

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

Prof. Ch. Hanzen

Faculté de Médecine Vétérinaire
Service de Thériogenologie des animaux de production

Année 2008-2009

Plan général

- Données générales : importance relative de la production d 'embryons
- La superovulation
 - Principes généraux
 - Traitements
 - Résultats
 - Facteurs d 'influence
- La récolte d 'embryons
- Détermination de la qualité des embryons
- Le transfert d 'embryons
- La conservation des embryons

Objectifs

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

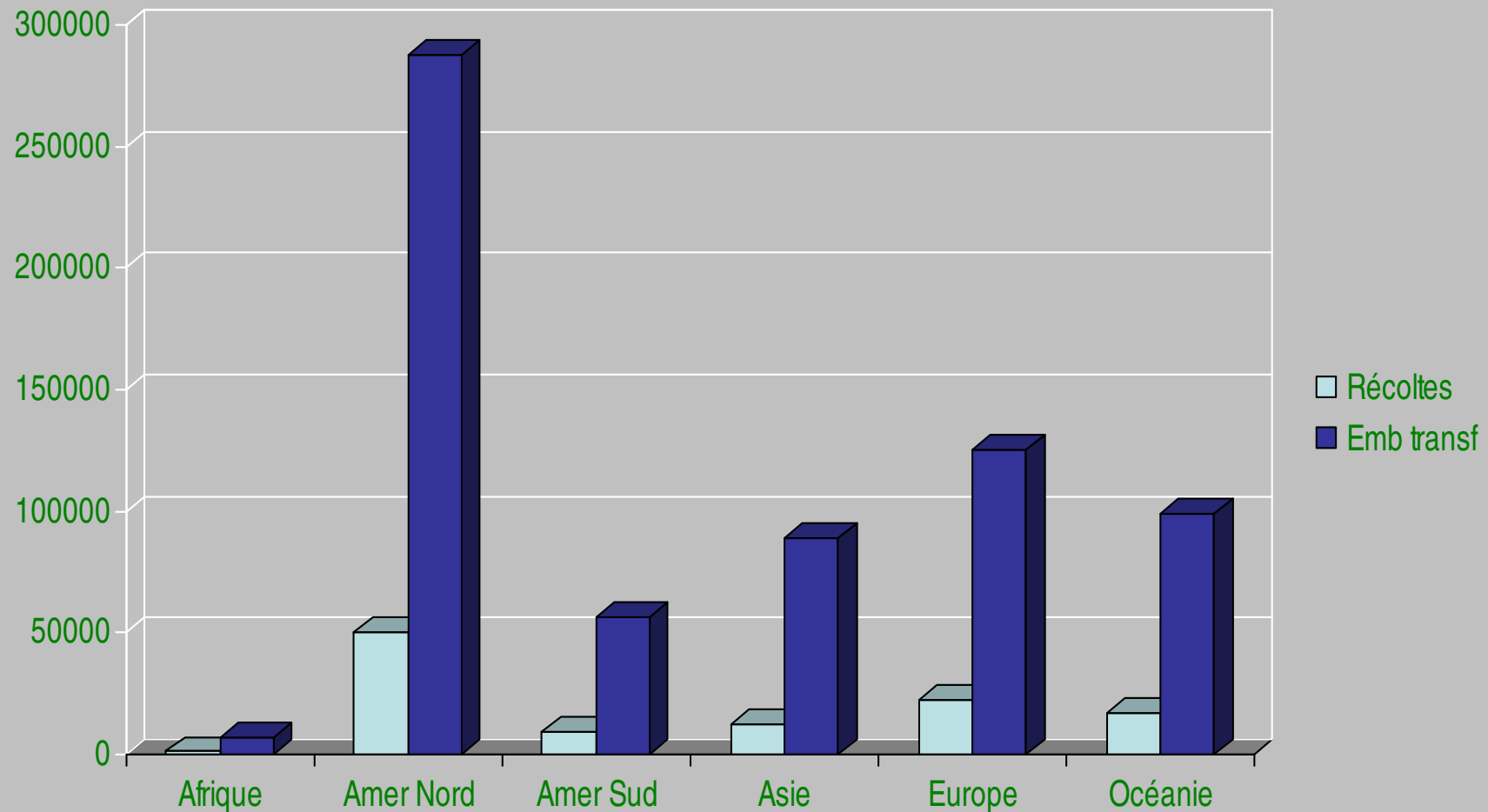
Objectifs spécifiques de connaissance

- Enoncer quelques biotechnologies de l'embryon
- énoncer les critères de choix d'une donneuse d'embryons
- Enoncer les hormones utilisées dans un protocole de superovulation
- expliquer (au besoin avec un schéma) une méthode de récolte non chirurgicale d'embryons
- faire le schéma des divers stades de l'embryon entre la fécondation et le 7ème jour de gestation
- énoncer les diverses manipulations possibles de l'embryon une fois sa récolte réalisée
- énoncer les principes généraux de la congélation/décongélation des embryons
- énoncer les critères de choix d'une receveuse d'embryons
- expliquer la méthode du transfert non chirurgical d'un embryon

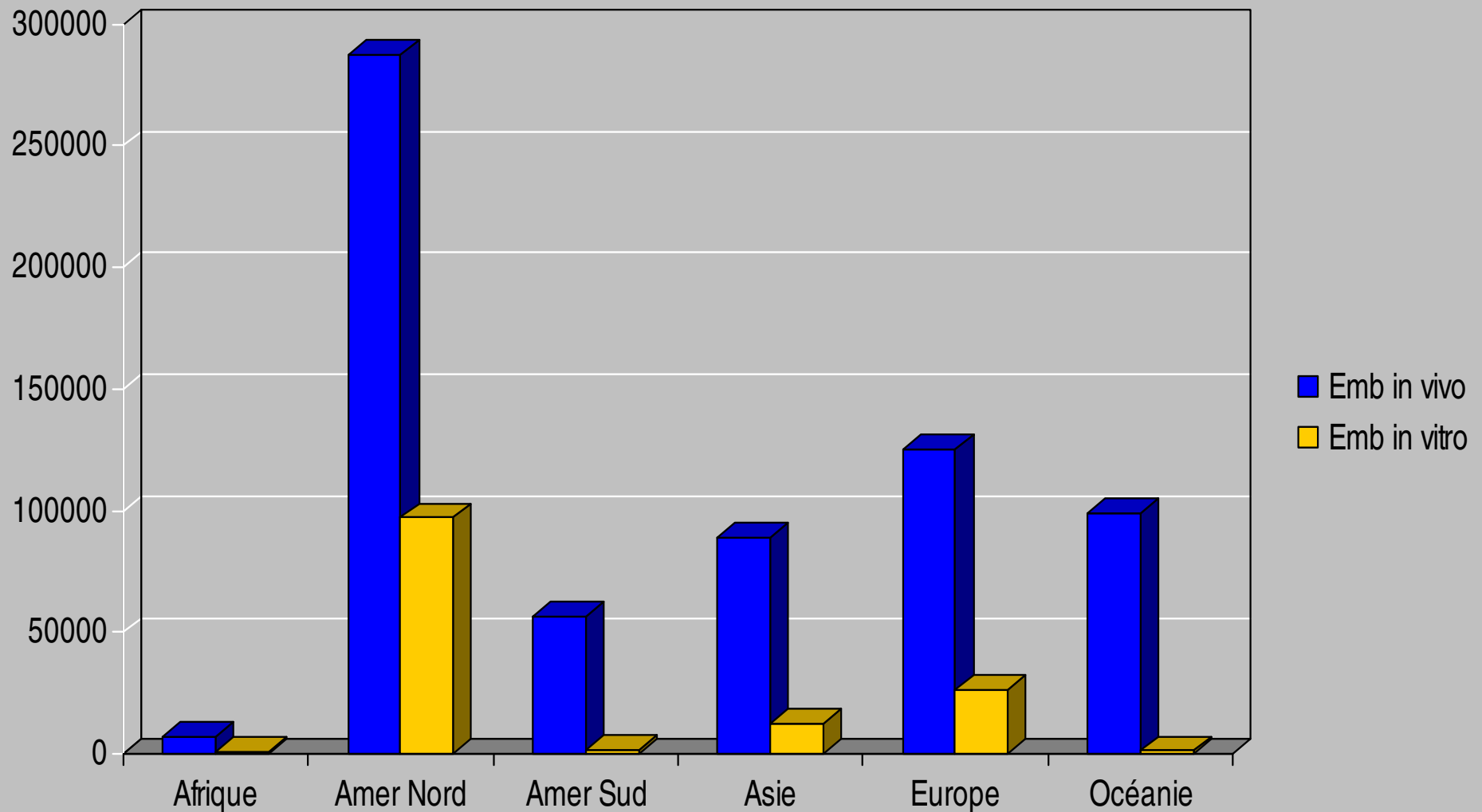
Objectifs spécifiques (suite)

- Objectifs de compréhension
 - comparer les avantages et inconvénients des deux principaux traitements hormonaux permettant une superovulation
 - justifier le moment d'une récolte d'embryons au 7ème jour de gestation
 - justifier le moment du transfert d'embryons au 7ème jour de gestation
- Objectifs d'application
 - Savoir protocoler une superovulation en fonction d'une anamnèse
 - Savoir mettre en place un protocole de synchronisation d'une donneuse et de receveuses en fonction d'une anamnèse

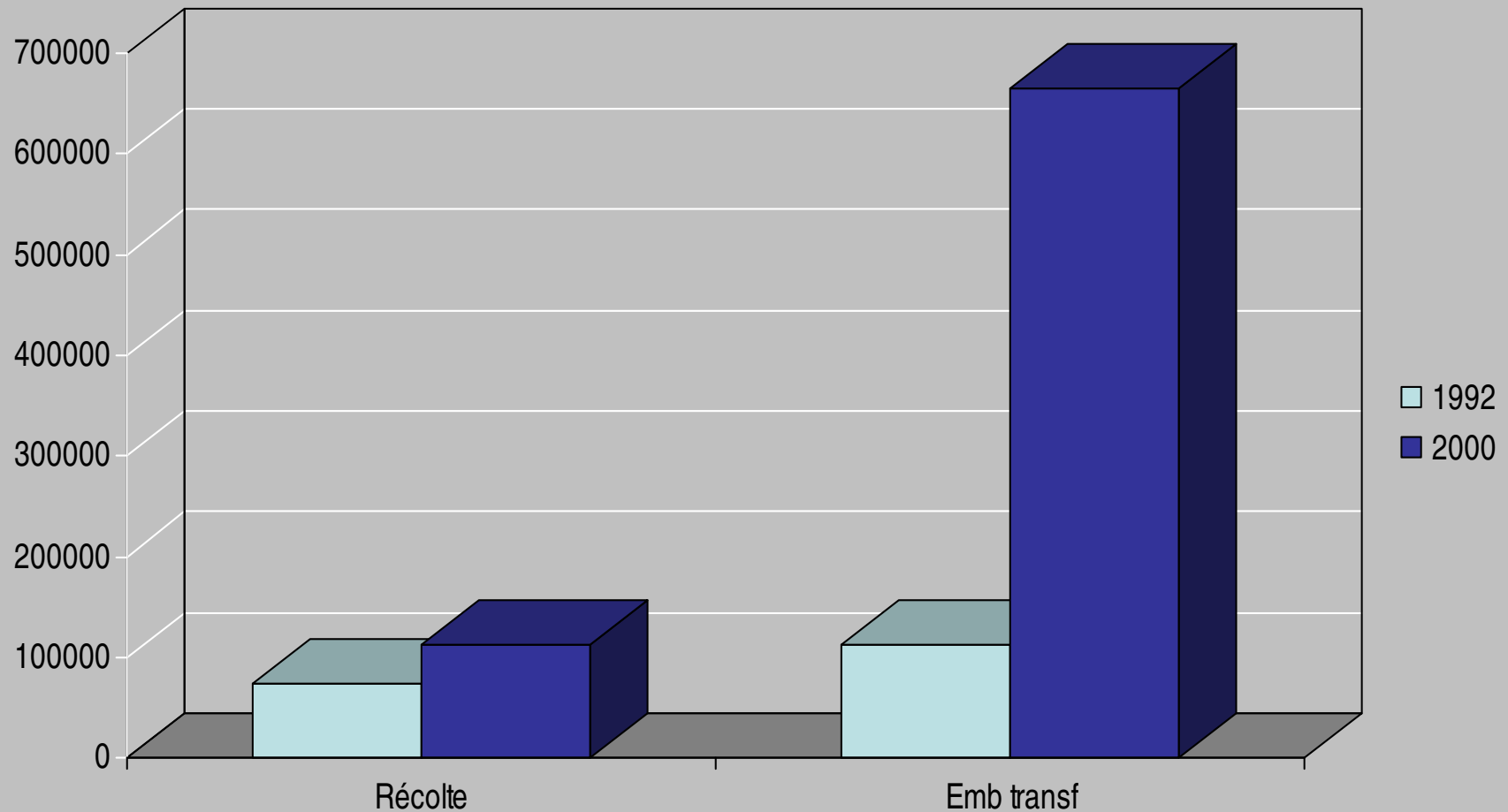
Importance de la récolte in vivo ($n = 113.058$) et du transfert d'embryons produits in vivo ($n = 664.320$) dans le monde en 2000 (Thibier IETS décembre 2001)



Nombre d'embryons transférables obtenus in vivo ($n = 664.320$) et in vitro ($n = 139.372$) dans le monde en 2000 (Thibier IETS déc 2001)



Evolution du nombre de récoltes et d'embryons transférables in vivo (n = 664.320) dans le monde de 1992 à 2000 (Anon 1993 et Thibier 2001)



Evolution de l'activité du transfert d'embryons bovins en Europe, en France et en Belgique (AETE 1993-1996 /IETS 2000) (1/2)

	1993	1994	1995	1996	2000

N collectes					
Europe	21.542	22.557	25.075	24.133	
France	6.680	5.890	6.680	6.657	6716
Belgique	1518	1420	1378	1639	1781

N d'emb récoltés					
Europe	176.470	194.589	215.046	214.290	
France	50.270	55.249	60.298	56.797	
Belgique	12.352	10.636	11.438	11.403	

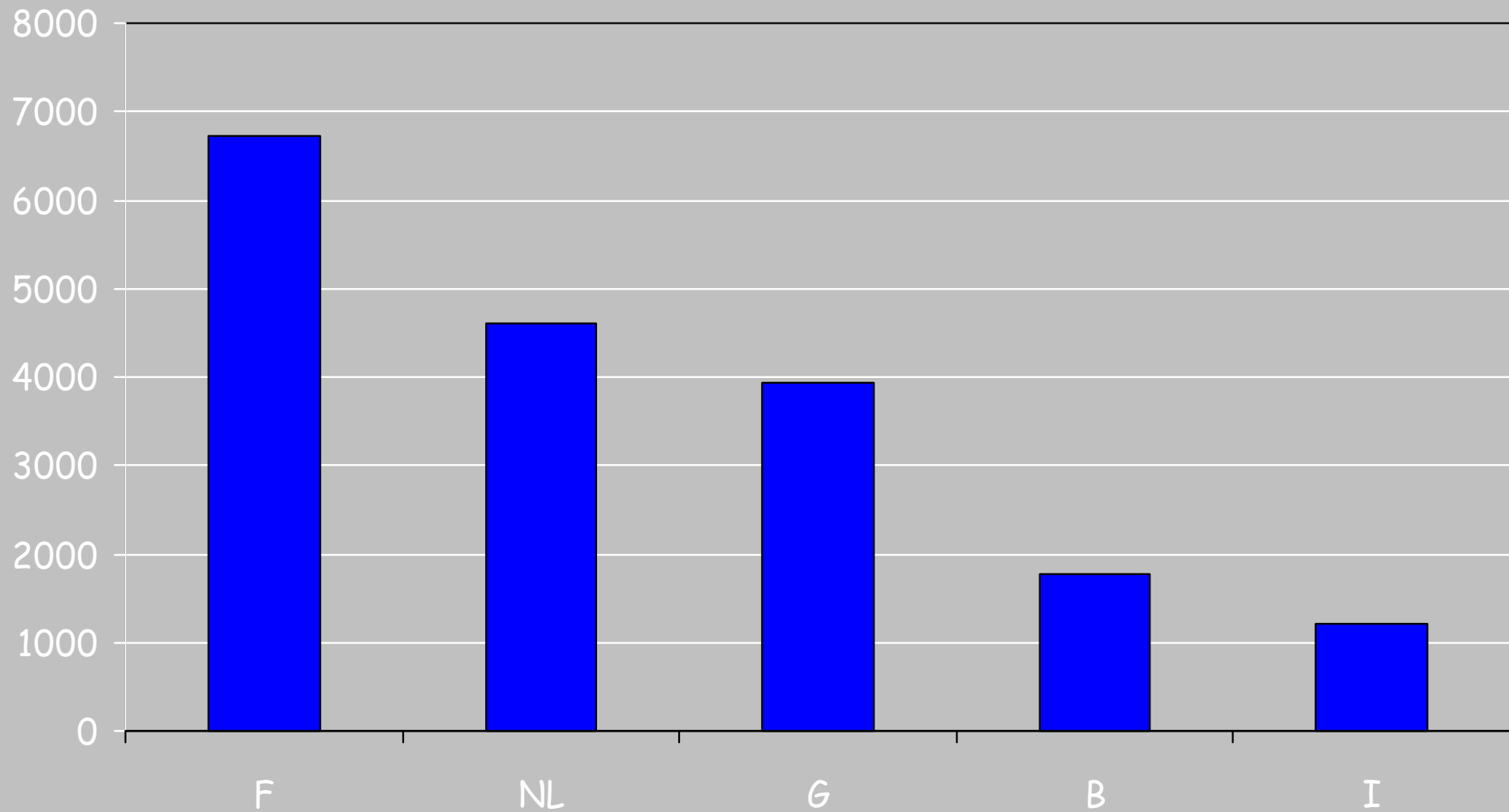
Evolution de l'activité du transfert d'embryons bovins en Europe, en France et en Belgique (AETE 1993-1996 / IETS 2000)

	1993	1994	1995	1996	2000

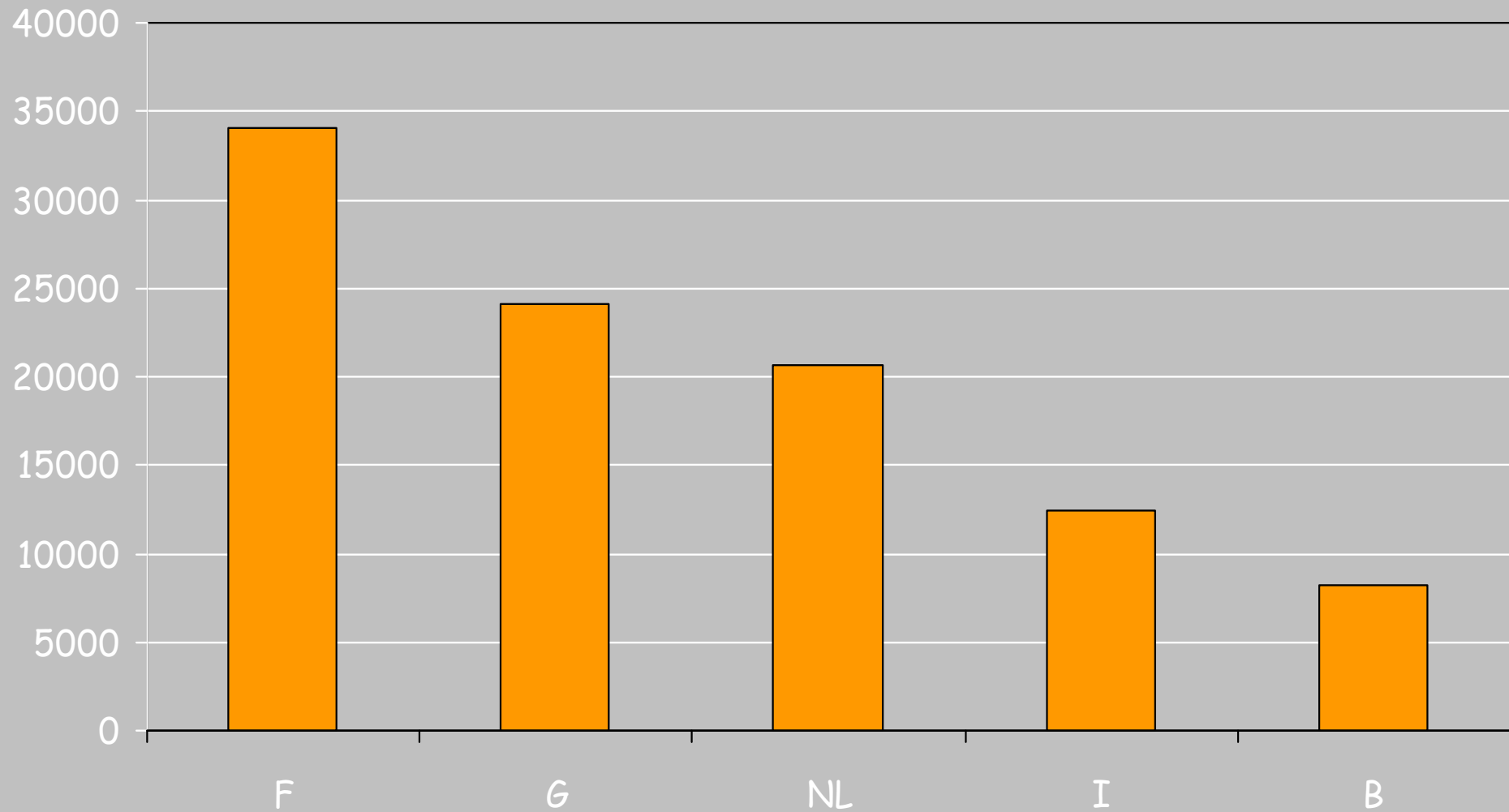
N d'emb transplantés					
Europe	96.470	102.887	112.531	117.942	
France	22.744	24.288	27.260	28.793	34062
Belgique	6492	5195	5542	5591	8213

N d'emb congelés					
Europe	42.263	54.485	60.848	55.786	
	48 %	53 %	54 %	47 %	
France	9.915	10.664	12.505	13.105	
	44 %	44%	46 %	46 %	
Belgique	4177	3416	3484	2725	
	64 %	66 %	63 %	49 %	

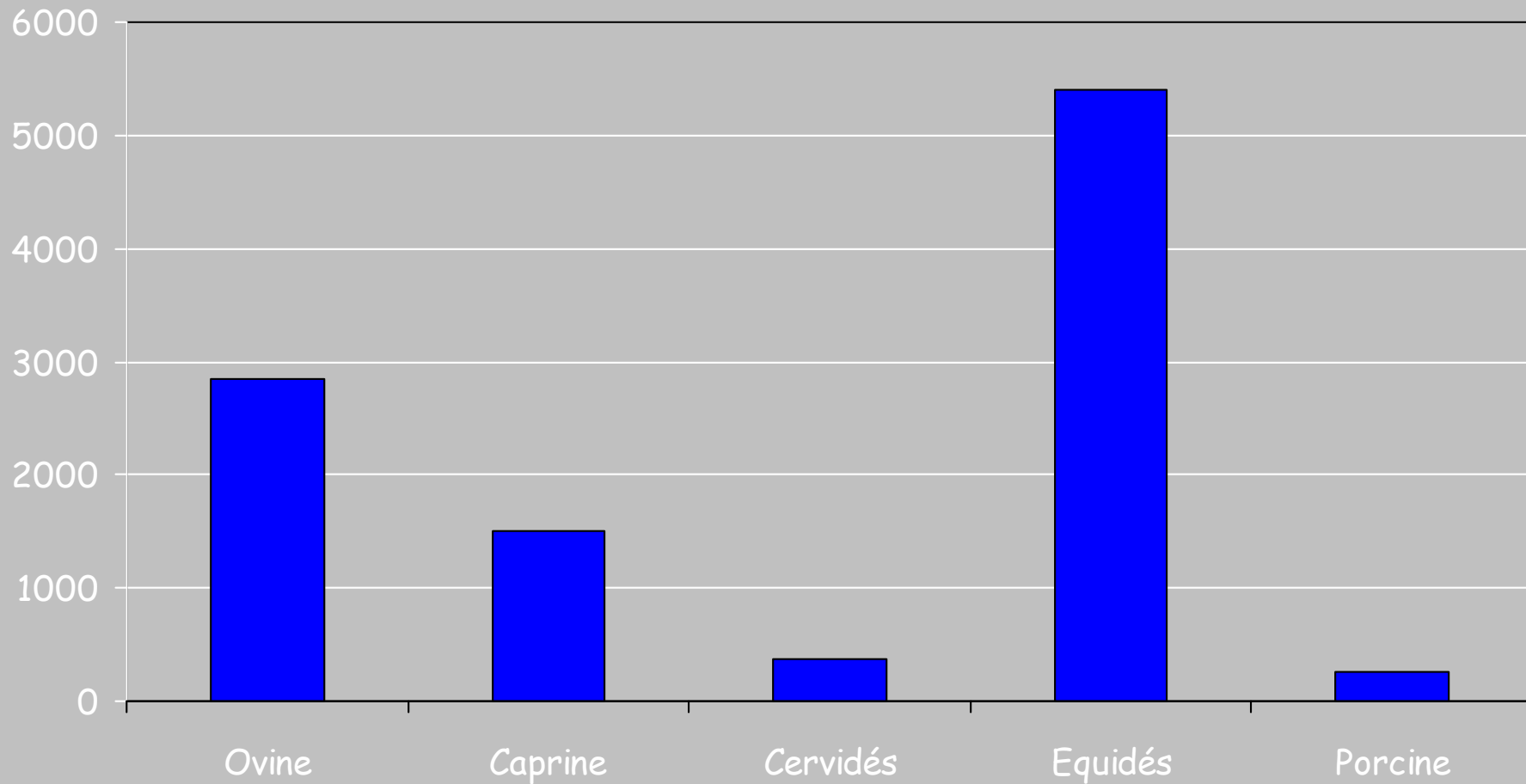
Nombre de récoltes in vivo en 2000 dans quelques pays européens (Thibier IETS déc 2001)



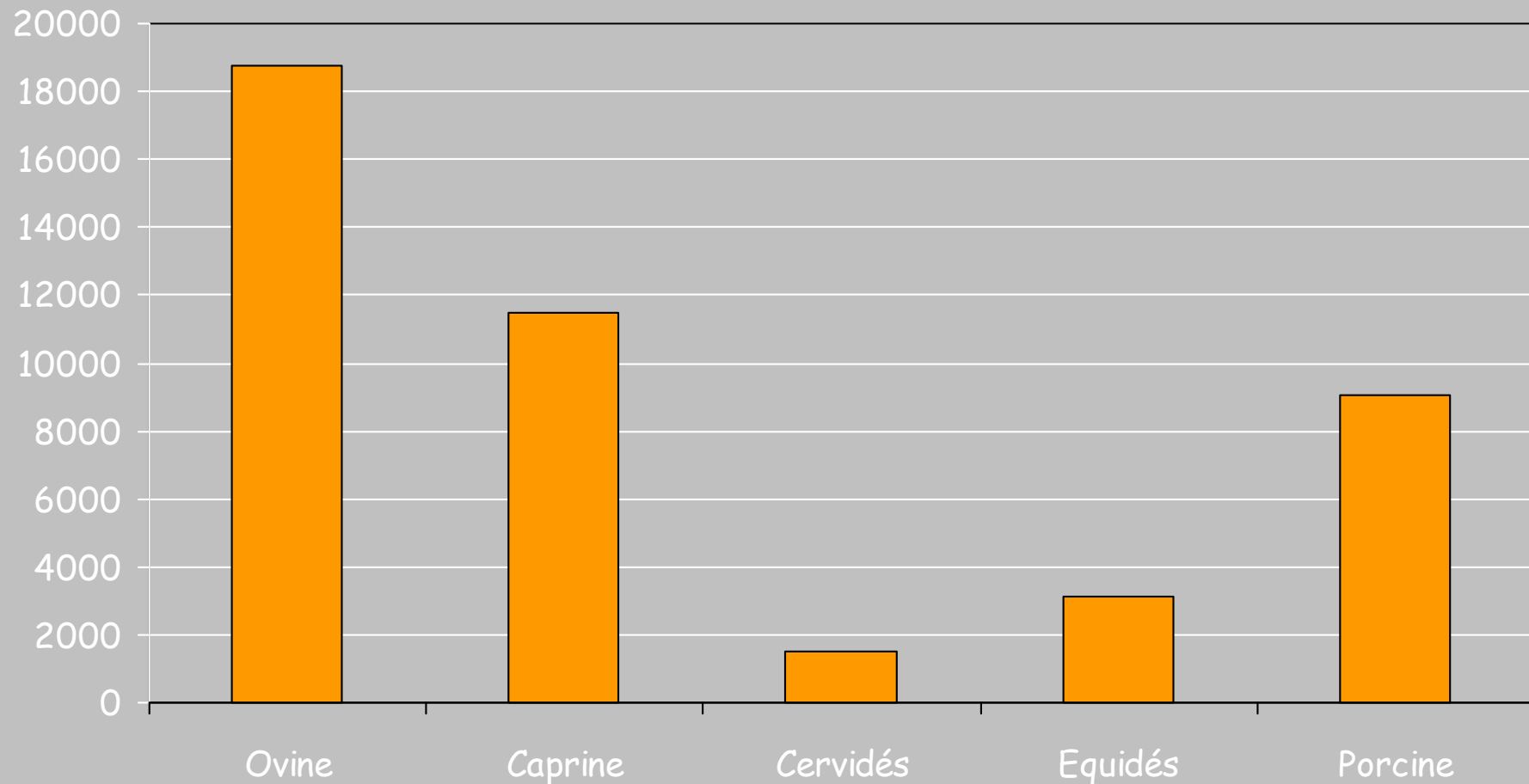
Nombre d'embryons produits in vivo transférés en 2000 dans quelques pays européens (Thibier IETS déc 2001)



Nombre de récoltes d 'embryons in vivo dans les différentes espèces dans le monde en 2000 (Thibier IETS déc 2001)



Nombre d'embryons transférables récoltés in vivo dans les différentes espèces dans le monde en 2000 (Thibier IETS déc 2001)



La superovulation

Vache BBB propriétaire : H Christophe



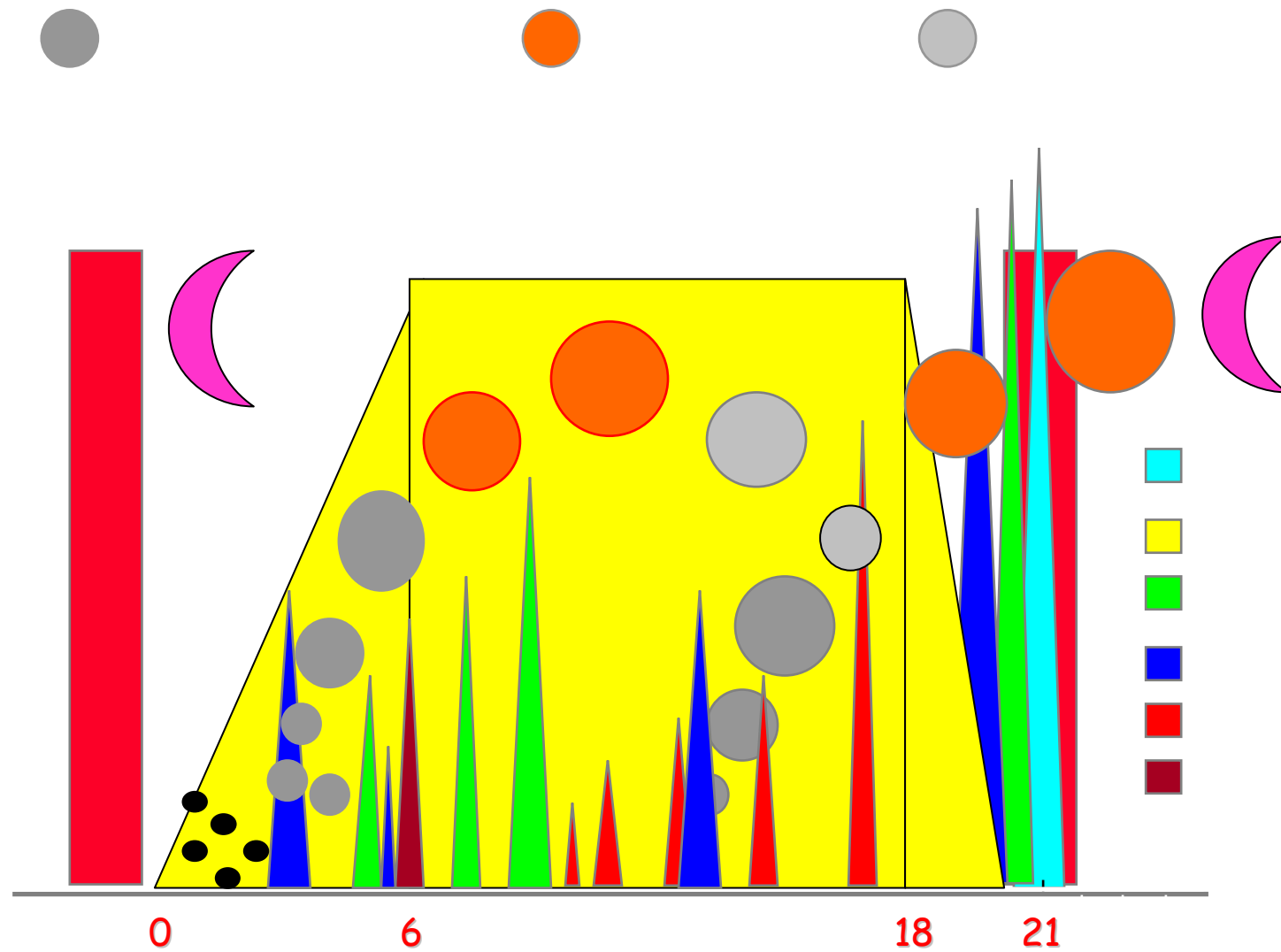
Critères de choix de la donneuse

- Anamnèse
 - Valeur génétique
 - Commémoratifs cliniques et pathologiques
 - Manifestation à intervalles réguliers de 2 voire 3 oestrus
 - Délai de 45 à 60 jours / SOV précédente
 - Absence (< 30 j) de traitements anti-parasitaires ou de vaccinations
- Examen clinique
 - Identification d'éventuelles lésions génitales : métrites, salpingites, kystes ...
 - Période d'attente supérieure à 60 voire 90 jours
 - Bilan énergétique positif ($EC > 3$)

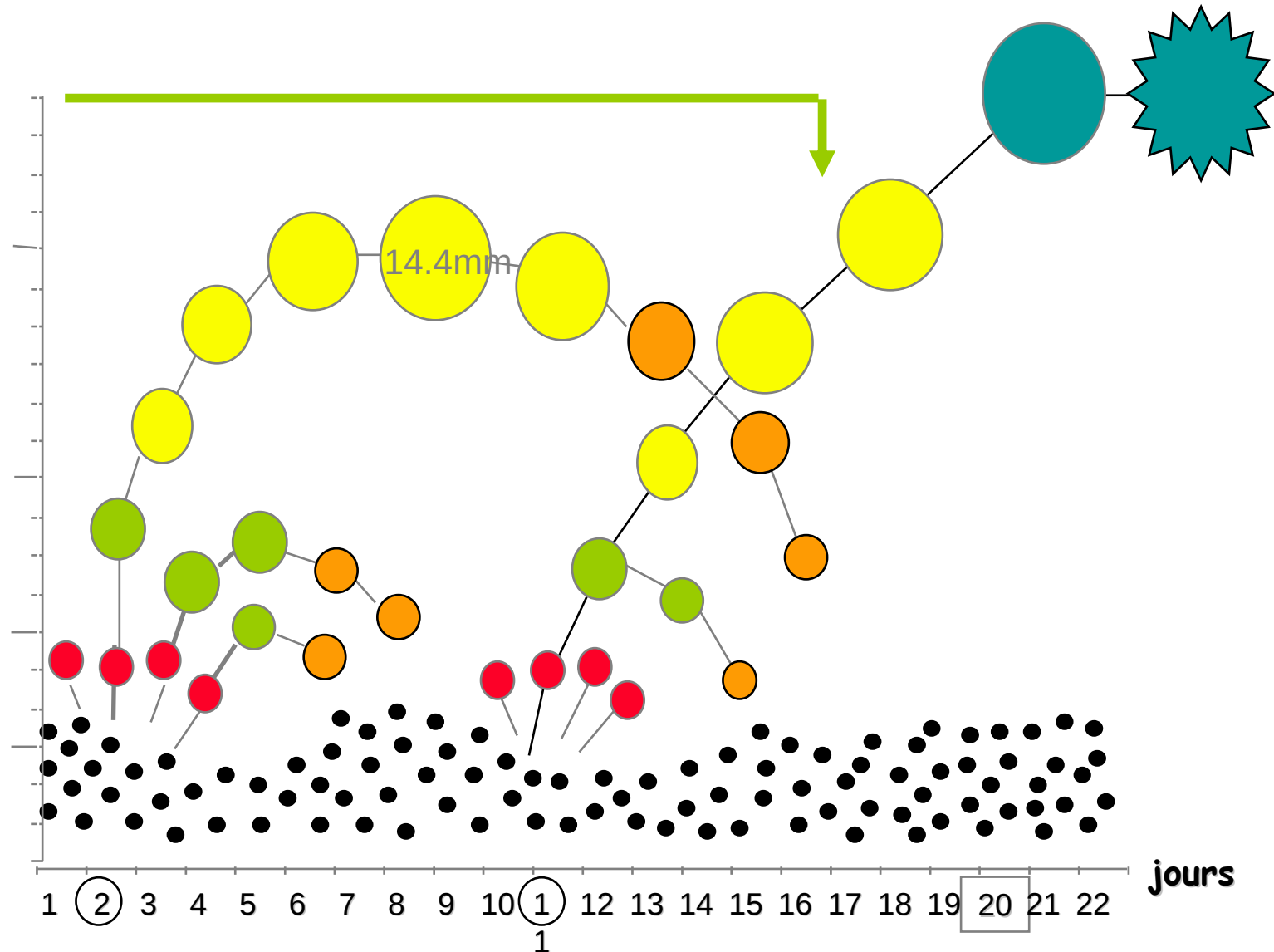
La superovulation : principes généraux

- De la croissance folliculaire
 - recrutement, sélection, dominance
 - vagues de croissance folliculaire
 - traitements hormonaux de la superovulation
- De la lutéolyse
 - les prostaglandines

Hormonologie du cycle chez la vache



Cinétique folliculaire



Nature des traitements hormonaux

- La Gonadolibérine (GnRH)
- La Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
- La Human Menopausal Gonadotrophin
- Les extraits hypophysaires (po > bo > ov)

Traitements hormonaux : la GnRH

- La GnRH
 - Inefficacité pour induire une superovulation
 - Utilisation en association avec d'autres hormones : ?
- La Human Menopausal Gonadotrophin
 - Résultats comparables à la PMSG
 - Coût plus élevé

Traitements hormonaux : La PMSG

- Effets
 - Effet FSH (2/3) et LH (1/3) variable selon le stade de gestation de la jument au moment du prélèvement
 - Injection IM : 2.000 et 3.000 UI
- Inconvénients
 - Augmentation de la réponse avec la dose
 - Augmentation du risque d'anovulations et de dégénérescence des embryons avec la dose
 - Effet selon la race : Jersey > Charol > Pie-Noire.
 - Longue demi-vie (120 heures) : ----> anti-PMSG
 - Induction de la formation d'anticorps

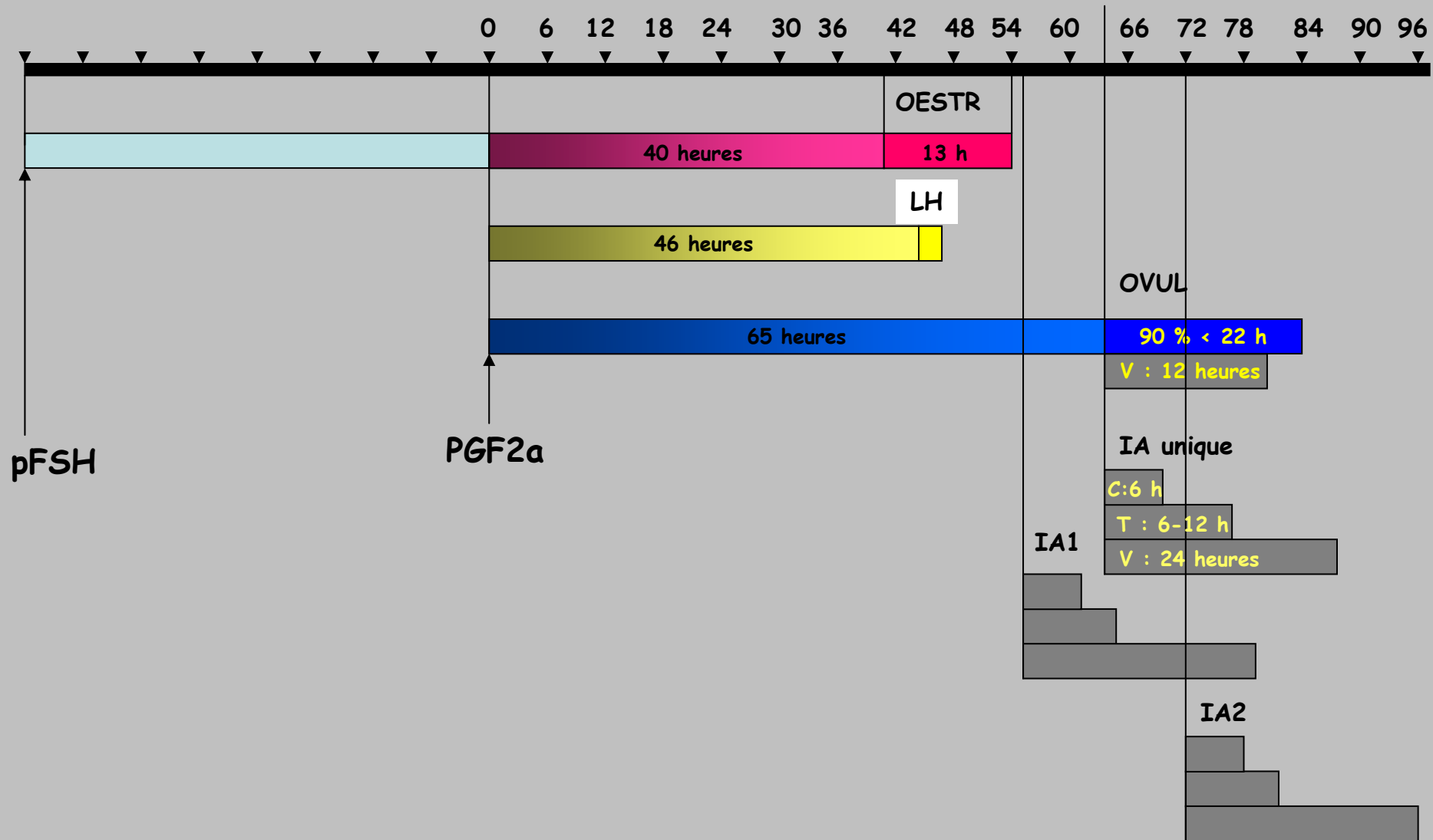
Traitements hormonaux : extraits hypophysaires

- Dose :
 - Totale : le plus souvent 32 mg (parfois 50 mg)
 - Doses journalières décroissantes 6, 5, 3 et 2 mg
2 fois / J pendant 4 jours
 - Demi-vie plus courte : 5 à 6 h (moins d'acide sialique)
- Injections répétées nécessaires
- Concentrations maximales 3 h après l'injection
- Concentration minimale 12 h après la dernière injection
- Pas de formation d'anticorps

La superovulation : PMSG, pFSH, PGF

	PMSG		pFSH
	(2500 à 3000 UI)		(32 mg PN et 40 mg BBB)
J 0 (8 à 12)	Matin	PMSG	FSH/LH (6 ou 8 mg)
	Soir		FSH/LH (6 ou 8 mg)
J1Matin			FSH/LH (5 ou 6 mg)
	Soir		FSH/LH (5 ou 6 mg)
J2Matin	PGF		FSH/LH (3 ou 4 mg) et PGF
	Soir		FSH/LH (3 ou 4 mg)
J3	Matin		FSH/LH (2 mg)
	Soir		FSH/LH (2 mg)
J4	Matin	IA	IA
	Anti-PMSG (1800 UI)		
	Soir	IA	IA
J11	Récolte et PGF		Récolte et PGF

Politique d'insémination lors de superovulation au moyen de FSH



Quelques références relatives aux vaches superovulées

- 90 % des ovulations apparaissant au cours d'une période de 22 heures
 - Yadav et al. Therio 1986,26,509).
- L'intervalle entre la première et la dernière ovulation est compris entre 1,2 et 12 heures
 - Adams Therio 1994,41,19-24 ;
 - Purwantara et al. Anim.Reprod.Sci. 1994,37,1-5
 - Laurincik et al. Therio 1993,39,537-544)
- L'intervalle moyen entre l'induction de la lutéolyse (double injection d'une PGF2alpha) et le début de l'oestrus a été de 39,4 +/- 7,7 heures (23,4 à 58,3 h). La durée de l'oestrus a été de 13,2 +/- 4,1 heure (5,4 à 20,9 heures).
 - Dalton et al. J.Anim.Sci.,2000,78,2081-2085

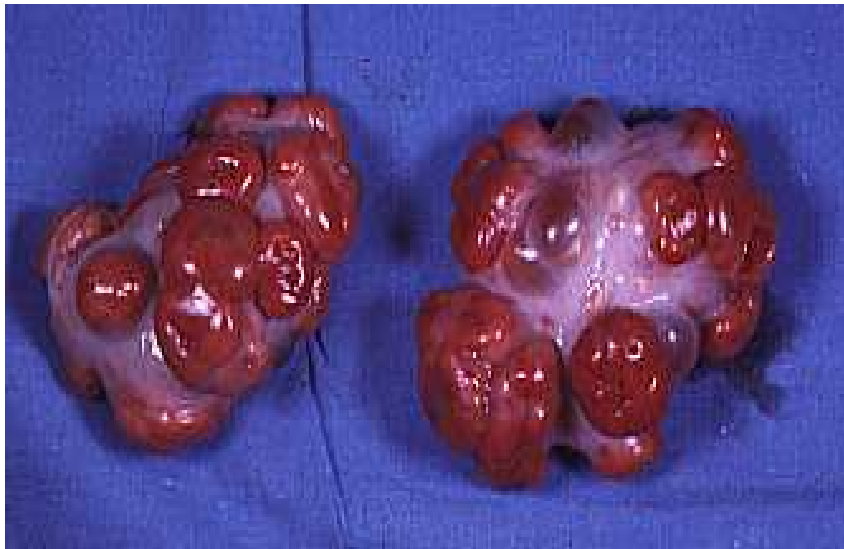
Quelques références relatives aux vaches superovulées

- 6 et 12 heures le temps requis pour que les spermatozoïdes déposés au niveau du corps utérin atteignent l'endroit de fertilisation
 - (Hunter et Wilmot Anim.Reprod.Sci.,1983,5,167-173, Wilmot et Hunter Reprod.Nutr.Dev.1984,24,461-468, Hawk et al. J.Dairy Sci. 1987,70,1487-1503).
- Durée de vie dans le tractus génital du spz
 - Trimberger GW et Davis HP Conception rate in dairy cattle from artificial insemination at various stages of oestrus. Nebr.Agric.Exp.Stn.res.Bull, 1943,129,1-14.
- Durée de fécondabilité de l'ovocyte 6 à 10 heures
 - Brackett et al. Fertilization and early development of cow ova. Biol Reprod.1980,23,189-205)

La superovulation : conséquences

- Nombre de corps jaunes

■ N de corps jaunes :	> 2	> 4	> 5
■ % de vaches :	85%	75 %	65 %

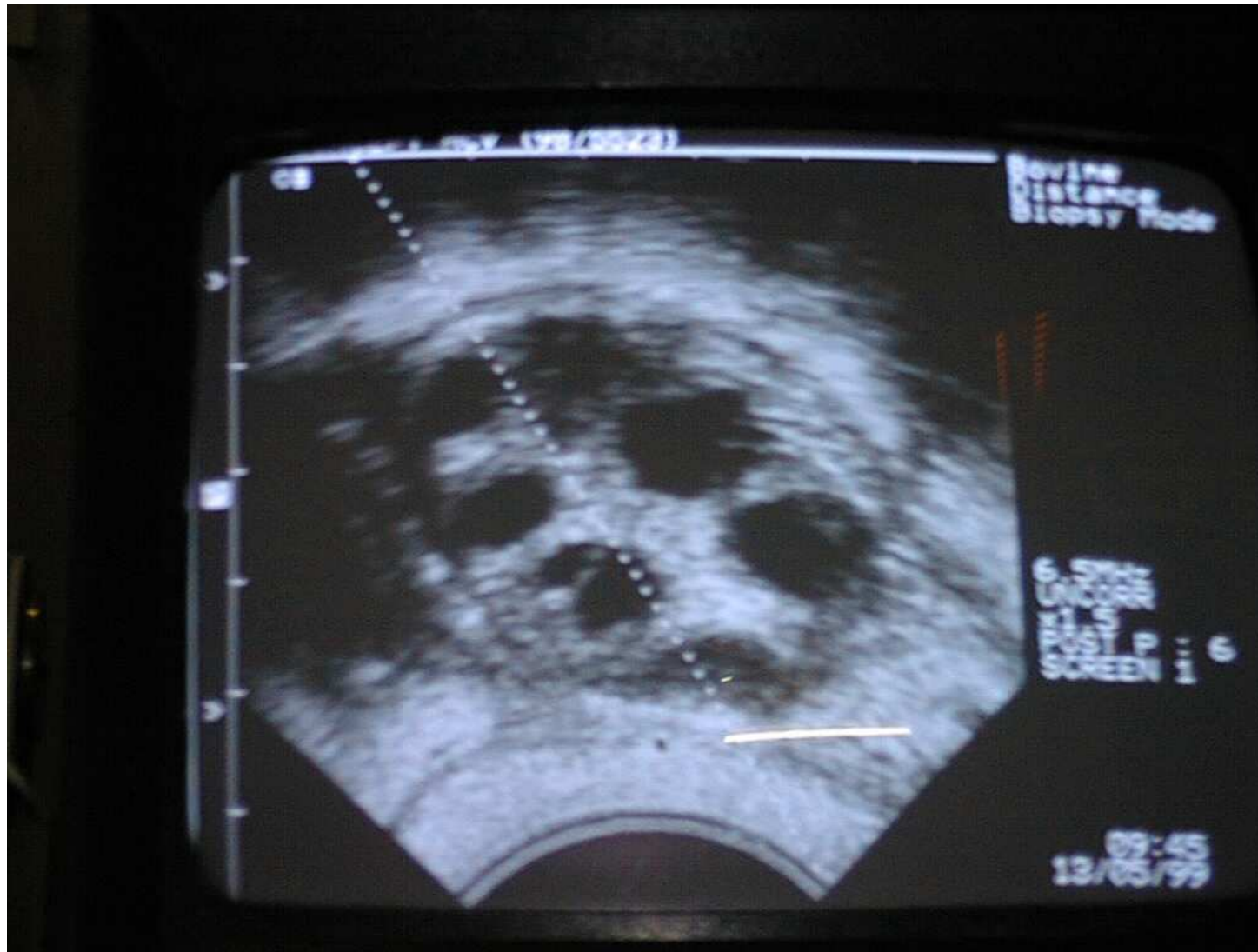


La superovulation : conséquences

Nombre de corps jaunes (récolte chirurgicale)



Ovaire en cours de superovulation ²⁴³⁶



La superovulation : conséquences

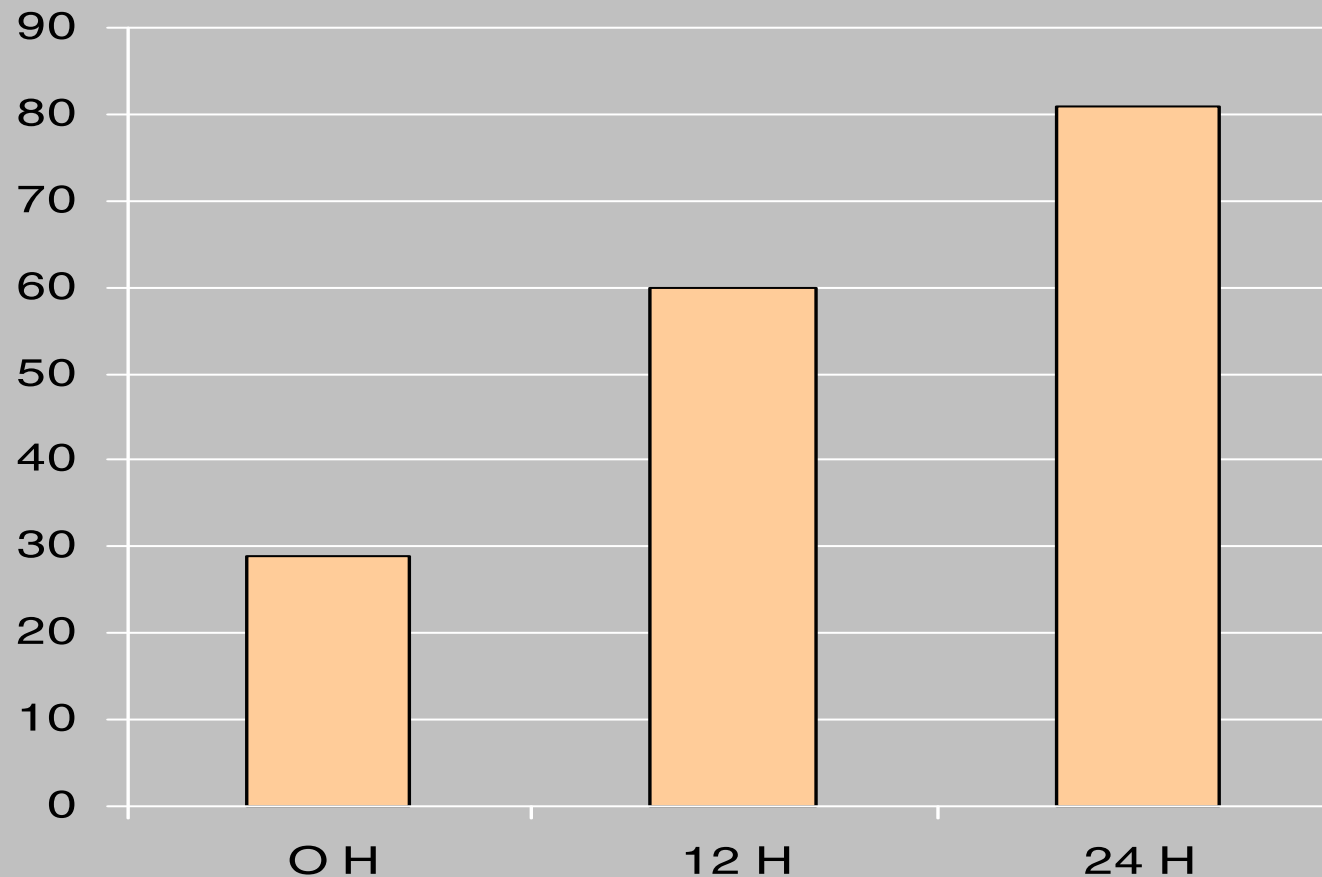
- Oestrus

- Oestrus plus précoce : 35 à 48 h après la PGF
- Apparition plus précoce des pics d'oestradiol et de LH
- Ovulations 24 h après pic de LH et pendant +/- 12 h

- Effets hormonaux

- LH : pas de modification de la sécrétion
- Progestéronémie :
 - 3 phases d'évolution
 - 2 profils anormaux possibles

Effet du moment d'insémination sur le taux de fécondation de vaches superovulées, inséminées 0, 12 ou 24 heures après un oestrus détecté au moyen du système Heatwatch (Dalton et al. J.Anim.Sci.,2000,78,2081-2085)



La superovulation : facteurs d'influence

- Facteurs propres à l'animal
 - N de follicules préantraux (2 à 5 mm) lors du traitement
 - Effet négatif d'un follicule dominant
 - Age
 - Race
- Nature du traitement de superovulation :
 - PMSG vs pFSH
 - Rapport LH FSH de la préparation hypophysaire
- Moment de mise en place
 - J 9 à J 15 du cycle : moment classique
 - J 2 à J 7 :
 - meilleur recrutement folliculaire
 - réduction du nombre des ovulations : moins bonne lutéolyse
- Traitements alternatifs

La superovulation : autres traitements

- Amélioration du recrutement
 - Le priming
 - L'insulin growth factor (IGF)
- Suppression du follicule dominant
 - GnRH
 - Valérate d'oestradiol
 - Progestagènes
 - Les traitements chirurgicaux

La superovulation : recrutement amélioré

- Le priming
 - = pré-traitement au moyen de FSH à J 2 ou J 3 du cycle
 - Effets positifs, négatifs voire absents
 - Inadéquation avec le recrutement des follicules préantraux
 - Atrésie du follicule dominant retardée et effet inhibiteur prolongé
 - Effet d'atrésie du priming sur les follicules préantraux
 - Effet de lutéinisation précoce des follicules
- L'IGF
 - agent médiateur de la PMSG et de la GH
 - Effet sur les follicules préantraux
 - Mécanisme ?

Suppression de l'effet inhibiteur du follicule dominant

- GnRH : effet réel ?
- Valérate d'oestradiol
 - inhibiteur de la croissance folliculaire au début d'une vague
 - stimulation indirecte de la croissance d'une 2ème vague
 - recherches complémentaires nécessaires
- Les traitements chirurgicaux
 - cautérisation
 - ablation chirurgicale d'un ovaire
 - éclatement manuel ou par ponction échoguidée et début de la SOV 36 à 48 heures après
- Les progestagènes

Induction d'une superovulation au moyen de progestagènes

- Nature : progestérone ou norgestomet
- Voies : SC (implant) ou vaginale (spirale ou CIDR)
- Avantages
 - Synchronisation de plusieurs donneuses
 - Contrôle de la croissance folliculaire
 - Gestion plus aisée des receveuses
- Inconvénients
 - Pertes vaginales
 - Pertes du système vaginal

La superovulation : traitement avec un implant

		PMSG (2500 à 3000 UI)	pFSH (32 mg PN et 40 mg BBB)
J0		Implant	Implant
J7	Matin	PMSG	FSH/LH (6 ou 8 mg)
	Soir		FSH/LH (6 ou 8 mg)
J8	Matin		FSH/LH (5 ou 6 mg)
	Soir		FSH/LH (5 ou 6 mg)
J9	Matin	Retrait	Retrait
		PGF	FSH/LH (3 ou 4 mg) et PGF
	Soir		FSH/LH (3 ou 4 mg)
J10	Matin		FSH/LH (2 mg)
	Soir		FSH/LH (2 mg)
J11 (J0)	Matin	IA 1	IA 1
		Anti-PMSG (1800 UI)	
	Soir	IA 2	IA 2
J7		Récolte et PGF	Récolte et PGF

La superovulation : traitement avec une spirale

		PMSG (2500 à 3000 UI)	pFSH (32 mg PN et 40 mg BBB)

J 0		Spirale	Spirale
J 10	Matin	PMSG	FSH/LH (6 ou 8 mg)
	Soir		FSH/LH (6 ou 8 mg)
J 11	Matin		FSH/LH (5 ou 6 mg)
	Soir		FSH/LH (5 ou 6 mg)
J 12	Matin	Retrait	Retrait
		PGF	FSH/LH (3 ou 4 mg) et PGF
J 13	Soir		FSH/LH (3 ou 4 mg)
	Matin		FSH/LH (2 mg)
J 14 (J0)	Soir		FSH/LH (2 mg)
	Matin	IA 1	IA 1
		Anti-PMSG (1800 UI)	
J 7	Soir	IA 2	IA 2
		Récolte et PGF	Récolte et PGF

La récolte d 'embryons in vivo

La récolte d 'embryons : matériel

- Sonde dilatatrice
 - prépare le col à la pénétration de la sonde de récolte
 - 60° cm, extrémité de 4 mm au sommet
- Sondes de récolte
 - à trois voies dite sonde IMV ou de Cassou
 - air, injection, récupération
 - bille à l 'extrémité et partie rigide pour la mise en place
 - à deux voies dite sonde de Han
 - air et voie pour l 'injection et la récupération en alternance
 - mandrin interne pour la mise en place

La récolte d'embryons : matériel

- Seringues
 - 20 ml pour gonfler le ballonnet
 - 50 ml pour injecter le liquide de récolte
- Liquides de récolte
 - 250 à 500 ml par corne utérine de
 - PBS : Phosphate Buffered Saline
 - parfois complété de FCS (Fetal Calf Serum) à 2 %
 - Flacons stériles à 37 °C

La récolte d 'embryons : méthodes

- Méthode chirurgicale
- Méthode non chirurgicale ou transcervicale
 - Travail de contention
 - Tranquillisation (générale, épidurale, buscopan ?)
 - Hygiène de la région périnéale
 - Introduction de la sonde
 - Positionnement du ballonnet 3 doigts en avant de la bifurcation
 - Fixation de la sonde par gonflement (10 ml génisse et 15 ml vache)
 - Progression du flexible (sonde de Cassou)
 - Fixation du flexible (bouchon à visser)
 - Injection du PBS et massage de la corne
 - Injection d 'air en fin de perfusion
 - Dégonflement du ballonnet
 - Retrait du flexible
 - Instillation d'une solution d'antibiotiques

La récolte d 'embryons : objectifs

- Le liquide doit atteindre le 1/3 supérieur de la corne
- Le liquide injecté doit être récupéré
- Le nombre d 'embryons dépend du volume de liquide récupéré
- Le flushing ne doit pas induire de lésions utérines

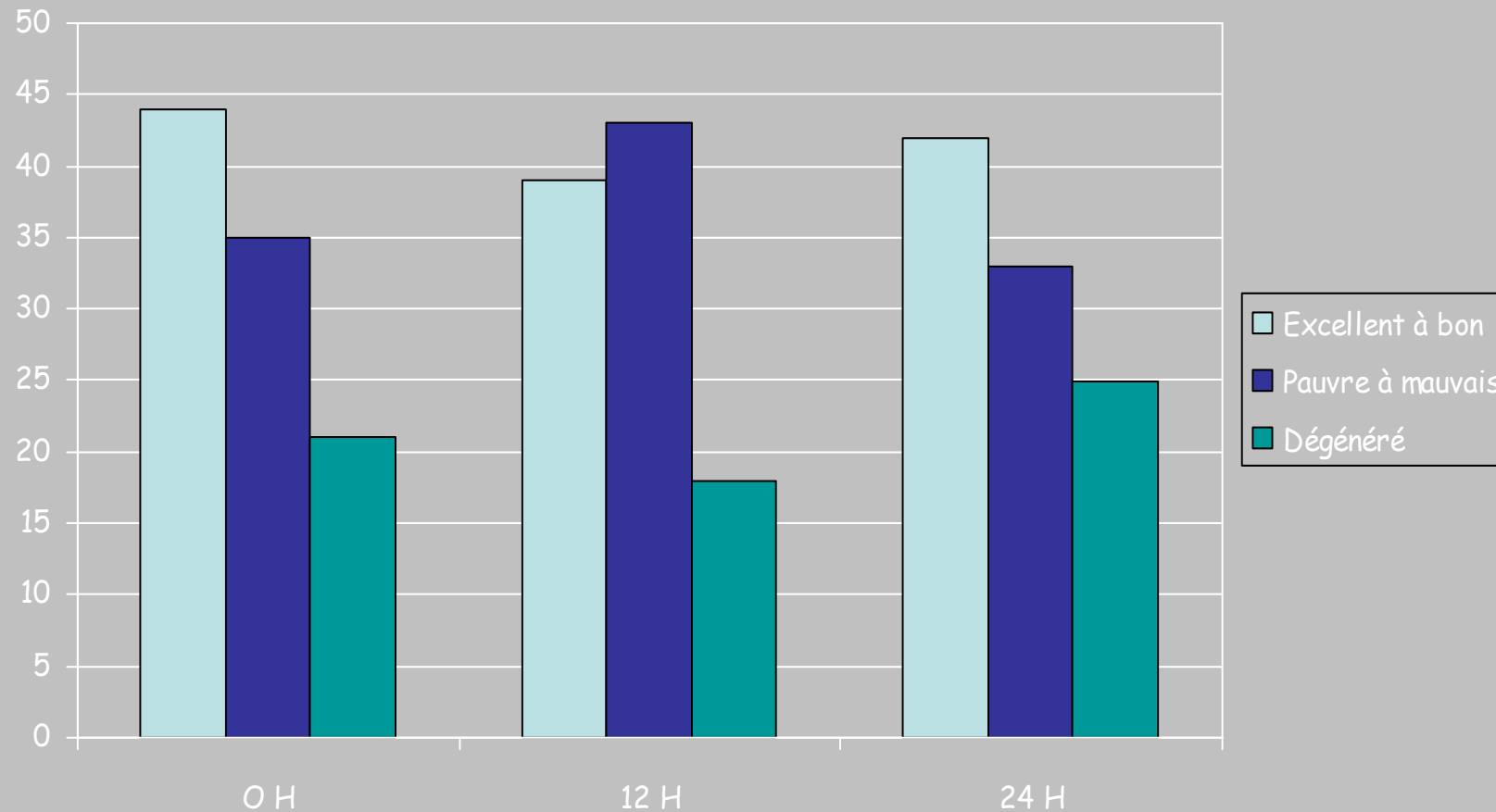
Récolte NC d'embryons



Récolte d 'embryons : facteurs d'influence

Effet du moment d'insémination sur la qualité des embryons

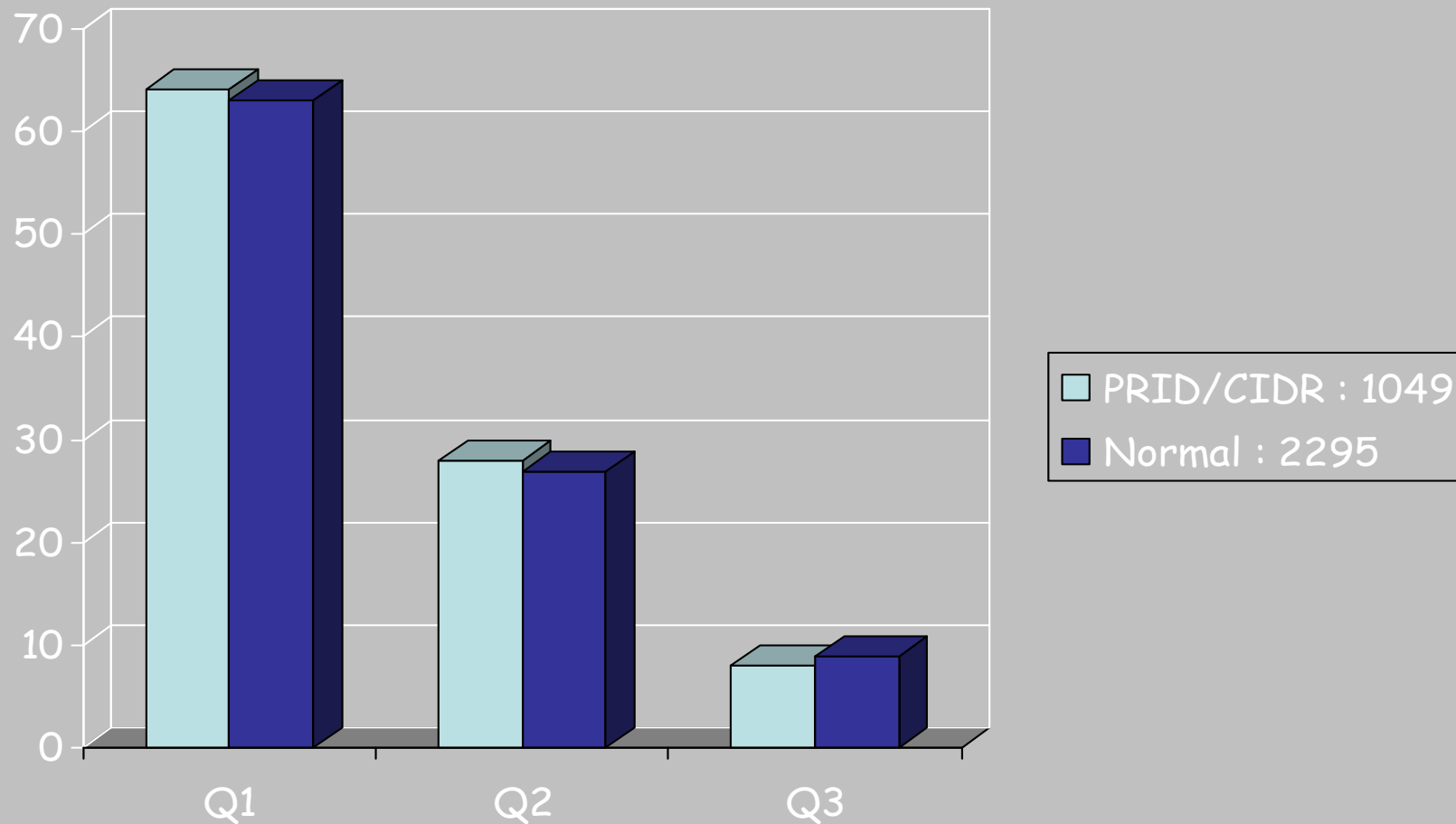
récoltés (En % par rapport au nombre d'embryons récoltés soit 57, 124 103) (Dalton et al. J.Anim.Sci.,2000,78,2081-2085)



Résultats Embryobec Quebec (Dr. Remillard) : effet de l'âge

Age de la donneuse	Moyenne de bons embryons/recol	Nbre de recoltes	Embryons totaux/ recolte	% bon embryons versus embryons recoltes
1	5.9	788	10.2	58.0 %
2	6.4	418	10.0	63.7 %
3	7.1	468	11.7	60.4 %
4	6.6	543	12.2	54.4 %
5	7.4	560	13.3	56.2 %
6	6.9	539	12.9	53.2 %
7	5.7	438	11.8	48.0 %
8	5.6	362	12.2	46.3 %
9	4.4	255	12.0	36.9 %
10	5.0	177	11.7	42.5 %
11	3.5	102	8.8	39.3 %
12	6.7	55	13.1	50.7 %
13 +	5.0	124	11.1	45.1 %

Effet des progestagènes sur la qualité des embryons (Dr. Remillard, Embryobec, Québec)



Détermination de la qualité des embryons

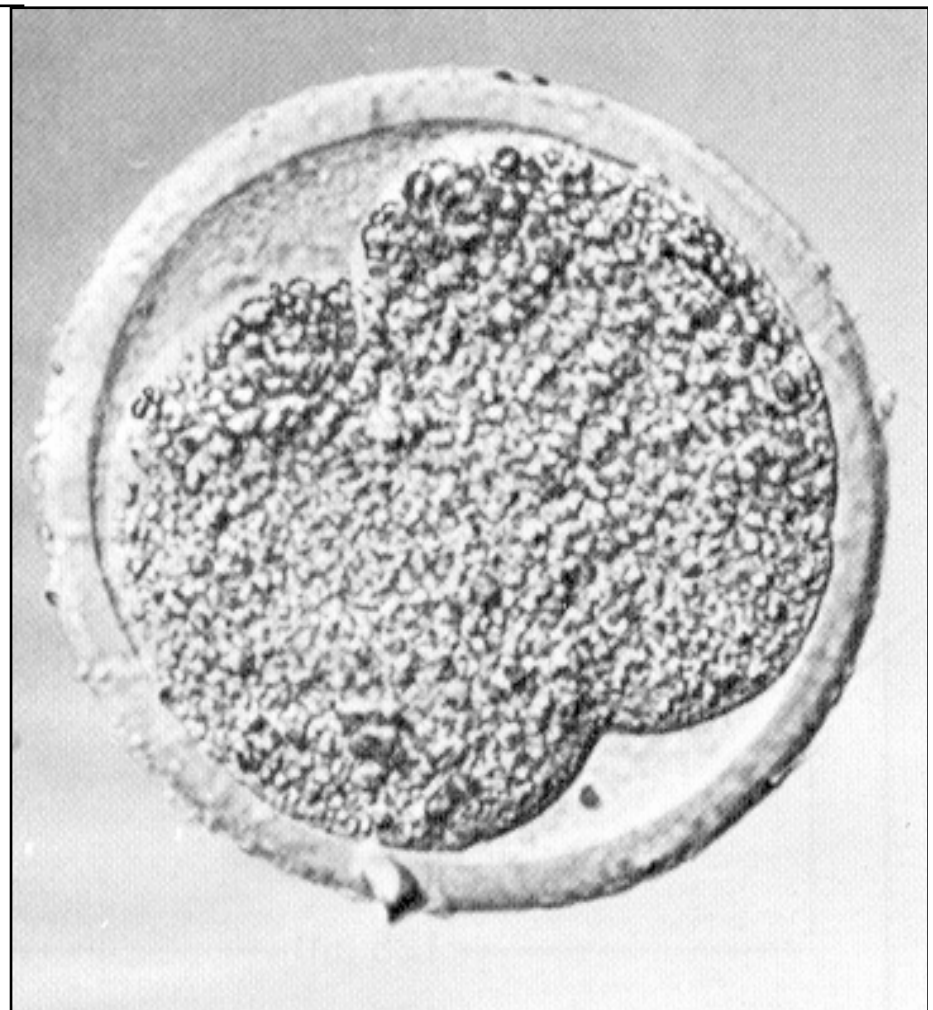
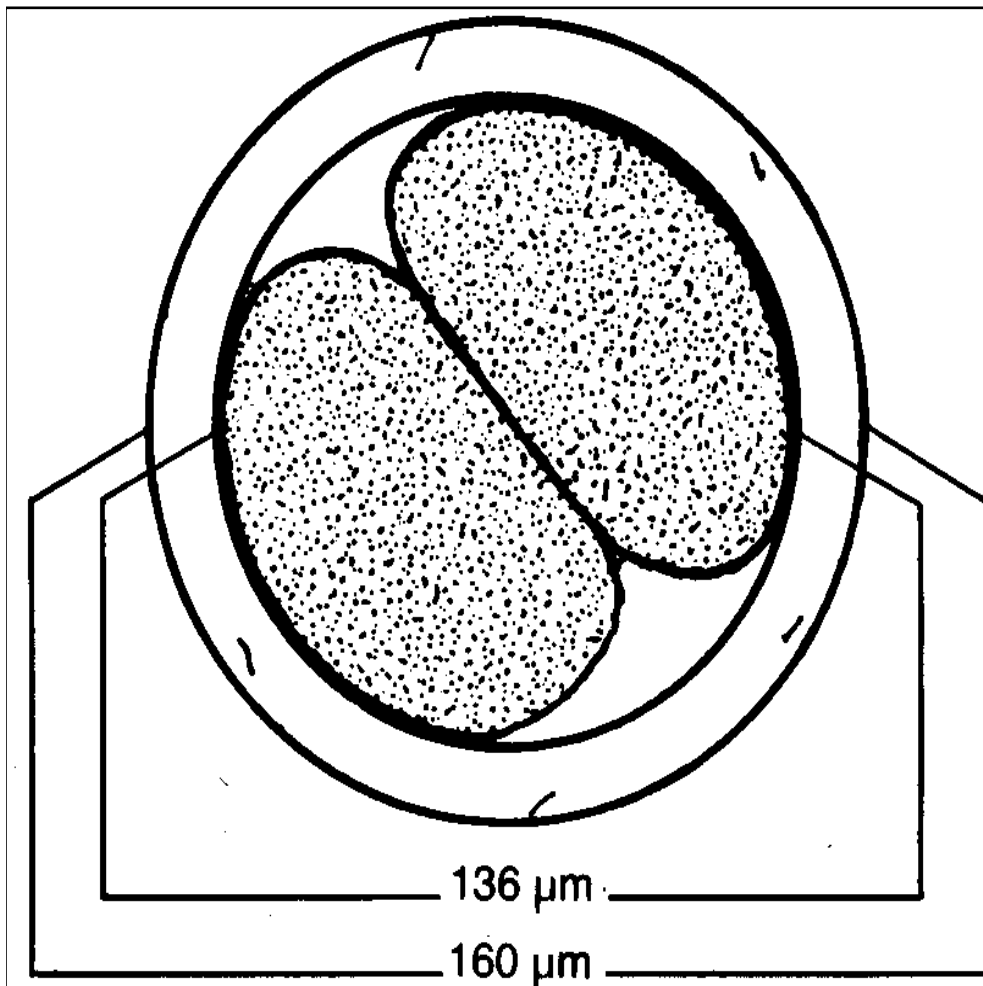
Chronologie du développement embryonnaire

Jour	Heures	Evènements	Taille

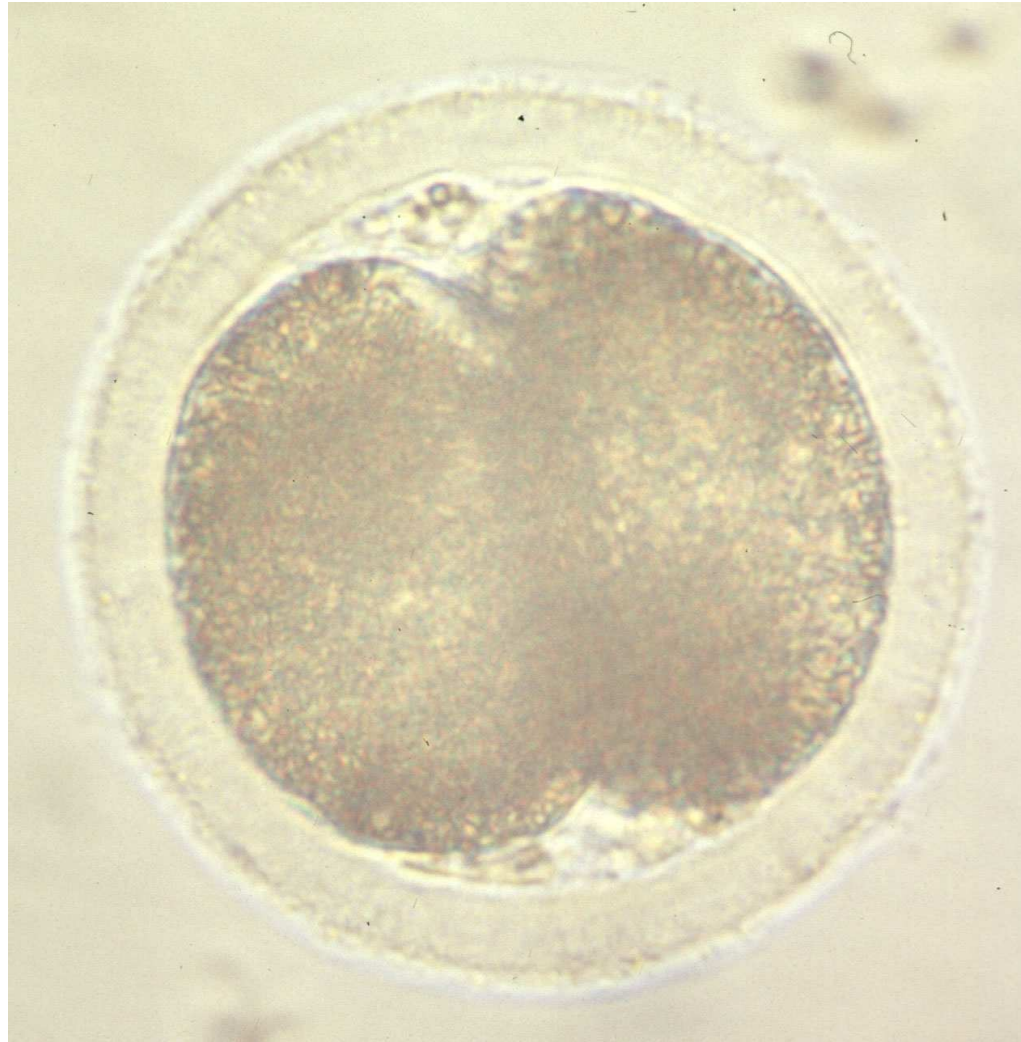
0	0	Début des chaleurs	
0	7	Libération de LH (pendant 8 à 12 heures)	
0	15	Insémination	
1	30	Ovulation	160
1	35	Fécondation	
2	50	Stade deux cellules	160
2	55	Stade 4 cellules	160
3	75	Stade 8 cellules	
4	100	Stade 16-32 cellules	
5	120	Passage de l'embryon dans l'utérus	
6	130	Stade 30-64 cellules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

Embryon stade deux blastomères 2014

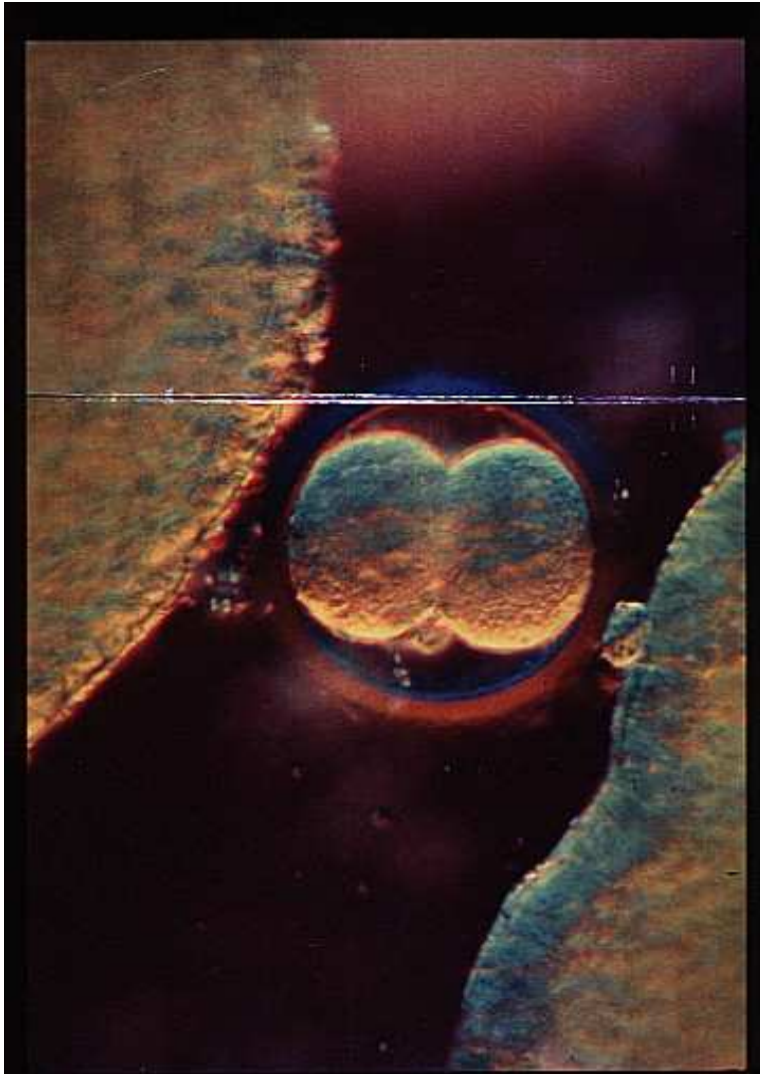
J 2



Embryon stade deux blastomères 2513

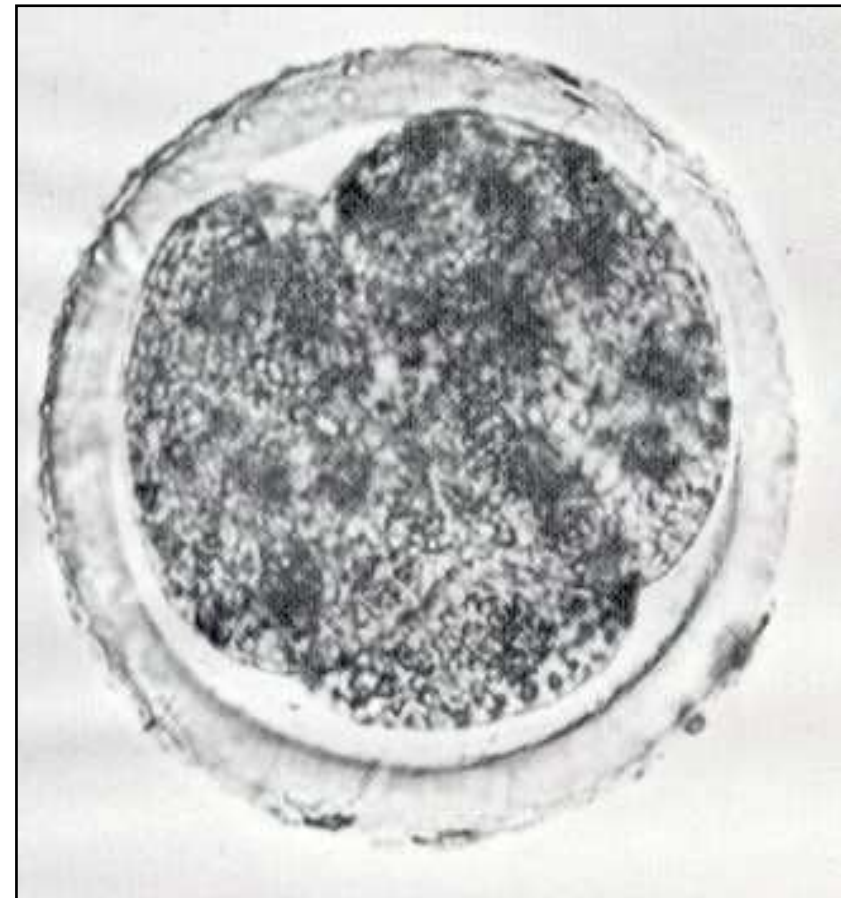
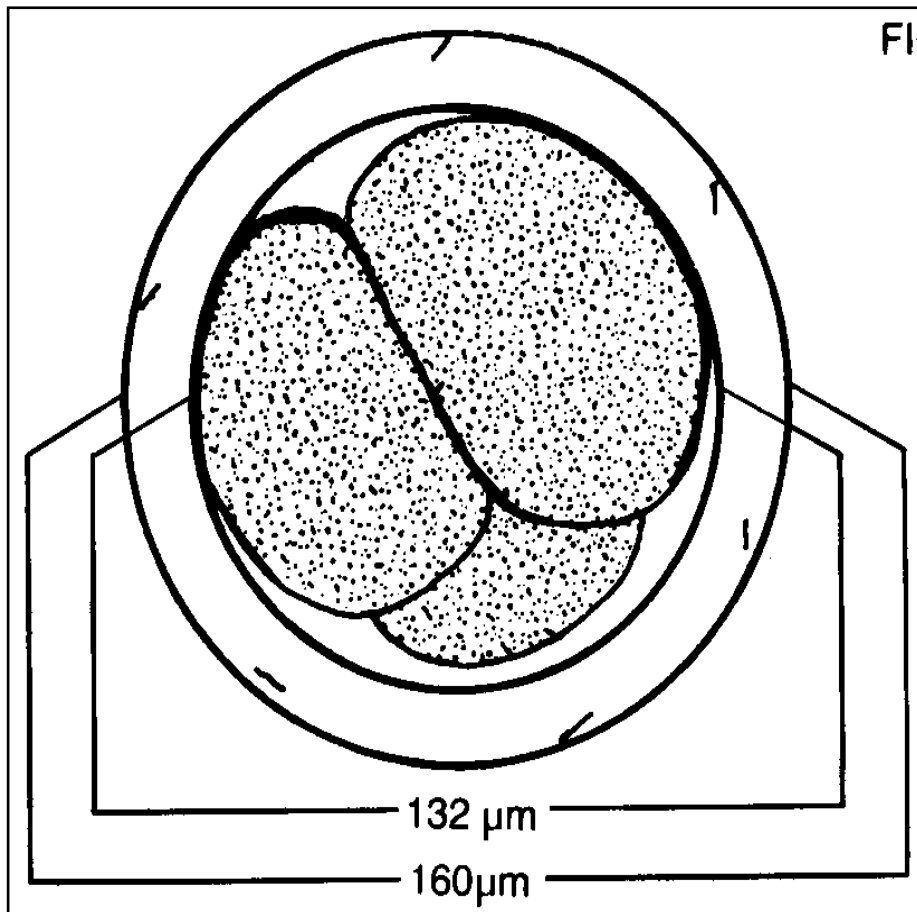


Embryon stade deux cellules dans l'oviducte



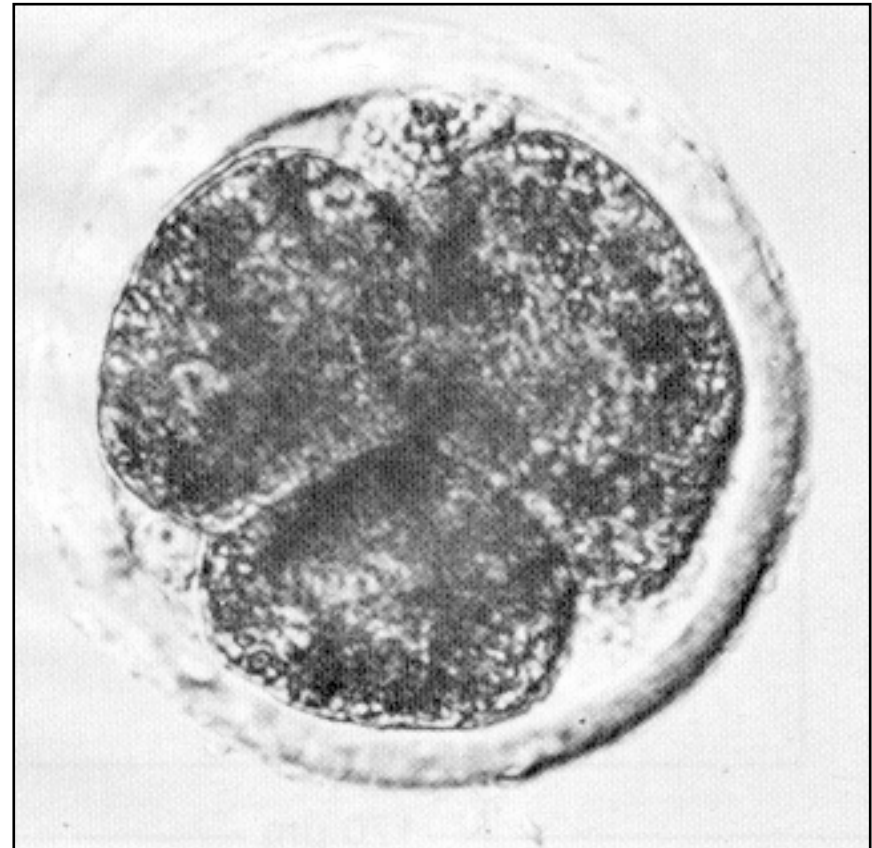
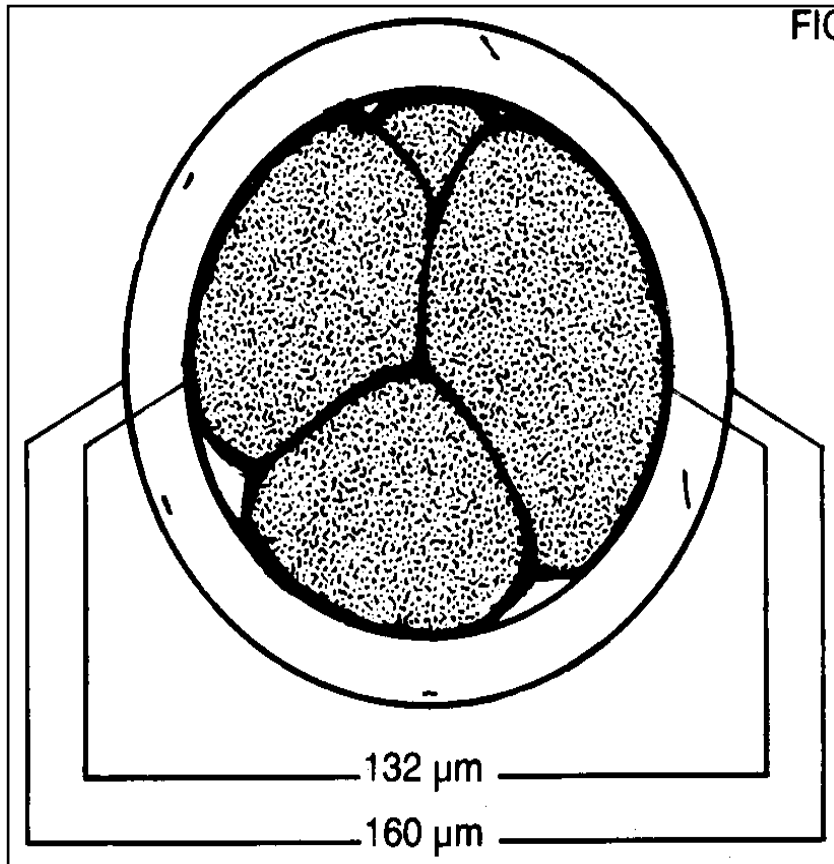
Embryon : stade deux blastomères
(manque de synchronisme dans les divisions, embryon à trois
blastomères)

J 2

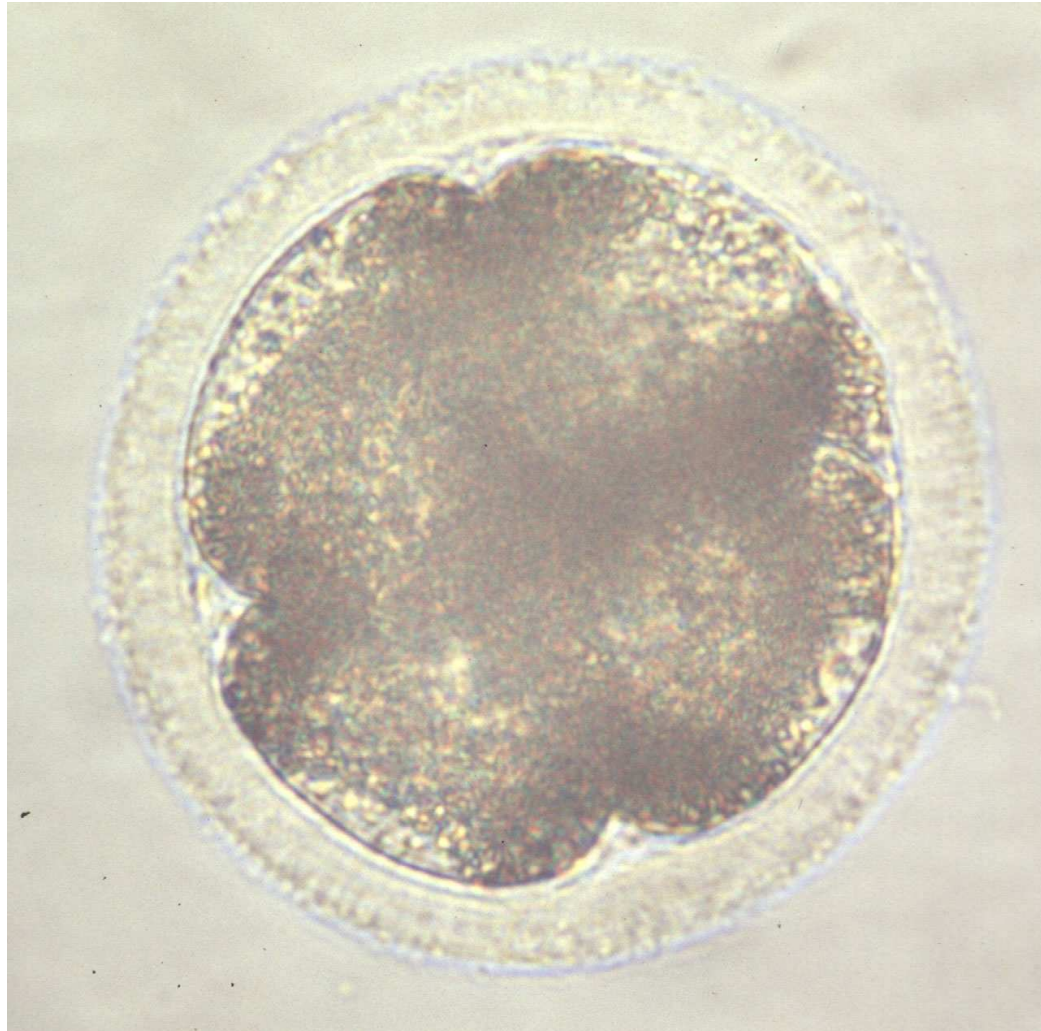


Embryon : stade quatre blastomères 2010

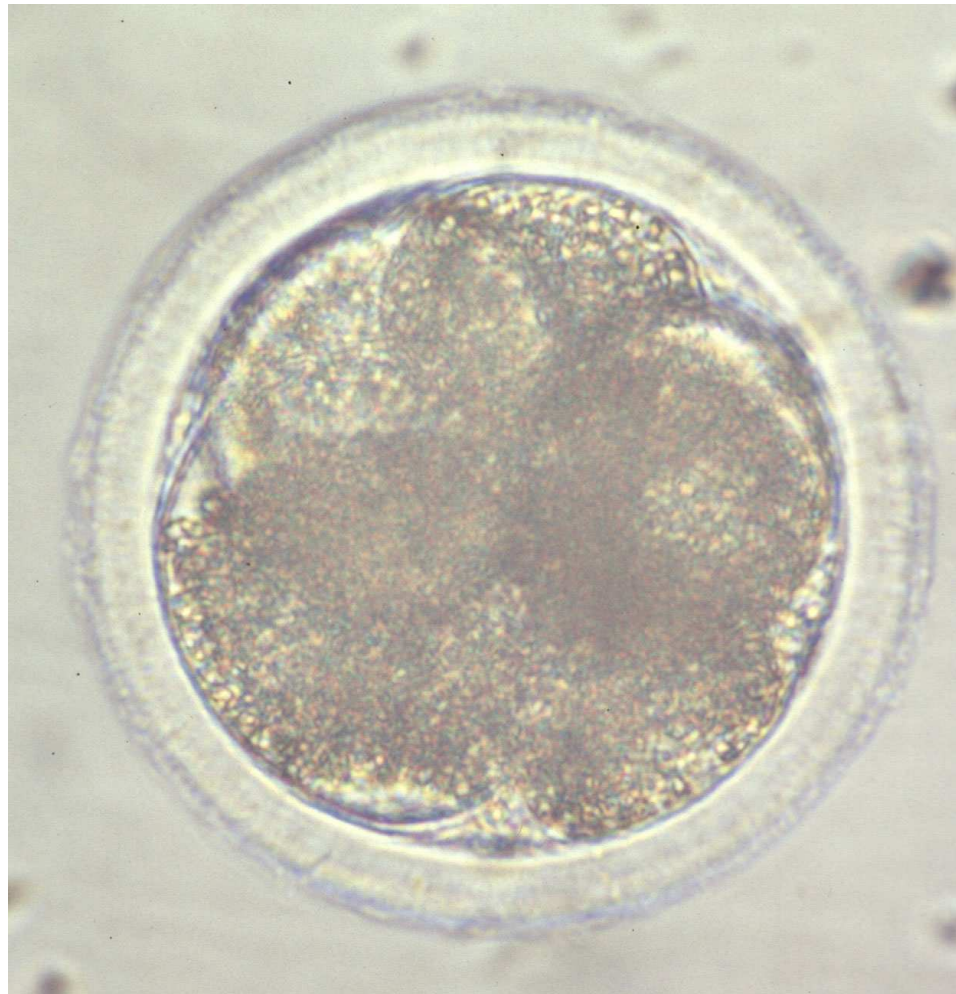
J 2



Embryon stade 4 blastomères ²⁵¹⁴

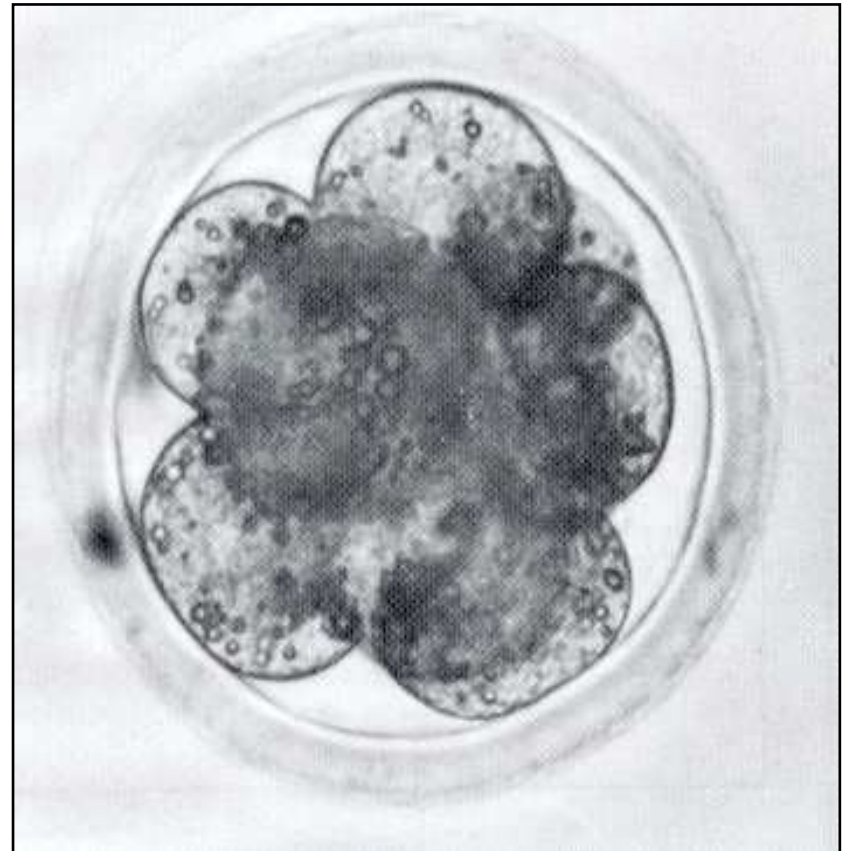
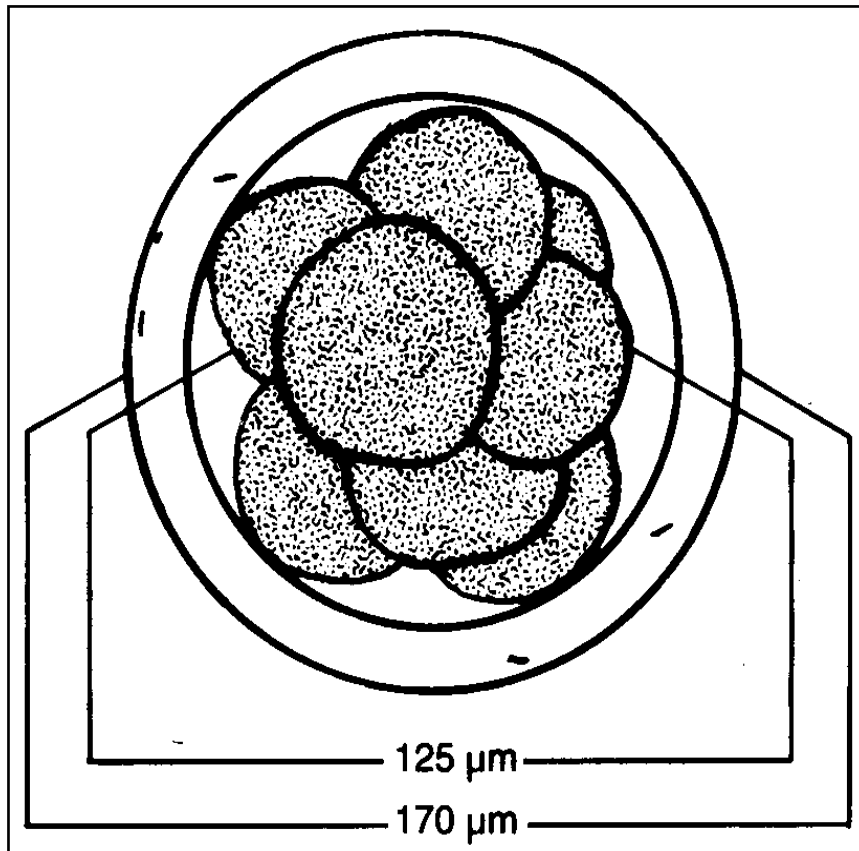


Embryon stade 6 blastomères ²⁵¹⁵



Embryon : stade huit blastomères 2009

J 3

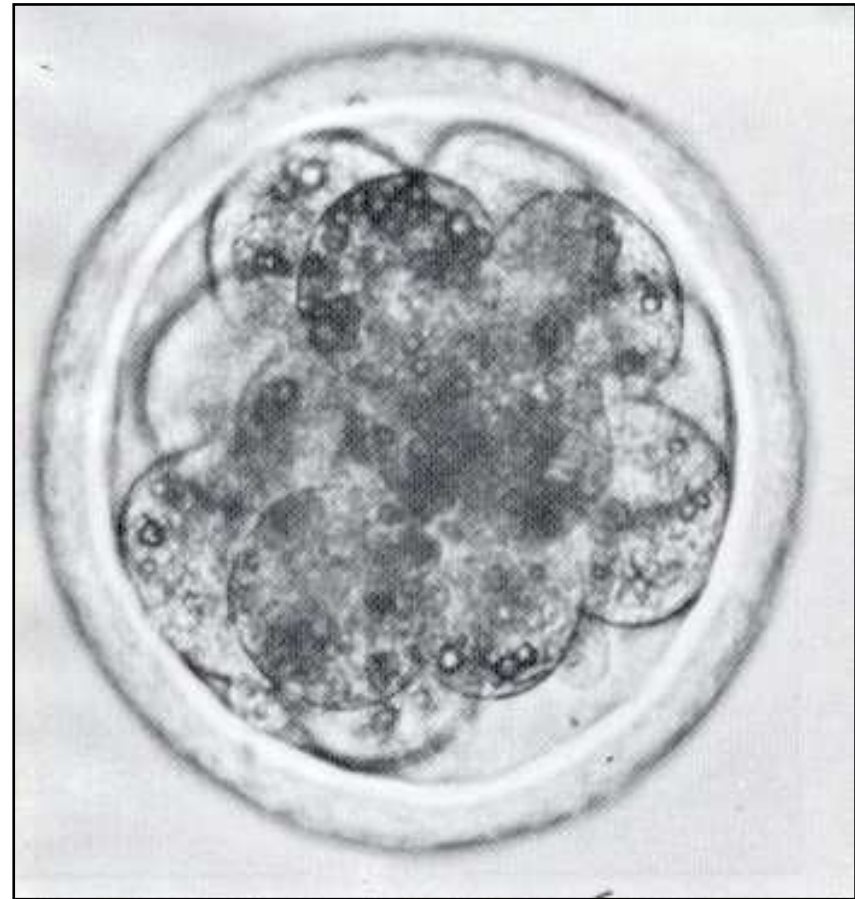
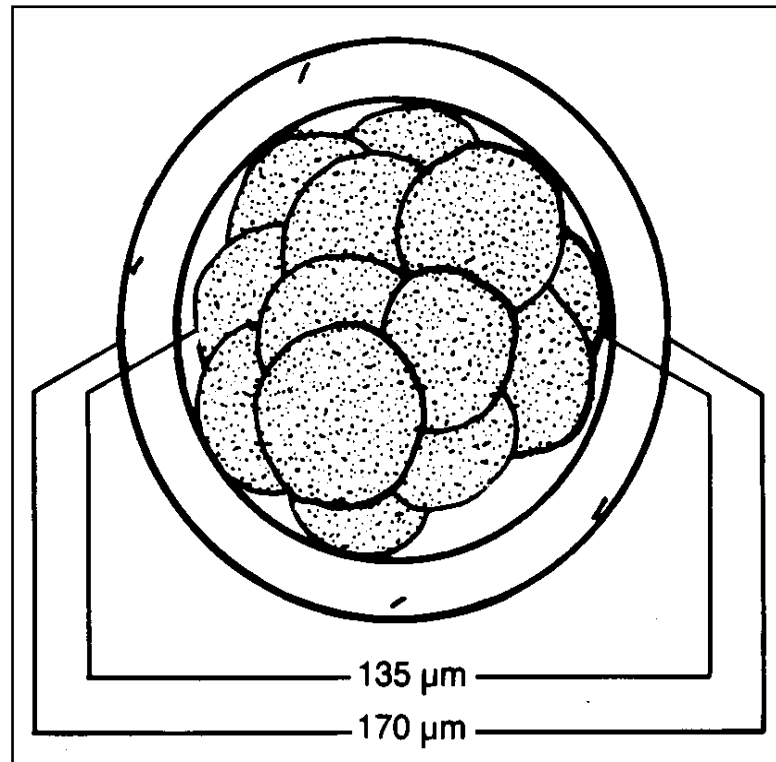


Embryon stade 8 blastomères ²⁵¹⁸



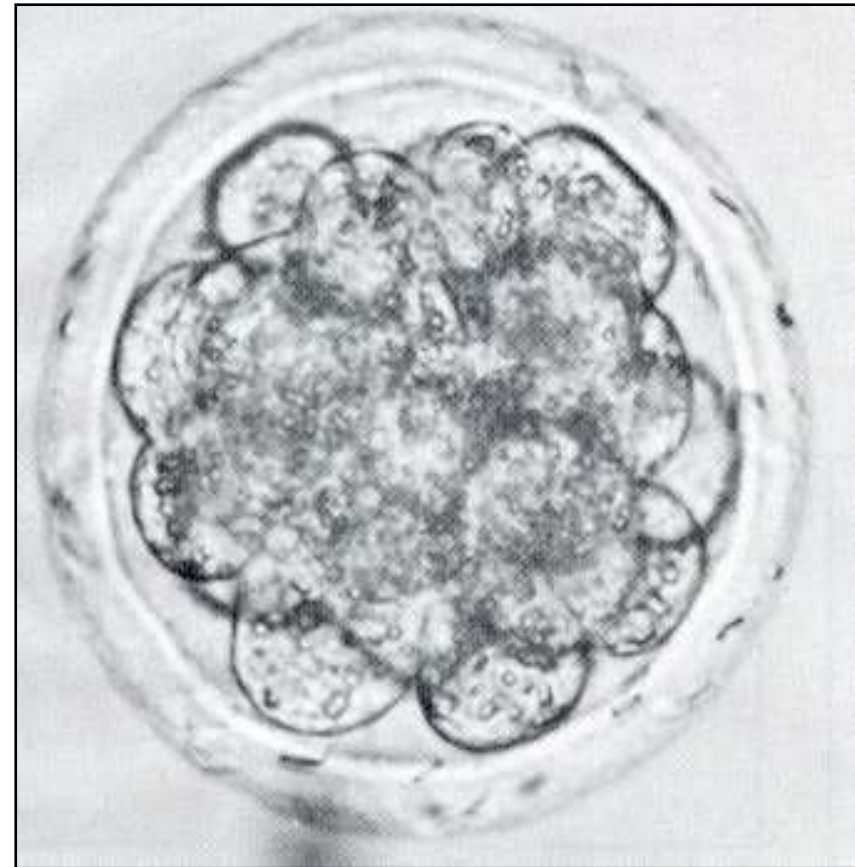
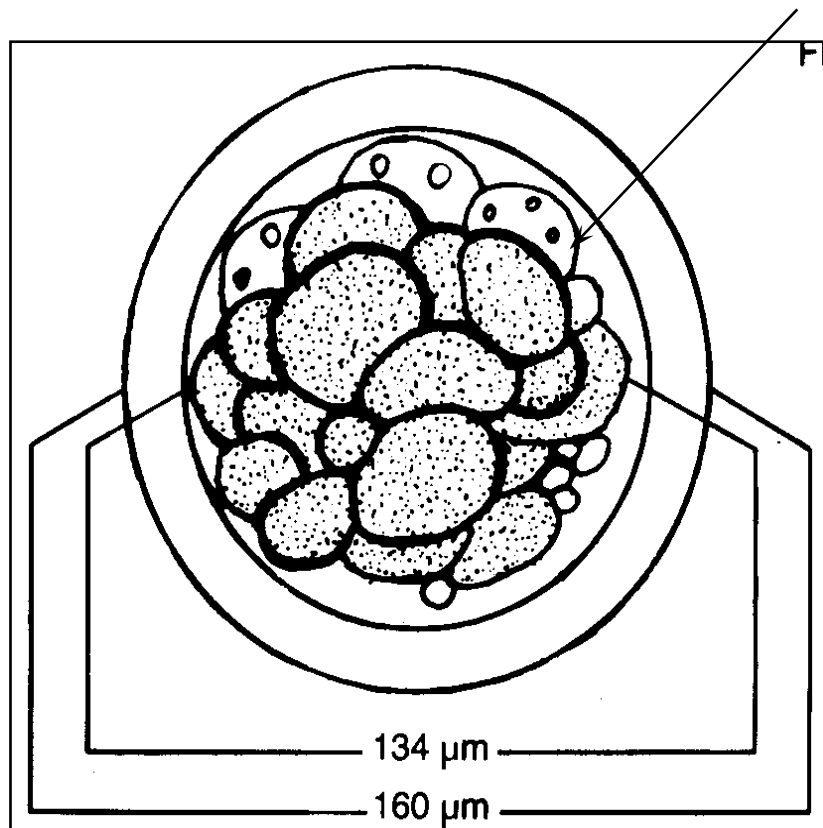
Embryon : stade seize blastomères 2008

J 4



Embryon : stade 40 blastomères 2007

J 5

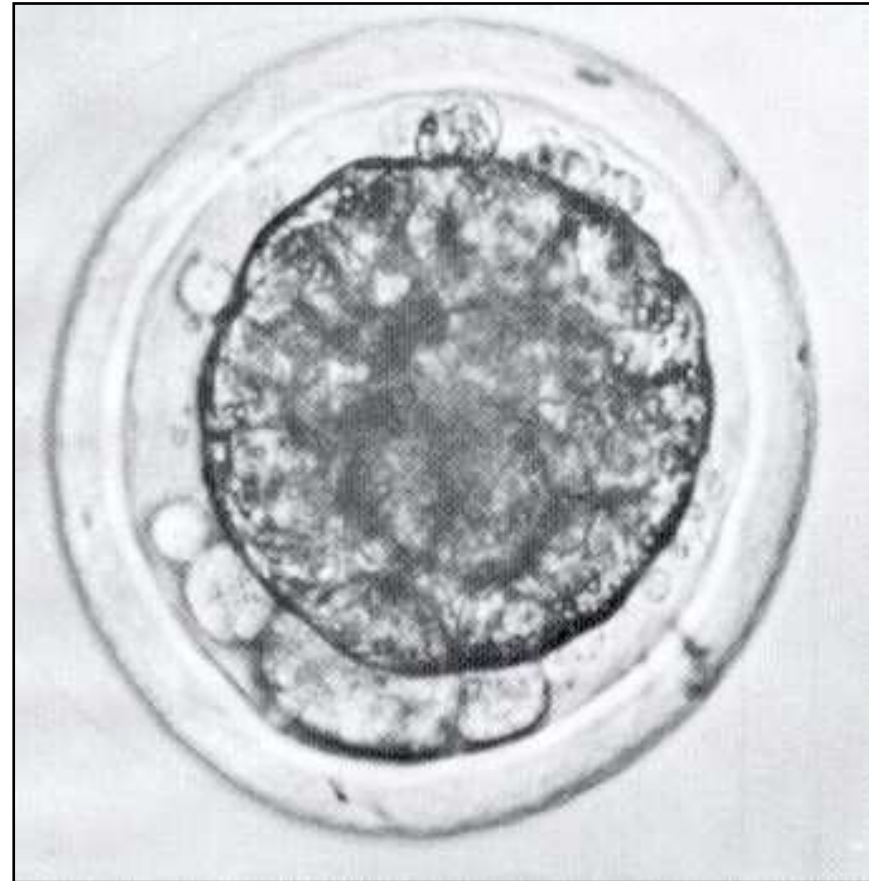
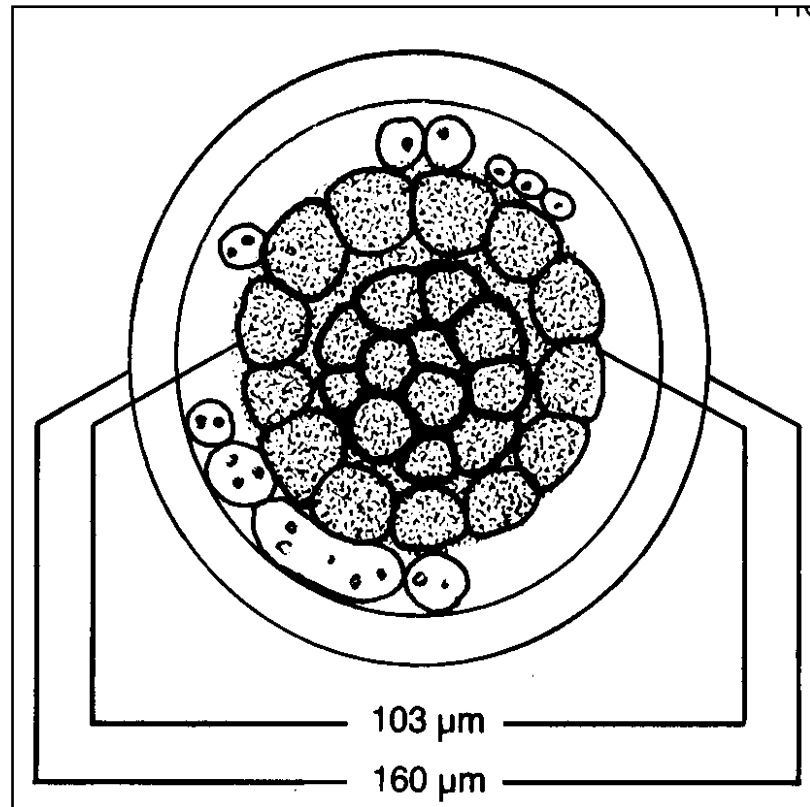


Morula dans l'oviducte



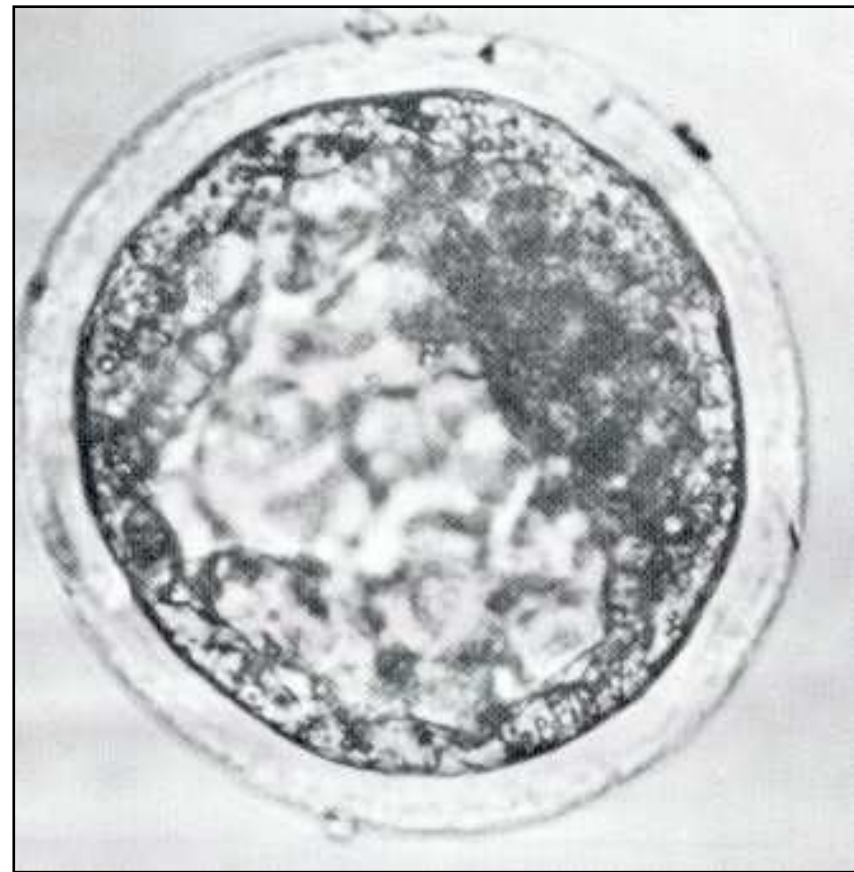
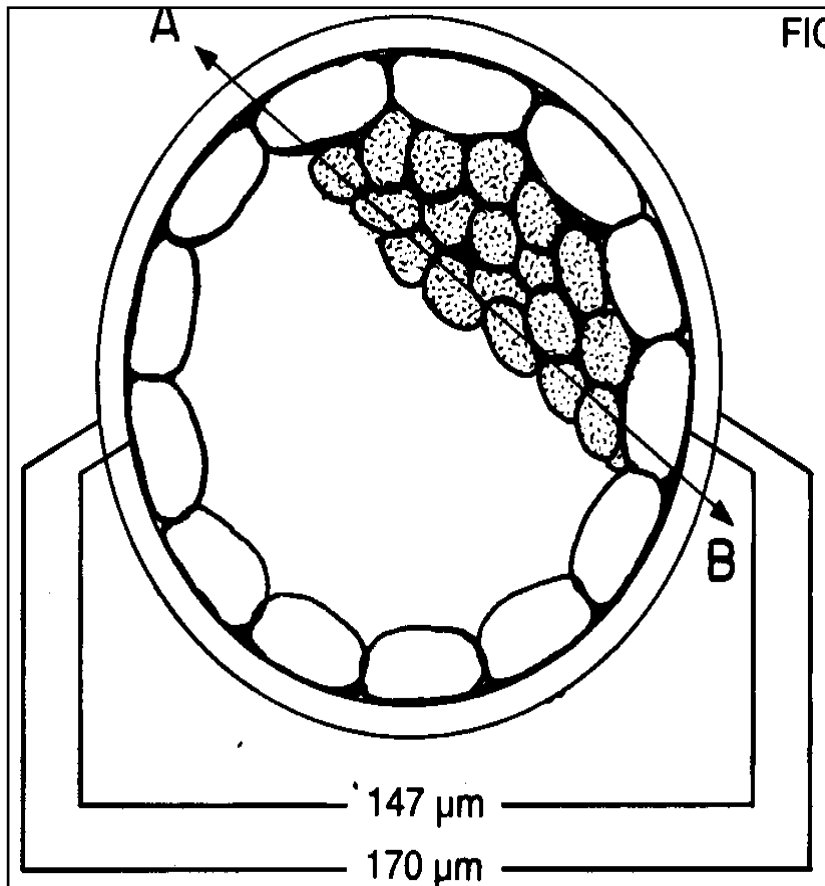
Embryon : stade 80 blastomères
Limites cellulaires moins distinctes 2006

J 6



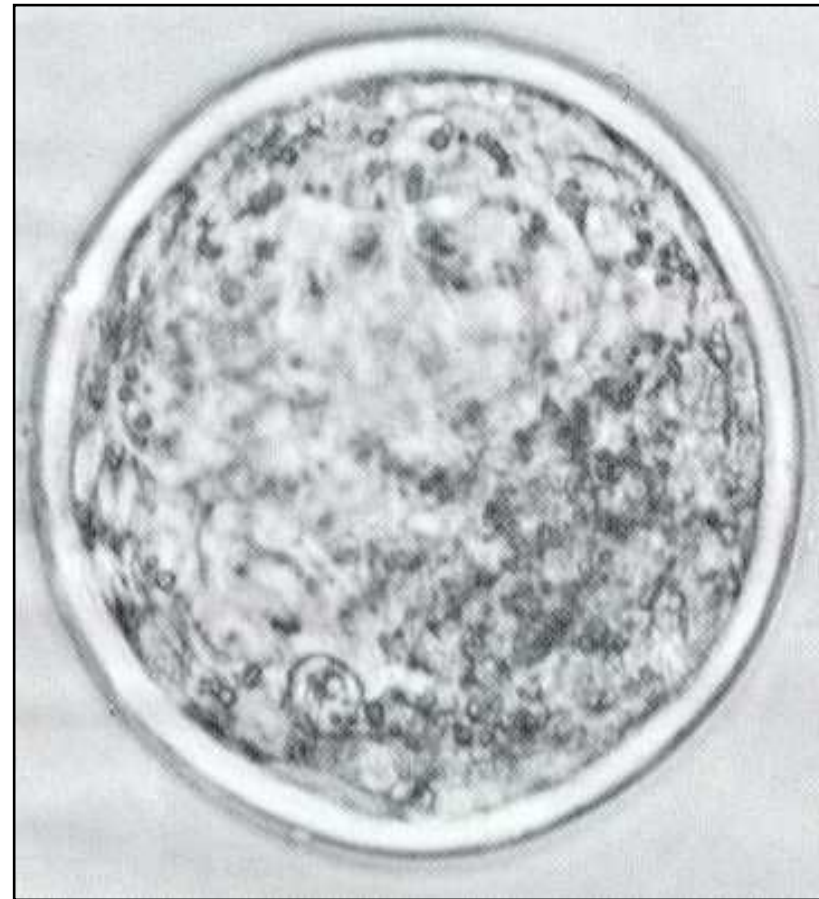
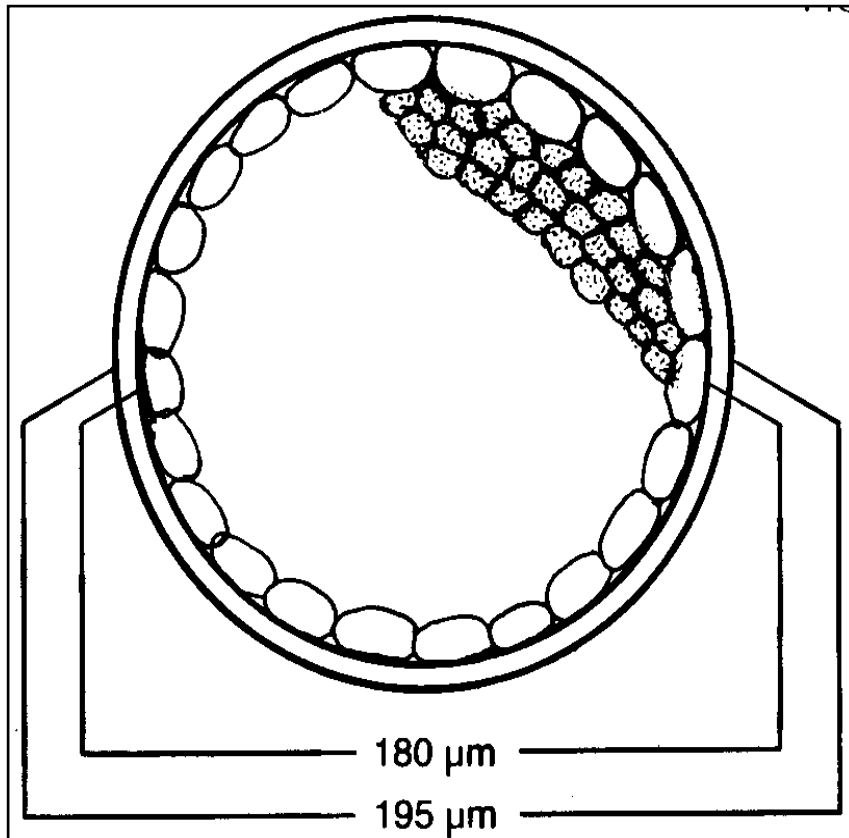
Embryon : stade jeune blastocyste
Formation du blastocoele
Amincissement de la pellucide 2005

J 6



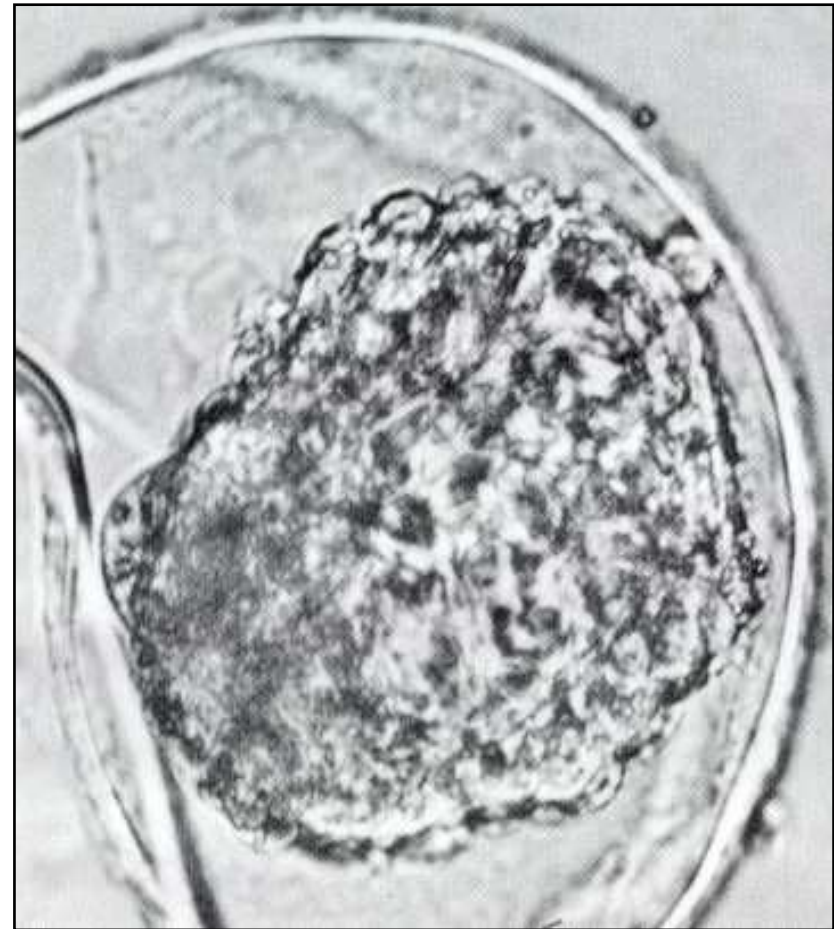
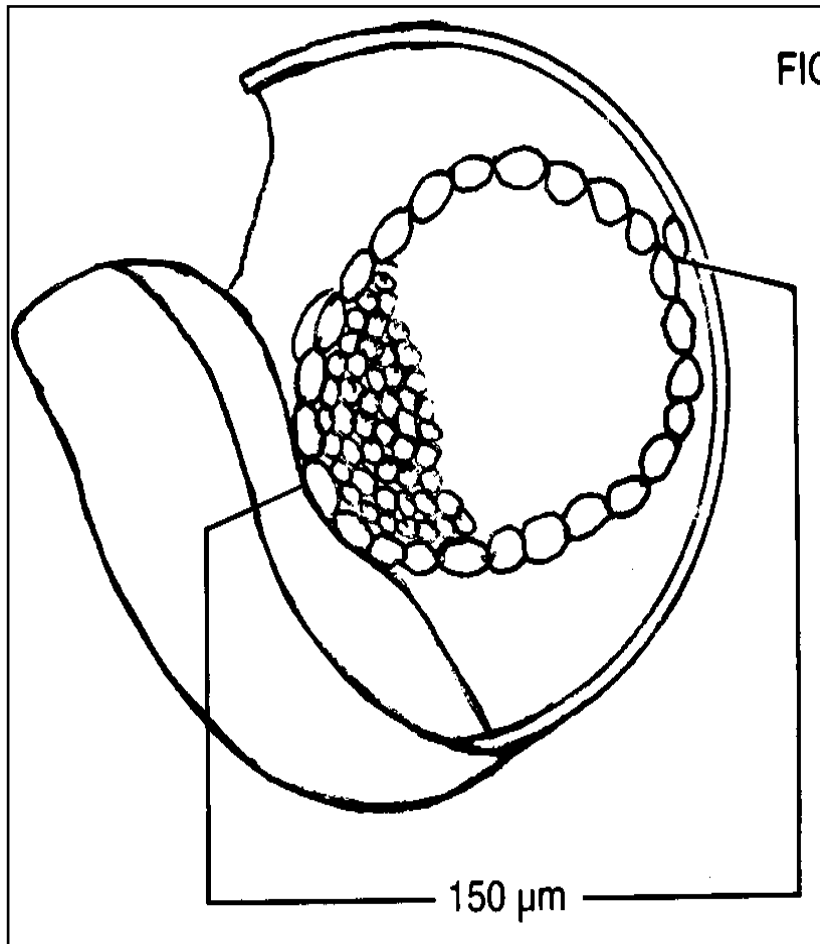
Embryon : stade blastocyste
Agrandissement du blastocoele
Poursuite de l'amincissement de la pellucide 2004

J 7



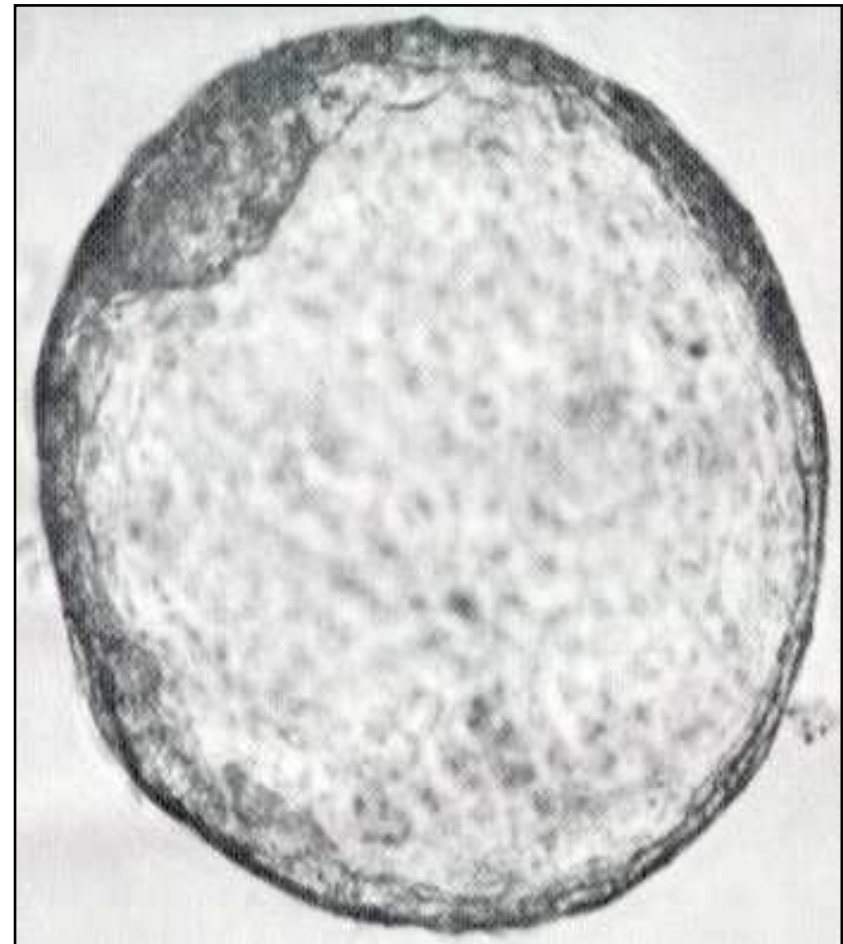
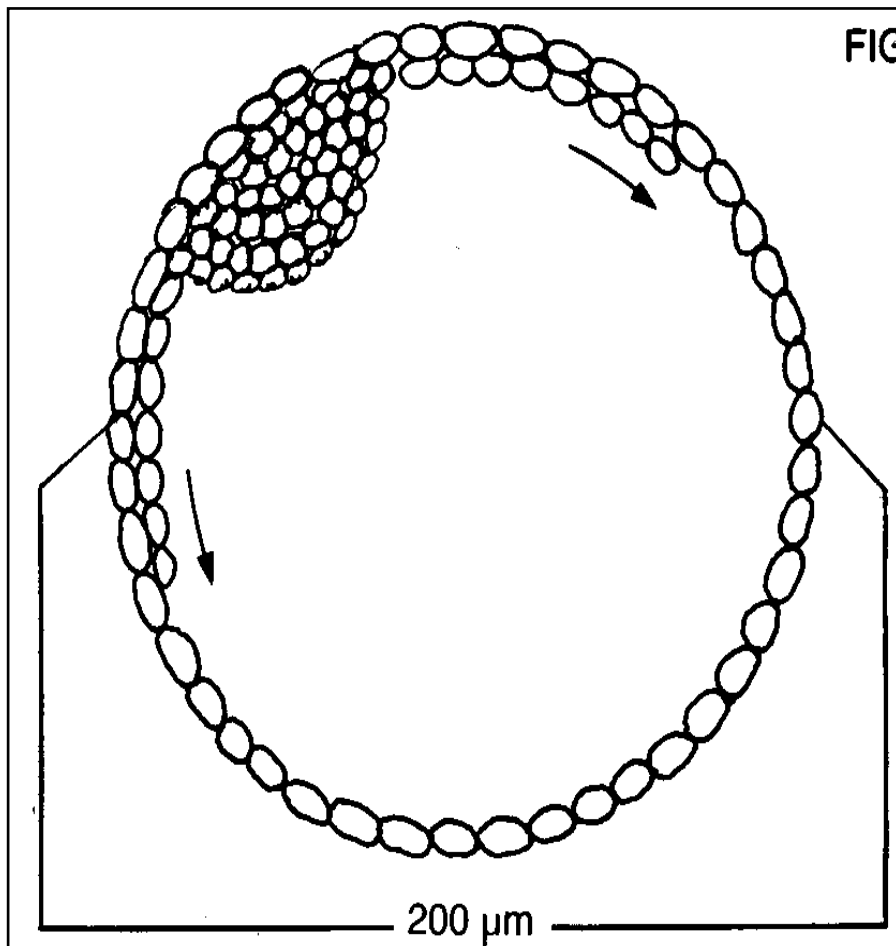
Embryon : stade blastocyste
Rutur de la pellucide (hatching) 2003

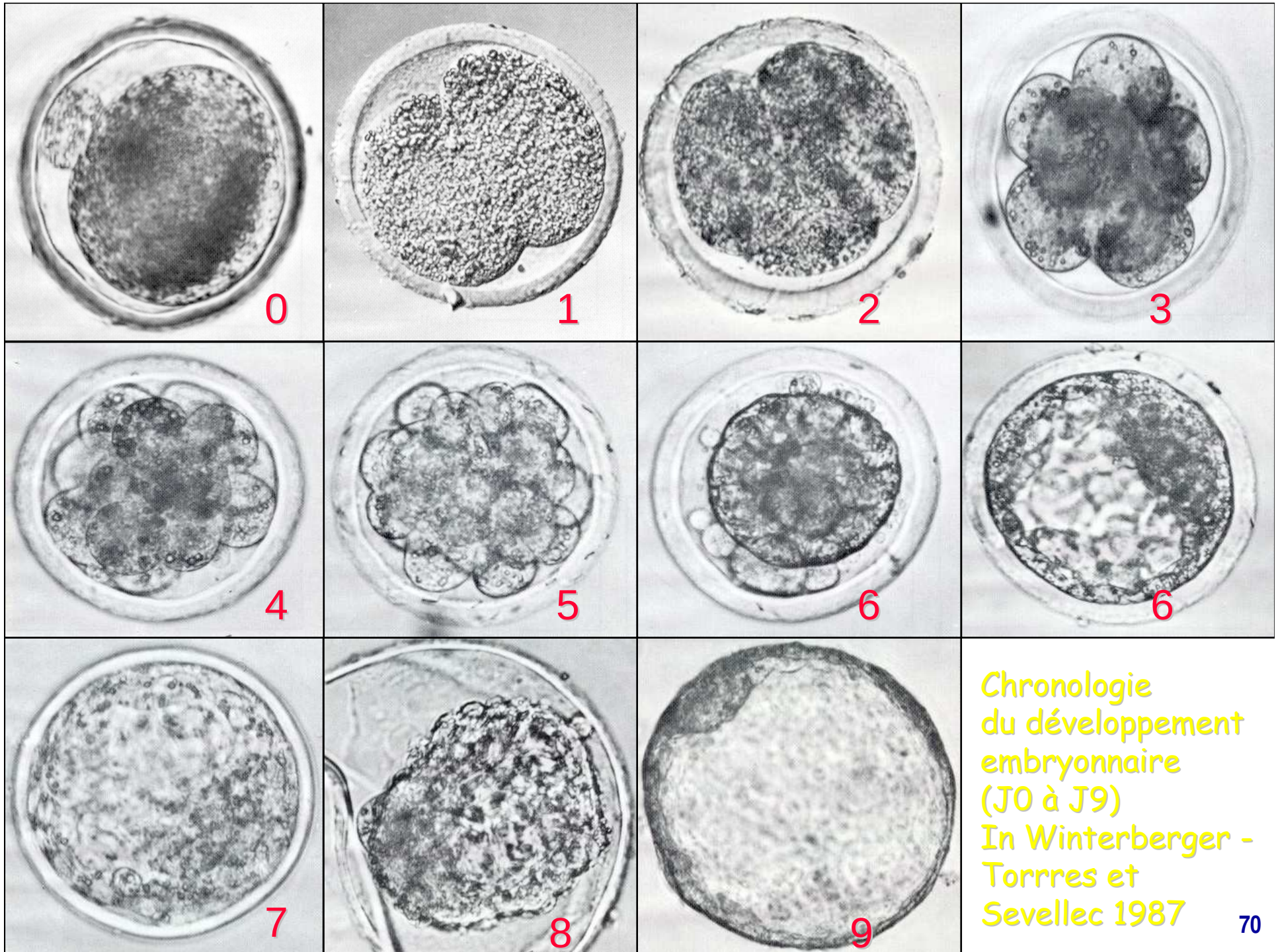
J 8



Embryon : blastocyste libéré de sa pellucide
Début de migration de l'endoderme 2002

J 9





Qualité des embryons : critères

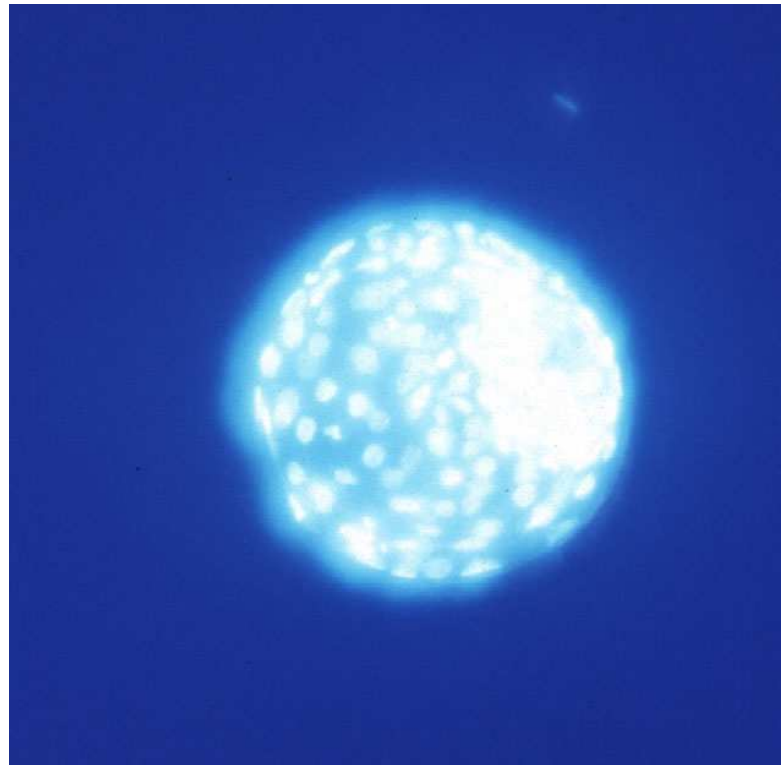
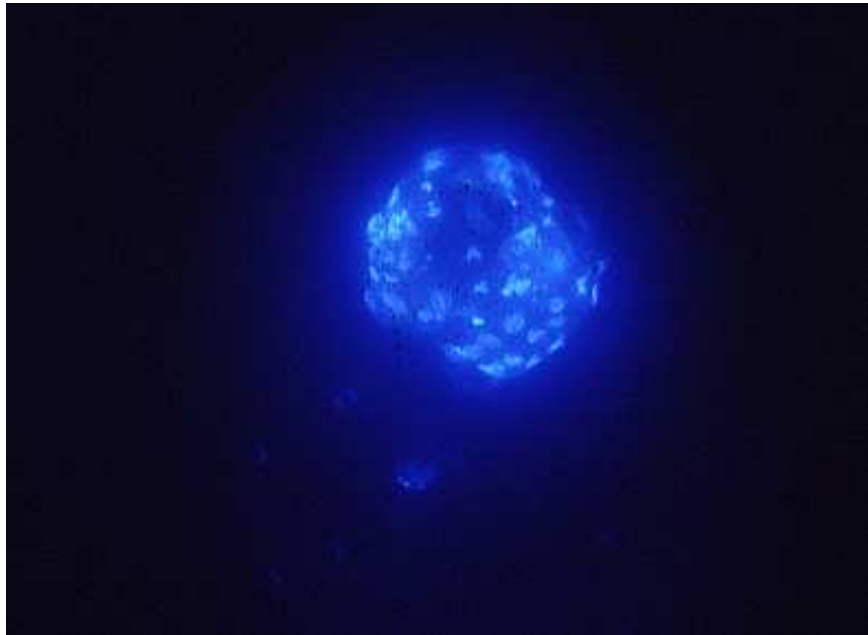
- Critères morphologiques

- Diamètre externe
- Épaisseur de la pellucide
- Nombre de cellules
- Modalités du hatching

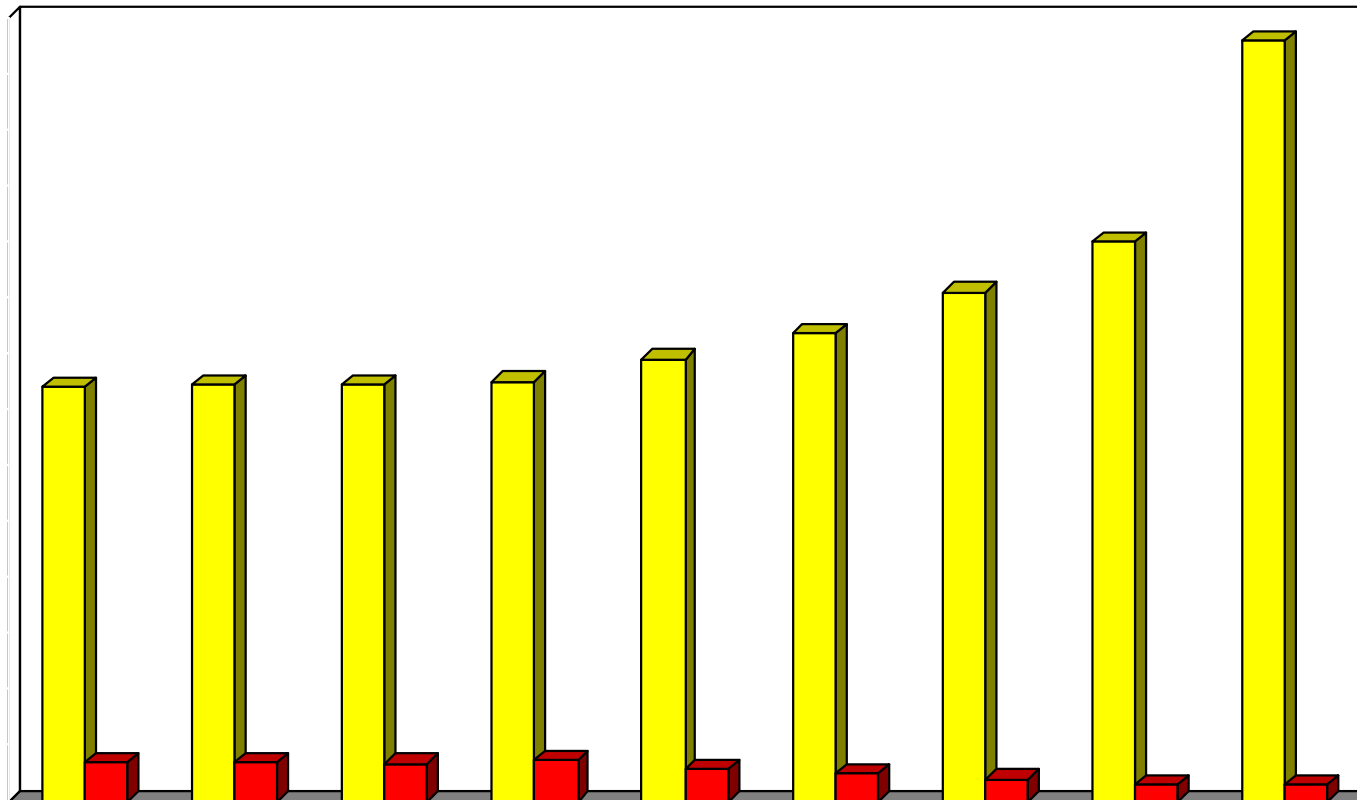
- Critères métaboliques

- Test enzymatique (test à la FDA : Fluorescéine Diacétate transformé sous l'action d'estérases présentes dans les cellules vivantes en un composé non fluorescent)
- Evaluation de la consommation de glucose
- Evaluation de la synthèse de lactate deshydrogénase

Coloration d'une morula et d'un blastocyste



Diamètre de l'embryon et épaisseur de la pellucide (microns)



Qualité des embryons : Critères morphologiques (n = 8) (Eldsen 1978)

- Membrane pellucide
 - Sphéricité
 - Epaisseur
 - Aspect fissuré ou non
- Blastocyste en général
 - Régularité de son aspect général
 - Degré d'identification du trophoblaste, du bouton embryonnaire et de la cavité
- Cellules blastocytaires
 - Aspect des contours, variation de taille
 - Présence de cellules détachées dans l'espace vitellin
 - Présence de vacuoles intracellulaires

Qualité des embryons :

Double évaluation nécessaire

- Evaluer le développement absolu :
l'embryon présente-t-il un aspect normal pour son stade de développement morula, jeune blastocyste, blastocyste
- Evaluer le développement relatif
c'est-à-dire le développement est-il normal compte tenu du stade de gestation

Qualité des embryons :

Classes d 'embryons (Eldsen 1978)

- Classe 1 (excellent)
 - aspect symétrique, blastomères polygonaux
 - Blastomères formant une masse compacte au stade morula
- Classe 2 (bon)
 - Idem classe 1
 - Mais retard de développement par rapport aux autres embryons
- Classe 3 (moyen)
 - Retard de développement de 1 à 2 jours
 - Vésicules dans les blastomères
 - Taille variable des morulas
- Classe 4 (mauvais)
 - Retard de développement de 2 jours
 - Limites cellulaires indistinctes
- Classe 5 (dégénérés)
 - Identification difficile du stade

Morula 2528



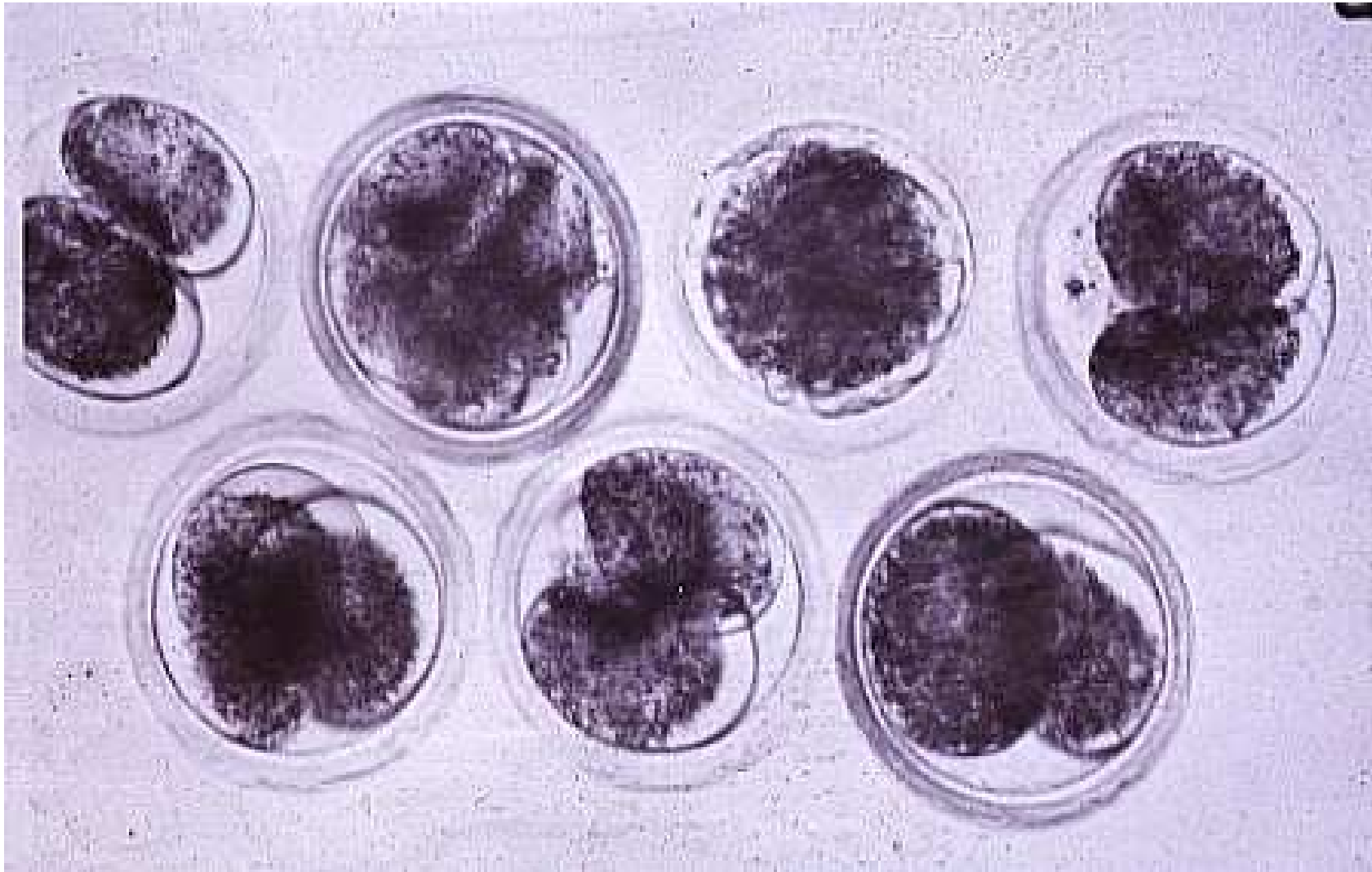
Jeune Blastocyste 2533



Blastocystes à divers stades de développement ¹¹⁹⁸



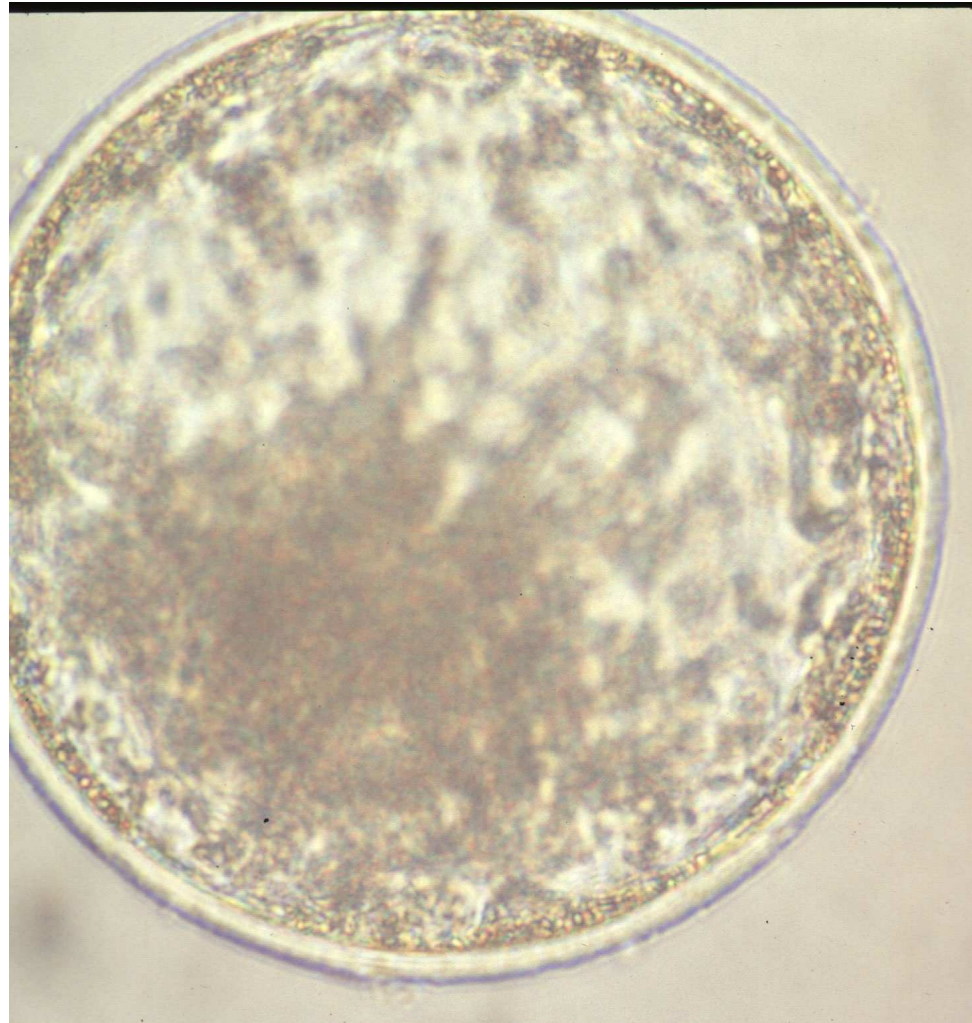
Embryons : divers stades de développement 0277



Blastocystes dégénérés 1197



Blastocyste expansé 2512



Blastocyste expansé 2530



Blastocyste 2532



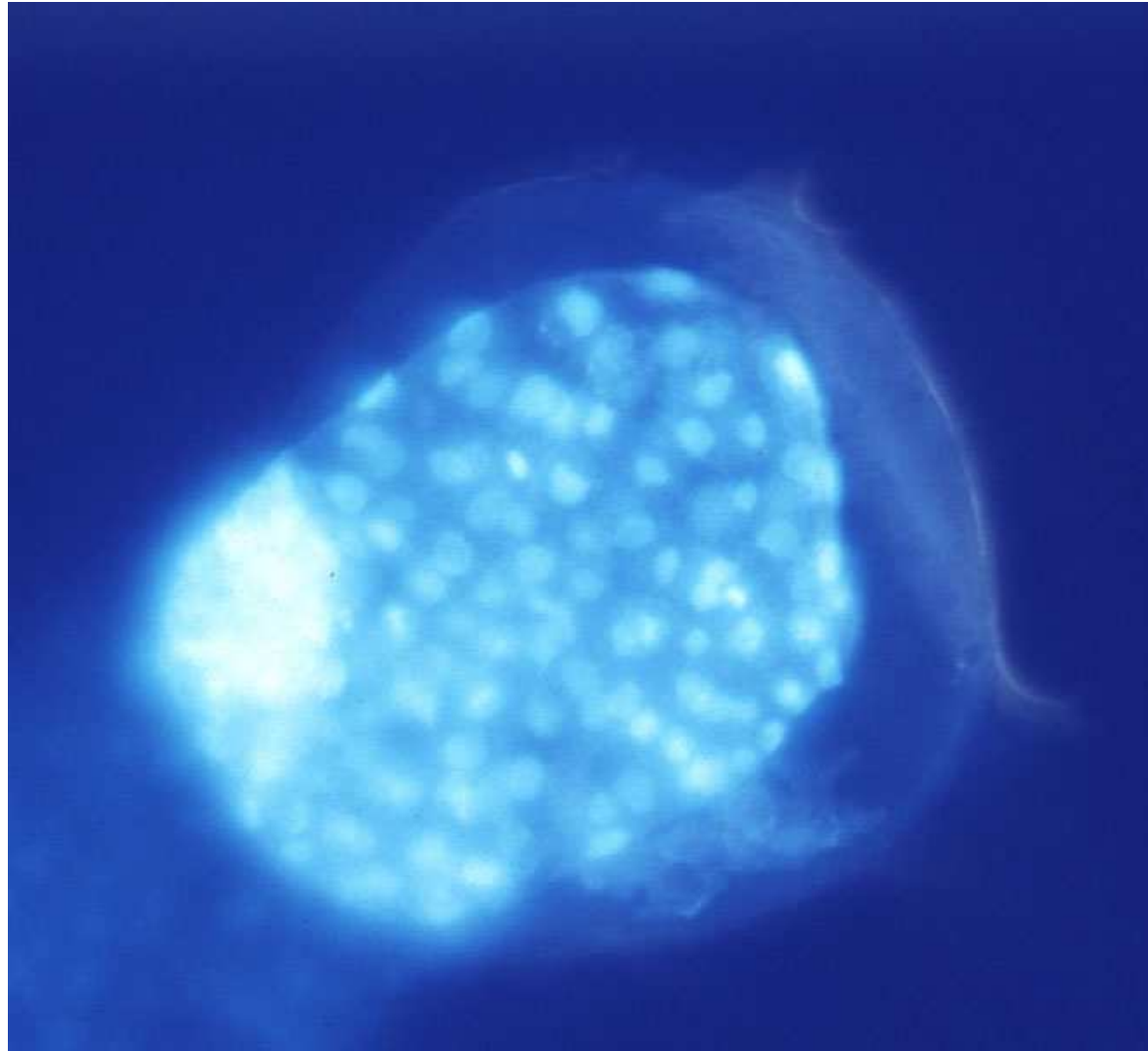
Blastocyste en phase de sortie de pellucide 1685



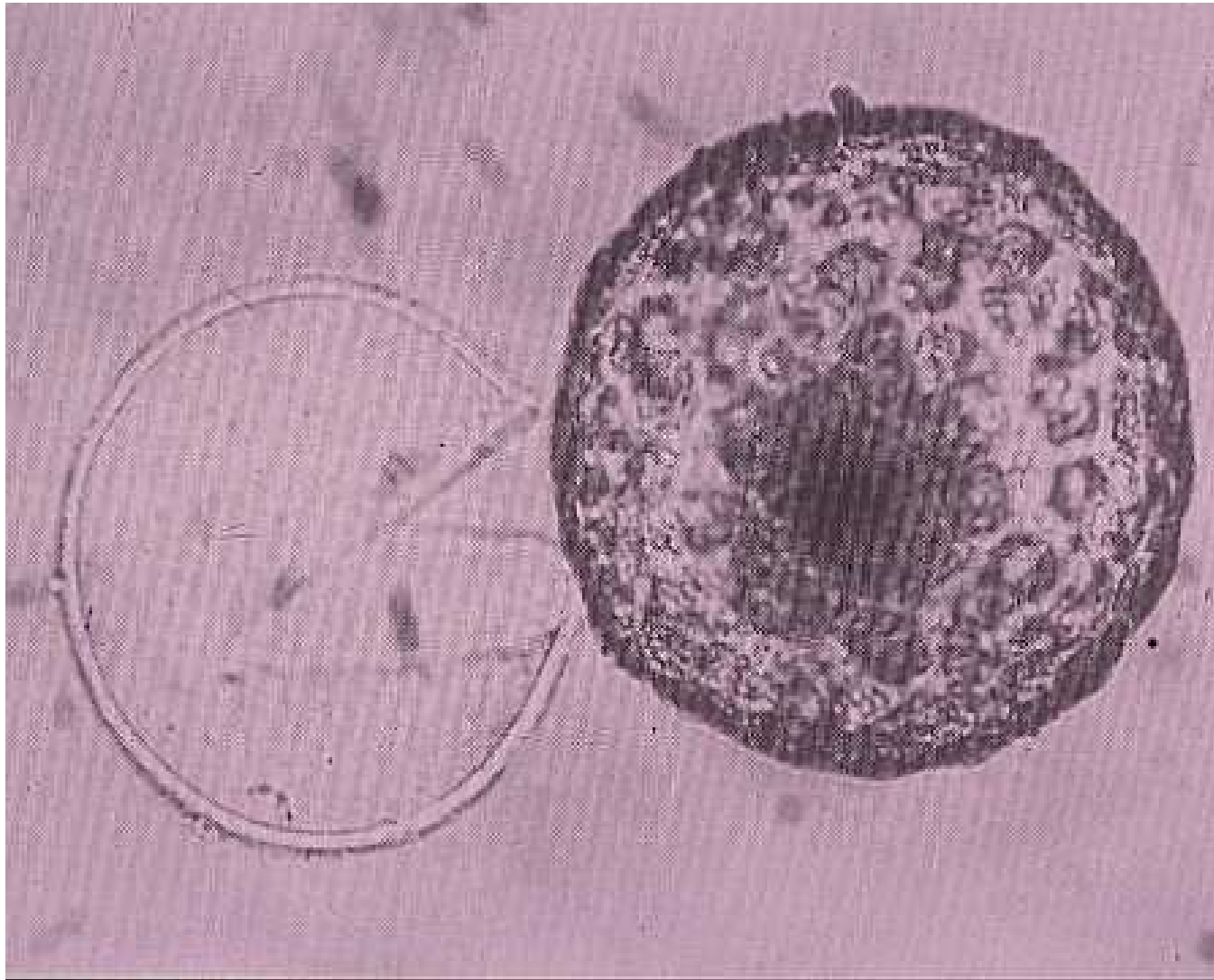
Blastocyste en phase de sortie de pellucide ²⁵⁴⁶



Blastocyste en phase de sortie de pellucide ²⁵³⁷



Blastocyste : sortie de pellucide 0280



Blastocyste : sorti de pellucide ²⁵³⁹



Blastocystes dégénérés (après décongélation) 0342



Le transfert d 'embryons

Le transfert d 'embryons

Méthodes

- Transfert chirurgical
- Transfert non chirurgical
 - Voie transcervicale
 - Inovulateur de Cassou (génisses 3 mm, vaches 4 mm)
 - J 7 du cycle (< 24 heures d 'asynchronisme)
 - Mise en place de l 'embryon dans la corne ipsilatérale au CJ
- Synchronisation
 - Transfert à frais : double PGF, implant et PGF
 - Si congélation : chaleurs naturelles, PGF

Synchronisation au moyen de prostaglandines F2alpha

- injection unique à J2 du traitement de superovulation (4ème injection de FSH/LH) d'une prostaglandine F2alpha naturelle ou de synthèse en IM (si CJ)
- double injection d'une prostaglandine F2alpha naturelle ou de synthèse à 11 (génisses) ou 14 jours (vaches) d'intervalle, la deuxième injection ayant lieu au 2ème jour du traitement de superovulation de la donneuse (4ème injection de FSH/LH) : plus grand degré de synchronisation des receveuses.

Synchronisation au moyen de prostaglandines F2alpha et/ou de progestagènes

- retrait au 2ème jour du traitement de superovulation de la donneuse (4ème injection de FSH/LH) d'un implant de norgestomet ou d'une spirale de progestérone après respectivement 9 et 12 jours de mise en place
- retrait au 2ème jour du traitement de superovulation de la donneuse (4ème injection de FSH/LH) d'un implant de norgestomet ou d'une spirale de progestérone et injection simultanée d'une prostaglandine F2alpha naturelle ou de synthèse après respectivement 7 et 9 jours de mise en place

TE : Résultats :
GER 1996-1997 :
1124 transferts

Résultats de transfert Embryobec (Embryobec: Dr. Remillard)

- 51 % de gestation
- 0.3 % d'avortements

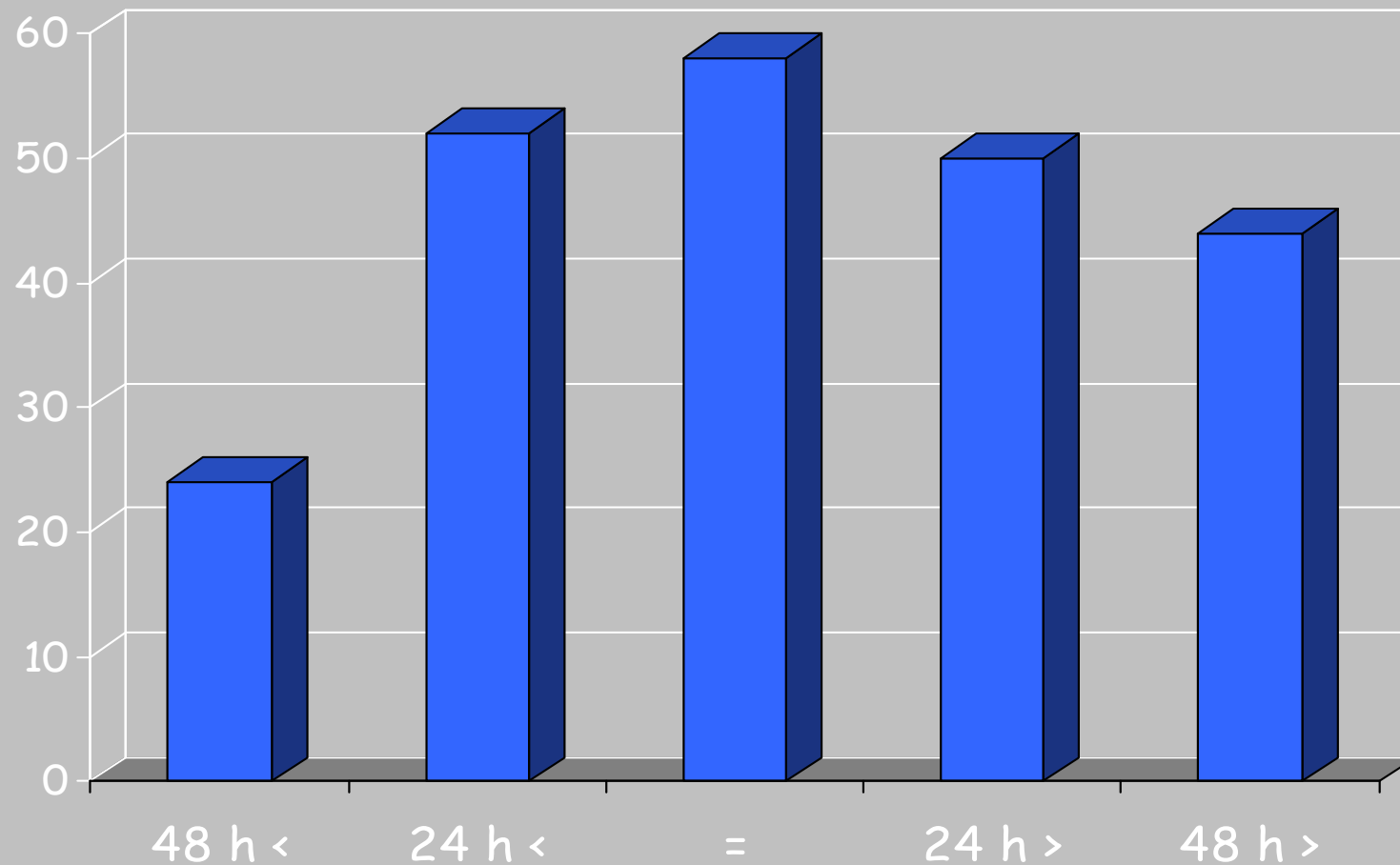
Qualité	%	N
1	61.7%	3252
2	59.0%	4649
3	50.3%	2090
Total	58.1%	9991

TE : Facteurs d 'influence des résultats

- Degré de la synchronisation
- Etat hormonal de l'animal receveur : CJ
- Effet de la saison : ?
 - résultats meilleurs en juin et décembre
 - résultats moins bon en août et novembre
 - Lonergan 1995 : 52 % en été et 21 % en hiver
- Effet de la race de la receveuse
 - race de la receveuse
 - Blanc Bleu Belge : 38.5 % Pie Noire : 40 %
 - taux de réussite
 - Blanc Bleu Belge : 40 % Pie Noire : 48 %

TE : Importance de la synchronisation

Janowitz : Animal Breeding Abs 1994 : 2478 transferts



Nature des chaleurs et des signes (Embryobec : Dr. Remillard)

Type	%	N

perte observée	56.2%	10508
aucune	50.6%	1057

Différence: 5.6%

TE : Facteurs d 'influence des résultats

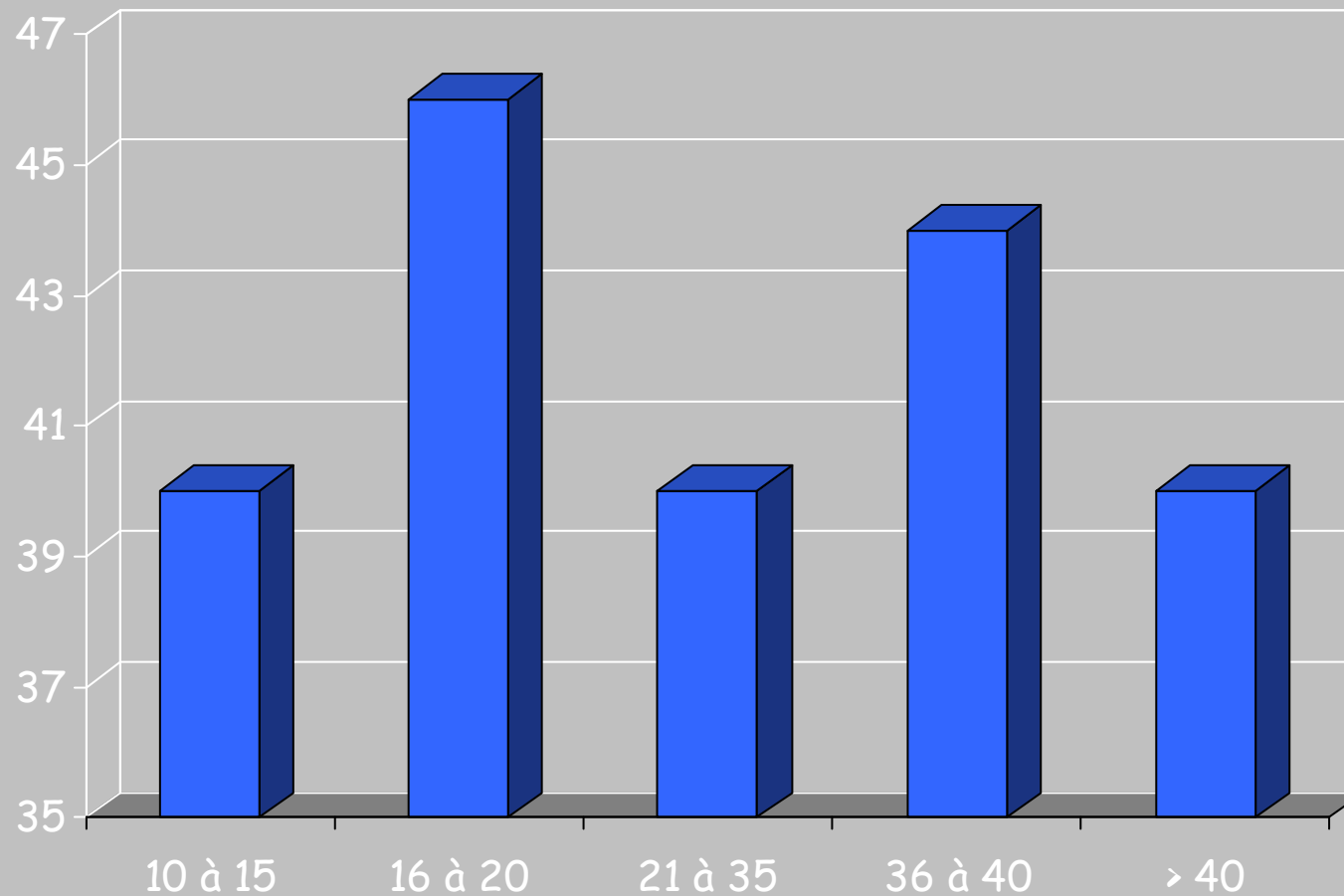
- Effet de l'âge de la receveuse
 - diminution avec l'âge de l'animal
 - 10 % des génisses ne sont pas transférables (col)
- Facteurs de stress
 - Eviter vaccinations
 - Eviter traitements antiparasitaires
 - Eviter changements de la ration
 - manipulation prudente des animaux
 - effet de l 'anesthésie loco-régionale ?

TE : Facteurs d 'influence des résultats

- Conditionnement de l 'embryon
- Expérience du praticien
 - lésion endométriale
 - localisation du transfert (1/3 médian)
 - contention de l 'animal
 - transfert dans la corne ipsilatérale
 - hygiène du transfert
- Age de l 'embryon
- Nombre d 'embryon : 2 > 1
- Traitements complémentaires

Effet de l'âge de la receveuse (mois)

GER 1996-1997 1668 transferts



Type	%	N
génisses	56.4	9358
vaches	49.9	4332
Différence : 6.5%		

Le transfert d 'embryons

Effet de l 'âge de l 'embryon

Classe	N transferts	%	% de gestation
Morula	2445	82	52
Jeune blastocyste	279	9	36
Blastocyste	271	9	43

(Données GER 1996-1997)

Le transfert d 'embryons

Effet de l 'âge de l 'embryon (Embryobec : Dr. Remillard)

Age	taux	N

4	57.3%	6766
5	60.27%	1403
6	60.5%	1415
7	55.7%	375

total	58.1%	9991

Le transfert d 'embryons

Effet de l 'agent responsable du transfert (Données GER 1996-1997)

Agent		N transferts	%	% de gestation
		(n = 5942)		(n = 1111)

1	2546	42		52
2	2008	34		61
3	1052	18		44
4	216	4		34
5	120	2		46

Le transfert d 'embryons

Effet du conditionnement de l 'embryon

TypeN transferts	%	% de gestation	
Frais	3636	62	51
Congélation lente	1645	28	53
Congélation rapide	615	10	46

- (Données GER 1996-1997)

Le transfert d 'embryons

Effet du type d 'oestrus (Embryobec : Dr. Remillard)

Selon chaleur induite ou naturelle

naturelle	50.85%	3868
-----------	--------	------

induite	54.01%	16712
---------	--------	-------

Différence: 3.16%

TE : traitements complémentaires

- Progestagènes
 - implants, spirales vaginales, CIDR
 - pendant 6 à 13 jours 6 à 10 jours après l'insémination artificielle
 - Résultats contradictoires
- Gonadolibérine (GnRH) :
 - 8 mcg le jour du transfert ou 4 à 6 jours après
 - Pas d'effet observé même si
 - embryon de moindre qualité
 - taux de progestérone de la receveuse insuffisant
 - Injections répétées nécessaires ?

TE :traitements complémentaires

- Interférons (rbolFN recombinant bovine interféron)
 - effets favorables observés chez la brebis
- Autres méthodes : pas d'évaluation disponible
 - co-transfert de vésicules trophoblastiques
 - embryons hybrides (bovin x ovin) (helper embryo),
 - embryons de moindre qualité (bouton embryonnaire détruit par LASER)
 - ovocytes parthénogénomiques

Application du TE aux repeat-breeders

Expérience 1994-1998 : embryobec

- Données générales
 - Embryons recueillis de donneuses commerciales
 - Qualité 1 et 2
 - Congelés avec Ethylene glycol
 - 1 ou 2 embryons par paillette
 - Sélection des receveuses:
 - vaches non gestantes après 3 saillies
 - aucune anormalité anatomique
 - bonne chaleur et non I.A.
 - corps jaune palpable

Application du TE aux repeat-breeders

Expérience 1994-1998 : embryobec

Résultats

N embryon	N TE	N gest	%
2	502	237	47.2
1	145	51	35.2

Taux normal gestation après IA R.B. : 20%

La conservation des embryons

La conservation des embryons

- Conservation à court terme
 - pendant une douzaine d 'heures
 - à T° ambiante
 - milieux : PBS, PBS et 20 % de FCS, PBS et BSA
 - pendant 12 à 24 heures
 - au réfrigérateur à 4°C
- Conservation à long terme : la congélation
 - < 2 heures suivant la récolte

Transfert et naissance d 'embryons congelés

Espèce	Année	Référence

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

La congélation des embryons

- Les chevaux du lac Ladoga ...
- La surfusion
- Les effets de la congélation
- Les agents cryoprotecteurs
 - pénétrants : glycérol, éthylène glycol ...
 - non pénétrants : sucrose
 - non pénétrants à action membranaire
- Méthodes
 - classique
 - vitrification
 - OPS (open Pulled Straw) vitrification

La congélation des embryons

- La surfusion

- Atteinte par une solution d'une température inférieure à celle à laquelle s'observe normalement la congélation
- Etat particulièrement instable
- Rupture aisée de cet état et donc cristallisation par choc, impureté ... = seeding
- remontée de la température jusqu'au point de congélation ($n < 2^{\circ}\text{C}$)

La congélation des embryons

- Les effets de la congélation
 - Formation de glace dans le milieu extracellulaire
 - Augmentation de la concentration en solutés de ce milieu
 - Déshydratation de l'embryon
 - importante si refroidissement lent
 - faible et donc cristallisation interne si refroidissement rapide
 - Utilisation d'agents cryoprotecteurs

La congélation des embryons

- Les agents cryoprotecteurs
 - pas de survie des cellules de mammifères à $< 20^{\circ}\text{C}$
 - Effets
 - fixant les molécules d'eau ils abaissent le point de cristallisation
 - ils réduisant la quantité de glace
 - ils modifient la forme des cristaux
 - effets négatifs parfois
 - Nature
 - pénétrants : glycérol, éthylène glycol
 - non pénétrants : sucrose
 - à effets protecteurs membranaires : dextran, SA

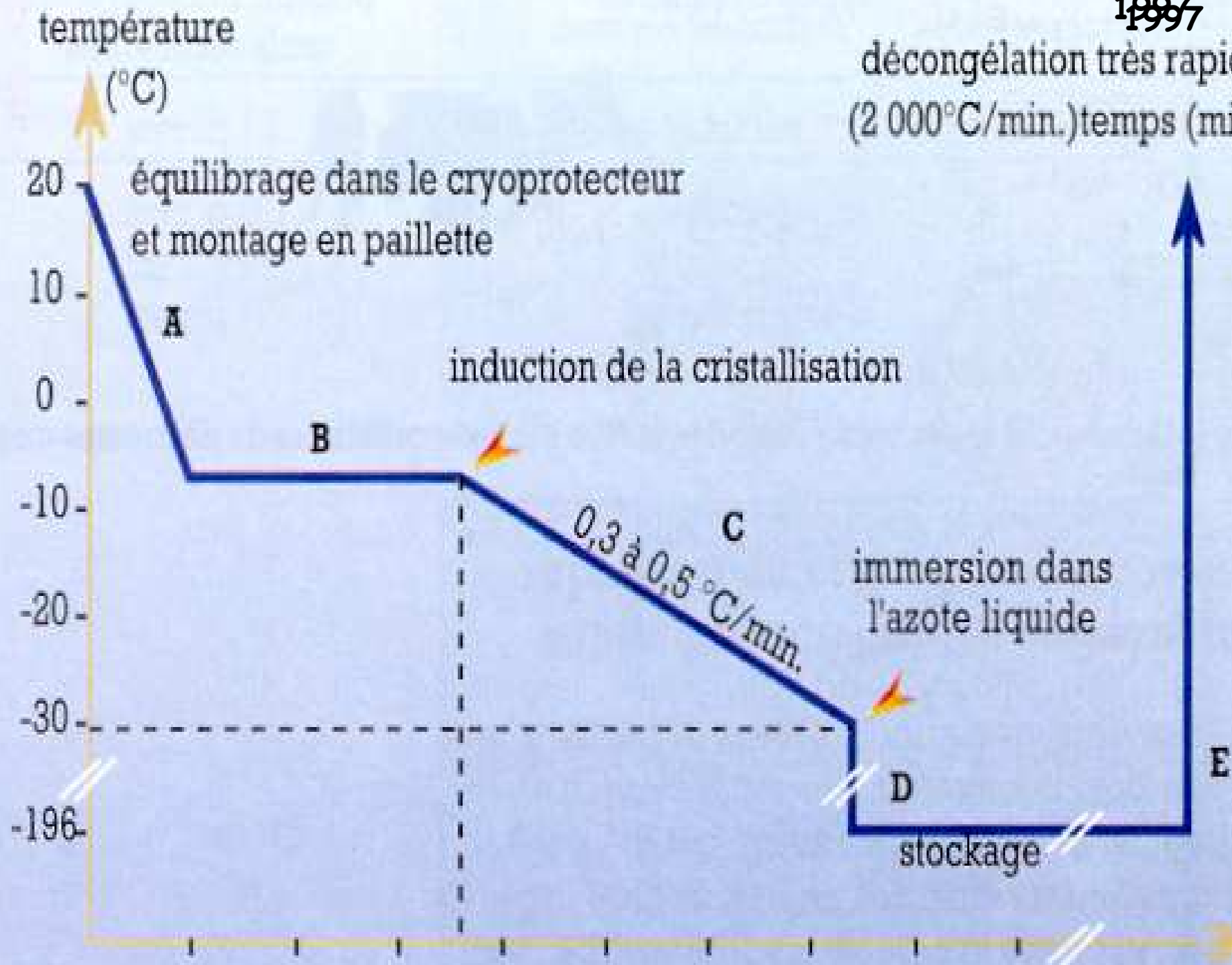
La congélation des embryons : étapes

- Equilibration de l'embryon dans une solution de PBS et cryoprotecteur (10 %)
- Conditionnement de cette solution et de l'E dans une paillette
- Transfert de la paillette dans l'appareil à congélation et refroidissement jusqu'à -7°C (1 à 3°C par minute); maintien pendant 5 à 7 minutes pour stabiliser la paillette
- Induction du seeding cad de la cristallisation ppd
- Refroidissement de -7°C à -35°C (0.3 à 0.6°C par minute)
- Paillette plongée dans l'azote liquide à -196°C
 - vérifier le niveau d'azote régulièrement
 - identification des paillettes (registre)

La vitrification des embryons

- Principe de la solidification directe
 - induction d'une viscosité extrême du milieu qui empêche la formation de glace intra ou extracellulaire
 - Utilisation de cryoprotecteurs pénétrants à forte concentration (25 % de glycérol et 25 % de propanediol).
 - Temps d'équilibration
 - Refroidissement très rapide en plongeant les paillettes dans l'azote liquide
 - Décongélation très rapide nécessaire (250°C / min)

1997

décongélation très rapide
(2 000°C/min.) temps (min.)

L 'OPS (Open Pulled Straw) vitrification (Vajta et al. 1998)

- Traitement à la chaleur des minipaillettes
 - réduction de leur diamètre (0.08 vs 1.7 mm)
 - réduction de l'épaisseur de leur paroi (0.07 vs 0.15 mm)
- Incubation des embryons dans deux solutions de concentrations croissantes de DMSO et de sucre
- Aspiration des embryons par capillarité
- Mise en place dans l'azote liquide
- Décongélation à 37°C
- Application aux ovocytes et embryons de J3 à J7

Appareil à congélation



La décongélation des embryons

La décongélation des embryons

- Décongélation lente (multistep thawing)
 - sortir la paillette
 - 30 sec à 30° C
 - Essuyer la paillette
 - Faire passer le contenu (5 ') dans des bains à concentration décroissante de cryoprotecteur (7.5, 5.0 et 2.5 %) et constante de sucrose (0.3 M)
 - 4ème bain pour réhydrater l 'embryon (PBS)
 - Evaluer la qualité de l 'embryon
 - Remonter l 'embryon dans sa paillette
- Décongélation rapide (one-step thawing)

La décongélation des embryons

- Décongélation rapide (one-step thawing)
 - à température de 20°C
 - montage de l'embryon dans du sucrose
 - équilibration dans une solution de glycérol et de sucrose
 - aspiration successive de sucrose, air, mélange glycérol-sucrose et embryon, air, sucrose
 - mélange des solutions lors de la décongélation
 - l'embryon est soustrait à l'action du glycérol
 - réhydratation de l'embryon dans l'utérus

Précautions sanitaires (in vitro> in vivo)

- Origine diverse des substrats utilisés : ovaires, cellules d'oviductes, sperme, sérum
- Contamination possible par des agents biologiques : bactéries, virus, prions ...
- Mécanismes de protection
 - membrane pellucide d'embryons mais différences possibles in vivo et in vitro
 - Recours à des milieux de culture artificiels
 - Recours à des procédés d'élimination des agents biologiques
 - Sperme : gradients de percoll, swim-up...
 - Sperme, embryons : antibiotiques, lavages
 - sérums décontaminés : irradiation

Du lavage des embryons

