiques*, le nombre de cellules dégénérées augmente, la membrane basale est désorganisée et des macrophages apparaissent dans la cavité folliculaire.

En moyenne on estime que 50 à 85 % des follicules présents sur l'ovaire sont plus ou moins atrétiques (Lussier 1987, Kruip 1982). Ce pourcentage dépend de leur taille. L'atrésie concerne davantage les follicules de grand que de petit diamètre. Lussier (1987) en a précisé l'importance (Tableau 3).

5.2.2.1. Aspects morphologiques

Comparant la transparence de follicules de diamètre supérieur à 5 mm, Grimes et Ireland (Biol.Reprod.,1987,35,725-732), obtiennent davantage d'ovocytes matures de follicules transparents que de follicules présentant un certain degré d'opacité. Par ailleurs, il semble bien démontré que la qualité des ovocytes dépend essentiellement de la taille des follicules dont ils sont issus (Lonergan et al. 1994, Pavlok et al. Molecular Reproduction and Dévelopment,1992,31,63-67 ; Blondin et Sirard Theriogenology,1994,41,164, Fukui et Sakuma 1980). Les ovocytes provenant de follicules de diamètre supérieur à 5 voire 6 mm produisent davantage d'embryons que ceux provenant de follicules dont le diamètre est compris entre 2 et 6 mm voire dont le diamètre est inférieur à 2 mm. Etudiant la qualité des ovocytes provenant de follicules de diamètre supérieur à 8 mm, Stubbings constate que les ovocytes matures proviennent le plus souvent de follicules dont le volume est d'au moins 0.3 ml (10 mm de diamètre moyen) (Stubbings et al. Anim.Reprod.Sci.,1990,23,181-195). La cause peut en être trouvée dans le fait qu'in vivo, la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte s'étale sur plusieurs jours, temps nécessaire à la croissance du follicule d'une taille comprise entre 2 et 6 mm et une taille préovulatoire (10 à 20 mm). In vitro, ces événements s'étalement sur moins de 24 heures. L'influence de divers facteurs hormonaux intrafolliculaires (hormones stéroïdiennes, facteurs de croissance...) s'en trouve donc modifiée.

Classiquement, les ovocytes de bonne qualité proviennent des follicules non-atrétiques (Wurth et Kruip Proc.12th Intern.Congress Anim Reprod.,1992,1,387-389) ou de follicules en voie d'atrésie (Blondi et Sirard Molecular Reproduction and Dévelopment 1995,41,54-62). L'explication en serait que la paroi des follicules non-atrétiques secrèterait une substance inhibitrice de la maturation cytoplasmique. Cette inhibition étant en tout ou partiellement levée dans les follicules en voie d'atrésie, le cytoplasme de ces ovocytes apparaît plus granuleux et les cellules du cumulus présentent un début d'expansion.

Il est vraisemblable que la mise au point de milieux de maturation plus adaptés au stade du développement folliculaire sera à l'avenir de nature à augmenter le nombre d'ovocytes capables d'être maturés in vitro. De même, il faudra poursuivre l'étude des facteurs et milieux adaptés au développement des ovocytes prélevés au stade préantral de développement des follicules de manière à optimiser le potentiel ovocytaire ovarien.

En pratique, dans le cadre de l'OPU, la possibilité de déterminer par échographie le diamètre du follicule voire l'identification d'un aspect transparent ou au contraire semi-opaque voire opaque représente un atout majeur dans l'évaluation indirecte de la qualité de l'ovocyte.

5.2.2.2. Aspects hormonaux

La croissance du follicule dominant a été associée à l'augmentation des concentrations en oestradiol 17beta et en progestérone (Assey et al. Molecular Reproduction and Development, 1994,37,335-344), le

rapport entre ces deux hormones augmentant dans les follicules dominants mais diminuant dans les follicules dominés. Par ailleurs on sait que la concentration en oestradiol diminue dans tous les follicules en voie de dégénérescence quelque soit leur taille (Kruip et Dieleman Reproduction, Nutrition and Development 1982,22,465-473). Les follicules dit non-atrétiques de taille inférieure à 8 mm sont sous influence androgénique tandis que ceux de taille supérieure à 11 mm sont sous influence oestrogénique. La dégénérescence s'accompagne d'une diminution progressive des concentrations folliculaires en oestradiol et androgènes et en une augmentation en progestérone (Kruip et Dieleman Theriogenology, 1985,24,395-408). Cette observation se trouve confirmée par le fait que davantage de blastocystes sont obtenus à partir d'ovocytes provenant de follicules dont le taux de progestérone était faible (Hazeleger et al. Theriogenology, 1995,43,509-522). En pratique, cette détermination des concentrations hormonales n'est que ponctuellement possible et ne peut être envisagée comme critère de sélection des follicules à ponctionner.

6. La maturation des ovocytes

6.1. Processus de la maturation in vivo : rappels

Les ovocytes présents dans les follicules vont devoir avant d'être éventuellement fécondés subir deux divisions méiotiques (ovocyte I : prophase I, métaphase I, anaphase I, télophase I et ovocyte II : prophase II, métaphase II, anaphase II et télophase II respectivement). A la naissance, les ovocytes primaires se trouvent bloqués en prophase I de la première division méiotique. Leur développement ultérieur est un processus biologique complexe appelé maturation ovocytaire. Elle comprend l'ensemble des modifications cytologiques et métaboliques permettant l'acquisition par l'ovocyte I de l'aptitude à être reconnu et pénétré par le spermatozoïde, à assurer la formation des pronucleus mâle et femelle et à permettre grâce à ses réserves (ARNm, ribosomes, protéines élaborés pendant la phase de croissance) le début du développement embryonnaire. Elle implique des modifications nucléaires, cytoplasmiques et membranaires de l'ovocyte I. Ce phénomène est rare puisqu'il ne concerne qu'un % environ des follicules présents sur l'ovaire.

Lorsque l'ovocyte a atteint 80 % de sa taille finale (0.15 mm environ), il a acquis la compétence ou l'aptitude à réaliser sa *maturation nucléaire* proprement dite c'est-à-dire la reprise de la méiose. Celle-ci correspond à la disparition de la membrane nucléaire (Germinal Vesicle Membrane Breakdown), à la condensation des chromosomes et finalement à l'émission du premier globule polaire: l'ovocyte I se transforme en ovocyte II. Lors du cycle sexuel, la maturation nucléaire survient 4 à 8 heures après la décharge ovulatoire de LH (Kruip et al. 1983 Gamete Research 1983, 8,29). Elle prend fin 24 heures plus tard environ juste avant l'ovulation lors de l'émission du premier globule polaire dans l'espace périvitellin ovocytaire. L'ovocyte II restera bloqué en métaphase de la deuxième division méiotique jusqu'au moment de sa pénétration par le spermatozoïde. La reprise de la division méiotique n'a pas lieu tant que l'ovocyte reste en contact avec les cellules de la granuleuse. Ce fait laisse supposer l'intervention de facteurs inhibiteurs de la méiose tels l'AMPc cyclique, le ou les OMI (Oocyte Meiosis Inhibitor) et les nucléosides puriques: hypoxanthine et adénosine. Il semblerait néanmoins que plus que de l'action de facteurs inhibiteurs, cette reprise de la méiose soit sous le contrôle d'un facteur inducteur appelé MPF (Meiotic Promoting Factor) ou encore MIS (Meiotic Inducing Substance).

La *maturation cytoplasmique* de l'ovocyte se caractérise par la multiplication des mitochondries, par l'apparition d'un appareil de Golgi bien développé, et par la migration des granules corticaux vers la périphérie de l'ovocyte, juste sous la membrane plasmique. Ces granules contiennent une ovoperoxidase qui lors de la fécondation a pour effet d'empêcher la pénétration de spermatozoïdes supplémentaires et dès lors de prévenir la polyspermie. Le cytoplasme est également le siège d'importantes protéosynthèses préparant l'ovocyte à une éventuelle fécondation et contribuant au développement précoce de l'embryon.

La *maturation membranaire* comprend l'ensemble des processus permettant la reconnaissance spécifique de l'ovocyte par le spermatozoïde. La membrane pellucide synthétisée pendant la croissance

ovocytaire joue un rôle important lors de la fertilisation. Elle doit notamment ne laisser pénétrer dans l'ovocyte que le spermatozoïde fécondant, favoriser et préparer la fusion spermatozoïde-ovule et protéger l'ovocyte contre la polyspermie. La zone pellucide est constituée à 95 % de trois glycoprotéines, organisées en longs filaments interconnectés, appelées ZP1, ZP2, ZP3. La ZP3 forme avec la ZP2 des filaments qui sont pontés par la ZP1. Seule la glycoprotéine ZP 3 est reconnue par le spermatozoïde et déclenche la réaction acrosomique. La ZP2 intervient lors de la fécondation en fixant transitoirement la tête du spermatozoïde pendant que celui-ci traverse la zone pellucide. La ZP1, composant le moins abondant (10 %), assure la stabilité de la zone pellucide jusqu'au stade blastocyttaire.

6.2. La maturation in vitro (MIV)

Diverses **méthodes** ont été proposées . Une première possibilité est de réaliser cette maturation ovocytaire en plaçant les follicules disséqués dans un milieu de culture. Cette méthode réservée aux follicules de petit diamètre (1 à 2 mm) requiert une expérience certaine. Dans l'espèce équine certains auteurs ont avec succès réussi le transfert d'ovocytes sur des follicules préovulatoires de juments, celles-ci étant ensuite récoltées après insémination. Habituellement cependant, les ovocytes sont placés en maturation par groupe de 10 à 20 dans des micropuits renfermant de 50 à 100 microlitres de milieu. Il est bien démontré que la température de maturation ovocytaire comme celle assurant une pénétration optimale des spermatozoïdes lors de la fécondation est de 39°C.

La maturation in vitro des ovocytes est soumise à l'influence de nombreux facteurs dont la plupart restent à préciser. En effet, alors qu'en moyenne 60 à 85 % des ovocytes maturés in vitro sont fécondés et se divisent, seuls 25 à 30 % atteignent le stade blastocyste. La réussite de la MIV dépend de nombreux facteurs dont un des plus importants est la technique de maturation et en particulier la composition du milieu de culture utilisé. En effet, 50,3 % des ovocytes maturés in vivo atteignent après fécondation in vitro le stade de blastocyste . Lors de maturation in vitro ce pourcentage est de 29,8 % (Van de Leemput EE Final follicular maturation in the cow and its effect on the developmental potential of the oocyte. Thesis Utrecht University, The Netherlands, 1994) . D'autres facteurs d'influence ont été décrits dans le chapitre plus spécifique consacré à la ponction échoguidée (Voir chapitre 26.3.2).

La plupart des milieux de culture cellulaires sont aptes à assurer la maturation ovocytaire et la réaction acrosomique des spermatozoïdes. Il en est de simples et de complexes. Les plus couramment employés sont le milieu 199, le TALP (Tyrode albumine lactate pyruvate) et le Krebs Ringer bicarbonate. Le plus souvent, les milieux de maturation renferme du sérum. Celui-ci peut être du sérum foetal (FCS Fetus Calf Serum), de taureau castré, de vache superovulée, en proœstrus ou en œstrus (ECS : Estrus Cow Serum). L'origine du sérum utilisé ne semble pas influencer les résultats obtenus. De même, l'addition de liquide folliculaire (bFF : bovine Follicular Fluid) à la concentration maximale de 20 % a également été préconisée. A plus forte concentration, ce liquide aurait un effet inhibiteur sur la reprise de la méiose et donc empêcherait la maturation ovocytaire. Compte tenu des risques sanitaires que comportent l'utilisation de sérum (BSE ?), des substituts de sérum ont été recommandés (Exemple : l'Ultroser G). Le problème réside dans la détermination aussi précise que possible de leur composition qualitative et quantitative. De même et pour les mêmes raisons, des essais de maturation dans des milieux ne renfermant pas de sérum ont été envisagés. L'addition de *cellules de la granuleuse voire de cellules thécales*, provenant éventuellement d'autres espèces a également été recommandée. L'addition de *substances tampons* (bicarbonate, pyruvate, lactate et glucose) dépendra notamment de la mise en place ou non de ces milieux dans une étuve exposée à l'air ou à un flux de CO₂. Les milieux seront exempts d'*endotoxines*.

Les milieux plus complexes renferment en outre divers *acides aminés* (glycine présente à grandes concentrations dans l'oviducte) et *des vitamines* (acide ascorbique au pouvoir antioxydant), de *l'albumine, des antibiotiques* (pénicilline G, aminosides), des *agents ionophores*, de *l'adrénaline* pour ses effets de capacitation et de stimulation de la mobilité des spermatozoïdes, de *la caféine* ou de *la théophylline* pour également leurs effets de stimulation de la mobilité des spermatozoïdes ou le plus souvent de *l'héparine* (effet de capacitation). Cette glycosaminoglycans est présente dans le milieu folliculaire. Elle favorise la capacitation à faibles doses mais l'inhibe à doses élevées. Ces milieux simples

ou complexes de distinguent par la concentration de leurs constituants. Les uns comme les autres doivent être préparés au moyen d'une eau ultrapure, distillée, désionisée et débarrassée de ses germes et éléments pyrogènes (Système Millipore). Leur pH doit être ajusté à 7.4 et leur pression osmotique sera comprise entre 280 et 300 mOsmoles/kg d'eau.

La plupart des auteurs démontrent l'importance d'une *complémentation hormonale*. L'efficacité de l'addition d'hormone LH a été reconnue. L'addition de FSH serait plus de nature à favoriser les premiers stades du développement embryonnaire que la phase de maturation proprement dite. La prolactine serait sans effet. Dans l'espèce porcine, certains auteurs ont observé un effet favorable de l'insuline et de l'hormone de croissance. Le rôle potentiel de l'inhibine, de l'activine, de l'ocytocine, des cytokines et des facteurs de croissance restent à démontrer.

Notre laboratoire utilise du milieu 199 additionné d'ECS (20 %) et d'extraits hypophysaires (5 mcg de LH / ml et 0.5 mcg de FSH / ml).

6.3. Evaluation de la maturation ovocytaire

In vitro, l'ovocyte placé dans des conditions optimales et donc soustrait à l'influence inhibitrice du milieu folliculaire et de l'OMI (Oocyte Maturation Inhibiting factor) en particulier, reprend *spontanément* sa division méiotique (Edwards Nature 1965,208 :349-351). L'expulsion du premier globule polaire (fin de la maturation) prend habituellement 18 à 24 heures. Elle peut néanmoins déjà s'observer après 3 à 12 heures de culture. On peut à ce moment aisément différencier la membrane pellucide, le noyau, et l'espace périvitellin renfermant le premier globule polaire. Morphologiquement, les cellules du cumulus apparaissent beaucoup plus dispersées (trois fois le diamètre de l'ovocyte c'est-à-dire plus de 300 microns) (=cumulus expansion) sous l'effet semble-t-il de l'acide hyaluronique sécrété par les cellules de la granuleuse en réponse à la libération de l'hormone LH. Cette expansion s'accompagne également d'une mucification plus intense des cellules. Elle facilite l'ovulation et le passage des spermatozoïdes.

L'absence de globule polaire n'implique pas nécessairement l'absence de maturation nucléaire. Au sein du noyau on peut observer également la migration centrale des vésicules, mitochondries et autres gouttelettes lipidiques, donnant à ce dernier un aspect plus condensé. Il est cependant difficile de conclure à la maturation de l'ovocyte sur son seul examen morphologique. Un complément d'information sera obtenu après coloration à base d'une solution de Tyrode et de fuchsine. Le critère définitif sera néanmoins le développement de l'ovocyte fécondé jusqu'au stade blastocyste.

6.4. Particularités d'espèces

Comme chez la vache, la maturation ovocytaire s'observe chez la *brebis* et la *chèvre* au bout de 24 heures. Il semblerait par ailleurs, que le stockage des ovaires à 22°C après leur prélèvement soit de nature à augmenter les résultats. L'addition d'hormones (LH, FSH) au milieu de maturation aurait davantage d'effets favorables dans l'espèce caprine qu'ovine.

Dans l'espèce porcine, le prélèvement d'ovocytes par aspiration ou par dissection des ovaires permet l'obtention respectivement de 8 et 45 ovocytes par ovaire. Plus que chez les ruminants, l'addition au milieu de maturation d'un grand nombre de cellules granuleuses favoriserait les résultats. Chez le porc, la durée de la maturation ovocytaire est plus longue : 42 à 44 heures. Le rôle favorisant de l'addition de cystéine et d'EGF a plus souvent été reconnu dans cette espèce.

La maturation de l'ovocyte de *jument* nécessiterait 36 heures. A la différence des ruminants et de la truie, cette espèce ne présente pas de pic préovulatoire de LH. La maturation de l'ovocyte serait optimisée par la présence dans le milieu de cellules thécales.

7. Capacitation des spermatozoïdes et FIV

7.1.1. Quelques rappels physiologiques

Chez les bovins, les spermatozoïdes sont déposés dans la cavité vaginale lors de la saillie voire dans l'utérus lors de l'insémination artificielle. Une fois l'utérus traversé, ils sont stockés dans la jonction

utéro-tubaire et l'isthme tubaire d'où ils seront relargués vers l'ampoule tubaire, endroit de fécondation. Ils subissent lors de leur remontée dans le tractus génital diverses modifications : ils se séparent, sous l'influence de facteurs présents dans le mucus cervical, de différentes glycoprotéines de surface acquises lors de son passage dans l'épididyme ou présentes dans le plasma séminal mais aussi d'un facteur de décapacitation, la spermine ; leur nombre diminue considérablement, seuls les spermatozoïdes mobiles arrivant à l'endroit de fécondation (Après une saillie naturelle : vagin : 3.000.000.000 ; base des cornes utérines : 10.000.000, jonction utéro-tubaire : 100.000 ; isthme : 2.000 à 4.000, ampoule : 10) et enfin, ils subissent la capacitation.

La capacitation est un processus spécifique à l'espèce rendant le spermatozoïde apte à la fécondation. Il a chez les bovins une durée comprise entre 4 et 6 heures. Il comporte essentiellement une augmentation de la mobilité et du type de déplacements du spermatozoïde et des phénomènes membranaires dont la réaction acrosomique dans laquelle est largement impliqué le calcium.

L'hyperactivité motrice du spermatozoïde se traduit par une augmentation de la mobilité du flagelle. Par ailleurs, son déplacement de rectiligne devient plus circulaire voire progressivement aléatoire et s'accompagne de fréquents changements de direction en cours de capacitation. Ces particularités constituerait selon certains auteurs des critères d'évaluation de la qualité de la capacitation. On peut trouver dans ces mouvements divers avantages telles la possibilité pour le spermatozoïde de sa maintenir dans la lumière de l'oviducte ou encore celle de pouvoir se déplacer dans du mucus.

Le Ca constitue chez tous les mammifères un élément essentiel au déclenchement de la réaction acrosomique. Celle-ci est induite par le contact avec la zone pellucide. Elle entraîne au niveau de la membrane acrosomique la formation de vésicules et de trous par lesquels s'échappent les enzymes acrosomiques. Ces derniers vont permettre la pénétration de la zone pellucide par le spermatozoïde conjointement à l'hypermotilité active acquise par le spermatozoïde. La pénétration de la zone pellucide par le spermatozoïde engendre la libération dans l'espace périvitellin des granules corticaux. Il en résulte des modifications de la zone pellucide et de la membrane plasmique de l'ovocyte empêchant toute pénétration supplémentaire par un spermatozoïde (polyspermie). Une fois franchie la membrane pellucide, le spermatozoïde pénètre dans le cytoplasme de l'ovocyte. Il en résulte la reprise de la méiose et l'expulsion du second globule polaire (GP2) dans l'espace périvitellin. Les pronoyaux mâle et femelle se constituent et migrent vers le centre de la cellule pour entamer la première division de segmentation et ainsi la formation des deux premiers blastomères.

Cette réaction acrosomique et l'activation de l'ovocyte sont placées sous le contrôle et notamment d'une part d'ions Ca et d'un équilibre optimal entre des facteurs pro-oxydants et antioxydants. La présence de ce Ca et de facteurs antioxydants (taurine, hypotaurine et acide ascorbique) dans les milieux de FIV revêtent un caractère essentiel.

7.1.2. Méthodologie de la FIV

7.2.1.1. Sélection des spermatozoïdes mobiles

La première étape consiste après décongélation d'une paillette (1 minute à 35°C) à séparer les spermatozoïdes du plasma séminal (et du milieu de congélation) en les lavant à deux ou trois reprises par centrifugation dans un tampon ou un milieu de culture. Etant donné la présence de glycérol, il n'est pas possible d'évaluer la viabilité des spermatozoïdes au moyen d'une coloration vitale après leur décongélation. Le lavage est dans l'espèce bovine souvent remplacée par la sélection des spermatozoïdes mobiles par centrifugation sur un gradient de percoll (milieu PBS concentré dix fois et percoll) ou plus souvent par swim-up (nage ascendante). Dans le premier cas, les spermatozoïdes sont déposés sur une double solution de concentration différente de percoll puis centrifugés pendant 15 minutes à 500 G ; Ce faisant les spermatozoïdes vivants se retrouvent au fond du tube et les morts à l'interface des deux solutions. Dans le second cas, on dépose un milieu tampon (TALP calcium free Tyrode/albumine/sodium lactate/sodium pyruvate) ou de culture sur un culot de spermatozoïdes et après incubation (1 heure à 39°C) on récupère la phase supérieure renfermant les spermatozoïdes mobiles, les spermatozoïdes morts demeurant dans le fond.

Le culot des spermatozoïdes vivants est remis en suspension dans du milieu pour le débarrasser le plus complètement possible de son milieu de congélation (glycérol). le culot des spermatozoïdes est

récupéré (100 microlitres) par centrifugation. Leur concentration est ensuite déterminée et ajustée de manière à avoir une concentration égale à 2.000.000 de spermatozoïdes par ml. Ainsi préparé et conservé à 25°C, le sperme peut encore être utilisé au bout de 4 à 8 heures. Ces manipulations seront réalisées dans une hotte à flux laminaire.

7.2.1.2. Induction de la capacitation

Bien que diverses méthodes aient été employées pour induire artificiellement la capacitation, il semble bien que la méthode utilisant l'héparine soit la plus appropriée pour le sperme bovin (milieu tampon ou de culture renfermant 10 à 20 mcg/ml d'héparine). Le sperme y est ajouté de manière à avoir une concentration de 2.000.000 spermatozoïdes par ml.

Le recours à l'héparine ne semble pas pouvoir être appliquée dans les espèces ovine, caprine et porcine. Dans l'espèce équine, il semble que le recours à un agent ionophore (A23187) doive être préféré.

7.2.1.3. Induction et entretien de la mobilité

Une première sélection des spermatozoïdes mobiles a déjà été opérée par le swim-up. Diverses substances sont connues pour augmenter la mobilité du sperme. La caféine comme la théophylline agissent en inhibant la phosphodiesterase, ce qui contribue à augmenter l'AMPc intracellulaire. L'addition d'un mélange penicillamine, hypotaurine et épinephrine (PHE) est connue également pour augmenter la mobilité du sperme et la pénétration de l'ovocyte.

7.2.1.4. Fécondation proprement dite

La fécondation est réalisée dans une goutte de 50 à 100 microlitres de milieu sous huile de paraffine ou minérale pour éviter toute évaporation. Chaque goutte renferme une vingtaine d'ovocytes et environ 100.000 spermatozoïdes (2 millions par ml). L'incubation dure 18 heures à 39°C dans une atmosphère d'air renfermant 5% de CO₂. L'atmosphère sera également saturée d'humidité pour éviter toute évaporation du milieu. Une augmentation du temps de l'incubation est un facteur de risque de polyspermie. Il est important par ailleurs que le laboratoire soit maintenu autant que faire se peut à une température comprise entre 25 et 30°C.

Diverses méthodes de préparation des ovocytes maturés ont été proposées pour augmenter les chances de leur pénétration par les spermatozoïdes. Les cellules restantes du cumulus peuvent être enlevées mécaniquement par vortexage ou chimiquement par l'addition d'enzymes tels que l'hyaluronidase ou d'agents chimiques comme le citrate de sodium (3% pendant 5 minutes). Il semble bien que ces méthodes ne doivent être utilisées que dans les cas de manipulation plus spécialisées des gamètes (transfert de noyau, micro-injection de spermatozoïde...). Habituellement donc, les ovocytes sont lavés au moyen d'une solution tampon.

Signalons enfin que des essais de « gamete intrafallopian transfer » (GIFT) ont été pratiqués chez la vache. L'intervention consiste à prélever les ovocytes d'une vache donneuse et à les injecter par laparoscopie dans l'oviducte d'un animal receveur inséminé (Fayrer-Hosken et al. Theriogenology, 1991, 36, 709-725).

Critères de fécondation

L'apparition de deux *globules polaires* ou des *deux pronoyaux* constituent les critères le plus souvent employés pour confirmer la fécondation. Cependant, dans l'espèce bovine et à la différence des espèces murine et humaine, ces pronuclei ne sont habituellement visibles que s'ils ont au préalable été traités par centrifugation ou par coloration (fuchsine). La raison doit en être trouvée dans le fait que l'ovocyte renferme davantage de vésicules lipidiques.

L'identification de *spermatozoïdes accessoires* fixés à la membrane pellucide constitue un autre paramètre d'évaluation. Leur nombre est directement proportionnel aux chances de fécondation et de développement embryonnaire.

Le *taux de clivage* constitue une autre méthode d'évaluation. In vivo, le stade 4 cellules est habituellement atteint après 42 heures. In vitro, il exprime le nombre de blastomères identifiés à 48 ou 72 heures. Ce nombre est directement proportionnel à la possibilité pour l'embryon d'atteindre le stade blastocyste. Ainsi, la présence de 4 blastomères 48 heures après la fécondation se traduit par 13 % de

développement jusqu'au stade de blastocyste. Si ce nombre est supérieur à 4, le pourcentage est de 40 %. Dans notre laboratoire , nous évaluons le nombre de blastomères à 72 heures. Si le stade est atteint à ce stade de gestation, 80 % des embryons se développent jusqu'au stade blastocyste.

Selon les auteurs et donc les protocoles au demeurant pléthoriques, les taux de fécondation sont compris entre 30 et 85 % tandis que les pourcentages de blastocystes obtenus sont compris entre 7 et 50 %, 50 % d'entre eux donnant lieu à une gestation. Il est intéressant de noter que comme après une fécondation *in vivo*, 60 % des embryons obtenus sont des mâles, ceux-ci seraient plus sensibles à une mortalité embryonnaire ultérieure puisque le sex-ratio des veaux à la naissance est en moyenne de 50/50.

La *polyspermie* est la principale anomalie observée lors de fécondation *in vitro*. Elle est plus fréquente qu'*in vivo* et de l'ordre de 5 %. Elle serait liée au grand nombre de spermatozoïdes nécessaires (10.000 spermatozoïdes par ovocyte en moyenne contre 10 par ovocyte *in vivo*). La parthénogenèse se définit comme le développement d'un ovocyte sans l'intervention d'un gamète mâle (elle aboutit à la formation d'un parthénogenome). Aucun parthénogenome n'a été décrit chez les mammifères. On connaît des cas chez le dindon. Dans l'espèce bovine cette parthénogenèse peut être induite par l'éthanol ou par électrostimulation de l'ovocyte.

Il existe une grande *variabilité individuelle* entre taureaux plus qu'entre ejaculats de leur pouvoir de fécondation *in vitro*. On peut y voir trois explications. La première est imputable à une composition différente du plasma séminal ; la seconde il peut y avoir des différences dans la capacité du spermatozoïde à induire les réactions ovocytaires, une fois sa pénétration réalisée ; enfin, le temps nécessaire à la capacitation peut être différent selon les animaux, il peut en résulter des différences dans le développement embryonnaire.

8. La culture des embryons

A la différence des embryons de l'espèce humaine, les embryons de différentes espèces animales subissent un blocage de leur développement à un moment bien particulier de leur développement. Ainsi ce blocage s'observe chez le souris au stade 2 cellules, chez le porc au stade 4 cellules, chez la vache au stade 4-8 cellules, chez le mouton au stade 8-16 cellules. Il existe donc certains facteurs encore mal connus, sécrétés par les cellules non ciliées de l'oviducte, qui *in vivo* au 2^{ème} et 3^{ème} jour de la gestation permettent à l'embryon de poursuivre son développement. Cet arrêt du développement correspond au stade où le développement de l'embryon passe d'un contrôle maternel ovocytaire sous le contrôle de son propre génome et où il commence donc à synthétiser ses propres protéines. Ces facteurs ne sont pas spécifiques de l'espèce. Diverses méthodes ont été mises au point pour permettre à l'embryon de franchir avec succès cette phase de blocage de son développement.

8.1. Culture de l'embryon *in vivo*

Le transfert des embryons *in vivo* dans des *oviductes de lapine ou de brebis* ne présente plus à l'heure actuelle qu'un intérêt historique. Ces méthodes ont néanmoins permis de mieux comprendre la physiologie des premiers stades du développement embryonnaire. Ainsi, 5 à 20 embryons étaient transférés dans l'oviducte ligaturé d'une lapine. Ils en étaient récupérés après 3 à 7 jours. Des résultats semblables ont été obtenus après transfert d'embryons dans des oviductes (10 à 50 embryons par oviducte) de brebis préalablement synchronisées au moyen d'une éponge vaginale et d'une injection de PMSG, les embryons étant introduits après ligature des oviductes un à deux jours après l'ovulation. De différentes études réalisées (55.797 embryons transférés), il apparaît que 56 % des embryons peuvent être récupérés après une semaine, 24 % d'entre eux ayant franchi la phase de blocage et atteint le stade morula-blastocyste.

D'autres méthodes ont également été évaluées : transfert à des oviductes de vaches ou à des femelles bovines prépubères, culture dans le sac amniotique d'embryons de poulet.

8.2. Culture de l'embryon *in vitro*

Les embryons ne peuvent se développer dans les milieux traditionnellement utilisés pour les cultures

cellulaires. Il leur faut pour franchir avec succès la phase de blocage, être cultivés en présence de cellules (ou de leur produit de sécrétion) d'origine le plus souvent tubaire ou autre : c'est la coculture. Certaines méthodes ont recours à des milieux chimiquement définis se rapprochant le plus de la composition des sécrétions tubaires. Ce sont des milieux salins additionnés d'acides aminés tels que le SOF (Synthetic oviductal fluid), le CR1 (milieu de Rosenkrans) ou le BMOC-3 (milieu de Brinster). La culture des embryons dans ce type de milieu permet de mesurer directement l'impact de divers facteurs sur le développement embryonnaire sans qu'il y ait besoin de prendre en considération l'effet des cellules.

En coculture, les embryons sont placés en contact avec un substrat nourricier (cellules feeder). Ces cellules peuvent être trophoblastiques, tubaires, cellules de la granuleuse ou somatiques. Ces dernières telles les MDBK (Madin darby bovine kidney), BRL (Buffalo rat liver) ou VERO (Cellules de rein de singe vert) offrent l'avantage de pouvoir être contrôlées sur le plan sanitaire (absence de virus IBR ou BVD) ce qui n'est pas le cas des autres types cellulaires, le plus souvent prélevées à l'abattoir. Ces cellules sont placées en culture dans un milieu (le plus souvent le milieu M-199 ajouté parfois d'OCS ou de divers facteurs de croissance tels l'IGF, le TGF, l'EGF, l'insuline...). Dans notre laboratoire, les embryons se développent en co-culture sur cellules tubaires prélevées à l'abattoir. Le milieu de coculture est le Menezo-B2 auquel est ajouté 20 % d'ECS.

Selon les auteurs et par conséquent la nature des milieux ou types cellulaires utilisés, le pourcentage de blastocyste/morulas obtenu par rapport au nombre d'ovocytes inséminés serait compris entre 25 et 30 %. Cette évaluation se fait au jour 7.

9. Conséquences de la fécondation in vitro

Les biotechnologies de l'embryon ont vu apparaître un syndrome qualifié de « Large Offspring Syndrome » (LOS) par les auteurs anglosaxons. Diverses synthèses ont fait le point sur les manifestations cliniques et les causes potentielles de ce syndrome décrit dans les espèces bovine et ovine(Barnes Theriogenology 2000,53,649-658 ; Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000, 53, 575-597 ; Hasler et al. Theriogenology, 1995, 43, 141-152 ; Kruip et den Haas Theriogenology 1997,47,43-53 ; Leese et al. Human Reprod. 1998, 13 (suppl4), 184-202 ; Young et al. Rev Reprod., 1998,3,155-163) .

9.1. Manifestations du LOS

Les embryons obtenus in vitro se développent plus rapidement que ceux obtenus in vivo. De même ils présentent des différences tout à la fois morphologiques et fonctionnelles (Thompson Reprod.Fert.Devlop, 1997,9,341-354).

Leur transfert à des receveuses s'accompagnent ou non selon les études d'une réduction significative ou non du pourcentage de gestation comparaison faite avec l'insémination artificielle ou le transfert d'embryons obtenus in vivo (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597) ..

L'analyse des retours en chaleurs au cours du mois suivant le transfert d'un embryon fait apparaître des différences significatives selon la méthode d'obtention de l'embryon. En effet, les receveuses ayant reçu un embryon obtenu par coculture reviennent significativement plus fréquemment en chaleurs entre le 11^{ème} et le 18^{ème} jour suivant l'oestrus (19 %) que celles ayant reçu un embryon obtenu in vivo (10,8 %) ou in vitro après développement sur milieu SOF (13,2 %) (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597) .

La gestation se trouve allongée (Kruip et den Haas Theriogenology 1997,47,43-53 ; Sinclair et al. J.Reprod.Fert.,1999,116,177-186). Elle est respectivement 0,9 et 2,4 jour plus longue après transfert d'un embryon obtenu in vivo (282,1 jour) ou in vitro (283,6 jours) que par IA (281,2 jours) (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597) . La fréquence des avortements (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597, Hasler et al. Theriogenology, 1995, 43, 141-152) et des hydro allantoïde (Hasler et al. Theriogenology, 1995, 43, 141-152 Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology 1998, 49,883-894) est augmentée. Le poids des veaux obtenus par FIV est plus élevé que ceux obtenus par IA ou par la méthode MOET (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597; Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology 1998, 49,883-894;

Walker et al. Theriogenology 1996, 45,111-120; Hasler et al. Theriogenology, 1995, 43, 141-152 ; Farin et Farin Biol.Reprod.1995,52,676-682). Cela se traduit par une augmentation du pourcentage de césariennes (5 à 12 fois plus de césariennes après transfert d'embryons obtenus in vivo ou in vitro que par IA : Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597) . La naissance de veaux mâles est plus souvent observée (2 à 4 % de veaux mâles en plus : Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597) . La mortalité néonatale est plus fréquente (Kruip et den Haas Theriogenology 1997,47,43-53 ; Behboodi et al. Theriogenology 1995,44,227-232 ; Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology 1998, 49,883-894). Elle après transfert d'embryons obtenus in vitro respectivement 1,7 et 2,9 % plus élevée que celle observée après IA (5,3 %) ou transfert d'embryons obtenus in vivo (4,6 %) (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597) . Les veaux présentent davantage d'anomalies congénitales (Schmidt et al. 46, 527-539) telles que des anomalies des membres (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597) . Semblables altérations du poids du développement normal du fœtus ou de la physiologie néonatale (problèmes respiratoires, acidose, léthargie) ont également été observées après transfert de veaux clonés (Willadsen et al. Theriogenology 1991, 35,161-170 ; Wilson et al. Anim.Reprod.Sci.1995,38,73-83 ; Garry et al. Theriogenology 1996,45,141-152).

Des accélérations du développement fœtal ou des organes fœtaux tels que le foie, les reins ou le cœur ont également été rapportés dans l'espèce ovine (Sinclair et al. J.Reprod.Fert.,1999,116,177-186) et murine (Lane et Gardner J.Reprod.Fert.,1994,102,305-312). A la naissance, les veaux obtenus par FIV présentent une épaisseur du septum et de la paroi du ventricule gauche significativement plus épaisse que les veaux obtenus par fécondation in vivo ce qui en démontre l'immaturité cardiaque (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597) .

Dans l'espèce humaine, les enfants nés après fécondation in vitro ont généralement un poids à la naissance moins élevé. Leurs mères ont également une durée de gestation plus courte (MRC Working Party. Brit.Med.J.1990,300,1229-1233). Il existe il est vrai plusieurs différences entre les espèces animales et humaine en ce qui concerne la méthodologie de la FIV. Dans l'espèce humaine en effet, les ovocytes proviennent généralement de donneuses le plus souvent moins fertiles voire plus âgées. Les ovocytes sont obtenus après stimulation hormonale. Ils sont maturés in vivo. Ils sont également fécondés avec du sperme moins fertile. Enfin, la culture des embryons ne dure en général que 2 à 3 jours. Enfin, la receveuse est le plus souvent la donneuse.

9.2. Etiologie du LOS

Les facteurs responsables du LOS sont loin d'être compris. Il est vraisemblable qu'ils sont susceptibles d'exercer leurs effets pendant les phases de maturation, de fécondation et de développement de l'embryon et/ou du fœtus que ce soit in vitro ou après leur transfert à des receveuses. D'une manière générale, les milieux utilisés pour les différentes étapes d'obtention d'embryons in vitro sont loin d'être définis même s'ils sont sensés refléter au mieux les conditions de l'oviducte et de l'utérus in vivo (Thompson Theriogenology 1996,45,27-40) .

D'une manière générale, il semble bien que l'addition de sérum aux milieux de culture constitue un des facteurs prédisposants à l'apparition d'anomalies fœtales. D'autres facteurs ont également été évoqués. Nous citerons les facteurs de croissance libérés par les cellules utilisés dans les systèmes de co-culture, la haute tension en oxygène (20 % contre 6 à 7 % dans l'utérus), la forte concentration en ammonium résultant du métabolisme protéique. Chez la *brebis*, l'utilisation du milieu SOF sans sérum contribue à réduire le poids des agneaux à la naissance et la durée de gestation . Les embryons ont moins d'inclusions lipidiques, se développent plus lentement et leur nombre de cellules sont davantage semblables à celui d'embryons obtenus in vivo (Thompson et al. Biol.Reprod.,1995,53,1385-1391 ; Holm et al. Theriogenology 1996,107,175-181) . Chez la *vache*, Le poids des veaux à la naissance est semblable que le milieu SOF utilisé renferme ou non du serum. Cependant dans le premeir cas, les embryons se développent plus rapidement et renferment moins de cellules que les autres (Tricoire et al. Theriogenology 1999,51,257 abs) . Pour d'autres auteurs, l'addition ou non de serum au mileiu SOF est sans effet sur le poids à la naissance ou la longueur de gestation comparasion faite avec les veaux nés par insémination artificielle (Jacobsen et al. Theriogenology 1999,51,226 abs) . fin observent une

réduction du poids fœtal et du placenta après utilisation de milieu SOF sans serum (Mc Millan et al. Theriogenology 1999,51,247 abs) . Comparé au milieu de coculture additionné de sérum, le développement des embryons dans un milieu SOF est plus lent et se traduit par un pourcentage plus élevé et une meilleure qualité des morulas au jour 7 (Van Wagtendonk-de Leeuw et al. Theriogenology, 2000,53,575-597) .

La congélation d'embryons obtenus in vitro serait de nature à augmenter le poids des veaux à la naissance (Merton et al. Theriogenology 1998,49,293 abs) .

Par ailleurs, les expériences de Wilmut et Sales ont bien démontré l'importance d'un synchronisme aussi parfait que possible entre l'embryon transféré et l'utérus receveur (Wilmut et Salers J.Reprod.Fert.1981,61,179-184). Les embryons qui ont transférés dans un utérus se trouvant à un stade plus avancé (3 jours) que leur propre stade de développement et replacés ensuite dans un utérus se trouvant au même stade qu'eux présentent des signes de développement accéléré ou au contraire n'arrivent pas à survivre. Semblable importance du synchronisme n'a pas été observé dans l'espèce humaine, un transfert d'embryon pouvant être réalisé entre le 1 et le 6^{ème} jour de la phase lutéale (Navot et al. J.Clin.Endocrin.Metabo.,1991,72,408-414). Il est bien connu que l'administration de progestérone au cours des premiers jours du cycle induit des modifications endométriales et donc l'environnement utérin susceptibles d'accélérer le développement de l'embryon (Garrett et al. J.Reprod.Fert., 1988,84,437-446 ; Geisert et al. Biol.Reprod.1991³,45,975-983 ; Lawson et al. J.Reprod.Fert.1983,67,473-475 ; Moore J.reprod.Fert.,43,386-387) via sans doute la stimulation de l'expression endométriale de l'Insulin Growth Factor II (Watson et al. Mol.Reprod.Dev.1992,31,87-95). Ceci explique sans doute le développement plus rapide d'embryons obtenus in vivo, soumis à une imprégnation progestéronique plus élevée, résultat du traitement de superovulation et donc du développement de corps jaunes multiples.

10. Pour en savoir plus

1. Bols PEJ, de Kruif A. Bovine oocyte retrieval : which follicles to puncture. VI.Diergeneesk.Tijdsch.,1998,67,45-52.
2. Hanzen Ch. , Goffin L. Application de l'échographie à la ponction des follicules ovariens. Ann.Méd.Vét.,1998,142,81-91.
3. Peters RM in Animal Reproduction Science 1992 28 415-421.
4. http://www.oie.int/fr/normes/mcode/F_00127.htm : réglementation de l'OIE en matière de production d'embryons
5. Biotechnologies de la reproduction chez les bovins
 - <http://www.inra.fr/Internet/Produits/PA/an1998/num981/colleau/jc981.htm>

11. Tableaux

Tableau 1 : Pourcentage de récupération des ovocytes après ponction échoguidée transvaginale chez la vache

MHz	N follicules	N ovocytes récupérés	%	Diamètre follicule (mm)	Références
7.5 / 6	91	17	19	>= 3	Scott et al. 1994
7.5	115	29	25	> 2	Van der Schans et al. 1991
5	197	53	27	NP	Pieterse et al. 1988
7.5	415	116	28	> 9	Vos et al. 1994
6.5	1289	461	36	NP	Simon et al. 1993
7.5	291	122	42	NP	Bols et al. 1995
5	1391	625	45	>= 2	Meintjes et al. 1995
7.5	124	60	48	>= 5	Moyo et Dobson 1995
7.5	443	220	50	NP	Baltussen et al. 1990
7.5	206	103	50	>=3	Kruip et al. 1991
7.5	723	376	52	>=3	Pieterse et al. 1991b
NP	7970	4303	54	>=2	Kruip et al. 1993
6.5	3042	1677	55	>= 2	Roelofsen-Vendrig et al. 1994
NP	1014	558	55	NP	Lansbergen et al. 1995
6.5	641	371	58	>= 2	Donnay et al. 1996
6.5	937	618	66	> 2	Bungartz et al. 1995
5	9120	6344	70	NP	Looney et al. 1994
Total	28009	16053	57		

NP: Non Précisé

Tableau 2 Pourcentage de morulas et /ou blastocystes obtenus après maturation et fécondation in vitro d'ovocytes récupérés par ponction échoguidée chez la vache

OR [*] n	OM [*] n	OMAT [*] n	EMB [*] n	Références
	%	%	%	
625	127 256	35 94	28 37	Simon et al. 1993
618	344	196	57	Meintjes et al. 1994
6344	5986	2677	45	Bungartz et al. 1995
4294	3124		11 813 515	Looney et al. 1994 Kruip et al. 1993
			29	Gibbons et al. 1994
1677	1366	944	16	Kruip et al. 1994
104	104		18	Kruip et al. 1991
122	116	80	28	Bols et al. 1995
228	120		49	Gibbons et al. 1995
	82	49	15	Moyenne (%)

*OR : Ovocytes récupérés

OM :Ovocytes mis en maturation (le pourcentage est calculé par rapport au nombre d'ovocytes récupérés)

OMAT :Ovocytes ayant terminé leur maturation (le pourcentage est calculé par rapport au nombre d'ovocytes mis en maturation)

EMB :Embryons transférables (morulas et/ou blastocystes) (le pourcentage est calculé par rapport au nombre d'ovocytes mis en maturation)

Tableau 3 : Distribution du nombre de follicules
et de leur % d'atrésie selon leur diamètre

Diamètre (mm)	N / ovaire	% d'atrétiques
0.13 - 0.28	120	1.6
0.29 - 0.67	60	6.6
0.68 - 1.52	30	40.5
1.53 - 3.67	25	30.0
3.68 - 8.57	5	67.4

12. Annexe

L'HISTOIRE DE L'HOMME ET DE LA SCIENCE

J.M. FOIDART

Université de Liège –

Département de Gynécologie-Obstétrique

Conférence donnée en janvier 2003 dans le cadre d'une formation en biologie.

La place de l'Homme

La place de l'Homme dans l'Univers a été bouleversée dès le début du XIXème siècle par la théorie de l'évolution. L'Homme a été créé, façonné, animé à l'image de Dieu. De plus, le Dieu créateur donne explicitement à l'Homme le pouvoir sur le reste du monde. La révolution scientifique du XVIème siècle (Copernic), et surtout du XVIIème siècle (Kepler, Galilée, Newton), réduit à néant la conception

géocentrique selon laquelle la Terre est au centre de l'Univers, pratiquement conservée inchangée depuis Aristote. Cependant, la prééminence humaine sur le reste du monde vivant, ou anthropocentrisme, n'est alors pas contestée. Au XVIII^e siècle, Buffon évoque en termes clairs la possibilité d'une transformation des espèces, à l'origine de leur variabilité. Epouvanté par son audace dans le fait de remettre en cause la création par Dieu d'espèces distinctes, Buffon précise: "Mais non: il est certain par la Révélation que tous les animaux ont également participé à la grâce de la création; que les deux premiers de chaque espèce, et de toutes les espèces, sont sortis tout formés des mains du Créateur; et on doit croire qu'ils étaient tels à peu près qu'ils nous sont représentés par leurs descendants".

Un moment menacé par la perspicacité de Buffon, l'Homme conserve donc, en définitive, son privilège de créature de Dieu, à l'image de Dieu, dominant la nature. Mais, dès le tout début du XIX^e siècle, Jean-Baptiste Lamarck franchit le pas. Cinquante ans plus tard, Charles Darwin confirmara, développera et corrigera les travaux de Lamarck. L'apport de Darwin, considérable, n'est donc pas, comme on l'écrit souvent, le premier énoncé de la théorie scientifique de l'évolution, il faut en reconnaître le mérite à Lamarck. Avec Copernic, puis Kepler et Galilée, la Terre est chassée du centre de l'Univers. Avec Lamarck, Darwin et d'autres, l'Homme choisit du sommet de la création pour n'être plus que le fruit d'une évolution aléatoire.

Depuis la condamnation de Galilée, l'Eglise catholique ne cessera de contester la véracité des découvertes scientifiques. Contre Darwin, Rome soutient que l'ancienneté de la vie et de la Terre ne dépasse pas quatre mille ans avant Jésus-Christ. L'Eglise considérera ultérieurement que l'atome est une notion impossible puisqu'elle ne permet pas d'expliquer la transsubstantiation de l'eucharistie. Au siècle dernier, Léon XII déclare que se faire vacciner revient, pour un catholique, à s'opposer à la volonté de Dieu, créateur de la nature et de ses épidémies. Ces positions, dont se repent aujourd'hui la hiérarchie romaine, devaient entraîner une inéluctable cassure entre l'Eglise et le Positivisme Scientifique.

Lamarck et Darwin l'ont proposé, les recherches paléontologiques et biologiques modernes le confirment. L'Homme est un produit de l'évolution. De ce fait, du point de vue biologique, du fonctionnement de ses cellules et de ses gènes, *Homo sapiens* n'est guère différent des autres êtres vivants, et en particulier des mammifères. Les techniques d'embryologie, d'analyse et de transformation génétiques peuvent être indifféremment utilisées sur des cellules humaines ou non humaines. On sait notamment asservir partiellement, grâce au transfert de gènes, n'importe quel être vivant à l'exécution d'une partie du programme génétique d'un autre être. Cela signifie qu'un gène humain transféré dans un colibacille, une fraise ou une vache va commander à ces organismes de fabriquer une protéine humaine, l'inverse étant également, en principe, vrai.

Cette interchangeabilité quasi universelle des gènes n'a rien de prodigieux, elle est une conséquence logique de l'évolution: si tous les êtres vivants, y compris l'Homme, dérivent d'une cellule originelle apparue sur la Terre il y a 3,8 milliards d'années, il faut s'attendre que les mécanismes fondamentaux de leur fonctionnement, notamment leur contrôle génétique, soient similaires.

Ainsi se pose la question: "Quelles sont les bases de la Dignité Humaine ? Qu'est-ce qui rend moralement illégitimes certaines pratiques, applicables et appliquées à d'autres êtres vivants, dès lors qu'on voudrait les utiliser chez l'Homme ?"

La spécificité humaine la plus apparente est bien évidemment l'ensemble de ses capacités intellectuelles, sa créativité, son aptitude au sens moral, sa capacité de construire et de manipuler des concepts. Pour autant, on ne peut limiter la définition de la personne à des capacités mentales largement liées aux propriétés biologiques du cerveau sans risquer alors d'en déduire que quiconque a des aptitudes intellectuelles insuffisantes n'a point droit à prétendre à une telle dignité humaine. On serait alors menacé de retomber dans une barbarie dont les pires méfaits sont suffisamment proches de nous pour que personne ne puisse les oublier. Donc, une définition biologique de la personne ne suffit pas à fonder sa dignité.

D'un point de vue religieux, tout est simple: si l'Homme a été créé à l'image de Dieu, la question de sa dignité supérieure ne se pose pas. Si, dans le règne vivant, l'Homme seul possède une âme, cela suffit à lui conférer une dignité et, donc, des droits particuliers. La question des bases de la dignité de la personne dans une approche laïque est, en revanche, d'une extrême complexité.

Quels Respect pour l'Embryon ?

Faut-il conférer à l'embryon le statut de personne dès sa conception ? A-t-il donc une Dignité humaine avec le respect du à la personne ?

Le sujet est éminemment polémique, et nul consensus ne peut sans doute être trouvé sur la question du statut de l'embryon comparé à celui de la personne. Dans un certain nombre de cas, le développement de cet embryon donnera naissance à une personne. Il est donc, au moins, la possibilité d'une personne, ce que le Comité consultatif national d'éthique en France définissait comme une "personne humaine potentielle", ce qui, sur le plan pratique, va déterminer cette personnalité, c'est-à-dire le fait qu'il soit ou non porteur d'un projet parental. S'il est réimplanté, objet d'amour et d'attention, il pourra évoluer en un fœtus puis un nouveau-né. Au contraire, le zygote, ou l'embryon, peut rester congelé dans une situation de suspense dont l'issue dépendra de la volonté des parents, des médecins et dans certains pays des Juges. Par exemple en Angleterre, la législation britannique a choisi une définition juridique de la limite chronologique d'apparition de l'humain dans l'embryon: entre 13 jours, 23 heures, 59 minutes et 59 secondes ... et 14 jours. Impossible d'être plus précis. Avant, cette chose, résultant de la fécondation d'un ovule féminin par un spermatozoïde masculin, n'a rien à voir avec une personne, peut être créée pour la recherche et utilisée à des fins diverses sans contrainte particulière. Mais, au-delà, la force de la loi ayant le pouvoir du feu divin, nous nous trouvons devant un petit être humain immature qu'il s'agit de respecter en tant que personne.

Avant quatorze jours, la loi parle de "pré-embryon", concept surprenant pour un stade du développement appelé "embryon" dans toutes les espèces animales. Ainsi, comme "raille" Axel Khant, pour quiconque aura le projet de "tirer sur le pianiste", conviendra-t-il dans l'avenir de créer le concept de "pré-pianiste". Cette législation n'a en réalité aucunement vocation à transposer dans le droit un fait biologique, mais reflète la tradition utilitariste et pragmatique de nos voisins d'outre-Manche. Puisqu'il est incontestablement utile de faire de la recherche sur l'embryon humain mais que tout un corpus de loi protège la personne, ce qui rend incertain le statut de son embryon, le législateur anglais contourne la difficulté en créant un objet virtuel, une fiction juridique sous la protection de laquelle pourront œuvrer les biologistes. Les attendus scientifiques de la logique anglaise relèvent d'ailleurs eux-mêmes de l'utilitarisme: si la limite de quatorze jours a été retenue, c'est qu'apparaît alors la ligne primitive, ébauche du système nerveux qui permettra ensuite de ressentir la douleur.

Le statut conféré à l'embryon varie donc selon les ETATS, les moralistes et les religions. Pour certains, comme René FRYDMAN, c'est le projet parental qui confère sa dignité à l'embryon humain. De ce fait, l'IVG cesse de poser le moindre souci éthique et l'embryon d'*Homo Sapiens* créé à des fins de recherche ou de fabrication d'un matériel cellulaire thérapeutique, dénué de projet parental n'est pas humain, n'est pas concerné par les interrogations sur la part de dignité à laquelle il a droit.

Le législateur Britannique a probablement perçu la faille d'un tel raisonnement lorsqu'il a établi la frontière de 14 jours au terme de laquelle l'embryon humain doit être protégé dans tous les cas!

L'argument de l'intentionnalité, c'est-à-dire du statut variable de l'embryon selon le projet parental dont il est investi, ne s'oppose pas à l'infanticide parce qu'un enfant n'est pas désiré, ni à l'accouchement prématuré de grossesses mises en route dans le but de récupérer des organes fœtaux.

Peter Stinger (Professeur de Bioéthique à Mellon, puis à Princeton), défenseur du droit des animaux, ne voit d'ailleurs à cela rien de répréhensible sur le plan éthique puisque « si l'on compare honnêtement le veau, le cochon et le poulet avec le fœtus, selon des critères moralement significatifs tels que la rationalité, la conscience de soi, la conscience, l'autonomie, le plaisir et la souffrance, etc., alors ces animaux viennent bien avant le fœtus quel que soit l'état d'avancement de la grossesse. Car même un poisson manifeste davantage de signes de conscience qu'un fœtus de moins de trois mois ».

Cette vision extrême restant tout de même, à ce jour, minoritaire, les partisans d'un système où ce serait la réalité d'un projet parental qui humaniserait l'embryon sont tenus, afin d'éviter ces formes de

barbarie, d'instituer parallèlement une limite temporelle, et donc de réintroduire cette notion de pré-embryon (même si le vocable change) dont nous avons vu combien elle était difficilement justifiable sous l'angle de la biologie, ou même sous celui du simple bon sens.

Le médecin et la procréation

Ce qui singularise toutefois l'action médicale et sa réflexion morale, c'est la décision ou non de réimplantation!

A partir du transfert de l'embryon dans l'utérus, la prise de la greffe embryonnaire donnera une concrétisation à ce projet de vie. Nombreux sont encore les risques possibles d'échecs, mais la voie naturelle est tracée, qui aboutira en quelques semaines à la mise en place des ébauches du fœtus. L'aventure humaine se construit!

Il peut paraître absurde et paradoxalement injuste que dans de nombreux pays la loi sacrifie quasiment l'embryon, le protège, lui confère un statut, des droits, impose des devoirs et des contraintes aux médecins qui le manipulent, puis permette, après son implantation, dès qu'il a progressé dans son humanisation à l'état de fœtus, sa suppression. **C'est l'illogisme de la protection de l'embryon et de la légalisation de l'avortement.**

La dépénalisation de l'avortement est-elle incompatible avec le refus de considérer l'embryon comme une chose, un matériau accessible, commercialisable ou un objet banal?

Il peut se faire qu'existent des situations de conflit entre la détresse de la femme, personne incontestée, et la dignité évolutive graduelle de son embryon. Pour avoir, comme jeune médecin, connu la période où tant de jeunes femmes mouraient d'avortements clandestins, réalisés dans des conditions effroyables, je sais que la dépénalisation de l'avortement équivaut à un secours apporté à une personne en danger. Dans l'immense majorité des cas, la seule question est, en réalité, de savoir si l'interruption de grossesse sera réalisée dans des conditions menaçant ou non la vie de la femme.

Je suis bien conscient qu'il s'agit là d'une attitude pragmatique de terrain. La personnalité en devenir de l'embryon, la légitimité d'en prendre soin, de le protéger, parfois d'essayer de le guérir sont autant de certitudes nées de son absence et de sa fréquentation. Les sollicitations croissantes des couples et des parentalités nouvelles imposent une réflexion collégiale des équipes de procréation médicale! Il ne peut y avoir de Science sans Conscience. Que répondre aux sollicitations monoparentales, aux femmes isolées ou veuves? Que répondre aux demandes des couples homosexuels, transsexuels, aux demandes de don d'embryon, d'ovocytes, de spermatozoïdes, ou de diagnostic préimplantatoire?

On peut être frileux et prétendre qu'il est devenu difficile d'être médecin. L'Ethique médicale et la réflexion philosophique sont au cœur de la pratique du pédiatre, de l'obstétricien, du spécialiste de la procréation parce que c'est à ce niveau que la vie commence et qu'elle est fragile.

Le médecin est probablement l'un des derniers médiateurs entre la Société Civile, la Vie Religieuse et les libertés individuelles ; De consensus, il ne saurait être question. La solitude de la conscience individuelle doit s'appuyer sur une réflexion éthique, morale et chrétienne. Le médecin a donc le droit de sa réflexion autonome. Nous reconnaissons qu'il y a des sensibilités personnelles, des options contradictoires et des références à des valeurs différentes selon les médecins et les équipes, il importe finalement de poser des choix qui tiennent compte, non seulement des grands principes philosophiques, mais aussi de la réalité = du projet parental du désir d'enfant, de la capacité d'Amour et d'accueil de l'enfant à naître. Bref du souffle vital ébauché et que le médecin désire promouvoir dès la conception.