

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES



Mémoire de fin d'études  
en vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire

THEME :

# Les biotechnologies actuelles dans la reproduction bovine

Présenté par :

Melle : AZZEDINE Elhadja Badra

Melle : ZOUHIRI Ilhem

Encadre par :

Dr. AYAD. Med Amine

Année universitaire : 2018 – 2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# Remerciements

On remercie dieu (ALLAH) le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

A Monsieur le Docteur Ayad Mohamed Amine, pour avoir encadré ce travail, pour sa patience, son soutien.

# Dédicace

Mon père Mokhtar et ma mère Fatma: pour votre patience, votre soutien et votre amour. Vous avez toujours été là pour moi. Merci de nous avoir toujours donné les moyens d'atteindre nos objectifs dans les études .

A mes sœurs : Dalila , Amina , Fatima , Soumia , Djamila

Mon frère Mohamed : merci pour ta confiance

Mes amies : Fatima , Amina , Ilhem , Halima



**Azzedine Elhadja BADRA**



# Dédicace

Mes parents : Maman Saadia et papa Mohamed

A mes grand parent : mami Fatna et grand père Omar

A mes sœurs : Hanane, Dounia et mon petit frère Omar el Farouk.

Et aussi un remerciement à ma collègue Azzedine el Hadja Badra et mes chères copine Nada Amira, Hayat, Hiba.



**Zouhiri ILHEM**

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b>	L'appareil génital de la vache en place	03
<b>Figure 2 :</b>	L'appareil génital de la vache	04
<b>Figure 3 :</b>	Le cycle œstral chez la vache	06
<b>Figure 4 :</b>	Les étapes du développement folliculaire vers l'ovulation et le corps jaune ou l'atrésie	07
<b>Figure 5 :</b>	Le développement folliculaire	08
<b>Figure 6 :</b>	Vagues de croissance folliculaire et variations hormonales au cours du cycle oestral de la vache	09
<b>Figure 7 :</b>	Des concentrations hormonales au cours du cycle oestral	10
<b>Figure 8 :</b>	Rôles relatifs des gonadotrophines et des facteurs de croissance au cours du développement folliculaire	12
<b>Figure 9 :</b>	Croissances folliculaires au cours d'un cycle oestral chez la vache	15
<b>Figure 10 :</b>	Vagin artificiel	20
<b>Figure 11 :</b>	Electro – éjaculation	21
<b>Figure 12 :</b>	Le matériel pour la dilution de sperme	24
<b>Figure 13 :</b>	Conditionnement en paillettes	29
<b>Figure 14 :</b>	La technique d'insémination artificielle chez les bovins	30
<b>Figure 15 :</b>	Contenaire d'azote liquide montrant des paillettes d'IA	32
<b>Figure 16 :</b>	Paillette d'IA	33
<b>Figure 17 :</b>	Le pistolet d'insémination	34
<b>Figure 18 :</b>	Les principales biotechnologies de l'embryon	41
<b>Figure 19 :</b>	Système d'aspiration et d'injection du liquide de collecte	50
<b>Figure 20 :</b>	Les techniques de transfert embryonnaire	57
<b>Figure 21 :</b>	Prélèvement des ovocytes	61

## Liste des abréviations

<b>FIV :</b>	Fécondation In Vitro
<b>FSH :</b>	Follicule Stimulating Hormone / Hormone Folliculo-Stimulante
<b>GnRH :</b>	Gonadotropin Releasing Hormone
<b>IA :</b>	Insémination artificielle
<b>ICSI :</b>	Intra-Cytoplasmic Injection of Spermatozoa
<b>LH :</b>	Hormone lutéinisante
<b>OPU :</b>	Ovule Pick-Up
<b>PGF2<math>\alpha</math> :</b>	Prostaglandine F2 $\alpha$
<b>SPZ :</b>	Spermatozoïdes

# TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction .....	01

## Chapitre I : Rappel physiologique et anatomique

1. Rappels anatomiques de l'appareil génital femelle : L'appareil génital de la femelle comporte trois grandes portions .....	03
1.1. Le tractus génital de la vache présente quatre segments distincts .....	03
2. Rappels physiologiques sur la reproduction chez la vache .....	04
2.1 Les étapes de la vie sexuelle et de la puberté .....	04
2. Cycle sexuel de la vache.....	05
A. Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache .....	06
1. Ovogenèse .....	06
2. Folliculogenèse .....	06
3. Phase lutéale .....	10
B. Régulation hormonale du cycle sexuel chez la vache .....	10
1. Aperçu du contrôle hormonal du cycle .....	10
2. Régulation de la sécrétion de la GnRH .....	11
3. Régulation de la croissance folliculaire .....	12
Conclusion.....	16

## Chapitre II : L'insémination artificielle

1. Historique .....	18
2. L'importance de l'insémination artificielle .....	18
a. Les avantages techniques.....	19
b. Les avantages économiques.....	19
c. Les avantages sanitaires.....	19
d. Les inconvénients.....	19
3. La récolte et évaluation du sperme .....	20
a. Méthode de récolte du sperme .....	20
b. Evaluation du sperme.....	21

4. Etude physique-chimique et biochimique du sperme .....	23
5. La préparation de la semence .....	23
6. Les différentes étapes de préparation de semence .....	24
a. Dilution du sperme .....	24
b. Les milieux de dilution.....	24
b.1. Qualités des milieux de dilution.....	24
b.2. Nature des milieux de dilution.....	25
c. Le taux de dilution.....	26
d. Conservation du sperme .....	26
7. Technique de l'IA bovine.....	29
8. Repérer les signes de chaleurs significatifs .....	30
9. Le geste opératoire .....	30
10. Les clés de la réussite à l'insémination .....	31
11. Facteurs qui influencent sur le développement de l'insémination artificielle .....	31
12. Le matériel nécessaire à l'insémination bovine .....	32

### **Chapitre III : Biopsie et transfert embryonnaire**

1. La biopsie embryonnaire .....	36
2. Transfert embryonnaire chez les bovins.....	37
3. Aspects généraux du transfert embryonnaire bovin.....	38
a. Transplantation embryonnaire et amélioration génétique du troupeau.....	38
b. Diffusion génétique permise par le transfert embryonnaire .....	39
c. Les défenses immunitaires du veau corrélées à son environnement.....	40
d. Le transfert embryonnaire et autres biotechnologies de reproduction.....	40
4. Sélection des donneuses .....	41
5. Sélection des receveuses.....	44
6. Une conduite d'élevage particulière.....	45
7. L'insémination de la femelle donneuse.....	48
a. Quand pratiquer l'insémination ?.....	48
b. Cas de l'insémination artificielle avec une semence sexée .....	48
8. Collecte des embryons.....	49
9. Récupération des embryons.....	49
a. Collecte des embryons par lavage des cornes utérines.....	49
b. Utilisation de molécules utérotoniques associées à un second lavage utérin.....	50
c. Utilisation d'un second lavage utérin.....	51
10. Le transfert d'embryons frais.....	51
11. La congélation des embryons .....	51

a. Les suites sur la femelle donneuse .....	52
b. Les suites sur les receveuses.....	52
12. Risques sanitaires .....	53
a. Les agents pathogènes à risqué .....	53
b. Risques liés à la semence .....	54
13. Mesures preventives .....	55
a. La prophylaxie sanitaire du transfert embryonnaire .....	55
b. Les conditions concernant le laboratoire de manipulation.....	56

## **Chapitre IV : Fécondation in vitro**

1. Historique .....	59
2. Les étapes de la FIV .....	60
3. Les milieux utilisés pour la production d'embryons fécondés in vitro .....	60
a. Milieu de maturation in vitro .....	60
b. Milieu de fécondation in vitro .....	60
c. Milieu de culture in vitro .....	60
4. Le prélèvement des ovocytes in vitro.....	61
5. Les avantages de la FIV .....	62
6. Les inconvénients de la FIV .....	62

## **Chapitre X : Intra-cytoplasmic injection of spermatozoa**

1. ICSI .....	64
2. Quels sont les risques intrinsèquesliéesà la technique? .....	66
3. Evaluation des risques pathogènesliéesàl'ICSI .....	68
a. Du point de vue génique.....	69
b. Du point de vue épigénétique .....	71
4. Risques du suivie des animaux issues d'ICSI.....	71
5. Incidence des malformations congénitales .....	73
6. Évaluation psychomotrice .....	73
Conclusion.....	75

## **Chapitre IV : Clonage**

1. Le principe du clonage .....	77
2. Les techniques de clonage .....	79
a. Le choix des cellules donneuses .....	81
b. Le transfert de noyau.....	82
3. Les possibles améliorations des techniques de clonage .....	83
4. Les applications du clonage.....	86
5. Clonage pour la diffusion génétique .....	87

6. Clonage pour la production .....	87
7. Aspects économiques du clonage .....	88
8. Composition du lait et de la viande.....	89
9. Impact du clonage sur la réduction de la diversité génétique des populations en élevage.....	90
10. Conséquences du clonage sur le bien-être des animaux d'élevage.....	92
11. Impact sur le bien-être des animaux clonés.....	93
Conclusion générale.....	96
Références bibliographiques .....	98

---

# Introduction

---



La reproduction chez l'espèce bovine est un processus biologique qui permet la production de nouveaux organes d'une espèce à partir des individus préexistants.

C'est l'une des grandes fonctions qui consiste à l'amélioration et à l'augmentation du nombre de cette dernière, elle nécessite une bonne connaissance de l'appareil anatomique et physiologique de l'appareil génital de la vache, parmi les volets de la reproduction apparaît les biotechnologies assistés à la reproduction qui sont plus au moins connu en Algérie mais qui sont développés au autres pays (européens et américains).

Pour essayer de faire connaître cette partie de la reproduction pour les praticiens vétérinaires et techniciens on a donné un aperçu sur les biotechnologies classées par ordre chronologique d'apparition, on commence par l'insémination artificielle qui est la plus pratique, suivie par le transfert embryonnaire, la fécondation *in vitro*, l'injection intra cytoplasmique des spermatozoïdes, et pour finir la technique rarement utilisée est celle de clonage.

---

# **Chapitre I**

Rappel physiologique et anatomique

---

## I. RAPPELS ANATOMIQUES DE L'APPAREIL GÉNITAL FEMELLE :

### L'appareil génital de la femelle comporte trois grandes portions:

- Une portion glandulaire constituée par les *ovaires* jouant une double fonction : *gamétogénèse* assurant l'ovogénèse, et *endocrine* commandant (sous le contrôle hypothalamo-hypophysaire) l'activité génitale par la sécrétion des hormones oestrogènes et progestative ;
- Une portion tubulaire constituée par l'*utérus* (qui reçoit l'oeuf fécondé, permet son implantation et assure sa nutrition pendant la gestation), *les trompes utérines* (qui captent les ovocytes et sont le siège de la fécondation).
- Le sinus uro-génital formé du *vagin* et une *région orificielle* qui constitue la *vulve*. Le vagin est le lieu de copulation et la porte de sortie du veau à la naissance (CIRAD, 2009).

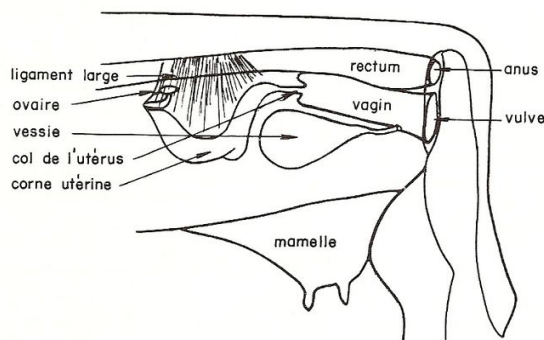


Fig. 34. Schéma de l'appareil génital de la vache : organes en place.

**Figure 1** : L'appareil génital de la vache en place (Source : CIRAD, 2009)

### ***I-1 Le tractus génital de la vache présente quatre segments distincts :***

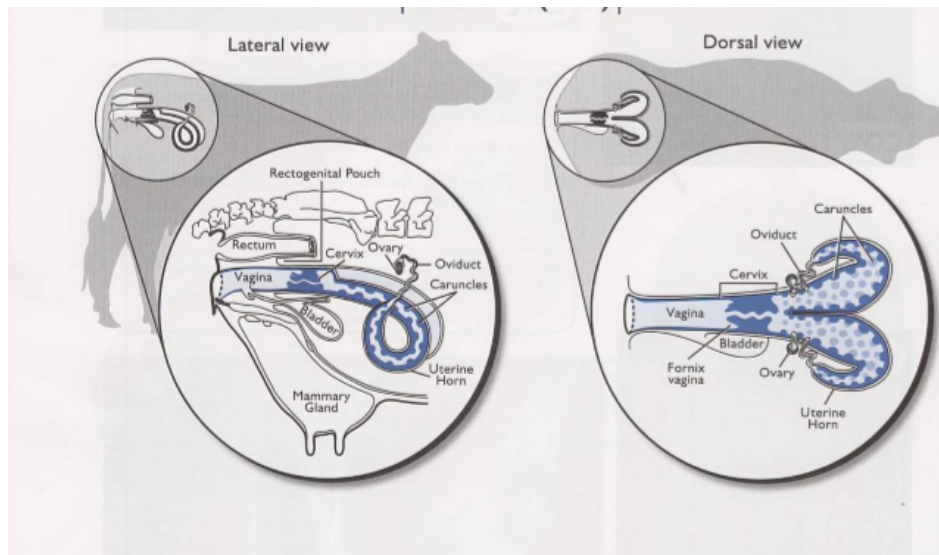
**a -Le vagin** : Lieu de copulation. C'est un conduit cylindrique de 30 cm de long environ.

**b- L'utérus** : Lieu d'implantation de l'embryon puis de la gestation, il est composé de 3 parties : le col utérin, le corps utérin court et les cornes utérines.

**c- Les oviductes** : Lieu de fécondation, les oviductes (ou trompes utérines), sont 2 conduits fins longs de 20 à 30

cm situés à l'extrémité des cornes utérines.

**d- Les ovaires** : De forme ovoïde, mesurant de 1 à 5 cm, les ovaires sont le lieu de formation des follicules contenant les ovocytes et du corps jaune.



**Figure 2** : L'appareil génital de la vache

## II. RAPPELS PHYSIOLOGIQUES SUR LA REPRODUCTION CHEZ LA VACHE

### 1. Les étapes de la vie sexuelle et de la puberté :

Quatre périodes chronologiques correspondant chacune à un état particulier de l'ovaire sont décrites chez la vache. Il s'agit d'une *période pré-pubertaire*, *une période pubertaire*, *une période adulte* et *une période sénile*.

La puberté est la période au cours de laquelle se met en place la fonction de reproduction. C'est l'âge auquel l'animal devient apte à produire les gamètes fécondants. C'est donc le moment d'apparition des premières chaleurs.

La puberté est atteinte en général lorsque la vache atteint un poids moyen minimum équivalent aux 2/3 de son poids adulte ; soit 60% de celui-ci. L'âge à la puberté varie en fonction du niveau alimentaire, de l'environnement et des facteurs génétiques (**ROBERT C.J. et al. 1993**).

A partir de la puberté et durant la période adulte, il apparaît chez la femelle une manifestation cyclique dénommée cycle sexuel. Selon **NIBART (1991)**, cette cyclicité chez la vache, une fois déclenchée, n'est interrompue que par la gestation, le postpartum et les troubles alimentaires.

## 2. Cycle sexuel de la vache

Chez tous les mammifères, l'appareil génital femelle est sujet à des modifications morphologiques et physiologiques au cours de la vie de la femelle. Elles se produisent toujours dans le même ordre et reviennent à intervalle périodique suivant un rythme bien défini pour chaque espèce. Ces modifications ou cycle sexuel commencent au moment de la puberté, se poursuivent tout au long de la vie génitale et ne sont interrompues que par la gestation, le postpartum et le déséquilibre alimentaire.

Elles dépendent de l'activité fonctionnelle de l'ovaire, elle-même tributaire de l'action hypothalamo-hypophysaire (**DERIVAUX, 1971**).

La vache est une espèce polyoestrienne de type continu avec une durée moyenne de cycle de 21/22 jours chez la femelle multipare et de 20 jours chez la génisse.

**Le cycle ovarien** : se définit comme l'intervalle entre deux ovulations. Les événements cellulaires du cycle sexuel se subdivisent en deux phases que sont la phase folliculaire et la phase lutéale.

- ❖ **La phase folliculaire** : est caractérisée par la sécrétion des oestrogènes par les cellules de la thèque interne du follicule ovarien. Cette phase se divise en prooestrus et oestrus.

### 🚦 *Le pro-oestrus*

Cette période dure environ 3 à 4 jours chez la vache. Elle est caractérisée par les processus de croissance et maturation folliculaire qui amènent un follicule du stock cavitaire au stade de follicule mûr. C'est également pendant cette période que se termine la lyse du corps jaune du cycle précédent.

### 🚦 *L'œstrus*

C'est la période de maturité folliculaire suivie de l'ovulation. Elle se caractérise par des modifications comportementales dites chaleurs ; période où la femelle accepte le chevauchement par le mâle ou par ses congénères. Sa durée est brève chez la vache ; environ 13 à 23 heures (**CISSE, 1991**).

- ❖ **La phase lutéale** est caractérisée par la sécrétion de la progestérone par le corps jaune. Cette phase comporte également deux étapes : le met-oestrus et le di-oestrus.

### 🚦 *Le met-oestrus*

Cette période appelée aussi post-oestrus correspond à la formation et développement du corps jaune (C.J). Cette étape a une durée d'environ quatre (4) jours chez la vache.

## ✚ Le di-oestrus

Cette étape correspond à la période de fonctionnement du corps jaune, avec sécrétion de la progestérone. Dans certains cas, cette étape peut se prolonger. Il devient alors un anoestrus ou repos sexuel qui peut être lié à la gestation, au déficit alimentaire ou au postpartum.

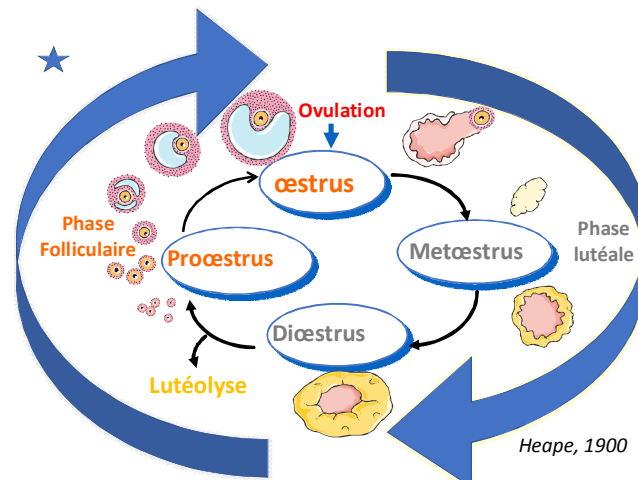


Figure 03 : le cycle œstral chez la vache (Heape, 1900)

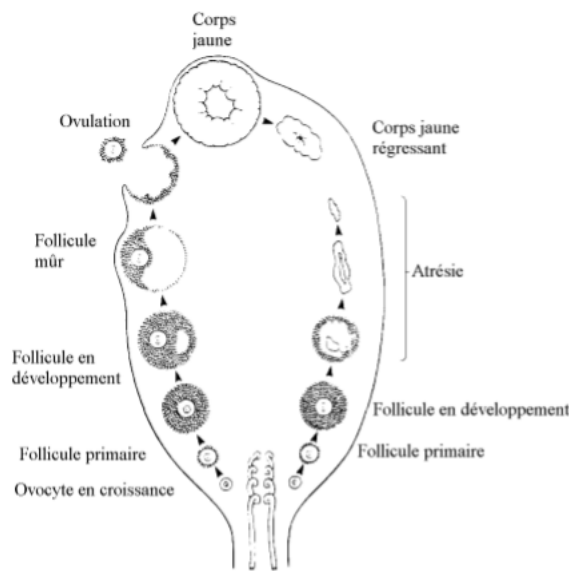
### A. Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache

#### 1. Ovogenèse

L'ovogenèse, débutée lors du développement embryonnaire, s'est arrêtée à la prophase méiotique, laissant les ovocytes I entourés de cellules folliculeuses. Le nombre de ces follicules primordiaux, 235 000 à la naissance chez la vache (MIALOT et al., 2001), diminuera avec l'âge par dégénérescence. Au cours de la succession des cycles, certains ovocytes iront jusqu'à la maturation et la ponte ovulaire, tandis que la majorité dégènera dans les follicules atrésiques. Seulement quelques centaines d'ovocytes primordiaux achèveront ainsi la première division de la méiose pour évoluer en ovocyte II avec émission du premier globule polaire, suivie de la seconde division méiotique. C'est au stade métaphase de cette division qu'a lieu l'ovulation, et la maturation finale se déroulera lors de la fécondation, avec émission du second globule polaire.

#### 2. Folliculogénèse

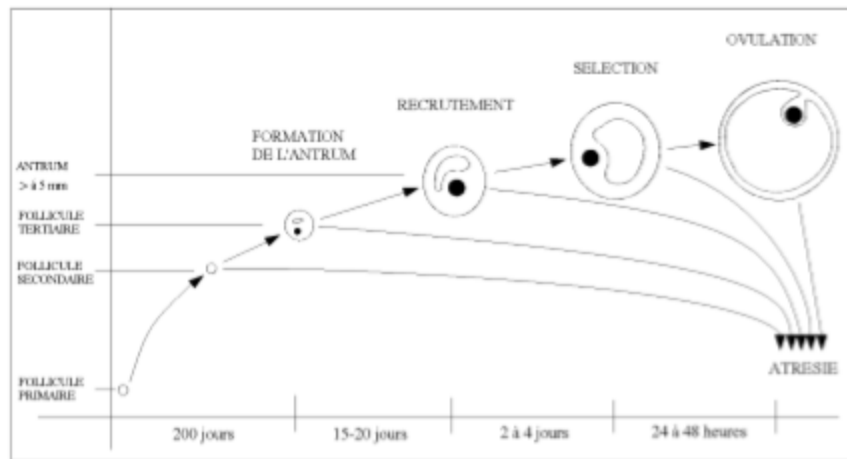
Une coupe d'ovaire de vache adulte permet de visualiser les follicules ovariens, présents depuis leur stade initial, ou follicule primordial, jusqu'au stade de follicule mûr ou dominant, libérant l'ovocyte.



**Figure 04** : les étapes du développement folliculaire vers l'ovulation et le corps jaune ou l'atrésie (d'après **PETERS et al., 1995**).

La folliculogenèse est un phénomène continu, succession des différentes étapes de développement du follicule, structure endocrine temporaire, depuis le moment où il sort de la réserve constituée lors du développement embryonnaire, jusqu'à sa rupture au moment de l'ovulation. A partir de la puberté, chaque jour, environ 80 follicules primordiaux (diamètre 30  $\mu\text{m}$ ) débutent leur croissance par multiplication des cellules folliculaires et développement de l'ovocyte (**FIENI et al., 1995 ; MIALOT et al., 2001**).

Cette croissance aboutit successivement aux stades de follicule primaire, secondaire puis tertiaire, à partir duquel commence la différenciation de l'antrum. Au cours de cette croissance, les follicules acquièrent également des récepteurs les rendant potentiellement capables de répondre à une stimulation gonadotrope : récepteurs à LH (Luteinizing Hormone) pour les cellules de la thèque interne et récepteurs à FSH (Follicle Stimulating Hormone) pour les cellules de la granulosa (**ENNUYER, 2000 ; FIENI et al., 1995**).

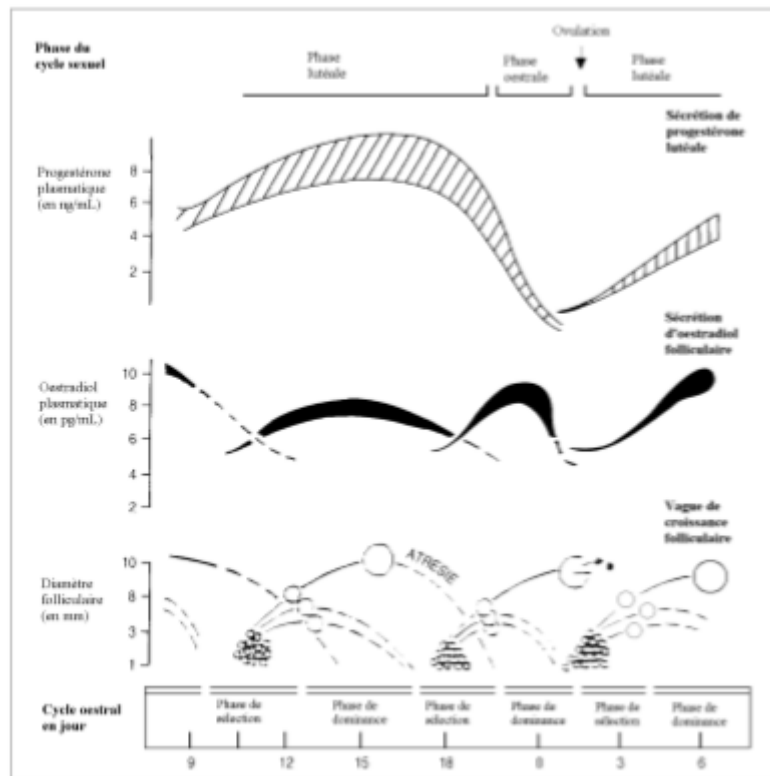


**Figure 05** : Le développement folliculaire (d'après FIENI et al., 1995).

La maturation qui s'ensuit, et qui ne concerne que quelques centaines de follicules pour toute la période de la vie génitale, est communément décrite par les concepts de recrutement, sélection et dominance. Elle est sous l'influence des gonadotrophines puis de l'émergence d'un ou de plusieurs follicules ovulatoires. Le recrutement est l'entrée en croissance terminale d'un groupe de follicules gonadodépendants. La sélection est l'émergence parmi les follicules recrutés du follicule ovulatoire.

La taille folliculaire au moment de la sélection correspond globalement à la taille où apparaissent les récepteurs à LH sur la granulosa (massif de cellules folliculaires). Enfin, la dominance correspond à l'amorce de la régression des autres follicules recrutés et au blocage du recrutement d'autres follicules. Avant la phase de recrutement, le développement folliculaire est très lent puisque le stade précavitaire n'est atteint qu'après 200 jours (ENNUYER, 2000 ; FIENI et al., 1995). Au cours de cette période, l'ovocyte passe de 20 à 120  $\mu\text{m}$  et s'entoure de la membrane pellucide. Les follicules dont la taille est supérieure à 5 mm sont recrutables, c'est-à-dire qu'ils sont sensibles aux gonadotrophines. Après recrutement, la croissance folliculaire est extrêmement rapide (environ 1,5 mm/jour), essentiellement par gonflement de l'antrum.





**Figure 6** : Vagues de croissance folliculaire et variations hormonales au cours du cycle oestral de la vache (d'après FIENI et al., 1995).

Le moment de la sélection est difficile à déterminer chez la vache en raison de l'existence de vagues folliculaires qui entraînent la juxtaposition de phénomènes de régression et de recrutement. Chaque vague de croissance dure chez la vache une dizaine de jours (2 vagues par cycles) ou environ 6 jours (3 vagues par cycle). Plus précisément, les vagues débutent à J2, J8 et J14 pour des cycles à 3 vagues (J0 correspondant à l'ovulation) : c'est le cas le plus fréquent chez les génisses. Elles apparaissent à J2 et J11 pour des cycles à 2 vagues, essentiellement chez les vaches adultes (ENNUYER, 2000). En pratique courante, il est donc impossible, étant donné l'existence de 2 types possibles de cycle, de savoir a priori à quel stade de la vague se trouve la femelle, même en connaissant la date des chaleurs précédentes. Cette précision pourrait pourtant permettre de mieux adapter certains protocoles thérapeutiques ; il serait notamment intéressant de déterminer la part de la génétique dans le nombre de vagues par cycle d'un animal (CHASTANT-MAILLARD et al., 2005).

Pour chacune de ces vagues, qui surviennent au hasard entre les deux ovaires, un follicule grossit beaucoup plus que les autres. C'est ce follicule dominant qui sera susceptible d'ovuler si sa phase de maturité correspond à la lyse du corps jaune du cycle précédent. Ce follicule ovulatoire se caractérise par une taille maximum de 16 à 20 mm (des follicules de 8 à 10 mm peuvent toutefois ovuler), un nombre de cellules de la granulosa maximum ainsi

qu'une atresie systematique des follicules de taille immediatement inferieure. La croissance terminale du follicule preovulatoire, qui se deroule pendant la phase folliculaire, est explosive, de l'ordre de 5 à 6 mm par jour (FIENI et al., 1995).

Ce follicule ovulera si le corps jaune du cycle precedent a regresse. En general, un seul follicule ovule par cycle ; la frequence des ovulations multiples est de 3 à 6 % chez la vache.

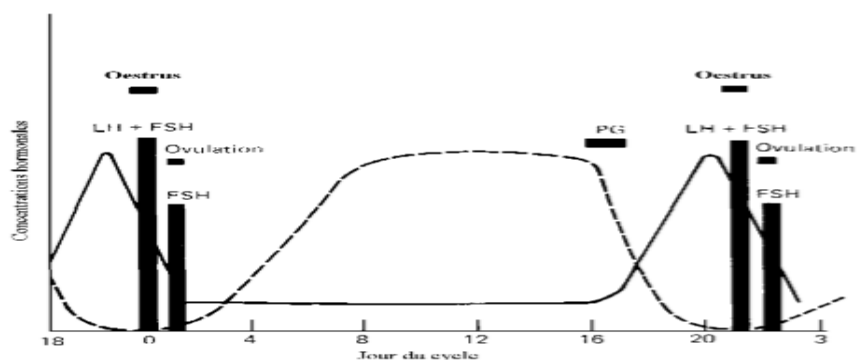
### 3. Phase lutéale

Immédiatement après l'ovulation débute la phase lutéale, tout follicule rompu étant le siège de remaniements cytologiques et biochimiques qui conduisent à la formation du corps jaune. Cet organite contient des grandes cellules issues de la granulosa et des petites provenant de la thèque interne. En fin de croissance, il atteint un diamètre minimal de 20 mm (MIALOT et al., 2001). Il sécrète essentiellement de la progestérone, mais aussi des œstrogènes, de la relaxine et de l'ocytocine. L'évolution du corps jaune chez la vache se réalise en trois temps : une période de croissance de 4 à 5 jours, au cours de laquelle il est insensible aux prostaglandines ; un temps de maintien d'activité pendant 8 à 10 jours ; enfin, s'il n'y a pas eu de fécondation, une période de lutéolyse, observable macroscopiquement à partir du 17ème-18ème jour du cycle, aboutissant à la formation d'un reliquat ovarien, le corps blanc (FIENI et al., 1995).

### B. Régulation hormonale du cycle sexuel chez la vache

#### 1. Aperçu du contrôle hormonal du cycle

La physiologie du cycle sexuel est complexe et fait intervenir le système nerveux central (axe hypothalamo-hypophysaire) et l'appareil génital (ovaires et utérus).



**Figure 7** : Des concentrations hormonales au cours du cycle oestral

(d'après PETERS et al., 1995).

Quand le corps jaune régresse à la fin du cycle (du 15<sup>ème</sup> au 19<sup>ème</sup> jour du cycle), le rétrocontrôle négatif exercé par la progestérone, sécrétée au cours de la phase lutéale par le corps jaune, sur l'axe hypothalamo-hypophysaire est levé progressivement.

Les gonadotrophines hypophysaires, FSH et LH, stimulent la croissance du follicule dominant, jusqu'au stade pré-ovulatoire, et son activité sécrétoire, libérant des quantités croissantes d'œstradiol. En 2 à 3 jours, la forte augmentation d'œstradiol plasmatique (à l'origine du comportement de chaleurs) entraîne une décharge importante de FSH et de LH, provoquant l'ovulation. Le corps jaune néoformé se développe sous l'influence trophique de la LH et de la prolactine, d'origine hypophysaire. Il sécrète à la fois de la progestérone et de l'œstradiol, à l'origine d'un rétrocontrôle négatif marqué sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, ce qui inhibe une éventuelle sécrétion pré-ovulatoire de gonadotrophines tout en permettant l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire. La progestérone provoque le stockage de précurseurs d'acides gras dans l'endomètre. Après le 10<sup>ème</sup> jour du cycle, à partir de ces précurseurs, l'œstradiol induit la synthèse de prostaglandines utérines PGF2 $\alpha$ , qui seront ensuite libérées par l'action de l'ocytocine lutéale sur ses récepteurs utérins. Leur effet lutéolytique aura pour conséquence d'un point de vue hormonal la diminution progressive de la progestéronémie (MEREDITH, 1995).

## 2. Régulation de la sécrétion de la GnRH

L'initiateur et le régulateur fondamental de la fonction reproductrice est la GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone ou gonadolibérine). Cette hormone est synthétisée et libérée par les neurones de l'hypothalamus, et se lie aux récepteurs spécifiques situés sur les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse, ce qui provoque la synthèse et la libération des gonadotrophines, FSH et LH.

La FSH, à son tour, agit spécifiquement sur les petits follicules ovariens pour stimuler leur croissance, tandis que la LH agit en plus sur le follicule dominant mûr pour provoquer la maturation finale et l'ovulation.

La GnRH est sécrétée par l'hypothalamus de façon pulsatile, ces décharges pulsatiles étant responsables de la pulsativité des sécrétions des gonadotrophines (FIENI et al., 1995). La régulation de la sécrétion de GnRH fait à la fois intervenir des facteurs internes et externes:

- **facteurs internes :**

Ce sont principalement les hormones stéroïdes ovariennes, la progestérone et l'œstradiol. La progestérone agit sur les neurones de la GnRH en abaissant la fréquence des

décharges de GnRH. Lors de la phase lutéinique, où les concentrations de progestérone sont élevées, l'œstradiol agit en synergie avec la progestérone pour diminuer la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus. Au contraire, pendant la phase folliculaire, l'œstradiol sécrété par le follicule pré-ovulatoire exerce une rétroaction positive sur la GnRH, ce qui provoque la prolongation d'une sécrétion élevée responsable des pics pré-ovulatoires de LH et de FSH.

- **facteurs externes :**

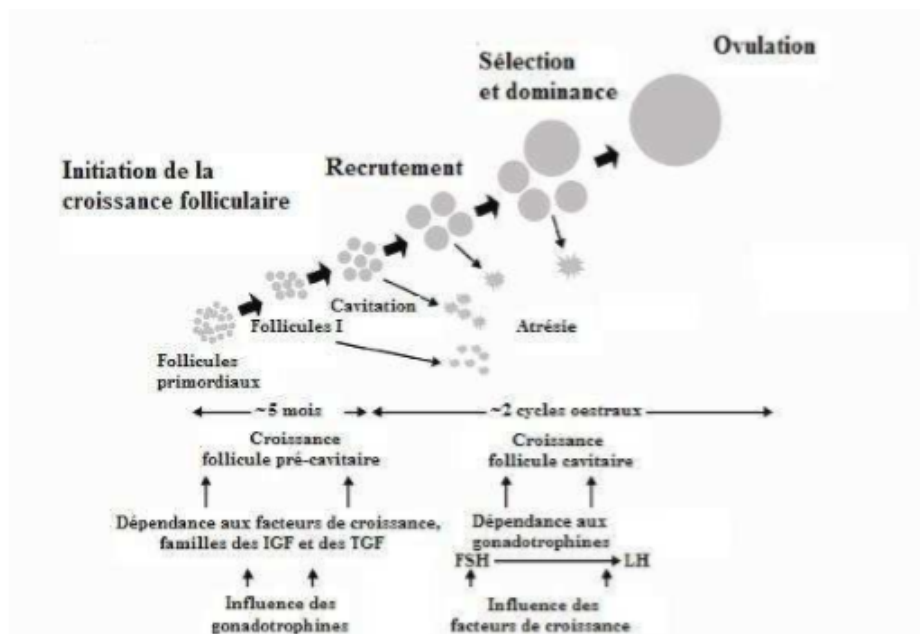
Ce sont essentiellement le statut nutritionnel de l'animal, le stimulus d'allaitement chez la vache allaitante, les phéromones du mâle ainsi que la photopériode (corrélation positive démontrée chez la vache entre fertilité et longueur du jour).

Le stimulus nerveux de la tétée, voire de la traite, entraîne en début de postpartum une inhibition de la sécrétion de GnRH, le mécanisme faisant éventuellement intervenir la libération de substances opiacées au niveau du système nerveux central. Ceci expliquerait en partie l'état d'anoestrus postpartum chez les vaches allaitantes (**FIENI et al., 1995 ; MIALOT et al., 2001**).

### **3. Régulation de la croissance folliculaire**

Les stades initiaux de la folliculogenèse se produisent indépendamment des gonadotrophines (**WEBB et al., 2003**).

En revanche, la FSH et la LH deviennent indispensables au développement des follicules dès le début de la maturation, grâce à une action synergique séquentielle mais aussi parfois simultanée. Ces hormones sont animées d'une sécrétion de base « tonique » à caractère pulsatile de faible fréquence mais aussi à intervalles réguliers, puis, 24 heures avant l'ovulation, d'une décharge importante de courte durée, décharge « cyclique » ou ovulatoire, également pulsatile mais de haute fréquence.



**Figure 8** : Rôles relatifs des gonadotrophines et des facteurs de croissance au cours du développement folliculaire (d'après WEBB, 1999).

#### a) Croissance folliculaire pré-antrale

Ce phénomène continu démarre lors de l'entrée en croissance des follicules primordiaux, à partir de la sortie du stock, jusqu'à la taille de 5 mm. Les gonadotrophines ne sont probablement pas indispensables dans l'initiation de la croissance folliculaire (MCNATHY et al., 1999), bien que les ARNm des récepteurs à FSH et à LH semblent apparaître précocement (BAO et al., 1998).

La régulation de cette première phase, dite non-gonadodépendante, semble être largement assurée par des facteurs locaux, à l'origine d'interactions entre les cellules de la granulosa et l'ovocyte : activines et inhibines, protéines BMP (BoneMorphogeneticProteins), facteurs de croissance, en particulier IGF (Insulin-likeGrowthFactors), bFGF (basic FibroblastGrowth Factor), EGF (EpidermalGrowth Factor) et TGF  $\beta$  (TransformingGrowthFactors  $\beta$ ), ... (MCNATTY et al., 1999 ; WEBB et al., 2004).

#### b) Recrutement

La formation de l'antrum coïncide avec l'acquisition d'une dépendance du développement folliculaire vis-à-vis des gonadotrophines. Au cours de la maturation folliculaire, les cellules de la granulosa acquièrent des récepteurs spécifiques à la FSH. La sécrétion de la FSH va provoquer à leur niveau deux effets biologiques : d'une part, grâce à l'action conjointe de l'IGF-I, la stimulation de l'aromatation des androgènes, fournis par les

cellules de la thèque, en oestrogènes ; d'autre part, l'apparition de récepteurs à LH sur les membranes cellulaires, toujours en relation avec l'IGF-I.

Les oestrogènes synthétisés grâce à l'action synergique de la FSH et de la LH stimulent la multiplication des cellules de la granulosa, induisant la croissance du follicule et le développement de la cavité antrale remplie de liquide folliculaire [ENNUYER, 2000 ; FIENI et al., 1995]. L'IGF-II, produit par les cellules thécales, serait le principal facteur ovarien de croissance folliculaire impliqué dans la régulation de la croissance des follicules cavitaires chez la vache (**WEBB et al., 1999**).

### c) Sélection

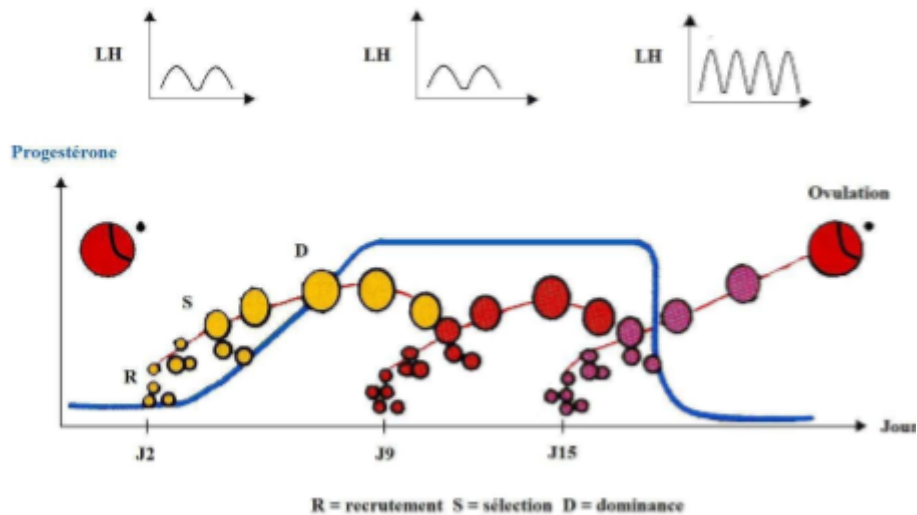
Lors de la sélection, l'augmentation de la fréquence des pulses de LH stimule la production d'œstradiol et d'inhibine par la granulosa des gros follicules. Oestradiol et inhibine agissent conjointement en réduisant progressivement la sécrétion de la FSH, réduction responsable de la sélection [WEBB et al., 1999]. En effet, la prévention de la chute de FSH par injection de cette hormone à petite dose conduit à une polyovulation (**ENNUYER, 2000 ; FIENI et al., 1995**).

Lorsqu'un follicule dominant a acquis suffisamment de récepteurs à LH pour lui permettre de subsister quand le taux de FSH diminue, il sécrète de grandes quantités d'oestrogènes et continue à croître en raison de l'augmentation de sa propre sensibilité à la FSH et à la LH, et par production de facteurs locaux, notamment des IGF. L'action de l'IGF-I semble régulée par la concentration en ses protéines-ligands, les IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Proteins) : une diminution de la concentration en IGFBP, entraînant une plus grande biodisponibilité de l'IGF-I, serait déterminante dans le mécanisme d'acquisition de la dominance (**AUSTIN et al., 2001 ; MONGET et al., 2002**). La sécrétion réduite de FSH ne permet plus en revanche la croissance des follicules non sélectionnés (**ENNUYER, 2000**).

### d) Dominance

La LH induit la synthèse de progestérone par les cellules de la granulosa. La progestérone a un effet inhibiteur sur la production de 17- $\beta$ -oestradiol : ainsi, sa sécrétion par le follicule dominant maintient les autres follicules dans un état d'immaturité en inhibant l'aromatisation à leur niveau. Les follicules dominants ne seraient pas affectés en raison de concentrations importantes d'œstradiol présentes dans leur liquide folliculaire, tandis que les follicules atrétiques se caractérisent par leur richesse en androgènes.

L'inhibine folliculaire, outre son action inhibitrice sélective sur la FSH, empêcherait également l'aromatisation (FIENI et al., 1995).



**Figure 9** : Croissances folliculaires au cours d'un cycle oestral chez la vache

(d'après ENNUYER, 2000).

La LH assure la maturation du follicule dominant, dont l'avenir dépend de la fréquence des décharges de LH, régulées par la GnRH.

Lorsqu'un corps jaune est présent, la fréquence d'une décharge de LH toutes les 3 ou 4 heures aboutit à la perte de dominance et à l'atrésie du follicule, donc à l'absence d'ovulation et d'œstrus. Une nouvelle vague folliculaire émerge alors, également précédée d'une augmentation transitoire de FSH, celle-ci commençant environ 60 heures avant le recrutement et se terminant lorsque celui-ci débute (HAMILTON, 1995).

Lorsque la fréquence est d'un pic par heure, l'ovulation peut avoir lieu. Celle-ci est possible lors de la levée de l'inhibition de la progestérone sur la production de GnRH, à la suite de la lyse du corps jaune du cycle précédent (ENNUYER, 2000).

**Conclusion :**

La croissance folliculaire chez la vache se déroule en 2 étapes: à une phase de croissance indépendante de l'action des gonadotrophines, succède une phase gonadodépendante, pendant laquelle la croissance folliculaire est soumise à l'influence des gonadotrophines, FSH et LH.

Le développement des follicules passe alors d'une croissance de type continu à une croissance de type cyclique, sous forme de vagues folliculaires.



---

# Chapitre II

L'insémination artificielle

---

L'insémination artificielle bovine est une technique qui requiert un équipement spécifique et une formation pointue en anatomie, physiologie et geste opératoire. La réussite dès la première insémination reste l'objectif des éleveurs et des inséminateurs qui doivent tenir compte de différents facteurs pour choisir le bon moment de mise à la reproduction, parmi lesquels la détection des chaleurs et la condition de l'animal.

### **1. Historique :**

D'après Heape (1897), l'insémination artificielle aurait été pratiquée par les arabes pour la reproduction des chevaux dès le 14<sup>ème</sup> siècle par Abou Bakr el Naciri. Toutefois la 1<sup>ère</sup> expérience scientifique réalisée par le physiologiste italien Lauro Spallanzani en 1779 qui obtint trois chiots après avoir inséminé artificiellement une chienne de la race des Barbet, en injectant du sperme dans la cavité péritonéale à proximité des ovaires.

La première mention scientifique de l'application de l'insémination artificielle au cheval est due au vétérinaire français (Repiquet 1887 au début du siècle par I A) la jument (la Mouche) donna naissance successivement à deux poulains E I V et O W qui pratiquent en Russie la 1<sup>ère</sup> insémination artificielle chez les ovins entre 1901-1905, le 1<sup>er</sup> centre d'insémination fut créé en France en 1946 ; en 1950 on insémina pour la 1<sup>ère</sup> fois des vaches avec sperme congelé à -79°C, en 1972 pour la France plus de 7300.000 vaches et plus de 46000 truies et plus de 5350 chèvres ont été inséminées artificiellement, en 1949 les chercheurs anglais POLGE SMIETH et PARKET découvraient une méthode pratique de congeler le spermatozoïde de sorte qu'il pourrait être conservé longtemps à des températures de glace sèche -78°C et plus tard dans l'azote liquide (-196°C) il est indispensable de citer ici que chez pratiquement toutes les espèces à l'exception des bovins, l'insémination artificielle ne peut être effectuée qu'avec du sperme frais.

### **2. L'importance de l'insémination artificielle :**

Malgré la vive opposition qu'elle a connue l'application de cette technique est devenue comme étant un acte anti naturel.

Les européens avaient rapidement perçus que bien que ces inconvénients soient illusoire, ces avantages sont nombreux, c'est pour quoi elle a connu un tel succès aujourd'hui.

**a. Les avantages techniques :**

1. Diffusion rapide dans le temps et dans l'espace, du progrès génétique.
2. Découverte rapide de géniteur, ayant de très hautes performances génétiques grâce au testage sur descendance qui exige l'utilisation de l'insémination artificielle.
3. Grande possibilité pour l'éleveur du choix des caractéristiques du taureau qu'il désire utiliser en fonction du type de son élevage et l'option de production animale a développé .

**b. Les avantages économiques :**

1. Diminution du nombre du males a utilisé en reproduction et leur valorisation en production de viande.
2. Amélioration de la productivité du troupeau ( lait-viande ) qui se traduit par l'amélioration du revenu de l'éleveur , cette aspect est particulièrement perceptible chez les animaux croises obtenus par I A des vaches locales .
3. La possibilité des récolte de grand quantité des semences en prévenance d'un individu et de utilisé même après la mort du donneurs.

**c. Les avantages sanitaires :**

1. L'insémination artificielle est un outil de prévention de propagation des maladies contagieuses et / ou vénériennes grâce au non contacte physique directe entre les femelles et le géniteur.
2. Le contrôle des maladies grâce aux normes sanitaire strictes exigées. Au niveau des centres producteur des semences, ce qui réduit considérablement le risque de transmission de maladie par vois male.
3. Contrôle et diagnostic précoce des problèmes d'infertilité grâce au système de suivre individuel et permanent des vaches inséminées (fiche insémination).

**d. Les inconvénient:**

L'utilisation de géniteur de faible valeur peut avoir de conséquence catastrophique pour l'élevage , il faut insister sur les nécessite de n'utiliser que des males dont la valeur à été reconnue par l'épreuve de la descendance.

L'IA comme elle peut prévenir les maladies vénérienne, peut contribuer a leur dispersion si le contrôle sanitaire des géniteur n'est pas systématiquement realize, ou si l'on prend pas les précaution de propriété et d'hygiène indispensable.

### 3. La récolte et évaluation du sperme :

#### a- méthode de récolte du sperme :

Le prélèvement de sperme est réalisé au cours d'une opération nommée récolte au collecte du sperme, c'est le temps initial des opération de préparation de la semence.

Des déférentes méthodes ont été proposés, mais en pratique deux seulement son utilisable pour les centres d'insémination artificielle.

#### a-1. Récolte au vagin artificiel :

La quasi-totalité des semences préparés pour IA sont obtenues par ce procédé.

Appareille en caoutchouc a deux parois, constitue d'un manchon externe résistant et d'un manchon interne dont les extrémité sont recourbée sur le manchon externe , c'est un cylindre ouvert a chaque extrémité entoure d'un chambre annulaire fermée, que l'on peut remplir d'eau à 39-40°C , un réceptacle en caoutchouc (cône) fixe a une extrémité termine par un tube de verre (généralement gradué) complète l'appareille , les condition sensorielles, de la vulve et du vagin naturel sont fournie pat l'orifice lubrifie (vaseline neutre) et par la paroi chaud.

Le pénis pénètre l'appareille a l'image du vagin naturel lors de la copulation et le sperme est éjacule dans le cône terminal.

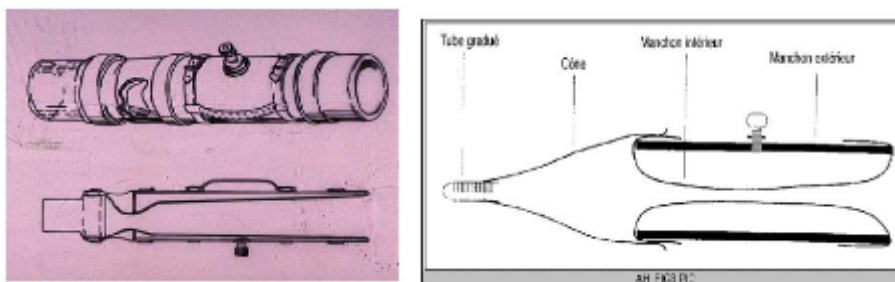


Figure 10 : Vagin artificiel

#### a-2. Electro – éjaculation :

Méthode d'exception dans les centre d'insémination artificielle , elle permet d'obtenir le prélèvement de la semence a partir du taureau sans intervention des mécanismes normaux

sensoriels et psychique de l'éjaculation lors que l'animal souffre des postérieurs au qu'il refuse le vagin artificielle.

L'appareille utilisée se compose d'un transformateur, un rhéostat, un voltmètre et d'une électrode bipolaire de dimension adaptée a l'espèce considérée.

Après contention de l'animal l'électrode lubrifie en augmentant progressivement l'intensité selon les instruction du fabricants jusqu'à l'érection complète et éjaculation, le sperme est recueilli par appareille de récolte .

Les éjaculat recueillis par électro – éjaculation sont généralement d'un volume plus grand et d'une concentration plus faible en spermatozoïde que ceux recueillis par les vagin artificielle .



**Figure 11 :** Electro – éjaculation

### **b-évaluation du sperme :**

C'est la première phase des opérations de laboratoire , elle a pour objectif d'apprécier différentes caractéristique biologique du sperme plus ou moins relies a son pouvoir fécondant et se précise le niveau de dilution qu'il pourra supporter, afin de préparer une semence correspondant a l'optimum biologique et économique recherché.

### **L'évaluation du sperme comporte trois niveaux:**

#### **b-1- l'évaluation visuelle:**

Elle permet d'apprécie:

- Le volume.
- La couleur.
- La consistance.

**Le volume :**

Le volume de sperme recueilli varie en fonction de l'âge de taureau , de la préparation, de l'alimentation, des facteurs psychique et d'environnement momentanés, le volume moyen est de 4ml .

**La couleur :**

Est habituellement blanchâtre (laiteux et crémeux) sont plus de qualificatifs en relation avec la concentration en SPZ certain taureaux fournissent des éjaculats de coloration jaunâtre normale (teneur en carotène).

**La consistance :**

Ou viscosité est relie a la concentration en SPZ l'éjaculat est d'autant plus aqueux qu'il contient moins de SPZ .

**b-2-l'évaluation microscopique :**

Elle permet d'apprécie :

- La motilité du SPZ.
- La concentration en SPZ et autre élément cellulaires.
- La morphologie normale.

**La motilité du SPZ :**

C'est l'examen classique, constant, obligatoire, au quel se referer le plus souvent le technicien de laboratoire de IA.

La technique la plus utilisée consiste aobserve une goûte de sperme au microscope sur un platine chauffée a 37-38°C en évalué le pourcentage de SPZ mobile et la qualité du mouvement.

Normalement, le SPZ se déplace par des ondulation de flagelle dans un plan et simultanément , il tourne au tour de son axe longitudinale, progressant ainsi d'un mouvement rectiligne.

**La concentration de SPZ :**

Elle est souvent déterminée par comptage direct des spermatozoïdes sous microscope, l'utilisation de la densité optique, l'utilisation d'un compteur électronique, la détermination de volume cellulaire par centrifugation.

La concentration moyen du sperme de taureau et de  $10^9$  SPZ au ml (  $0.2 \times 10^9$  a  $2 \times 10^9$  ) le sperme pressentant au moins  $0.7 \times 10^9$  SPZ au ml est admis pour la dilution.

### **La morphologie des SPZ :**

Cette évaluation faite partie de l'examen hebdomadaire effectuée sur le jeune taurillon lors de l'étude de la fonction sexuelle .

C'est généralement l'étude d'un étalement coloré qui pratiquement permet cette évaluation on été proposée différents technique de coloration : ( coloration de giémsa, a l'encre de chine, au rose bengale, bleu opale..... ) qui sert a l'étude de la morphologie et du pourcentage de SPZ vivant au morts .

On admet que, pour être admissible en IA, sperme doit contenir moins de 20% a 25% de SPZ anormaux et plus de 60% de SPZ vivant .

### **4. Etude physique-chimique et biochimique du sperme :**

L'activité métabolique des SPZ est importante indication de la qualité de sperme, l'évaluation peut se faire par plusieurs moyens.

- 1- Mesure de PH
- 2- Indice de fructoloyse
- 3- Réduction du bleu de méthylène
- 4- Teste de résistance au Na cl
- 5- Oxydation pyruvate
- 6- Teste de résistance à la chaleur, variation osmotique

### **5. La préparation de la semence:**

La semence: est une sperme qui préparé (dilué, conditionnée, conservé) par une technique appropriée en vue de son emploi par IA.

Les objectifs de cette préparation sont:

- 1- Accroître le volume de tell sorte qui un plus grand nombre de femelle puissent être insémine .
- 2- Protège le SPZ pour qu'ils puissent supporte sans dégradation la succession des opérations ultérieures .

3- Emballer et identifie chaque portion qui servira a l'insémination de la vache.

## 6. Les différentes étapes de préparation de semence :

### a. Dilution du sperme:

Chez les ruminants, l'étape préliminaire visant à séparer la fraction spermatique proprement dite de la fraction constituée des sécrétions des glandes annexes, n'est pas indispensable étant donné que la semence est constituée pour l'essentiel des sécrétions testiculaires. Le conditionnement du sperme requiert quelques précautions telles que l'utilisation de récipients stériles, de produits chimiquement purs, d'eau distillée, l'absence de chocs thermiques et la mise du sperme à l'abri de l'air et de la lumière.



Figure 12 : Le matériel pour la dilution de sperm

### b. Les milieux de dilution

La dilution du sperme a pour but d'accroître le volume total de la masse spermatique, d'assurer un milieu favorable à la survie des spermatozoïdes in vitro et de réaliser à partir d'un seul éjaculat l'insémination d'un grand nombre de femelles.

#### *b.1. Qualités des milieux de dilution*

Les milieux de dilution doivent répondre à un certain nombre de conditions : Leur pression osmotique doit être isotonique avec le sperme pour l'espèce en cause et être capable de la maintenir pendant la durée de stockage. Ils doivent renfermer des substances colloïdales (jaune d'œuf, lipoprotéines, lécithines) susceptibles de protéger les spermatozoïdes.

Les substances tampons permettent de maintenir un pH favorable aux spermatozoïdes (6.2 à 6.8). Leur présence est plus importante pour le sperme de taureau et de bœuf que celui d'étalon et de verrat étant donné la concentration élevée en spermatozoïdes et donc la



glycogénolyse élevée du sperme de ces deux espèces qui est responsable d'une diminution rapide du pH. Les substances nutritives sont sensées favoriser le métabolisme, la vitalité et la longévité des spermatozoïdes. Le milieu de dilution doit être dépourvu d'agents infectieux, car ils sont préjudiciables à la survie des spermatozoïdes, à la fertilisation et au développement de l'embryon. Ce faisant, les spermatozoïdes se trouveront dans les meilleures conditions pour remplir leurs 4 fonctions préalables à la fécondation :

- a. activité métabolique productrice d'énergie,
- b. mobilité pour progresser dans les voies génitales femelles,
- c. enzymes de protection sur l'acrosome pour en faciliter la pénétration dans l'ovocyte,
- d. présence de protéines sur la membrane plasmique pour assurer leur survie optimale dans le tractus génital femelle et leur fixation sur la pellucide de l'ovocyte.

### **b.2. Nature des milieux de dilution**

Il existe quelque soit l'espèce animale une grande variété de dilueurs. Ils se différencient par la nature voire la concentration d'utilisation de leurs composants. On peut ainsi distinguer les dilueurs à base de jaune d'œuf phosphaté (Milieu de Lardy et Philips) ou citrate (Milieu de Salisbury), à bases de sucres (glucose, fructose : milieux de Kampschmidt, de Chominat, de Dimitropoulos, de Foote), à base de glyocolle et de glycérol (milieu de Roy), de CO<sub>2</sub> (milieu de Van Demark ou IVT : Illinois Variable Temperature) ou et plus classiquement maintenant à base de lait dont certains sont commercialisés (Laiciphos IMT).

Le lait peut être considéré comme un constituant de base apportant aux spermatozoïdes phosphates, citrates et sucres. Son pH est voisin de celui du sperme. Il est simple à préparer et peu cher. Le plus utilisé est préparé à partir de poudre de lait écrémé de vache additionné de cholestérol ou de lécithine, de sels, de glucose, d'acides aminés (glycocolle, tryptophane, tyrosine) et d'antibiotiques (Laiciphos : IMV).

Le jaune d'œuf est habituellement utilisé à des concentrations comprises chez le taureau entre 5 et 15 %. Il protège le sperme grâce aux lécithines qu'il renferme de l'effet néfaste des brusques variations de température. Source de nutriments, il agit aussi favorablement vis à vis des variations de pH et de pression osmotique. Les antibiotiques s'opposent au développement des micro-organismes. Classiquement, la pénicilline et la streptomycine sont employées à la dose respectivement de 1000 UI et d'un mg par ml de

dilueur. On se souviendra que certains antibiotiques peuvent être toxiques pour le spermatozoïde. Ainsi en est-il de l'oxytétracycline à la dose de 500 mcg/ml, de la chlorotétracycline à la dose de 50 mcg/ml. L'emploi du glycérol (agent cryoprotecteur) n'est requis que si le sperme est destiné à être congelé. Le glycérol fixe une partie de l'eau du dilueur et ce faisant abaisse le point de congélation du milieu, diminue la quantité de glace à la congélation et à la décongélation et diminue la taille des cristaux.

Il exerce par ailleurs un effet protecteur sur les membranes cellulaires et limite l'augmentation de la pression osmotique en réduisant la quantité d'eau qui se transforme en glace.

### **c. Le taux de dilution**

Pour le taureau, son calcul est basé sur l'obtention de doses d'insémination renfermant une concentration en spermatozoïdes zootechniquement acceptable soit 10 à 12 millions de spermatozoïdes par paille. Estimant à 40 % les pertes imputables aux processus de congélation-décongélation, il faut donc obtenir au terme de la dilution une concentration moyenne de 20 millions de spermatozoïdes par paille de 0.25 ml.

### **d. Conservation du sperme**

**Conservation à court terme :** L'utilisation directe du sperme dilué de taureau suppose une conservation à une température voisine de 5°C. Celle-ci doit cependant pour éviter les chocs thermiques, être atteinte progressivement au rythme moyen de refroidissement de 0.5°C par minute entre 37 et 22°C et de 1°C par minute entre 22 et 5°C. Bien diluée et convenablement refroidie, la semence peut conserver son pouvoir de fécondation pendant 2 à 3 jours.

**Conservation à long terme :** la congélation du sperme de taureau, La congélation requiert l'utilisation d'agents cryoprotecteurs.. Classiquement, le glycérol est utilisé pour congeler le sperme. Il n'est pas inutile de préciser qu'étant donné les effets délétères potentiels des agents cryoprotecteurs sur le spermatozoïde, ils doivent être utilisés à une dilution optimale.

Ainsi, à la concentration de 4%, le glycérol offre la plus grande mobilité massale des spermatozoïdes du verrat mais c'est après congélation dans une solution à 1 % que les lésions de leurs acrosomes sont les moins nombreuses.

Deux solutions de dilueurs (Laiciphos 10 %, jaune d'œuf 10 %, eau distillée) sont requises. Elles se distinguent par le fait que la seconde renferme du glycérol à une concentration de 14 %. Le dilueur A est maintenu à 32°C et le dilueur B à 4°C.

**Phase de refroidissement :** Le sperme est ajouté à la fraction A en deux temps. Dans un premier temps on mélange une quantité égale de sperme et de dilueur A. Ce mélange est après 2 à 3 minutes ajouté au reste du dilueur A. Ce milieu predilué est alors amené progressivement à la température de 4°C (voir supra). Une fois cette température atteinte, le dilueur B est ajouté au dilueur A en 4 étapes de 15 minutes.

Il est important en effet de laisser au glycérol le temps de pénétrer dans les spermatozoïdes, ce processus étant d'autant plus long qu'il s'effectue à basse température. L'équilibration prend donc deux heures environ et la dilution finale de glycérol sera de 7 %.

**Conditionnement:** Une fois refroidi, le sperme sera conditionné le plus souvent en paillettes voire en ampoules de verre ou de plastique ou en pellets. Classiquement trois types de paillette sont utilisés. Elles ont toutes une longueur de 133 mm. La paillette grosse a un diamètre compris entre 3.8 et 4.2 mm et un volume de 1.2 ml. La paillette moyenne a un diamètre compris entre 2.5 et 2.8 mm et un volume de 0.5 ml. La paillette fine (la plus utilisée) a un diamètre compris entre 1.7 et 2.2 mm et un volume utile de 0.25 ml. Ces paillettes sont constituées d'un cylindre de chlorure de polyvinyle dont une extrémité est obturée au moyen de deux étoupes de gaze entourant un bouchon de matière pulvérulente : l'alcool polyvinylique. Ce dispositif servira de piston lors de l'insémination. L'autre bout est libre et servira au remplissage de la paillette. Les paillettes sont de couleurs différentes pour en faciliter l'identification. Celle-ci se trouve complétée par l'impression sur le corps de la paillette du nom du taureau, de son numéro d'identification, de la date de récolte et de l'identification du centre d'insémination.

Pour leur remplissage, une vingtaine de paillettes sont fixées à un peigne relié à une pompe d'aspiration. Une fois remplies, une légère agitation des paillettes permettra de ménager une place pour l'obturation et la bulle d'air nécessaire pour permettre la dilution du sperme lors de la congélation. Le bouchage s'effectue manuellement ou est plus souvent actuellement automatisée. Il est réalisé au moyen de poudre d'alcool polyvinylique qui une fois humide se transforme en gel ou par sertissage.

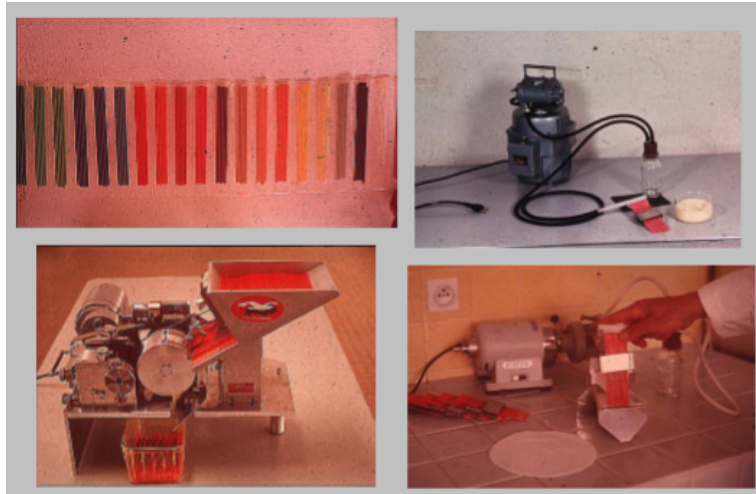
Une fois le sperme conditionné, les paillettes sont plongées dans de l'eau à 4°C pour permettre l'action du glycérol (phase de glycerolisation) et des autres constituants du dilueur. Cette phase contribue également à rendre plus hermétique l'obturation de la paillette.

Les paillettes sont alors disposées sur une rampe de refroidissement en vue de leur congélation. Elles sont dans un premier temps disposées dans les vapeurs d'azote à quelques cm au-dessus du niveau d'azote liquide de la cuve. Le refroidissement est obtenu selon une courbe classique à savoir entre 4°C et -10°C un refroidissement de 4°C par minute et entre -10°C et -130°C un refroidissement de 40°C par minute. Biologiquement, la phase critique est celle comprise entre -10°C et -50°C. C'est entre ces températures en effet que se produisent les phénomènes de cristallisation extra puis intracellulaire et les mouvements d'ions qui en résultent. Au bout de 7 à 9 minutes, la congélation est obtenue et les paillettes sont plongées dans l'azote liquide à -196°C. Il est intéressant de noter que ce type de congélation n'altère en rien le caractère pathogène de germes tels que *Brucella abortus*, *Campylobacter foetus*, *Actinomyces pyogenes* ou *Listeria monocytogenes*.

Les paillettes sont stockées dans des visotubes, cylindres hexagonaux de couleur variable pour en faciliter le repérage, eux-mêmes placés dans des gobelets plus gros appelés canisters rangés dans des tanks pouvant contenir plusieurs centaines de litres.

Le transport des paillettes se fera dans des containers cryogéniques ou cuves d'azote dont il existe différents modèles de capacité et de propriétés thermiques différentes. Une vérification régulière du niveau d'azote de ces cuves s'impose. Par ailleurs, la température doit toujours y être inférieure à -120°C.

Il est indispensable pour ce faire d'y maintenir un niveau minimal de 5 cm d'azote liquide. L'évaporation sera fonction de la fréquence d'ouverture de la cuve et du temps nécessaire au choix d'une paillette (5 à 8 secondes).



**Figure 13 :** Conditionnement en paillettes

**7. Technique de l'IA bovine :**

- Vérifier l'état œstral voire identifier l'ovaire porteur du follicule.
- Décongélation de la paillette.
- Rapide : 30 sec à 34 -37°C
- Décongélation in vivo (col utérin : possible)
- Réchauffer le pistolet d'insémination.
- Monter la paillette dans le pistolet.
- Attendre le dernier moment si  $T^{\circ} < 20^{\circ}\text{C}$
- Attente de 60 minutes possible si  $T^{\circ} 35^{\circ}\text{C}$
- Essuyer la paillette.
- Confirmer le taureau et le numéro de sir.
- Couper le bout.
- Mettre la gaine sanitaire.
- Expulser une goutte (perler).
- Mettre la chemise sanitaire.

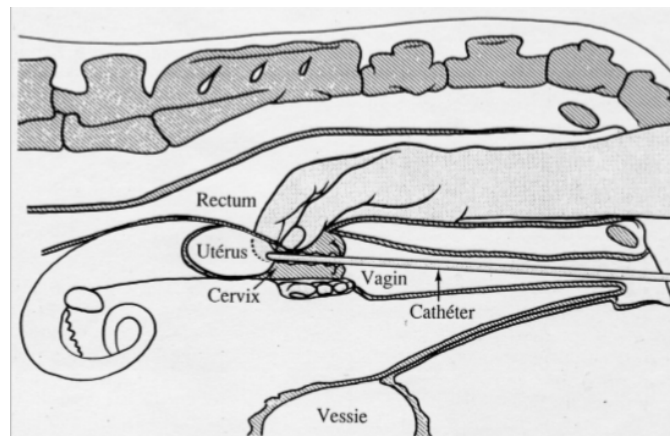
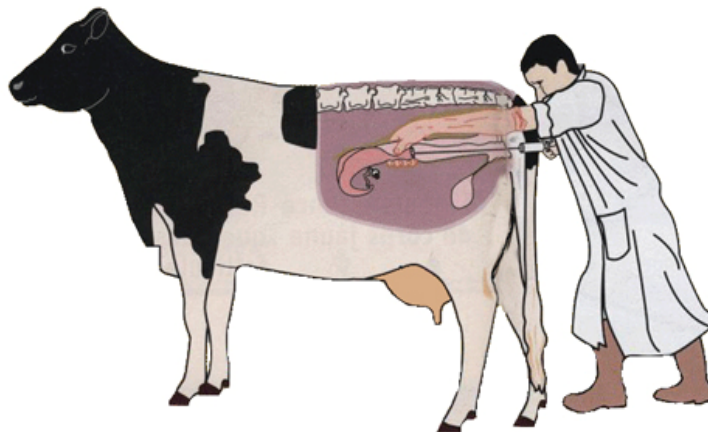
### 8. Repérer les signes de chaleurs significatifs :

Les chaleurs durent en moyenne de 6 à 18 heures, selon la capacité de l'animal à les exprimer : état de santé, milieu de vie, saison, alimentation, bâtiment.

Pour que l'insémination soit réussie, l'éleveur joue un rôle important au niveau de leur détection. Un temps d'observation est nécessaire, de 30 minutes 2 fois par jour, lorsque le troupeau est au calme.

Plusieurs signes peuvent être perçus qu'il faut savoir différencier, certains pouvant même apparaissent 6 à 10 heures avant le début des chaleurs. Les signes « non sexuels », marqués par une augmentation générale de l'activité, ne sont pas représentatifs. Parmi les signes «sexuels », seule l'acceptation du chevauchement est considérée comme caractéristique du début des chaleurs.

### 9. Le geste opératoire :



**Figure 14 :** La technique d'insémination artificielle chez les bovins

Inséminer consiste à féconder une vache ou une génisse en déposant la semence d'un taureau dans le corps de l'utérus, 1 à 2 cm après la sortie du col utérin.

*Deux méthodes d'insémination peuvent être utilisées chez les bovins.*

**La première ou voie vaginale :** repose sur l'emploi d'un spéculum et d'une source lumineuse permettant le dépôt du sperme dans la partie postérieure du canal cervical. Elle est pratiquement abandonnée voire réservée à des cas individuels.

**La seconde ou voie rectale :** pour y parvenir, l'inséminateur introduit un bras dans le rectum de la vache (qu'il vide des bouses existantes) et à travers la fine paroi, attrape et maintient le col de l'utérus. De sa main libre, il introduit le pistolet dans le vagin de la femelle incliné à 45 ° vers le plafond du vagin, passe le col utérin et presse le piston du pistolet pour libérer la semence juste à l'entrée du corps utérin.

Cette action épargne aux spermatozoïdes 10 heures d'efforts et garantit leur vivacité: ils n'ont pas à subir l'acidité du vagin ni le passage des plis du col utérin.

#### **10. Les clés de la réussite à l'insémination :**

Pour accroître ses chances de réussite en première IA (Insémination Animale), il est fortement recommandé:

- De noter toutes les chaleurs,
- D'inséminer sur une chaleur de référence,
- De ne pas inséminer pendant les 50 jours qui suivent le vêlage.
- D'inséminer entre 6 et 24 heures après le début des chaleurs,
- D'adopter un bon moyen de contention,
- D'avoir recours à un technicien expérimenté.

#### **11. Facteurs qui influencent sur le développement de l'insémination artificielle :**

Selon les études réalisées et les évaluations permanentes de l'insémination artificielle, plusieurs facteurs influencent l'extension de l'IA.

##### **1- Infrastructures des Voies de communication :**

L'insuffisance de moyennes de communication constituent un handicap moyen de l'IA (route, piste, impraticable, manque de liaisons téléphonique)

**2-Facteur lies a l'animal:**

- 1- Facteur anatomique (race, l'âge)
- 2- Facteur indocriniens
- 3- Pathologie de l'appareil génital (métrite, endométrite, pyromètre)
- 4- Stade physiologique (puberté, post partum)

**3- Facteur lies a la semence :**

- Qualité.
- Conservation.
- Concentration.
- Mobilité.
- Pourcentage des formes pathologique.

**4-Facteur lies a l'insémination :**

- Technique et on savoir faire.
- Mauvaise décongélation.
- Manque de matériels.
- Moments ( la détection des chaleur ) et site d'insémination.

**5- Facteur lies à l'éleveuret aux conditions d'élevage :**

- Niveau d'instruction de l'éleveur.
- Nutrition du troupeau.
- Conduit du troupeau.
- Effet du milieu : climat, saison, lumière, hygiene.
- Méthode de détection des chaleurs.

**12. Le matériel nécessaire à l'insémination bovine :**

La semence de taureaux de différentes races sexés et indexés





**Figure 15 :** Contenaire d'azote liquide montrant des paillettes d'IA.

Cette semence est conditionnée en paillettes de 0,25 ml, contenant chacune 20 millions de spermatozoïdes. Chaque paillette est identifiée par un code couleur qui révèle la race, et par un code barre qui assure la traçabilité (nom du taureau, centre de production, date de conditionnement). Les paillettes sont congelées afin d'assurer la bonne conservation des spermatozoïdes. Avant utilisation, elles sont réchauffées à 37°C pendant 20 à 30 secondes dans un décongélateur.

#### **La cuve d'azote:**

Elle sert à stocker les paillettes et à les conserver dans l'azote, gaz liquide qui maintient la semence congelée à -196°C. L'organisation des paillettes dans la cuve se fait selon un plan de cuve bien précis. Les paillettes sont regroupées dans des canisters, sorte de récipients en métal que l'on peut monter et descendre dans la cuve.



**Figure 16 :** Paillette d'IA

**Le pistolet d'insémination:**

La paillette se monte sur un pistolet d'insémination protégé d'une gaine sanitaire à usage unique. Longue tige de métal, le pistolet permet une pénétration en profondeur dans l'anatomie de la femelle. A son extrémité : un poussoir permet de libérer la semence décongelée.



**Figure 17** : Le pistolet d'insémination.

---

# Chapitre III

Biopsie et transfert embryonnaire

---

### 1. La biopsie embryonnaire:

Les embryons collectés sont rincés à dix reprises, selon les conditions sanitaires réglementaires, et jugés sur des critères morphologiques. Seuls ceux considérés comme d'excellente ou bonne qualité, et encore inclus dans la zone pellucide, sont réservés à la biopsie. Celle-ci consiste à prélever cinq à dix cellules environ sur un embryon qui en comporte 60 à 80, à l'aide de deux micromanipulations, sous observation microscopique. Dans un tube dûment identifié par le numéro de l'embryon; seront effectuées les principales étapes de la détermination du sexe.

La technique du sexage repose sur la détection d'une séquence spécifique de l'ADN du chromosome Y bovin (brevet INRA) après hybridation par une sonde spécifique et amplification de cette séquence à l'aide d'une méthode de laboratoire dite PCR (polymérase Chain réaction). L'ADN spécifique amplifié est ensuite séparé par électrophorèse sur gel d'agarose.

L'observation du gel en fluorescence permet de visualiser la bande spécifique de la présence du chromosome Y dans les cellules provenant d'un embryon mâle. L'absence de cette bande permet d'affirmer que les cellules proviennent d'un embryon femelle. Une séquence commune aux deux sexes permet de contrôler la présence de la biopsie dans le tube de sexage.

Les opérations de la biopsie et de sexage sont réalisables en ferme. L'organisation d'un tel chantier de sexage a été récemment simplifiée.

En effet, le temps nécessaire pour réaliser le sexage est dorénavant de l'ordre de 2 heures. Il faut ajouter le temps nécessaire pour réaliser la biopsie, qui doit être limitée à 1h30 maximum.

Il est également possible de congeler les embryons biopsiés et d'expédier des biopsies au laboratoire centralisé du sexage, situé à Maisons-Alfort. Cette méthode permet de dissocier ces deux opérations.

Les embryons sexes congelés et de sexe désiré sont ensuite remis en receveuse par transfert direct.

## 2. Transfert embryonnaire chez les bovins

### Introduction:

Le transfert embryonnaire ou transplantation embryonnaire, consiste à collecter sur un animal vivant, nommé ( donneur ), des embryons après que cet animal ait subi un traitement de super ovulation. Ces embryons sont ensuite transférés à des femelles nommées (receveuses) dont le cycle sexuel a été synchronisé avec l'animal (donneur). Ce transfert peut être effectué à l'état frais, c'est-à-dire directement, ou après congélation pour un transfert ultérieur (**MALAFOSSE A., 1997**).

Le premier transfert embryonnaire réussi avec succès sur des animaux date de plus d'un siècle. Il fut réalisé par Walter Herpe dans l'espèce lapine en 1890 à l'Université de Cambridge. En 1897, il publia un article indiquant que les embryons d'une race peuvent se développer dans le tractus génital d'une lapine de race différente, sans que ces derniers ne soient affectés par l'environnement utérin. Cette expérience marqua le début d'une nouvelle ère dans le monde de la reproduction animale (**HEYMAN Y., 2010**).

Ce n'est qu'en 1951 dans le Wisconsin qu'est né le premier veau issu d'un transfert embryonnaire. A cette époque, le transfert était réalisé de manière chirurgicale. Puis au milieu des années 1970, des méthodes de transfert embryonnaire non chirurgicales ont commencé à se développer. Ces méthodes ont permis de simplifier le transfert, menant à des activités commerciales et à une industrie de l'embryon, principalement dans l'espèce bovine (**HEYMAN Y., 2010**).

Des chercheurs français ont contribué à l'élaboration d'une méthode de transfert embryonnaire non chirurgicale. Ces recherches sur le transfert embryonnaire bovin ont été conduites à l'INRA par le Pr Charles THIBAUT au milieu des années 1970. Son équipe a ainsi proposé une méthode trans vaginale pour réaliser les transferts embryonnaires bovins (**HEYMAN Y., 2010**). En effet, initialement transférés par voie chirurgicale jusqu'en 1980, les embryons le sont maintenant par une méthode dite « cervicale », consistant à déposer l'embryon au-delà du col de l'utérus par voie vaginale, ce qui a été à l'origine du réel développement du transfert embryonnaire (**PONSART C. et al. 2006**).

Aujourd'hui, les transferts embryonnaires dans l'espèce bovine sont réalisés par des personnes professionnelles de manière presque (banale), en suivant un protocole précis auquel

chaque équipe peut apporter des modifications. Il y a donc une méthode universelle, mais chaque équipe réalisant un transfert embryonnaire peut y apporter une touche personnelle.

Le transfert embryonnaire est aussi utilisé aujourd'hui dans les schémas de sélection, ce qui donne la possibilité d'augmenter et d'accélérer la diffusion génétique des meilleures femelles, au même titre que l'insémination artificielle permet d'accélérer la diffusion génétique des meilleurs taureaux répondant à certains critères. Le transfert embryonnaire a été utilisé pour la première fois dans les schémas de sélection au début des années 1980. C'est à cette période qu'ont été développés de nouveaux protocoles pour la congélation des embryons produits *in vivo*, ainsi que la mise au point de méthodes de sexage des embryons. Ces protocoles ont grandement contribué à l'essor du transfert embryonnaire dans l'espèce bovine, et ont étoffé l'offre de service (PONSART C. et al., 2006).

L'objectif de ce travail est dans un premier temps de présenter les objectifs du transfert embryonnaire bovin ainsi que son utilisation. Dans un second temps, des rappels sur le développement embryonnaire précoce bovin et sur le cycle sexuel chez la vache seront présentés. Ensuite, les différents protocoles hormonaux nécessaires à la mise en place d'un transfert embryonnaire seront présentés.

### 3. Aspects généraux du transfert embryonnaire bovin

Au début des années 1980, alors que l'insémination artificielle (IA) terminait son intégration aux programmes de sélection, le transfert embryonnaire (TE) n'atteignait pas ce niveau d'utilisation malgré les progrès réalisés. C'est pourquoi les chercheurs proposaient déjà divers intérêts de TE au moins à moyen terme (MENISSIERF., 1983). En effet, cette technique peut:

- Contribuer à la diffusion du matériel génétique.
- Etre un outil des programmes collectifs de sélection.
- Permettre une utilisation optimale du matériel génétique femelle.

#### a. Transplantation embryonnaire et amélioration génétique du troupeau:

Au sein d'un troupeau, la sélection consiste à identifier et à trier les individus capables d'améliorer la valeur génétique de ce dernier. Il en est de même au sein d'une race. Dans un schéma classique de conduite de troupeau, la capacité de reproduction des femelles, qui est d'environ 4 à 5 veaux par vache durant leur carrière, limite le progrès génétique. Le TE

permet une utilisation plus intense des femelles avec un fort potentiel génétique par la multiplication de leur descendance, car la vache peut ainsi produire plus de 100 veaux durant sa carrière (**PINARD P., 1981**).

Ainsi, différentes filières ont été améliorées dans le temps grâce au TE :

- Sélection des femelles d'élite grâce aux performances de leur descendance.
- Sélection des femelles de remplacement du troupeau.
- Sélection des mères à taureaux.
- Augmentation du nombre de descendants (filles et fils) de mères à taureaux.

Le coût du TE est plus élevé que le coût de l'IA, c'est pourquoi ces opérations sont réservées essentiellement à des animaux de grande valeur génétique et notamment aux mères à taureaux et aux futures mères à taureaux. En effet, le TE permet d'obtenir avec une grande probabilité un mâle par opération de collecte et par transfert, d'avoir plus de descendants des meilleures femelles et de créer des noyaux de sélection de haut niveau génétique qui fourniront les futurs taureaux. De plus, pour certains éleveurs sélectionneurs, le TE permet de mieux valoriser le capital génétique de leurs animaux en vendant des embryons (**MALAFOSSE A., 1997**).

A l'échelle d'un continent tel que l'Europe, il a été reconnu, très tôt, que le TE était l'outil de choix dans la gestion de la génétique en permettant la naissance de mâles avec une forte valeur génétique. Ces mâles à fort potentiel génétique peuvent être utilisés comme pères à taureaux. Ainsi les meilleurs taureaux peuvent être utilisés sur les meilleures femelles en protocole de TE afin d'augmenter la progéniture des meilleurs croisements. Ceci est surtout vrai pour le troupeau laitier en Europe. Entre 1989 et 2005, le transfert d'embryons de très hautes valeurs génétiques est devenu le coeur de tous les programmes génétiques et ceci explique également pourquoi en Europe beaucoup d'équipes de TE sont en lien avec les centres d'IA ou avec les compagnies en charge de conduire le développement des programmes génétiques (**THIBIER M., 2014**).

#### **b. Diffusion génétique permise par le transfert embryonnaire:**

Le TE est un excellent moyen de multiplication et de diffusion rapides d'un matériel génétique rare (**MENISSIER F., 1983**). Ceci est encore plus vrai aujourd'hui avec la possibilité de congélation des embryons qui facilite grandement leur transport. En effet, il est

moins contraignant et plus rapide de transporter des embryons conditionnés dans des paillettes au sein de conteneurs d'azote liquide, plutôt que de transporter des animaux sur pieds. De plus, il est apparu que le TE est le moyen le plus sûr au plan sanitaire (**THIBIER M. et GUERIN B., 1993**).

C'est pourquoi il peut être utilisé aisément pour l'exportation et l'importation de matériel génétique à condition de respecter certaines règles. Ainsi, il est possible d'importer des embryons de pays éloignés en réduisant considérablement les coûts de transport que l'on aurait eu en important des reproducteurs sur pieds. Cela permet également de s'affranchir de contraintes sanitaires comme l'interdiction d'importer des reproducteurs de certains pays, par exemple des Etats-Unis vers l'Europe (**MALAFOSSE A., 1997**).

#### **c. Les défenses immunitaires du veau corrélées à son environnement**

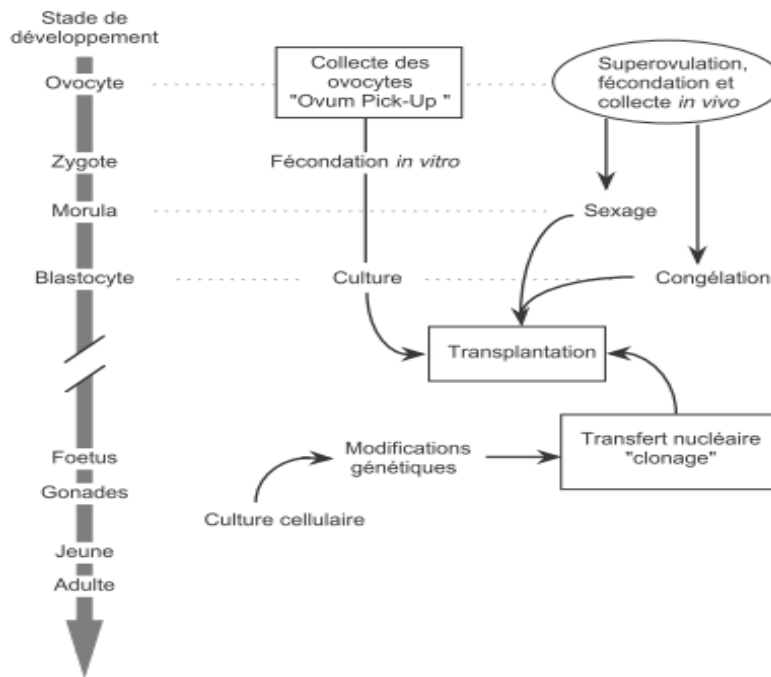
Le TE a aussi été utilisé pour la multiplication d'une race donnée à distance, dans un nouvel environnement. Cette utilisation a été aidée par des risques sanitaires minimes concernant le transport des embryons (**PASQUIER P., 1988**).

Lors de vente d'animaux vivants, leur arrivée dans un nouvel environnement aboutit, en général, à l'apparition de maladies car leurs défenses immunitaires ne sont pas en phase avec le microbisme local. C'est pourquoi des embryons implantés dans des femelles receveuses déjà présentes dans l'exploitation donneront des veaux mieux adaptés à cet environnement grâce à l'apport des anticorps maternels via la prise colostrale (**SERRE M., 1999**).

#### **d. Le transfert embryonnaire et autres biotechnologies de reproduction**

Les interventions sur les embryons bovins comme pour les autres mammifères se font durant la période précédant leur sortie de la zone pellucide, soit pendant 9 à 10 jours après la fécondation chez la vache. Ainsi, différentes biotechnologies de l'embryon bovin ont été développées (Figure 1). Ces techniques se sont développées autour de trois technologies principales qui sont : la transplantation embryonnaire, associant la production et la collecte d'embryons in vivo et intégrant maintenant le plus souvent les possibilités offertes par leur congélation ou leur sexage par micromanipulation ; le prélèvement in vivo d'ovocytes par ponction folliculaire (OPU) suivi de leur maturation, leur fécondation in vitro (FIV) puis la culture des embryons ; enfin le clonage qui ouvre la voie à la multiplication de génotypes identiques (**COLLEAU J. J. et al., 1998**).





INRA Productions Animales, janvier 1998

**Figure 18:** Les principales biotechnologies de l'embryon (d'après INRA 1998)

#### 4. Sélection des donneuses:

##### - Effets de l'âge:

##### (a) Primipare ou multipare

Des études ont été menées sur cet effet, dont une en particulier dans l'espèce caprine réalisée par une équipe sud-africaine. Cette équipe a cherché à savoir s'il y avait une influence de l'âge sur la réponse au protocole de superovulation, chez la chèvre de race Boer. Ils ont comparé deux groupes d'animaux, un groupe de chèvres jeunes primipares (1 à 2 ans) et un groupe de multipares (3 à 4 ans), subissant le même protocole de SO. Ils ont montré que le nombre moyen de corps jaunes, de structures et d'embryons récoltés étaient significativement supérieurs chez les multipares. Alors qu'il n'y avait pas de différence entre les deux groupes pour le taux de fertilisation, les nombres moyens d'ovocytes non fécondés et d'embryons dégénérés, il n'en était pas de même pour le nombre moyen d'embryons transférables qui était plus important chez les multipares (**LEHLOENYA K. C. et al., 2008**).

Peut-être pouvons-nous extrapoler cette conclusion à l'espèce bovine.

Sur le plan pratique, et d'après une discussion avec des vétérinaires de la société Embryovet, les vaches ont fait leurs preuves en matière de production et de morphologie,

comparées aux génisses. En effet, les sélections s'effectuent en testant les descendance des animaux. Donc au sein d'un troupeau, il est préférable de collecter la femelle qui a déjà prouvé sa valeur génétique grâce à sa descendance (**COLLEAU J. J., 1985**).

Mais il est à noter qu'une génisse peut être collectée dès qu'elle est bien cyclée, en général entre 10 et 14 mois. C'est sans danger pour sa vie future, c'est-à-dire pour sa croissance, sa mamelle et sa reproduction ultérieure à condition que les règles de base de l'alimentation soient respectées.

Des recherches ont également été menées sur l'effet que pouvait avoir l'administration d'une dose totale de 22 UI de FSH sur des génisses pré-pubères de 7 mois. Pendant 14 jours, tous les follicules visibles à l'échographie transrectale ont été aspirés par OvumPick Up (OPU), puis pendant 3 jours des injections toutes les 12h de FSH à doses décroissantes ont été réalisées. Avant les injections de FSH, la population de follicules consistait en une majorité de petits follicules (inférieurs à 4 mm), une minorité de follicules moyens (4-10 mm) et juste quelques follicules de grande taille (supérieurs à 10 mm). Huit jours après les injections de FSH, une augmentation de 43% du nombre total de follicules était observée avec une population majoritairement représentée par des follicules de taille moyenne, une minorité de petits follicules et plusieurs grands follicules. Pour ce qui est des effets hormonaux, sur les 14 génisses, 3 ont montré une augmentation du taux de progestérone quelques jours après la FSH, mais aucune n'a montré de signes de production d'œstrogènes.

Il a donc été conclu que l'administration de FSH sur des génisses pré-pubères augmentait le nombre et le diamètre des follicules, influençait la production de progestérone mais pas celle d'œstrogènes (**DE ROOVER R. et al., 2001**).

C'est pourquoi la question d'un intérêt de réaliser des injections de FSH préalables à un protocole de SO chez des génisses se pose. En effet, elles paraissent contre-indiquées chez une femelle n'ayant pas encore eu de chaleurs de référence, sinon l'œstrus ne sera que faiblement exprimé et sera non-observé pas l'éleveur.

### **(b) Age de la multipare**

Une étude a été menée afin de voir si l'âge avancé de l'animal pouvait avoir un effet sur la capacité à produire des embryons. Ce travail a été conduit dans une ferme expérimentale au Brésil, sur 4 vaches de race Holstein et 4 vaches de race 5/8 Girolando, toutes avec un âge compris entre 10 et 14 ans. Au total, une Holstein et deux Girolando n'ont

pas répondu au traitement de SO. Les trois autres Holstein ont produit 5 embryons viables au total, 3 complexes cumulo-ovocytaires dégénérés et 22 ovocytes non-fécondés. Les deux autres Girolando ont produit 2 embryons viables au total, 3 complexes cumulo-ovocytaires dégénérés et 4 ovocytes non-fécondés. Il a alors été conclu que les vaches âgées de plus de 10 ans produisent un nombre d'embryons viables plus faible (**SANTOS FILHO A. S. et al. 2010**).

## 2) Répétabilité des collectes

On peut se demander à quelle fréquence une même femelle peut être collectée. Pour avoir un début de réponse, un groupe de 20 génisses de race Holstein-Friesian ont été intégrées dans un programme de collecte d'embryons. Douze d'entre elles ont été collectées une fois par mois sur 4 mois, avec à chaque fois un protocole de SO, et les résultats de chaque collecte ont été comparés. Il en ressortait que le nombre total d'embryons de grade I-II n'était pas significativement différent entre les collectes, que le nombre total d'embryons dégénérés et d'ovocytes non fertilisés décroissait de manière significative après la deuxième collecte, et que le nombre de corps jaunes décroissait lui aussi au fur et à mesure des collectes. On peut en conclure que quatre collectes consécutives en quatre mois est réalisable (**LINDEBERG H. et al. 2005**).

## 3) Existe-t-il un effet famille ?

Il est connu que le nombre d'embryons obtenu après une SO peut montrer une large variation selon les femelles donneuses. Cela peut en partie être expliqué par une différence dans l'organisation et dans le protocole de récolte des embryons, mais les résultats peuvent aussi être influencés par les caractéristiques spécifiques de l'animal. C'est pourquoi une étude a cherché à savoir s'il pouvait y avoir un effet famille sur la production d'embryons lors de super ovulations. Une étude rétrospective a alors été menée entre 1994 et 2011 sur les collectes réalisées par le groupe CRV (Pays-Bas). Pour investiguer l'effet famille, ils ont étudié quatre taureaux dont au moins 3 filles avaient subi 10 collectes d'embryons au minimum.

Les différences entre ces 4 taureaux étaient énormes. En effet, pour le taureau le moins prolifique, ses filles donnaient en moyenne 1,9 embryon par collecte, alors que pour le plus prolifique, ses filles en donnaient 14,1 par collecte. Il a donc été prouvé qu'il existe un effet famille important sur la production d'embryons lors de protocoles de SO (**NOORDMAN J. W. J. et al. 2011**).

Ces résultats peuvent avoir une application pratique pour la logistique des programmes d'élevage. En effet, il n'y aurait pas de corrélation entre le nombre d'embryons obtenus in vivo par collecte et celui obtenu par production d'embryons in vitro (résultats non montrés). Ceci pourrait être expliqué par le fait que, lors d'une fécondation in vitro, on s'affranchit de la probabilité qu'aucun spermatozoïde n'atteigne l'ovocyte. C'est pourquoi il pourrait être préférable d'intégrer les filles provenant de familles faibles productrices directement dans un programme de production d'embryons in vitro et non dans un programme de TE, afin d'obtenir plus d'embryons (NOORDMAN J. W. J. et al., 2011).

#### 4) Cas des femelles ayant présenté des doubles ovulations

Concernant la SO des donneuses, une question se pose : les femelles ayant une prédisposition aux doubles ovulations sont-elles de meilleures candidates à la SO ? En effet, les doubles ovulations sont un phénomène croissant dans les troupeaux laitiers et sont probablement associées à une haute production laitière, même si cette hypothèse reste controversée selon les auteurs. Un groupe d'étude a alors comparé des résultats entre des vaches de race Holstein avec deux corps jaunes et des animaux de même race ayant un seul corps jaune. Les animaux avec deux corps jaunes au début de la super stimulation étaient majoritairement des animaux en quatrième ou cinquième lactation (52%) et ont été collectés plus tard dans leur lactation ( $284 \pm 152$  jours après vêlage) par rapport aux animaux avec un seul corps jaune ( $250 \pm 150$  jours après vêlage). En termes de nombre de structures collectées, d'embryons viables et de taux de gestation, les animaux à corps jaune unique ont eu les meilleures réponses à la SO. Ces résultats indiquent que les donneuses avec deux corps jaunes sont moins adaptées à la SO et ne devraient pas être choisies (DETTNERER J. et al., 2009).

#### 5. Sélection des receveuses :

Un moyen de choisir les meilleures receveuses est l'examen clinique de l'animal avec une palpation transrectale de l'appareil génital et surtout des ovaires. De nos jours, à l'aide d'un échographe et de manière très rapide, il est possible de visualiser les ovaires et de se faciliter la tâche de sélection des receveuses. Des chercheurs polonais ont réalisé une étude en deux étapes ; première étape, ils ont classé les receveuses en différents groupes selon les structures présentes sur les ovaires palpés manuellement.

Ils les classaient en bonnes receveuses, receveuses douteuses, receveuses insuffisantes, mauvaises receveuses et des non classées. La seconde étape consistait à échographier toutes les receveuses et de les reclasser de la même façon selon la taille du corps jaune lorsqu'il était

présent. Après échographie, 26,6% des receveuses douteuses à la main étaient reclassées en bonnes receveuses après échographie, ce qui veut dire que sans échographe ils auraient pu passer à côté de ces bonnes receveuses. Donc pratiquer un simple examen clinique est une méthode plus restrictive pour choisir les bonnes receveuses que l'examen à l'aide d'un échographe qui permet de visualiser les structures ovariennes (**JASKOWSKI JM et al. 2014**).

## **6. Une conduite d'élevage particulière:**

### **Contrôle de l'aptitude des femelles à réaliser un transfert embryonnaire:**

#### **(a) Chez les femelles donneuses:**

Sur les 30 dernières années, l'augmentation de la production laitière individuelle a été accompagnée d'une baisse de la fertilité des femelles hautes productrices. Le statut nutritionnel est indubitablement un des éléments majeurs influençant la fertilité, surtout le statut de la balance énergétique sur la période de péripartum. Quand l'apport énergétique dans la ration est insuffisant, les animaux mobilisent l'énergie dans leurs tissus pour la production laitière. Des vaches laitières hautes productrices peuvent avoir une balance énergétique négative pendant 20 semaines post-partum.

Ceci est associé à un intervalle vèlage-première ovulation allongé, une grande proportion de cycles anormaux et une diminution de la réussite à l'insémination. La balance énergétique négative se traduit par des augmentations des concentrations sanguines en acides gras non estérifiés (AGNE) et en  $\beta$ -hydroxy butyrate (BHB).

Ces taux représentent la mobilisation des tissus et sont directement ou indirectement associées à la fertilité. En plus de l'augmentation de ces taux, le déficit énergétique se traduit aussi par une glycémie et une insulïnémie diminuées. Or le glucose et l'insuline influencent directement la fonction de reproduction avec des actions sur le cerveau, les ovaires et le tractus génital (**WATHES D. C. et al. 2004**).

C'est pourquoi avant de mettre en place un protocole de SO sur une femelle, il peut être utile d'en évaluer le statut énergétique afin d'estimer sa réponse.

#### **(i) Contrôle du statut énergétique**

**La note d'état corporel:**

Beaucoup d'éleveurs souhaitant pratiquer un transfert embryonnaire dans leur élevage ne savent pas toujours comment choisir les meilleures donneuses. Ils peuvent donc demander aux équipes comment choisir un animal donneur d'embryons. Comme élément de réponse, il est possible de leur dire de contrôler la note d'état corporel (NEC) au vêlage et trois semaines plus tard.

En effet, la NEC est importante à évaluer autour du vêlage car elle permet de prédire, en partie, une reprise de cyclicité retardée ou non. Une NEC trop élevée ou trop basse avant le vêlage peut être délétère, la NEC idéale au vêlage étant de 3,5 (WATHES D. C. et al. 2004).

De plus, il faut aussi estimer la NEC après le vêlage afin de voir s'il y a une perte d'état et la quantifier. En effet, il a été démontré que les vaches avec la plus grosse perte d'état entre le vêlage et dix semaines post-partum ont le plus grand nombre d'embryons dégénérés et les taux d'embryons viables les plus bas. Ainsi, il est conseillé de réaliser un contrôle de la NEC trois semaines après le vêlage sur les animaux à forte production laitière. Ce contrôle permettra d'estimer l'efficacité d'un traitement de SO sur ces animaux. La perte de points de NEC ne doit pas dépasser 1,5 (CARVALHO P. D. et al., 2012).

**Acides gras non estérifiés et  $\beta$ -hydroxy butyrate:**

La lactation peut avoir un effet sur la production d'embryons et plus précisément sur le développement embryonnaire précoce. Une étude a comparé deux groupes de vaches de race Holstein : un groupe composé de bêtes tarées immédiatement après le vêlage, et un groupe de bêtes productrices de lait après le vêlage. A 60 jours post-partum, les femelles ont été synchronisées dans les deux groupes, et deux jours plus tard, des embryons au stade 2-4 cellules leurs ont été transférés dans la corne utérine ipsilatérale au corps jaune. Cinq jours après, les embryons ont été récupérés par lavage des cornes utérines, et les embryons au stade blastocyste ont été enregistrés. Afin de caractériser le statut métabolique de chaque femelle, des prises de sang étaient réalisées deux fois par semaine, de 15 jours avant le vêlage à 100 jours postpartum, pour mesurer les AGNE et le taux de BHB. Les concentrations en AGNE et BHB étaient plus élevées dans le groupe des femelles en lactation par rapport au groupe des femelles tarées. Concernant les embryons, les nombres collectés étaient semblables entre les deux groupes, mais les femelles tarées montraient des blastocystes plus développés.

En conclusion, la reproduction des femelles en production est compromise par rapport aux femelles tarées. En effet, les femelles en début de lactation présentent un déficit énergétique comparées aux femelles tarées (MAILLO V. et al. 2011).

Pour s'affranchir du risque d'une faible réponse d'une femelle en lactation à une SO, il peut être utile de contrôler le taux d'AGNE sanguin dans les 3 à 10 semaines post-partum. En effet, ils sont négativement corrélés avec le taux d'embryons viables et positivement avec le taux d'embryons dégénérés. Ainsi, on peut conseiller un contrôle du taux d'AGNE aux environs des trois semaines post-partum, en tolérant un seuil maximum de 0,5 mmol/L. Ce contrôle peut être un moyen de prédire l'efficacité d'un traitement de SO sur les animaux à forte production laitière (CARVALHO P. D. et al. 2012).

#### **Glycémie et insulinémie:**

Dans l'étude de MAILLO V. et al (2003) décrite dans le paragraphe précédent, la glycémie et l'insulinémie ont également été mesurées sur les femelles des deux groupes. Les concentrations sanguines en glucose et en insuline étaient plus faibles dans le groupe des vaches en lactation par rapport au groupe des vaches tarées. Donc les vaches tarées qui montrent des blastocystes plus développés ont des glycémies et insulinémies supérieures aux vaches en lactation (MAILLO V. et al. 2011).

#### **Taux de matière utile:**

Regarder les taux de matière utile dans le lait avant de débiter un protocole de SO sur une femelle en lactation peut donner des informations. En effet, il peut exister un lien notamment entre ces taux et la réponse de la femelle au protocole. Une étude a été réalisée sur des vaches de race Montbéliarde étant entre leur deuxième et leur septième lactation. Ces vaches étaient toutes à moins de 150 jours post-partum. Ces animaux ont été stimulés avec un protocole de SO avec une dose totale de 500 µg de FSH. Les embryons ont été collectés au septième jour après l'insémination artificielle, et ont été décomptés en nombre total et nombre viable. Il a été reporté que le taux protéique (TP) était en lien avec la supplémentation en énergie, alors que le taux butyreux (TB) était influencé par le type d'alimentation et décroissait avec une quantité importante de concentrés.

Il a été émis comme hypothèse que les donneuses avec un haut TP avant la collecte, et/ou avec des TP et TB proches, étaient plus susceptibles d'avoir été nourries avec une ration à haute valeur énergétique qui stimulerait alors la production d'embryons (Tableau 4). Ce lien

existant entre les statuts énergétiques et la production embryonnaire permettrait de prédire la réponse d'une donneuse à un traitement de SO en évaluant les taux de matière utile dans le lait qu'elle produit (MANCIAUX L. et al., 2003).

## **7. L'insémination de la femelle donneuse:**

### **a. Quand pratiquer l'insémination ?**

De manière général, l'insémination se fait de manière artificielle (IA) lorsque les chaleurs sont détectées ou lors du moment stipulé par le protocole de synchronisation. Selon le protocole de SO utilisé, l'IA peut ainsi se faire après observation des chaleurs ou à l'aveugle. En effet, quand la femelle est stimulée grâce au protocole Ovsynch (à base de GnRH), l'IA est réalisée en aveugle 16 à 20h après la seconde injection de GnRH. Si la femelle est stimulée grâce à l'utilisation du protocole Cosynch (à base de GnRH), l'IA est réalisée en aveugle au même moment que la seconde injection de GnRH.

Lorsqu'un dispositif libérant de la progestérone est utilisé, l'IA est réalisée sur observation des chaleurs. En effet, environ 48h après le retrait du dispositif libérant de la progestérone la femelle doit normalement exprimer ses chaleurs.

### **b. Cas de l'insémination artificielle avec une semence sexée:**

Il est connu qu'une insémination artificielle avec une semence sexée a un pourcentage de réussite plus faible qu'avec une semence non sexée. C'est pourquoi il vaut peut-être mieux adapter le protocole de SO à cette particularité pour augmenter les chances de réussite.

Une étude a montré qu'afin d'optimiser au mieux l'utilisation de semence sexée dans le cadre de l'IA à la suite d'un protocole de synchronisation (2 injections de PGF2 $\alpha$ ), il est préférable d'objectiver l'ovulation grâce à l'utilisation d'un échographe. En effet, sur deux groupes de vaches Holstein, le groupe contrôle a été inséminé, avec de la semence sexée, 48 heures, 60 heures et 72 heures après la première injection de PGF2 $\alpha$ . Pour le groupe expérimental, les animaux étaient examinés par échographie transrectale à partir de la dernière injection de FSH jusqu'à visualiser l'ovulation. Les femelles de ce groupe étaient inséminées au moment de la visualisation de l'ovulation et 12 heures plus tard. Sept jours plus tard, les embryons ont été collectés. Pour le groupe contrôle, 14% des embryons collectés étaient classés comme transférables, alors que pour le groupe expérimental 74% des embryons étaient transférables. Ces premières données montrent que la détection de l'ovulation pour l'insémination permet



d'obtenir un plus grand nombre d'embryons transférables dans les programmes de SO utilisant de la semence sexée congelée (**HOLASEK R. et al., 2009**).

Toutefois, il est reconnu que la détection des chaleurs est un préalable très important avant la réalisation d'une IA suite à l'utilisation d'un protocole de synchronisation utilisant 2 injections de PGF2 $\alpha$ . Cette donnée n'est pas spécifique à la semence sexée. Les taux de gestation très bas dans le groupe contrôle semblent confirmer cette donnée. Il aurait donc été intéressant dans cette étude de comparer les taux de gestation suite à une détection des chaleurs et suite à la détection de l'ovulation grâce à l'échographie afin de voir si la détection de l'ovulation apporte un bénéfice réel.

### **8. Collecte des embryons:**

Au cours des 30 dernières années, le taux de récupération des embryons au cours des collectes est d'environ 65-75%. Cela indique que les techniques de collecte seraient sub-optimales et que des embryons restent dans le tractus génital de la donneuse après la collecte (**WOLGAST T. et al., 2008**).

C'est pourquoi des recherches sont effectuées afin d'améliorer ces taux lors de la phase de collecte.

### **9. Récupération des embryons:**

#### **(a) Collecte des embryons par lavage des cornes utérines:**

Le jour de la collecte, les embryons sont récupérés grâce à un lavage de chaque corne utérine avec environ 500 ml de solution DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline). Pour cela, une sonde 3 voies est utilisée. Cette sonde permet à l'aide d'une seringue d'aspirer de la solution DPBS puis de l'injecter dans la tubulure qui va à l'utérus, grâce à un système manuel d'occlusion des tubulures (Figure 18).



**Figure 19** : Système d'aspiration et d'injection du liquide de collecte (photo de S. DUBOIS)

**(b) Utilisation de molécules utérotoniques associées à un second lavage utérin:**

Un groupe de recherche a testé l'effet de l'utilisation de molécules utérotoniques qui faciliterait la récupération des embryons par des contractions myométriales. Après la superstimulation, les 174 vaches étaient divisées en 5 groupes. Chaque groupe recevait ou non une injection de Dinoprost à dose lutéolytique (25 mg par voie intramusculaire) 12 à 16h avant la collecte, de même qu'une injection d'ocytocine (10 UI par voie intraveineuse) au début de la collecte.

Une première collecte était réalisée par un premier lavage des cornes utérines, puis un second lavage utérin était réalisé de la même manière 30 minutes plus tard sur les groupes A, B, C et D afin de collecter de possibles embryons restants. Les résultats objectivaient que le meilleur taux de récupération est obtenu avec l'utilisation du dinoprost seul après un ou deux lavages. Ainsi, il pourrait être recommandé de traiter les donneuses avec une dose lutéolytique de Dinoprost 12 à 16 heures avant la collecte des embryons afin d'obtenir le meilleur taux de récupération des embryons. Ensuite, l'idéal serait de faire un second lavage utérin pour améliorer au maximum le taux de récupération des embryons (**WOLGAST T. et al., 2008**).

**(c) Utilisation d'un second lavage utérin:**

Les vaches qui présentent une très bonne réponse au traitement de SO semblent avoir des taux de récupération d'embryons augmentés après un double lavage, ce qui n'est pas le cas après un simple lavage. En effet, la technique du double lavage utérin augmente le taux de récupération d'embryons de 20%, et semble avoir un avantage certain surtout chez les donneuses avec les plus grands nombres de corps jaunes (**BENDER R. W. et al., 2012**).

**10. Le transfert d'embryons frais:**

Lorsque les embryons sont mis en place sur les receveuses aptes le même jour que la collecte, on parle de transfert d'embryons à l'état frais.

Le transfert de l'embryon se fait à l'aide de ce que l'on appelle une sonde, comme pour une insémination artificielle. L'objectif est de traverser le col avec cet outil sur lequel se trouve la paillette, et d'implanter l'embryon dans la corne utérine ipsilatérale au corps jaune de la receveuse. La qualité des corps jaunes, et donc l'identification de la corne utérine qui recevra l'embryon doit être évaluée au préalable afin de connaître le nombre de receveuses aptes à être gestantes.

Concernant l'étape de la mise en place de l'embryon, plusieurs paramètres influencent sa durée, et donc potentiellement la réussite d'une future gestation. En effet, si la durée de la mise en place à travers le col est supérieure à 60 secondes, le taux de gestation est de 20,5%, alors qu'il est de 56,7% si cette durée est inférieure à 60 secondes (**JASKOWSKI J. M. and URBANIAK K., 2006**).

**11. La congélation des embryons:**

Pour pallier le manque de receveuses synchronisées avec la donneuse, il est possible de congeler des embryons au stade blastocyste en les stockant dans l'azote liquide à -196°C. Pour être congelés, les embryons doivent être déshydratés par immersion dans des milieux contenant des cryoprotecteurs qui remplacent les molécules d'eau dans les cellules embryonnaires.

Tout d'abord, pour être congelé, l'embryon est placé dans une paillette qui sera identifiée avant d'être plongée dans le conteneur d'azote liquide. Pour cela, l'IETS recommande un système standardisé afin de minimiser les confusions, mais il existe plusieurs façons d'identifier une paillette contenant un ou plusieurs embryons. Prenons l'exemple d'un mode d'identification, appelée unité de base, qui est composée de trois parties. Il inclut le

code de congélation de l'équipe de transfert ou du praticien suivi d'un code de deux lettres correspondant à la race de l'animal, lui-même suivi du numéro d'identification de la femelle donneuse. Voici un exemple concret : 515 HO 14468713, où 515 est le code du praticien, HO le code de la race Holstein, 14468713 le numéro d'identification de la femelle donneuse **(ROBERTSON I. and NELSON R. E., 2010)**.

**a. Les suites sur la femelle donneuse:**

Lors de la collecte ou dans les jours suivants, la femelle donneuse doit recevoir une injection de prostaglandines pour qu'elle puisse reprendre un cycle normal. Dès son retour en chaleur, elle peut être inséminée avec de bonnes chances d'obtenir une gestation.

Une étude finlandaise portant sur les collectes réalisées entre 1998 et 2003 dans ce pays, a cherché à voir quels étaient les effets d'une production d'embryons sur les femelles donneuses. Les résultats montrent que seulement 1,8% des donneuses sont par la suite réformées pour infertilité.

On peut alors en conclure que la superovulation et les protocoles de collecte des embryons ne semblent pas compromettre la fertilité des femelles donneuses en pratique, car presque tous les animaux sont de nouveaux gestants dans un intervalle de temps acceptable après la collecte. En moyenne, deux inséminations sont nécessaires, et l'intervalle de temps entre la collecte et l'insémination fécondante est de 66,5 jours **(TAPONEN J. and MIKKOLA M., 2010)**.

**b. Les suites sur les receveuses:**

Elles sont soumises à une attention particulière de la part de l'éleveur. En effet, ce dernier surveille spécifiquement un possible retour en chaleurs. Seules les receveuses qui extériorisent très nettement l'acceptation du chevauchement et le chevauchement des congénères avec écoulement de glaires sont considérées comme non gestantes et pourront être inséminées. Au contraire, si les chaleurs sont douteuses, il faut attendre le cycle suivant pour confirmer la gestation ou son absence.

Ce diagnostic de gestation peut être pratiqué par échographie environ 30 jours après la mise en place de l'embryon.

**12. Risques sanitaires:****a. Les agents pathogènes à risqué:****(a) Catégorie 1:**

Sont inscrits dans cette catégorie les maladies ou agents pathogènes pour lesquels les preuves réunies sont suffisantes pour affirmer que le risque de transmission est négligeable, à condition que les embryons soient manipulés correctement entre la collecte et la transplantation comme indiqué dans le manuel de l'IETS. Les maladies ou agents inscrits sont:

- Brucella abortus
- Encéphalopathie Spongiforme Bovine
- Fièvre aphteuse
- Fièvre catarrhale
- Leucose bovine enzootique
- Rhinotrachéite infectieuse bovine / vulvovaginite pustuleuse infectieuse : nécessite un traitement à la trypsine

**(b) Catégorie 2:**

Sont inscrites les maladies pour lesquelles des preuves substantielles ont été réunies, indiquant que le risque de transmission est négligeable, à condition que les embryons soient manipulés correctement entre la collecte et la transplantation comme indiqué dans le manuel de l'IETS, mais pour lesquelles les données existantes doivent être vérifiées par de nouvelles transplantations.

**(c) Catégorie 3:**

Sont inscrit dans cette catégorie les maladies ou agents pathogènes pour lesquels les résultats préliminaires indiquent que le risque de transmission est négligeable, à condition que les embryons soient manipulés correctement entre la collecte et la transplantation comme indiqué dans le manuel de l'IETS, mais pour lesquels ces constatations préliminaires doivent être corroborées par des données expérimentales complémentaires in vitro et in vivo. Les maladies ou agents inscrits sont :

- Haemophilus somnus
- Infection par le virus de la peste bovine
- Mycobacterium paratuberculosis
- Neosporacanthium
- Virus de l'immunodéficience bovine
- Virus de la diarrhée virale bovine

**(d) Catégorie 4**

Les maladies ou agents figurant dans cette catégorie sont :

- Anaplasmose bovine
- Chlamydia psittaci
- Entérovirus
- Escherichia coli O9 :K99
- Fièvre Q (Coxiella burnetii)
- Herpèsvirus-4 bovin
- Leptospira borgpetersenii serovar hardjobovis
- Mycobacterium bovis
- Stomatite vésiculeuse
- Tritrichomonas foetus
- Ureaplasma et Mycoplasma spp.
- Virus Akabane
- Virus para-influenza-3

**b. Risques liés à la semence:**

Beaucoup de pathogènes sont présents dans les testicules, le système lymphatique, le sang (pendant une virémie ou bactériémie) ou encore le système urinaire. Donc tous ces

pathogènes peuvent se retrouver facilement dans la semence via le liquide séminal, les spermatozoïdes ou le contact avec l'urine. Ces micro-organismes peuvent être présents dans la semence, et cette contamination peut jouer un rôle durant la fertilisation et peut aussi être transmise à l'embryon ou à la donneuse. Cela a été démontré avec le virus de la diarrhée virale bovine et *Mycoplasmaspp.* (LE TALLEC B. et al. 2001). Différentes études, testant la contamination des embryons produits in vivo, ont montré que le risque de transmission de micro-organismes pathogènes, quand la semence est contaminée, est très élevé. Pour éviter cela, des mesures préventives sont mises en place.

### **13. Mesures preventives:**

Elles servent à éviter la contamination de la semence et à contrôler les risques sanitaires liés à cette semence. La première, et la plus importante, est une règle épidémiologique spécifiquement appliquée aux centres d'IA : pour être sûre de collecter de la semence libre de tout pathogène, il est nécessaire de faire entrer et de ne garder dans le centre que des taureaux sains. Ainsi le centre d'IA est sain car tous les taureaux présents sont sains, et ils sont régulièrement contrôlés une fois dans le centre. Si la semence provient d'un taureau issu d'un centre non certifié indemne, alors la seule façon de minimiser les risques sanitaires est d'examiner chaque éjaculat en testant des paillettes avec des tests sensibles.

#### **a. La prophylaxie sanitaire du transfert embryonnaire:**

Après avoir vu quels étaient les agents pathogènes susceptibles d'intervenir au cours d'un transfert embryonnaire, voyons comment les risques sont gérés et pourquoi le TE est le moyen le plus sûr sanitaire de diffuser une génétique.

Comme pour l'insémination artificielle, le transfert embryonnaire est réalisé en Europe et en France dans un cadre réglementaire très strict (Journal Officiel des Communautés Européennes, JOCE L302 25 septembre 1989, L75 24 juin 1993, L53 24 février 1994) qui oblige avant toute intervention à évaluer très précisément le statut sanitaire des femelles donneuses, mais aussi celui des embryons transférés et des donneuses (**HUMBLLOT P., 1999**).

L'IETS a très précisément indiqué la façon dont les embryons devaient être manipulés pour réduire au maximum les risques. Cette procédure implique l'inspection clinique de la donneuse, le lavage des embryons, l'élimination de tout embryon dont la zone pellucide est non intacte ou associée à des débris cellulaires, un traitement trypsique dans certains cas et

une sélection très attentive des produits biologiques utilisés pour la préparation des milieux de culture (THIBIER M. and GUERIN B., 1997).

**b. Les conditions concernant le laboratoire de manipulation:**

Tout laboratoire de manipulation peut être fixe ou mobile, c'est une installation dans laquelle les embryons sont extraits de leur milieu de collecte, puis examinés et soumis à tous les traitements requis et examinés avant transfert ou congélation.

Le laboratoire doit être séparé physiquement des animaux, et le secteur propre dédié aux manipulations doit être nettement séparé du secteur souillé. Ainsi le laboratoire doit répondre à quelques règles sanitaires :

- Il doit être placé sous la supervision directe du vétérinaire de l'équipe et contrôlé régulièrement par un vétérinaire officiel.
- Lorsque des embryons destinés à l'exportation sont manipulés, aucune opération ne doit être effectuée sur des embryons de qualité sanitaire inférieure.
- Il doit être protégé contre les rongeurs et les insectes.
- Il est construit avec des matériaux permettant un nettoyage et une désinfection efficaces, ces opérations doivent toujours être réalisées avant et après chaque manipulation d'embryons.



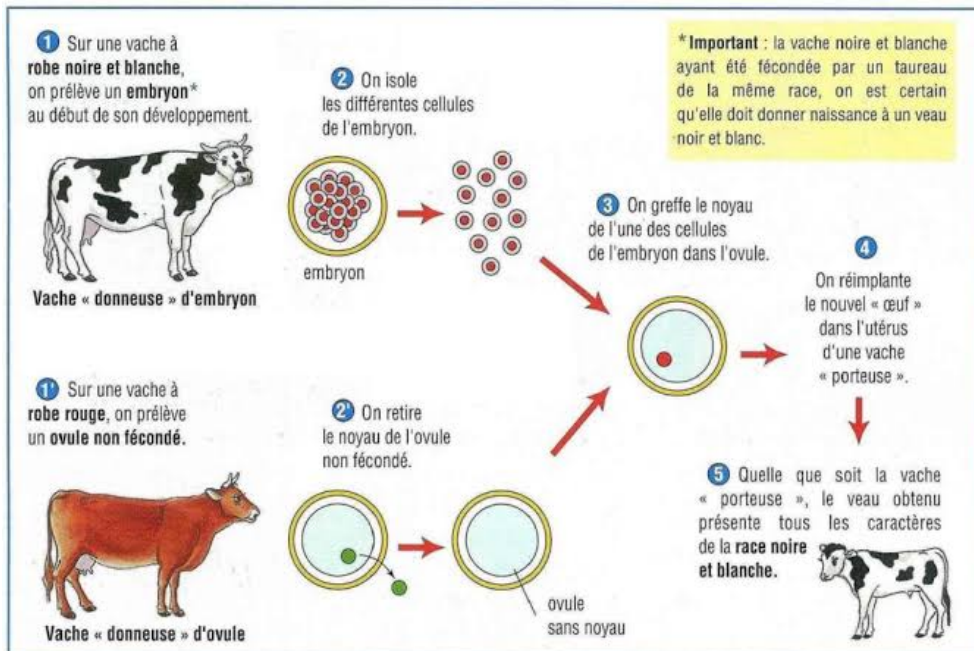
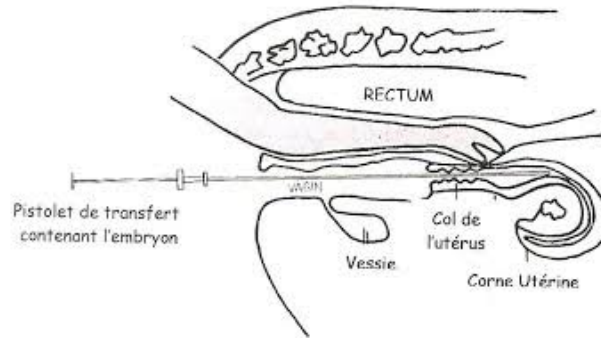
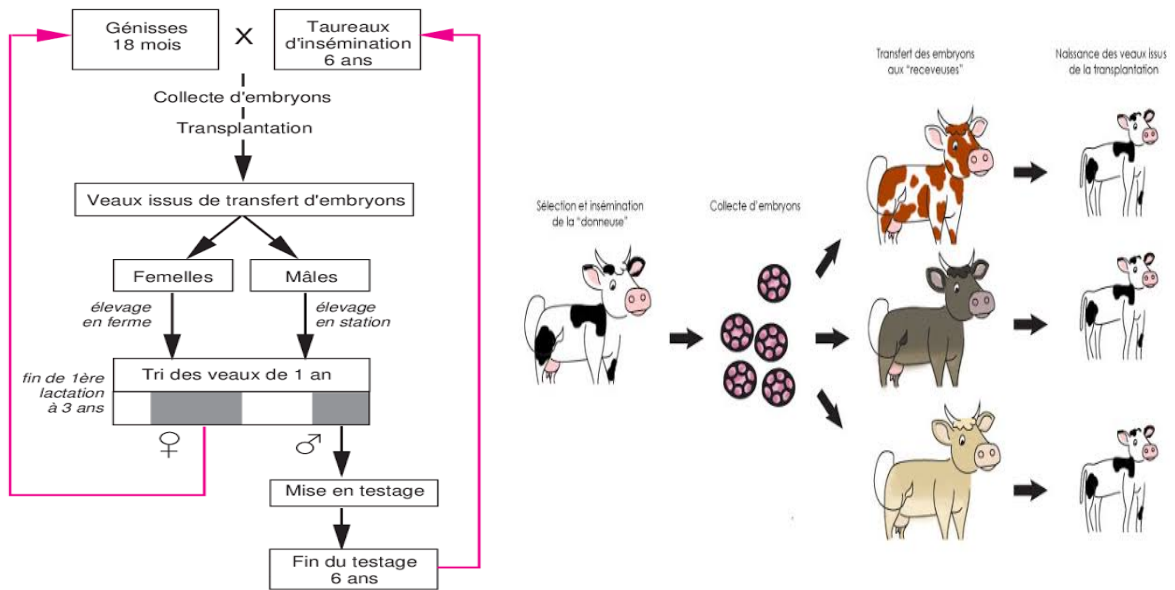


Figure 20: Les techniques de transfert embryonnaire.

---

# Chapitre IV

Fécondation in vitro

---

La production d'embryons par fécondation in vitro est une technique qui consiste à féconder des ovocytes par des spermatozoïdes en dehors du tractus génital. Elle n'a été maîtrisée qu'à partir du début des années 90. Elle a connu, depuis cette date, une évolution très rapide en raison des avantages qu'elle présente pour la gestion du progrès génétique, facteur économique majeur de productivité dans tous les grands pays d'élevage à travers le monde .

### 1. Historique:

Depuis quelques décennies, les techniques de reproduction assistée ont grandement évolué chez les bovins. Il y eut d'abord, au milieu de 20e siècle, l'insémination artificielle. Ensuite, au début des années soixante-dix, la technique d'ovulations multiples et du transfert embryonnaire (OMTE) est apparue. Cette technique permet la production d'embryons de vaches de génétique supérieure à la moyenne de la race ou du troupeau. Elle consiste à l'induction de l'ovulation multiple chez la vache donneuse, à l'aide d'injections hormonales, suivies de l'IA. Les embryons produits in vivo (dans l'animal), âgés d'environ sept jours, sont récoltés, congelés et/ou transférés chez des femelles receveuses.

La production d'embryons par FIV implique que la maturation et la fécondation des ovocytes (ovules immatures) ainsi que les premières étapes du développement embryonnaire ont lieu « in vitro », c'est-à-dire en laboratoire, entièrement dans des milieux de culture appropriés. La production d'embryons avec une fécondation in vitro (FIV) a été utilisée pour donner naissance au premier veau issu d'un embryon in vitro en 1981 (**Brackett et al., 1982**).

Cette technologie a grandement évolué durant les deux dernières décennies. Depuis 1991, le service commercial de production d'embryons par fécondation *in vitro* (FIV) d'ovocytes prélevés de vaches sélectionnées est offert aux éleveurs du Québec. Il est utilisé dans la majorité des cas pour permettre la reproduction des vaches sous fertiles et ainsi prolonger la vie reproductrice de ses vaches. La popularité de la FIV à l'échelle mondiale a augmenté au cours des dernières années principalement dans les pays qui utilisent la production d'embryons à partir des vaches réformées. Tel n'est pas le cas en Amérique du Nord où l'intérêt de la FIV est uniquement pour la production d'embryons de vaches élites. Au Canada ,le nombre d'embryons FIV transférés a augmenté de 80 % entre l'année 2000 et 2001 pour atteindre près de 1 300 embryons (**Statistiques de la CETA,2002**).

## **2. Les étapes de la FIV :**

La production d'embryons *in vitro* est un long processus qui se divise en trois principales étapes : maturation *in vitro* (MIV), fécondation *in vitro* (FIV), culture *in vitro* (CIV) jusqu'au stade d'embryon en laboratoire. Chaque étape se déroule dans un milieu de culture spécifique à l'intérieur d'un incubateur à 38,5 °C pour se rapprocher le plus possible de la température corporelle de la vache.

## **3. Les milieux utilisés pour la production d'embryons fécondés *in vitro* :**

### **(a) Milieu de maturation *in vitro* :**

Le milieu de maturation est composé d'un milieu salin (M199) additionné de sérum de fœtus de bovin ou d'un substitut synthétique de ce sérum, de molécules biologiquement actives identiques à celles utilisées pour la stimulation des femelles donneuses d'embryons produits *in vivo*, d'antibiotiques et d'un facteur de croissance épidermique l'EGF (embryonic growth factor). Ce facteur de croissance ainsi que son récepteur sont largement présents chez l'animal vivant en particulier au niveau de l'ovaire et du follicule ovarien.

### **(b) Milieu de fécondation *in vitro* :**

Le milieu de fécondation est constitué d'un milieu salin simple (milieu de Tyrode) additionné d'albumine ou d'un substitut de l'albumine et d'antibiotiques.

### **(c) Milieu de culture *in vitro* :**

Le milieu de culture des embryons est composé d'un milieu salin simple (SOF dont la composition ionique est calquée sur celle de l'oviducte qui permet de cultiver les embryons en l'absence de support cellulaire) additionné de sérum ou d'un substitut et d'antibiotiques

Pour commencer, la vache donneuse sélectionnée pour la fécondation *in vitro* doit recevoir une stimulation ovarienne à l'aide d'injections d'hormones avant la récolte et la culture de leurs ovocytes. Ensuite, les ovocytes sont aspirés, par ponction trans-vaginale (PTV), à l'aide d'une sonde guidée à l'ultrason directement dans les ovaires de la vache vivante. Plus précisément, l'aiguille au bout de la sonde est placée à l'intérieur d'un follicule et les ovocytes sont aspirés un par un.

Certains des ovocytes récoltés chez la donneuse seront choisis pour passer à une maturation durant 24 heures dans un milieu de culture. Suite à la maturation, les ovules maturés sont transférés dans un milieu de fécondation. Au même moment, plusieurs

manipulations sont effectuées sur le sperme afin de lui donner un pouvoir fécondant, en d'autres mots, de permettre la capacitation des spermatozoïdes. Les ovules et les spermatozoïdes sont laissés ensemble environ 18 heures en milieu de fécondation. Ensuite, les ovules fécondés sont mis dans des milieux de développement pour les derniers jours de culture en laboratoire.

Finalement, seuls les embryons viables sont sélectionnés pour le transfert dans l'utérus de receveuses, préférablement des taures chez lesquelles le taux de conception est meilleur. Parallèlement au processus de culture *in vitro*, ces dernières sont synchronisées à l'aide d'injections hormonales afin de préparer leur utérus à fournir un environnement propice à recevoir un embryon produit par FIV et âgé de sept jours. Le transfert des embryons consiste à introduire l'embryon dans la cavité utérine de la receveuse. Ensuite, l'embryon doit s'implanter ou « coller » afin de produire une gestation.

#### 4. Le prélèvement des ovocytes in vitro :

- Lavage préalable des ovaires prélevés dans du liquide physiologique à 39°C
- Aspiration dans un tube de 50 ml au moyen d'une pompe à eau et d'une aiguille (19G à biseau court) ou d'une seringue
- Ponction de tous les follicules visibles de diamètre < 10 mm et d'aspect transparent
- Décantation pendant 10 minutes
- Récupération des ovocytes
- Lavage dans milieu 199



**Figure 21** : Prélèvement des ovocytes

### 5. Les avantages de la FIV :

La fécondation *in vitro* présente plusieurs avantages importants par rapport au TE, tels que la production d'un plus grand nombre d'embryons pour une même période de temps, l'obtention d'embryons de vaches mortes ou de vaches avec des problèmes reproducteurs ainsi que la possibilité de produire des embryons d'une vache au cours du premier tiers de la gestation.

La production d'embryons *in vitro* permet, notamment, l'obtention d'embryons de vaches qui ne répondent pas positivement aux procédures de sur-ovulation et de production d'embryons par méthode conventionnelle. Comme autre avantage non négligeable, la production d'embryons chez des génisses pré-pubères est envisageable grâce à la FIV (**Armstrong *et al.*, 1992**).

De plus, la FIV permet de diminuer les risques de transmission de maladies (virus), un avantage sanitaire que l'on retrouve aussi dans le TE conventionnel. Par-dessus tout, ces deux technologies donnent l'occasion d'exploiter des développements technologiques tels le sexage des embryons avant leur transfert, ce qui permet de mieux choisir en fonction d'un marché ciblé (génisse ou taureau). Concrètement à la ferme, l'utilisation de la FIV ou du TE, au lieu de l'IA, pour obtenir des gestations, permet de réduire l'intervalle entre les générations et d'augmenter le nombre de veaux femelles provenant de vaches sélectionnées et ainsi d'accélérer l'amélioration génétique.

### 6. Les inconvénients de la FIV :

Malheureusement, depuis quelques années, plusieurs études relèvent des problèmes à la production de veaux provenant d'embryons FIV. Cette pratique possède des limitations qui sont: la fragilité des embryons à la congélation, la production d'un pourcentage de « gros » veaux à la naissance et une proportion plus élevée de perte de veaux durant la gestation et à la naissance comparativement à l'insémination artificielle. Certains auteurs rattachent ces problèmes à l'environnement du milieu de culture *in vitro* (**van Wagtendonk-de Leeuwet *al.*, 2000**).

Il va de soit que ces difficultés entraînent une diminution de l'efficacité de la production d'embryons par FIV. Les coûts, directs et indirects, liés à la production d'un veau par FIV sont souvent aussi mentionnés comme étant un des principaux désavantages de cette technologie.

---

# **Chapitre X**

Intra-cytoplasmic injection of  
spermatozoa

---

## 1. ICSI :

Le traitement des stérilités masculines a connu un réel essor avec le développement de l'injection intra cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), si l'efficacité de l'ICSI est indéniable, son innocuité est néanmoins mise en cause en raison de son caractère invasif et de l'apparente augmentation des anomalies chromosomiques, surtout sexuelles, observée chez les enfants conçus par cette technique. A l'heure actuelle, le risque d'anomalies zygotiques pouvant résulter de lésions subies par les gamètes micromanipulés est difficilement estimable. L'évaluation du risque de transmission d'une anomalie génétique, au minimum responsable de l'infertilité masculine, ne peut être qu'indirecte pour le moment.

Elle requiert une connaissance approfondie des mécanismes moléculaires et cellulaires de la spermatogenèse, et l'établissement d'une génétique de l'infertilité. Enfin, le bilan de sept années de pratique de l'ICSI met davantage en évidence l'insuffisance de données permettant de conclure, que d'authentiques raisons de craindre l'ICSI.

L'injection intra cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) a indéniablement constitué l'événement marquant de l'année 1992 dans le traitement des infertilités masculines sévères, comme le fut il y a plus de vingt ans la fécondation in vitro (FIV) pour les stérilités d'origine féminines (**Cohen J, 1992, et Palermo G, 1992**).

Rappelons que l'ICSI consiste également en une fécondation in vitro d'un ovocyte mature, mais qu'à la différence de la FIV classique, ce procédé nécessite qu'un spermatozoïde soit directement injecté dans le cytoplasme de l'ovocyte.

Cette prouesse technique est l'aboutissement d'un pari audacieux, tant sur le plan scientifique, puisque le processus complexe de maturation et de sélection des gamètes mâles dans les voies génitales femelles est totalement court-circuité, que sur le plan médical en raison de ses indications plurielles. Cependant, les circonstances de son application clinique se révèlent tout autant, voire davantage marquantes, puisque cette technique s'est dispensée de tout essai clinique avant son application chez l'homme.

Bien que les micromanipulations de gamètes aient été auparavant mises au point chez l'animal, leur succès n'autorisait pas l'extrapolation à l'homme, dont la biologie de la reproduction diffère de celle des modèles non primates utilisés jusqu'alors (**Iritani A et al, 1991**).



Les arguments mis en avant d'efficacité, de bénéfice pour les stérilités masculines et d'absence de modèles animaux, ajoutés à l'absence d'un encadrement légal de la pratique de l'assistance médicale à la Procréation (AMP), sont vraisemblablement à l'origine de l'application rapide de l'ICSI chez l'homme.

Dans la plupart de ses indications masculines, l'ICSI permet de pallier une anomalie plus ou moins profonde de la spermatogenèse, rendant ainsi possible la fécondation d'un ovocyte avec un sperme qui n'aurait pas permis de procéder à une FIV «classique».

Les étiologies de l'infertilité masculine sont difficiles à distinguer en raison de son caractère multifactoriel, les facteurs environnementaux et génétiques étant souvent intriqués. Les controverses et la crainte que suscite la pratique de l'ICSI sont liées en grande partie à l'éventualité de transmettre une anomalie génétique responsable de l'infertilité du père (**Siffroi JP, 2000 ; Schelegel PN 1999**).

Le caractère invasif de la technique implique un risque supplémentaire, lié aux perturbations biochimiques et cellulaires qu'elle peut causer au futur embryon, si le succès de l'ICSI dans le traitement de l'infertilité masculine est indéniable, l'incidence des anomalies chromosomiques, touchant en particulier les gonosomes, serait néanmoins plus élevée chez les enfants conçus par cette technique.

De la FIV à l'ICSI Lors d'une FIV, seule subsiste la barrière ovocytaire, qui comprend les cellules folliculaires péri-ovocytaires, la zone pellucide et la membrane cytoplasmique, dernier obstacle à la pénétration d'un gamète mâle dans le cytoplasme ovocytaire. L'ICSI permet d'enclencher le processus de fécondation malgré l'incapacité des gamètes mâles à franchir ces barrières (**Palermo Get al, 1992**).

En effet, cette technique consiste à injecter directement dans le cytoplasme ovocytaire un spermatozoïde, celui-ci étant d'autant plus difficile à choisir que les qualités du sperme sont altérées.

Les indications primaires de l'ICSI sont constituées d'une part par les oligozoospermies ou azoospermies excrétoires, qui sont d'origine congénitale (agénésie bilatérale des canaux déférents par exemple), traumatique ou infectieuse, et par les anomalies sécrétoires d'autre part, dues à des arrêts de maturation. Ses indications (secondaires) sont représentées par les échecs de fécondation en FIV classique.

D'après l'association nationale qui recense les résultats d'assistance médicale à la procréation fournis par les centres français (FIVNAT) pour l'année 1997, pour les 89 centres participants, 14175 micro-injections ont abouti à la naissance d'au moins un enfant normal vivant dans environ 20 % des cas de ponction ovocytaire.

L'efficacité supérieure de l'ICSI par rapport à la FIV classique, en termes de taux de fécondation et de grossesses abouties, est confirmée, mais elle est à nuancer, dépend en partie du taux d'avortements spontanés, or celui-ci est 1,25 fois plus élevé dans les cas de FIV.

Cette différence s'explique vrai semblablement par l'âge moins élevé des femmes candidates à l'ICSI. Le bilan FIVNAT pour l'année 1998 montre une tendance à la stabilisation du nombre d'ICSI.

Lorsque le recueil des spermatozoïdes ne peut se faire dans l'éjaculat, il est réalisé chirurgicalement au niveau épидидymaire ou testiculaire.

Les problèmes d'interruption de maturation entraînant l'absence de cellules matures dans les tubes séminifères, et a fortiori dans le sperme frais, ont conduit certaines équipes à utiliser les cellules précurseurs des spermatozoïdes. Cependant, la micro-injection de spermatides allongées (**Fishel S et al , 1995**), puis celle de spermatides rondes testiculaires (Edwards RG et al , 1994), se sont soldées par un échec relatif. Seulement douze enfants sont nés, trois de l'injection de spermatides rondes prélevées dans l'éjaculat et 9 de l'injection d'une spermatide allongée testiculaire (**Fishel S, 1995 ; Tesarik J, 1995**) et deux cas de malformations majeures ont été relevés (**Zech H et al ,2000**).

La maturation in vitro des cellules germinales immatures, existant avant même le stade de spermatide , permettrait de maîtriser un plus grand nombre de paramètres intervenant dans la spermatogenèse et vraisemblablement impliqués dans l'issue de l'ICSI. La France a décidé d'exercer la prudence dans ce domaine en n'autorisant l'injection de cellules germinales immature (spermatides), ou de spermatozoïdes, dont la vitalité n'est pas établie (dans l'état des connaissances actuelles).

## 2. Quels sont les risques intrinsèques liés à la technique?

La crainte des conséquences liées au traumatisme infligé au spermatozoïde pour l'immobiliser lors de l'aspiration et de l'injection, tient probablement d'une vision plus anthropomorphe que purement scientifique, car il semble même que cette altération soit nécessaire. En effet, (**Dozortsev D et al, 1994**) ont établi une corrélation entre le

dommage insuffisant infligé à la membrane du spermatozoïde lors de son immobilisation, qui rendrait le noyau spermatique inaccessible à l'action du glutathion ovocytaire dans la formation des pronucléus, et les défauts de décondensation chromatinienne (**Dozortsev D et al.1994**).

Par ailleurs, la localisation préférentielle des chromosomes au sein du noyau spermatique et sa décondensation asynchrone après ICSI pourraient expliquer l'augmentation apparente des anomalies chromosomiques sexuelles retrouvées dans la descendance. Ainsi, le retard de décondensation entre la région apicale du noyau, contenant le chromosome X, et celle de la région basale, serait impliqué dans les défauts de réplication de ce dernier lors du premier cycle pour cellule mitotique (**Luetjens CM, et al 1999**).

Le processus d'activation de l'ovocyte mature, bloqué en métaphase de sa seconde division méiotique, résulte de l'interaction spermatozoïde-ovocyte, et aboutit notamment à l'expulsion du deuxième globule polaire (**Tesarik J et al, 1998**).

Le risque est donc de compromettre la caryogamie et l'euploïdie du zygote (**Flatherty' SP et al 1998**). Les défauts d'activation ovocytaire, dont le démarrage et la propagation dépendent d'oscillations de la concentration calcique intra-ovocytaire, seraient la cause principale des échecs de fécondation après ICSI.

En effet, la micro injection de spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire, perturbant le phénomène d'oscillations calciques, peut d'une part favoriser la fusion du spermatozoïde avec des organites intracytoplasmiques dont les propriétés membranaires dépendantes du calcium seraient modifiées.

La manipulation de l'ovocyte par des actions biochimiques (hyaluronidase bovine) et surtout mécaniques, visant à éliminer les cellules folliculeuses péri-ovocytaires, est susceptible de déplacer le premier globule polaire. Celui-ci n'étant pas fermement amarré dans l'espace péri vitellin, sa nouvelle position n'indiquerait plus la localisation du fuseau méiotique. Ceci remet sérieusement en question l'utilisation de la procédure qui consiste à éviter le fuseau méiotique en injectant le spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire à 90° du premier globule polaire (**Hewitson L et al 1999**).

Il faut espérer que les lésions du cytosquelette ovocytaire provoquées par l'intrusion de la pipette de micro-injection, qui pourraient menacer l'intégrité génomique de l'embryon, soient spontanément réparables, ou que les anomalies chromosomiques qui en résultent soient

éliminées précocement par des mécanismes de sélection post zygotique ( BoueJG, Boue A. 1976). Les résultats préliminaires qui montrent l'innocuité de la polyvinyle pyrrolidone (PVP), utilisée dans le milieu de fécondation, et dont une partie est injectée avec le spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire, semblent rassurants mais méritent d'être confirmés à long terme (**Hamori M, Antoni K, 1999**).

Enfin, signalons le risque, certainement infime mais réel, de transmettre par ICSI de l'ADN exogène, provenant d'un agent pathogène en particulier (**Chan AW, 2000 ; Perry AC, 1999**).

### **3. Evaluation des risques pathogènes liés à l'ICSI :**

La complexité de l'étude des facteurs génétiques de l'infertilité réside dans le propos même de la génétique, qui consiste entre autres à caractériser la transmission d'un caractère génétique d'une génération à l'autre. Si l'utilisation de la FIV, et plus encore de l'ICSI, a permis de créer une (génétique de l'infertilité) et de la reproduction, les avancées réalisées avec ces techniques impliquent que l'infertilité pourrait bien devenir une maladie héréditaire causée par des anomalies chromosomiques.

Les anomalies chromosomiques représentent un facteur étiologique important de l'infertilité masculine (**Egozcue S, et al 2000**).

Les anomalies numériques sexuelles (1,7%) et les translocations robertsoniennes (1 %) seraient prépondérantes.

Les premières seraient en majorité représentées par l'anomalie 47, XXV mosaïque ou non (syndrome de Klinefelter) (**Tuerlings JH, et al 1998**), les ICSI réalisées avec les spermatozoïdes d'hommes 47, XXV, prélevés au niveau testiculaire ont permis d'obtenir la naissance d'enfants génotypiquement normaux et confirment que ces patients sont capables de produire des spermatozoïdes normalement haploïdes (Palermo GD, et al 1998), mais ceci reflète probablement l'existence d'un mosaïsme germinale.

Les mâles 47, XIV sont le plus souvent fertiles et ne présentent pas de risque particulier (**Benet T. Martin RH 1988**).

Les translocations équilibrées n'expriment pas obligatoirement par une infertilité chez l'individu qui les porte, mais celui-ci présente un risque élevé de concevoir un embryon présentant une anomalie génétique (chromosomique, génique ou épigénétique), susceptibles de se manifester chez la mère par des fausses couches à répétition, ou de se révéler au cours de

la petite enfance chez la descendance. Il n'a pas encore été prouvé que ce risque était accru chez de tels patients candidats à l'ICSI!

Rappelons que la fécondation in vivo n'offre aucune sélection génétique ou morphologique des spermatozoïdes, sauf dans les cas où une dysmorphie peut gêner l'interaction gamétique, si l'absence de corrélation phénotype/génotype des spermatozoïdes semble admise, les cas de macrocéphalie (**Bernardini L, 1998 ; Viville S, 2000**) et de globozoospermie (**Xu X et al 1999**) qui seraient associés à des anomalies chromosomiques ou génétiques tendent à laisser le débat ouvert, au demeurant, l'apparence normale des spermatozoïdes sélectionnés pour l'ICSI ne garantit en aucun cas leur intégrité génétique.

L'estimation du taux d'aneuploïdie des spermatozoïdes d'hommes infertiles par hybridation in situ en fluorescence (FISH) permet d'évaluer indirectement le risque de transmettre une anomalie chromosomique à la descendance.

Cependant l'interprétation des résultats doit être faite en fonction du nombre restreint de chromosomes analysables. En ce qui concerne les hommes infertiles à caryotype normal, les données sont encore peu nombreuses. Deux études portant sur un nombre élevé de chromosomes ont confirmé récemment l'augmentation réelle du taux d'aneuploïdie autosomique et sexuelle, en corrélation avec l'oligoasthénospermie responsable de l'infertilité (**Pang MG et al 1999**).

#### **a. Du point de vue génique :**

Les anomalies géniques responsables d'infertilité masculine sont nombreuses et soit affectent uniquement la spermatogenèse, soit provoquent des phénotypes plus complexes et graves, interférant éventuellement avec la genèse du tractus génital mâle. Dans de tels cas, l'utilisation de l'ICSI peut conduire à la transmission d'une anomalie génétique, éventuellement à l'origine d'une maladie se déclarant plus ou moins tardivement dans la descendance.

Plusieurs gènes de régulation de la spermatogenèse ont été localisés sur le chromosome Y. La délétion d'une des régions AZFa, AZFb ou AZFc (azoospermia factors), caractérisant le bras long Yq11 serait responsable d'anomalies spécifiques du spermogramme.

Ainsi, des microdélétions de Yq11 ont été détectées parmi les hommes dont l'infertilité est liée à une oligozoospermie sévère ou à une azoospermie sécrétoire (**Chandley AC, 1998**).

Cependant, les chiffres publiés sont extrêmement variables selon les études (de 1 à 55%), et ne permettent pas de conclure. En raison de la relative instabilité du chromosome Y, il est fort possible qu'un amalgame a été fait entre les remaniements caractérisant un polymorphisme et les (vraies) délétions perturbant la spermatogenèse (**Pryor L, Kent-First M, et al 1997**). Ont tenté de redéfinir le pourcentage de microdélétions chez les hommes candidats à l'ICSI sans préjuger de l'étiologie de l'infertilité. Seulement 2,2 % de ces hommes non «sélectionnés» présentaient une microdélétion, et ce pourcentage atteignait 16 % lorsqu'il s'agissait d'azoospermie idiopathique (**Krausz C, et al 1999**).

La mucoviscidose fait partie des maladies les plus fréquentes et les plus graves susceptibles d'être transmises par l'ICSI. Elle illustre la complexité d'un phénotype qui se caractérise au minimum par une infertilité, d'origine excrétoire, mais qui peut aller jusqu'aux manifestations particulièrement graves de cette maladie.

L'une de ses manifestations cliniques les moins graves est l'agénésie bilatérale des canaux déférents (ABCD), qui peut constituer la seule expression phénotypique de la maladie. Ainsi, 66 % des hommes souffrant d'ABCD sont porteurs d'une ou plusieurs mutations du gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (**Lissens W, Mercier B, et al 1996**).

Les 34 % restants auraient acquis cette agénésie suite à une anomalie distincte du développement. La possibilité de transmettre la mutation par l'ICSI constitue un risque, dans la mesure où la descendance peut développer une mucoviscidose. En effet, un couple sur 50 consultant pour une stérilité rapportée à une ABCD serait porteur d'une mutation CFTR chez les deux partenaires, et aurait 25 % de risque de donner naissance à un enfant atteint de mucoviscidose (**Férec C, Verlingue C, Mercier B 1996**).

Si la recherche systématique de mutations spécifiques chez les patients infertiles est envisageable, et vivement recommandée dans le cas de l'ABCD, elle est bien évidemment impossible pour les maladies dont la mutation ou le gène lui-même n'ont pas encore été identifiés. C'est le cas de la dyskinesie ciliaire ou encore des défauts du récepteur aux androgènes, maladies certes rares, mais dont le phénotype peut varier de l'infertilité à une maladie grave telle que le syndrome de Kartagener (dans le cas de la dyskinesie ciliaire) ou l'atrophie musculaire spino-bulbaire liée à l'X, aussi appelée maladie de Kennedy, dans le cas des défauts du récepteur aux androgènes.

L'ICSI constitue, pour les hommes dont l'infertilité est liée soit à une cause génique soit à une micro délétion de l'Y, le moyen de réaliser leur désir de paternité. Le risque de transmettre une anomalie génique à la descendance, et donc au minimum une infertilité (**Johnson MD.1994**), serait cependant minimisé par certains couples, puisque leurs fils infertiles auraient également la possibilité de recourir à l'ICSI!

#### **b. Du point de vue épigénétique:**

Le processus épigénétique le plus étudié est sans aucun doute l'empreinte génomique, par l'intermédiaire de laquelle les génomes paternel et maternel se révèlent non équivalents et complémentaires. Le marquage des gènes soumis à l'empreinte génomique a lieu lors de la gamétogenèse, de telle sorte qu'ovocytes et spermatozoïdes portent respectivement l'empreinte maternelle et paternelle transmise au futur zygote.

Ces gènes se caractérisent par une expression mono allylique dépendant de leur origine parentale. A l'heure actuelle, l'ontogenèse de l'empreinte génomique durant la gamétogenèse n'est pas encore clairement établie. La question du risque épigénétique a donc été soulevée dans le cas de l'injection de cellules germinales immatures, ce qui présenterait un risque de perturbation du développement embryonnaire si le marquage génique n'était pas achevé lors du recueil.

Ce risque concernerait également la manipulation des spermatozoïdes, dont le marquage pourrait se poursuivre lors du transit épidydimaire (Ariel M, Cedar H, McCarrey .1994) et ne s'achever qu'au moment de l'implantation embryonnaire (**Tanaka M et al 1999**). Cela suggère que le remodelage des pro noyaux au cours de la fécondation pourrait lui aussi jouer un rôle dans l'établissement de l'empreinte génomique. La démonstration que l'expression inappropriée de certains gènes subissant l'empreinte génomique peut conduire à des troubles subtils du comportement chez la souris (**Viville S, lefebvre L, 1999**), incite à la prudence en ICSI. Même si l'extrapolation à l'homme est difficile, ces travaux suggèrent néanmoins la nécessité d'un suivi des enfants issus d'ICSI sur les plans physique et psychomoteur.

#### **4. Risques du suivi des animaux issues d'ICSI :**

La plupart des études proviennent de l'importante activité du groupe de Van Steirteghem, qui a le mérite d'avoir établi précocement et de façon régulière le suivi des grossesses issues d'ICSI en Belgique (**Bonduelle M, et al.1999**). Incidence des aberrations

chromosomiques fœtales (**Veld et al, 1995**) furent les premiers, dans une étude très alarmante, à attirer l'attention sur l'augmentation des aberrations chromosomiques sexuelles (30 %). Il faut cependant nuancer les conclusions de cette étude. Non seulement la sélection a été faite sur l'âge maternel avancé, l'origine des anomalies gonosomiques étant vraisemblablement paternelle, mais surtout le nombre de cas analysés est largement insuffisant pour conclure (**Veld P, Brandenburg H et al 1995**).

Nous présentons ici les données cumulatives d'études menées de 1991 à 1998, principalement européennes, relevant le taux d'anomalies chromosomiques chez les fœtus issus d'ICSI. L'incidence des anomalies chromosomiques se situe entre 0,04 % et 3,3 %. Le pourcentage des Aberrations chromosomiques de novo (autosomiques et sexuelles) varie de 0 à 2,9 %, celui des aberrations chromosomiques héritées (équilibrées et déséquilibrées) de 0,04 à 1,3 %. Dans le bilan de leurs sept années de pratique, Bonduelle et al. ont relevé 2,6 % d'anomalies chromosomiques (28/1082) et 0,8 % d'anomalies sexuelles, (Bonduelle M, et al.1999) . Ces taux sont globalement supérieurs aux normes le plus souvent citées, soit 0,92 % pour les anomalies chromosomiques et 0,19 % pour les anomalies sexuelles (**Jacobs P, Browne C,1992**).

Cependant, l'interprétation de cette augmentation, particulièrement celle des anomalies sexuelles, observée principalement par ces auteurs, doit être prudente, avant tout parce que ces normes concernent des nouveau-nés témoins et non des fœtus.

Cette mise en garde s'applique également à la situation française évaluée annuellement par le bilan FIVNAT: le chiffre de 0,7 % d'anomalies chromosomiques (16/2332) s'inscrit dans les normes ci-dessus, mais il est au moins doublé par rapport à la valeur de référence citée par les auteurs. De plus, les facteurs de risque n'ont pas été appariés entre les populations ICSI et celles des registres contrôles utilisés (**FIVNAT, Bilan de l'année 1997**).

Une étude danoise récente n'a, quant à elle, pas relevé d'anomalies sexuelles, alors que le plus fort taux d'anomalies chromosomiques totales a été observé chez les 209 fœtus analysés (Loft A, et al.1999). Testart et al. ont le mérite d'avoir réalisé la seule étude française de cohorte, de laquelle ressort l'absence d'anomalies chromosomiques chez les fœtus issus d'ICSI en dehors de celles héritées des parents (**Testart J, et al , 1996**).

Enfin, la corrélation entre l'origine des spermatozoïdes injectés, épидидymaire ou testiculaire, ou des embryons issus d'ICSI, congelés, et le taux d'anomalies chromosomiques fœtales n'est pas clairement rétabli (**Bonduelle M,et al 1998**).



## 5. Incidence des malformations congénitales :

Les données concernant l'incidence des malformations congénitales observées chez les enfants nés d'ICSI sont également peu nombreuses, et ces études ne sont pas toujours menées en parallèle avec les relevés des anomalies chromosomiques.

Le pourcentage des malformations majeures relevées à l'âge de deux mois est très variable on observé une augmentation du pourcentage de malformations majeures à 1 an (3,4 %), alors que leurs chiffres à 2 mois de vie (2,3 %) s'inscrivent dans les normes qu'ils citent. Le pourcentage de malformations congénitales observées est de 2,4 %, soit presque deux fois supérieur à celui observé pour des grossesses spontanées (**FIVNAT, Bilan de l'année 1997**).

Les centres australien et anglais n'ont pas noté d'augmentation des malformations majeures à 1 an (4,5 % et 4,9 % respectivement) par rapport à leur population témoin (5 % et 4,1 %), contrairement au pourcentage d'anomalies mineures (Bowen JR, 1998 ; Sutcliffe AG, 2001.). Enfin, là encore aucune corrélation ne semble pouvoir être établie l'origine des spermatozoïdes injectés et le pourcentage de malformations congénitales (FIVNAT, Bilan de l'année 1998) (**Bonduelle M, et al.1999**).

La difficulté d'interprétation de ces résultats accentuée par la grande disparité des normes est liée en grande partie à la controverse sur la classification des malformations congénitales. Par exemple, la classification utilisée par Bonduelle - les malformations congénitales sont majeures quand elles ont des conséquences fonctionnelles et/ou qu'elles requièrent une correction chirurgicale, toutes les autres sont mineures (**Viville S, Iefebvre L.1999**) est plus laxiste que celle des Australiens.

La classification des malformations observées par ces mêmes auteurs par rapport à une population témoin a en effet permis à Kurinczuk et Bowern, selon leurs propres critères, de contredire les résultats plutôt rassurants de l'équipe belge (**Kurinczuk 1J, Bower C.1996**).

L'intérêt de cette étude particulièrement démonstrative est cependant d'encourager la recherche d'un consensus et la poursuite de telles études, et non pas de révéler une incidence sur l'intégrité accrue congénitales.

## 6. Évaluation psychomotrice:

L'évolution psychomotrice évaluée dans 3 centres, australien, belge et anglais, et comparée à celle de populations contrôles (**Bowen JR, 1998; Sutcliffe AG, 2001**). Bowen et al. ont observé lors d'ICSI un index de développement mental diminué.

L'hypothèse d'une relation avec l'existence d'anomalies chromosomiques est d'autant plus probable, selon eux, que la transmission d'aberrations chromosomiques paternelles expliquerait l'existence d'un retard de développement accru, Bonduelle et al. n'ont pas noté d'altération du développement mental issus d'ICSI évalués à 2 ans. Sutcliffe et al., en se fondant sur une autre échelle, ont confirmé l'absence de différence significative par rapport à ceux conçus naturellement.

Même si elle porte sur un nombre inférieur d'enfants (123), leur étude semble néanmoins plus fiable que les précédentes, qui présentent de nombreux biais de recrutement. La validité de telles études, qui devraient être poursuivies à long terme, repose sur un échantillonnage important, des critères communs d'évaluation mentale et la prise en compte des facteurs environnementaux.

**Conclusion :**

Si le succès de l'ICSI en thérapeutique de l'infertilité est indéniable, elle reste encore une technique (sous surveillance). L'aspect rassurant des résultats préliminaires dusuivi des enfants nés d'ICSI ne doit pas pour autant faire relâcher les efforts. L'étude des conséquences sur le patrimoine génétique de ces enfants doit notamment être poursuivie à long terme, car si l'ICSI ne crée pas l'anomalie génétique, elle permet néanmoins sa transmission.

Ainsi, tout couple candidat à une ICSI pour une infertilité d'origine masculine devrait bénéficier d'un conseil génétique, afin d'être informé des risques potentiels encourus par sa descendance (Johnson MD.).

L'option d'un consensus sur les examens réalisés et l'analyse des résultats multicentriques du suivi des enfants nés d'ICSI devraient permettre d'orienter au mieux les axes de recherche et la poursuite d'une (biovigilance). Celle-ci, déjà initiée par la CNMBRDP, se justifie d'ailleurs autant pour l'ICSI que pour les autres techniques de l'assistance médicale à la procreation (AMP). Les questions fondamentales d'éthique soulevées par l'ICSI rejoignent de manière générale celles de l'AMP. Comme cela est suggéré dans le rapport du Conseil d'Etat de 1999 sur la révision des lois de bioéthique, il serait souhaitable que soit créée une urgence nationale de la médecine de la reproduction, équivalente à l'Agence du Médicament. Cette agence serait chargée non seulement du suivi à long terme des pratiques actuelles de l'AMP, mais aussi de la délivrance des autorisations pour les nouvelles techniques, à l'instar des autorisations de mise sur le marché (AMM) accordées aux produits pharmaceutiques.

Enfin, il est clair que la mise en place d'un suivi systématisé n'est pas chose aisée car elle se heurte non seulement à des difficultés pratiques, mais aussi à la réticence des parents, dont les enfants sont plus encore (examinés à la loupe).

---

# Chapitre VI

Clonage

---

Les biologistes comme les éleveurs recherchent des animaux présentant une large diversité génétique. Ceci permet aux biologistes de disposer de modèles pour étudier les fonctions biologiques et certaines maladies humaines. Les éleveurs bénéficient de cette manière des lignées d'animaux les mieux adaptées aux besoins humains en utilisant la variabilité génétique pour sélectionner les reproducteurs.

Pour atteindre ces buts, deux voies sont traditionnellement suivies : la reproduction sexuée et la sélection des individus les plus intéressants. Des progrès considérables ont été faits dans les cent dernières années pour optimiser ces voies d'amélioration des lignées animales. La maîtrise de la reproduction chez les animaux repose sur les méthodes suivantes :

Choix des géniteurs, insémination artificielle, collecte et transfert d'embryons, collecte et maturation d'ovocytes suivies d'une fécondation in vitro et d'un transfert d'embryon, conservation sur de longues durées des gamètes et des embryons. De son côté, la sélection devient de plus en plus précise au fur et à mesure que le choix des animaux d'une population et en particulier des géniteurs ne repose plus seulement sur une observation globale des individus mais sur des mesures biochimiques précises et sur la structure chimique de régions chromosomiques comportant des gènes d'intérêt (Quantitative Trait Loci (QTL ou gènes marqueurs)).

### **1. Le principe du clonage :**

Le développement d'un organisme vivant sexué passe par une série d'étapes dont la première est la fécondation. Le zygote ainsi formé contient une seule cellule qui renferme deux copies de chromosomes, l'une étant présente dans l'ovocyte et l'autre étant apportée par le spermatozoïde.

Cette cellule est dite diploïde car elle contient deux copies de chromosomes comme toutes les cellules des organes qui en découlent et que l'on qualifie de somatiques.

La première cellule formant l'embryon se divise pour donner deux puis quatre cellules etc. Jusqu'au stade quatre cellules, chaque cellule est totipotente. Cela signifie que chacune de ces cellules a toutes les potentialités et notamment celle de pouvoir assurer le développement complet de l'organisme dès lors qu'elle est placée dans des conditions appropriées, en l'occurrence leur présence dans l'utérus chez les mammifères. Au-delà de ce stade de développement, les cellules de l'embryon perdent leur totipotence pour devenir pluripotentes. Ceci signifie qu'aucune de ces cellules, seule, ne peut assurer le développement complet d'un

organisme, mais que chacune d'entre elle peut indifféremment participer à la formation de n'importe quel organe à la condition expresse d'être associée à d'autres cellules comme cela est le cas dans l'embryon au stade blastocyste.

En continuant leurs divisions, les cellules se spécialisent progressivement. On dit qu'elles se différencient. Elles sont alors multipotentes, ce qui implique qu'elles ne sont plus capables que de participer à la formation de certains organes et tissus bien définis (exemple : les cellules de la moelle osseuse qui donnent naissance à l'ensemble des cellules sanguines, les globules rouges et les globules blancs). Le dernier stade consiste, pour les cellules, à se spécialiser complètement pour remplir, dans chaque organe ou tissu où elles se trouvent, les fonctions qui leur sont dévolues.

Ce processus, appelé différenciation, est considéré comme irréversible dans la mesure où une cellule différenciée, multipotente ou pluripotente ne redevient pas spontanément totipotente.

A partir des cellules pluripotentes et multipotentes, il est possible d'établir des lignées de cellules dites cellules souches embryonnaires dans le premier cas et cellules souches d'organes dans le second.

Par définition, une cellule est capable de se diviser à l'identique un très grand nombre de fois et de se différencier en cas de nécessité. Au cours du développement embryonnaire, les cellules souches se différencient spontanément sous l'influence des inducteurs qui se trouvent à leur contact. Les cellules pluripotentes des lignées de cellules souches embryonnaires peuvent se différencier lorsqu'on les réintroduit dans un embryon précoce ou que l'on ajoute à leur milieu de culture les inducteurs appropriés. Les cellules souches embryonnaires sont donc une source potentielle de cellules multipotentes ou différenciées pour régénérer des organes endommagés chez les patients. Les cellules souches d'organes amplifiées *in vitro* peuvent également contribuer à la régénération d'organes. Dans certaines situations, des cellules souches d'un organe peuvent se transformer en cellule souche d'un autre organe, selon un processus appelé trans différenciation.

La formation des cellules sexuelles ou gamètes se fait à partir de cellules somatiques dérivées des cellules pluripotentes par un circuit court n'impliquant qu'un nombre réduit de divisions cellulaires. Les cellules sexuelles sont devenues haploïdes (ne contiennent plus qu'une copie de chromosomes) et la diploïdie est restaurée par la fécondation.

La reproduction sexuée crée un nouveau génome lors de la formation des gamètes et de la fécondation. Les chromosomes homologues échangent en effet leurs gènes de manière aléatoire lors de la formation des gamètes et ces nouvelles versions de chromosomes sont distribuées de manière également aléatoire pour former les gamètes haploïdes.

La rencontre des gamètes lors de la fécondation ajoute encore une composante aléatoire à la reproduction sexuée. Ces mécanismes engendrent une diversité génétique permettant une adaptation des espèces aux pressions de l'environnement et de la sélection. Ils sont exploités par les sélectionneurs qui favorisent artificiellement l'obtention d'animaux répondant à leurs besoins.

## **2. Les techniques de clonage:**

Le noyau du spermatozoïde dont l'ADN est recouvert de protamines et qui n'est transitoirement plus capable de se répliquer ni d'exprimer les gènes qu'il contient, subit rapidement de profondes transformations dans les heures qui suivent la fécondation. Au contact du cytoplasme de l'ovocyte, le noyau du spermatozoïde perd ses protamines qui sont remplacées par des histones et des protéines nucléaires régulatrices. Le noyau se décondense pour être visuellement semblable à celui de l'ovocyte moins de 24 heures après la fécondation. L'ADN des noyaux de l'ovocyte et du spermatozoïde peut alors se répliquer simultanément pour assurer la première division cellulaire de l'embryon.

Dans les tous premiers jours du développement, (de 1 à 4 jours selon les espèces) le génome commence à être transcrit. Le cytoplasme de l'ovocyte a donc été capable de programmer le génome du spermatozoïde en rendant possible l'expression immédiate d'un grand nombre de gènes, ainsi que l'expression future au cours du développement foetal et chez l'adulte de l'ensemble des gènes de l'organisme. Au cours de la gamétogenèse et dans la période qui suit la fécondation jusqu'au stade blastocyste, l'ADN de l'embryon se déméthyle massivement rendant possible l'expression d'un grand nombre de gènes.

A partir de "l'éclosion" et pendant l'implantation, l'ADN se reméthyle mais de manière sélective. Ce mécanisme participe au choix des régions du génome qui vont garder leurs capacités à transcrire les gènes qu'elles contiennent. Pour certains gènes, la région où ils se trouvent est méthylée sur l'un des chromosomes parentaux et non sur l'autre. Les gènes non méthylés sont les seuls qui restent activables. Ce phénomène qui est plus ou moins transmissible d'une génération à l'autre est appelé empreinte génétique. L'extinction d'un

gène ne dépend donc pas, dans ces situations, de mutations de l'ADN mais de son inactivation locale. Ce type de phénomène est qualifié pour cette raison d'épigénétique.

La fusion expérimentale de cellules se traduit par l'obtention de cellules hybrides qui gardent, plus ou moins selon les cas, les spectres d'expression des gènes des deux cellules. Les hybrides entre des cellules somatiques et des cellules ES pluripotentes expriment pour l'essentiel les gènes des cellules ES tandis que les gènes spécifiques des cellules somatiques s'éteignent chez ces cellules hybrides.

Le gène *oct4*, dont l'expression est restreinte aux cellules pluripotentes, est ainsi réactivé dans les cellules hybrides dont l'une des partenaires est une cellule ES. Il en est de même pour les gènes du chromosome X rendus silencieux au cours du développement. Les gènes méthylés responsables du phénomène d'empreinte génétique sont également déméthylés et réactivés. Il est donc considéré que les ovocytes et les cellules pluripotentes ont un caractère dominant en ce qui concerne la programmation génétique (Jouneau et Renard, 2003). C'est cette propriété qui est mise à profit depuis 50 ans pour obtenir des clones d'animaux.

**L'énucléation de l'ovocyte** Pour pouvoir bénéficier des propriétés de programmation génétique du cytoplasme de l'ovocyte, le noyau est tout d'abord retiré mécaniquement de ce dernier par aspiration. Le globule polaire qui contient le jeu de chromosomes éjectés de la cellule pour former le gamète haploïde et qui se trouve entre la zone pellucide et la membrane est aspiré en même temps.

Cette opération est traumatisante non seulement en raison de la relative violence mécanique qu'elle comporte mais aussi parce qu'elle s'accompagne du retrait d'environ un tiers du cytoplasme.

Ceci abaisse d'autant les capacités de programmation de l'ovocyte. Des additions compensatoires de cytoplasme d'ovocyte atténuent quelque peu l'amplitude de ce phénomène. L'addition de cytoplasme d'ovocyte exogène ne paraît plus nécessaire lorsque le noyau du cytoplasme n'est pas retiré par aspiration mais par un clivage de la cellule à l'aide d'une lame tranchante qui sépare le noyau du reste de l'ovocyte.



**a. Le choix des cellules donneuses :**

- L'origine des cellules donneuses de noyau a une importance très grande sur l'efficacité du clonage.
- Les cellules pluripotentes des embryons non cultivées donnent les meilleurs rendements de clonage.
- Ce rendement baisse notablement lorsque ces cellules ont été cultivées pendant plusieurs semaines.
- L'efficacité du clonage baisse encore plus lorsque les cellules donneuses sont prélevées chez un fœtus et surtout lorsqu'elles proviennent d'un adulte (**Wilmot et al., 2002 ; Hiiragi et Solter, 2005**).

Il semble donc que le retour à la totipotence soit d'autant plus difficile que la cellule donneuse de noyau est plus différenciée. Il est important de noter que l'utilisation de noyaux de lymphocytes B et T ont permis le clonage de souris. Le rendement de l'opération était particulièrement faible mais ces résultats ont levé une ambiguïté.

Il est en effet toujours possible que le faible succès du clonage à partir de cellules primaires soit dû à la présence de cellules souches d'organes incomplètement différenciées et donc plus aptes à retrouver l'état de totipotence. Ce phénomène, s'il existe, ne paraît plus possible à partir de clones de cellules B et T dans lesquelles on peut identifier sans ambiguïté respectivement les gènes des immunoglobulines et des récepteurs qui ne sont réarrangés que dans ce type de cellules à l'état différencié (**Hochedlinger et al., 2002**).

Le type cellulaire de la cellule donneuse de noyau est également important. Les cellules du cumulus chez l'adulte et les fibroblastes de la peau chez le fœtus sont parmi les meilleures donneuses de noyau sans que l'on ait pu en déterminer les raisons. Les données actuelles indiquent que le type de cellules utilisées comme donneuses de noyau a une influence sur le rendement du clonage mais non sur les caractéristiques physiologiques des animaux nés après transfert de noyau.

La situation physiologique des cellules donneuses et receveuses de noyau est également très importante. Ceci est particulièrement vrai en ce qui concerne la phase du cycle de division cellulaire des deux cellules. Plusieurs stratégies sont possibles sans qu'il ait pu

être prouvé que l'une d'entre elles soit incontestablement la meilleure (**Wilmot et al., 2002 ; Li et al., 2003**).

Il est important de noter par ailleurs que certains animaux donneurs d'ovocytes ou de noyaux permettent d'obtenir systématiquement de meilleurs rendements de clonage que d'autres. Les mécanismes qui déterminent ces propriétés et qui apparaissent d'origine génétique sont inconnus (**Powell et al., 2004**).

La santé de l'animal cloné dépendra étroitement de l'état sanitaire de l'animal donneur dont le noyau d'une cellule sera utilisé pour l'obtention du clone, de même elle dépendra de l'état sanitaire de la femelle receveuse. Tout évènement pathologique en cours de gestation pourra avoir un impact sur la santé du fœtus et du jeune animal cloné. En particulier, la présence dans les noyaux des cellules utilisées pour le clonage de génomes de certains virus en phase de latence (ex : Herpès virus) ou intégrés dans les gènes cellulaires (ex : rétrovirus) peut avoir un impact direct sur le développement cellulaire, le fœtus ou le jeune clone après la naissance. Tous ces éléments devront donc être pris en compte dans le choix des cellules donneuses et donc de l'animal donneur ou receveur.

#### **b. Le transfert de noyau :**

Le transfert d'un noyau de cellule isolé dans le cytoplasme d'un ovocyte énucléé est mécaniquement possible mais il n'est en pratique suivi d'un développement embryonnaire que chez la souris. Il semble que l'architecture de la région du cytoplasme, qui entoure le noyau, soit essentielle et que la manipulation du noyau isolé en altère l'intégrité. Cependant, c'est cette technique qui est utilisée chez le poisson-zèbre et le medaka sans apparemment poser de problème particulier (les pourcentages de transferts nucléaires réussis sont identiques à ceux observés chez les vertébrés supérieurs).

La cellule donneuse de noyau est donc introduite mécaniquement, par micromanipulation, entre la zone pellucide et la membrane de l'ovocyte. Cette opération est suivie d'un traitement répété par un champ électrique qui a pour but d'induire la fusion des membranes plasmiques de l'ovocyte énucléé et de la cellule donneuse. Le noyau diploïde de la cellule se retrouve ainsi au contact du cytoplasme de l'ovocyte. Le nouvel édifice ainsi construit s'apparente fortement à un zygote.

Le traitement par le champ électrique a également comme effet d'activer le nouvel embryon pour qu'il commence son développement. En effet, ce champ électrique induit la

formation de pores dans la membrane de l'embryon ce qui permet au calcium ambiant de pénétrer dans le compartiment intracellulaire. Cet artifice mime en partie l'induction de flux de calcium qui est normalement déclenchée par des signaux provenant du spermatozoïde lors de la fécondation.

L'activation de l'embryon issu d'un transfert de noyau peut être également être induite par l'action d'ionophores à calcium (ionomycine ou A23187), par l'addition de DMAP (6-diméthylaminopurine) qui est un inhibiteur de kinase capable de provoquer l'inactivation du MPF (M-phase promoting factor) de l'ovocyte (Hwang et al., 2004) ou par l'addition d'inhibiteurs de la synthèse protéique (cycloheximide) et d'inhibiteur du cytosquelette (cytochalasine).

Les effets de ces traitements ne sont pas tous connus. Il vient ainsi d'être mentionné que le DMAP, classiquement utilisé par les biologistes cellulaires pour inhiber la phosphorylation de certaines protéines, a des propriétés mutagènes très significatives, la phase d'activation de l'ovocyte après le transfert de noyau est un point capital dans le succès du clonage.

### **3. Les possibles améliorations des techniques de clonage :**

Il est admis que les clones sont génétiquement identiques à leurs parents génétiques. La viabilité des clones et les diverses ressemblances phénotypiques ainsi que génotypiques ne suffisent pas strictement à conclure que ceci est véritablement le cas. Personne ne connaît en effet le statut génétique d'une cellule somatique utilisée comme donneuse de noyau. Ces cellules ne sont sans doute pas strictement génétiquement identiques. Des études basées sur la comparaison de multiples marqueurs génétiques sont en cours pour comparer les génomes des clones à ceux de leurs parents génétiques (**De Montéra et al., 2004**).

Il reste raisonnable de considérer que la majorité des clones issus d'un même animal sont génétiquement identiques entre eux et à l'animal qui a donné son génome. En revanche, un certain nombre de gènes n'étant pas correctement exprimé, ces clones sont épigénétiquement modifiés. Il reste raisonnable de considérer que la majorité des clones issus d'un même animal sont génétiquement identiques entre eux et à l'animal qui a donné son génome.

En revanche, un certain nombre de gènes n'étant pas correctement exprimé, ces clones sont épigénétiquement modifiés.

Il reste dans ce domaine à confirmer que les descendants des clones ne sont plus épigénétiquement modifiés. Les tests appliqués aux clones pour mesurer systématiquement l'expression d'un grand nombre de gènes n'ont pas encore révélé si ces mêmes gènes ont repris un fonctionnement normal chez les descendants des clones modifiés.

Des études récentes ont montré que l'association artificielle de deux embryons clonés augmentait considérablement les chances de développement de ces embryons et la survie des nouveau-nés.

Cette amélioration du devenir des clones s'accompagne précisément d'une forte augmentation de l'expression précoce du gène *oct4* qui est indispensable pour le développement embryonnaire (**Houdebine, 2003**).

Certaines expériences récentes montrent que les noyaux de fibroblastes peuvent être reprogrammés par des extraits de lymphocytes T. Les cellules ainsi modifiées expriment certaines fonctions spécifiques des cellules T (Hakelien et al., 2002). Il est concevable que des extraits de cytoplasme ou des facteurs isolés et bien caractérisés puissent dédifférencier des cellules somatiques pour les rendre totipotentes. Le recours à des ovocytes pour le clonage ne serait alors plus nécessaire. Sans aller jusqu'à une situation aussi extrême, une expérience récente a montré que l'inoculation des cellules donneuses de noyaux perméabilisés avec des extraits de cellules en phase mitotique induit une condensation des chromosomes qui favorise le développement ultérieur des clones (**Sullivan et al., 2004**).

Les ovocytes constituent un matériel limitant pour le clonage, chez certaines espèces en tout cas et particulièrement chez l'homme (Hwang et al., 2004). Le transfert de noyaux humains dans des ovocytes de vaches énucléées a permis, il y a plusieurs années, d'obtenir des blastocystes ayant une apparence normale. Ces expériences ont été reprises en utilisant cette fois des ovocytes énucléées de lapin (**Chen et al., 2003**).

Une proportion importante des embryons a atteint le stade blastocyste. Des lignées de cellules pluripotentes ont pu être établies à partir de ces blastocystes. Des lignées de cellules différenciées ont ensuite été établies *in vitro* à partir des cellules embryonnaires. Ces cellules sont semblables aux cellules humaines. Ce procédé, s'il comporte encore des inconnues et s'il soulève des problèmes éthiques spécifiques pourrait constituer un moyen simplifié pour procéder à des clonages thérapeutiques chez l'homme et à des clonages pour des usages divers chez les animaux (**Wakayama, 2004**).

Diverses combinaisons inter-espèces, entre cellules donneuses et ovocytes receveurs, ont été tentées et ont conduit à l'obtention de blastocystes. Une des plus récentes tentatives a consisté à transférer des noyaux d'embryon de poulet dans des ovocytes de lapin énucléés **(Liu et al., 2004)**.

Une autre possibilité pourrait consister à exploiter une observation récente qui a montré que des cellules ES (pluripotentes) étaient capables de se transformer en ovocytes in vitro (Vogel, 2003). Ce procédé permettrait de disposer d'un grand nombre d'ovocytes génétiquement identiques sans devoir recourir à une ovulation.

Divers examens histologiques et biochimiques sont régulièrement faits sur les clones. La mesure des concentrations de certains facteurs de croissance et de leurs protéines associées comme IGFI, IGFII, IGFBP, d'hormones comme T4, GH, insuline, leptine, cortisol, ACTH, de paramètres sanguins comme le volume globulaire, l'hémoglobine etc. ne révèle pas de différences avec les animaux normaux susceptibles de rendre compte de certains états pathologiques.

Certains clones ont une aplasie thymique partielle et une production d'anticorps anormalement basse. La reprogrammation incomplète du génome des clones et l'affaiblissement du système immunitaire de certains d'entre eux seraient susceptibles de réactiver des génomes rétroviraux endogènes. De tels génomes sont en effet nombreux chez nombre d'espèces. Ils sont pour la plupart inactivés par méthylation de leur ADN puis au cours du temps par des mutations successives. La recherche de rétrovirus bovins a donc été effectuée chez les clones. Ces examens n'ont révélé aucune propension des clones à héberger des rétrovirus actifs.

Il est intéressant de noter que certains syndromes bien identifiés, comme l'obésité chez les clones d'une lignée particulière de souris, ne sont observés chez aucun de leurs descendants **(Tamashiro et al., 2002)**.

Des clones ont été obtenus à partir de souris et de bovins clonés. Dans le premiers cas, les souris ne montrent pas de différence significative avec les animaux contrôle après six clonages successifs **(Wakayama et al., 2000)**.

A l'inverse, les bovins clonés descendant de clones présentent de sérieuses anomalies et ils ne survivent que difficilement **(Kubota et al., 2004)**.

La reproduction normale effacerait donc en grande partie sinon complètement les défauts induits par le clonage alors que la reproduction par clonage les aggrave plutôt.

#### **4. Les applications du clonage :**

Il s'agit ici d'inventorier les applications potentielles du clonage, si possible de manière exhaustive.

Le clonage à considérer en priorité est celui des cellules somatiques d'individus ayant pu manifester dans leur vie une série d'aptitudes intéressantes, ce qui serait de nature à motiver les utilisateurs potentiels.

Il y a, en effet, encore trop d'inconnues sur la valeur génétique d'un embryon, donneur potentiel de noyau. On peut bien sûr envisager de cloner un embryon, après typage et sélection, pour toute une série de gènes connus et (ou) une valeur génétique estimée via la théorie des QTL (la recherche dans ce domaine est en plein développement). Mais il ne s'agit là qu'une position stratégique de repli, à laquelle on serait contraint, notamment si l'on n'arrivait pas à faire baisser très sensiblement la fréquence des anomalies phénotypiques parmi les produits issus de clonage somatique.

On se projette donc dans un futur idéal où les problèmes techniques et scientifiques actuels relatifs au clonage auraient fini par être totalement maîtrisés. On dispose alors d'individus dont l'ADN nucléaire est la copie conforme de celui de l'individu de départ (donneur). Bien entendu, le prix de revient pour l'obtention de ces clones va dépendre des taux d'élimination observés à chaque stade des opérations de clonage. Par ailleurs, dans cette hypothèse, on ne prend pas en considération le fait que les mutations somatiques préexistantes chez les donneurs et liées par exemple au vieillissement puissent être gênantes.

Cette projection tient également compte des avancées futures dans la connaissance du génome naturel (sachant que d'importants moyens y sont consacrés dans le monde entier et que la recherche progresse rapidement) ainsi que dans sa manipulation via la transgénèse. Concrètement, on ne demande donc pas aux techniques de clonage de contribuer de manière prépondérante au progrès génétique, qui peut être obtenu en utilisant les autres techniques de reproduction et le marquage moléculaire (sélection assistée par marqueurs).

L'objectif est plutôt de déterminer les applications qui présentent un intérêt objectif pour le monde de l'élevage parce qu'aucune autre méthode que le clonage ne permet tout court, ou ne

permet pas dans un temps raisonnable, d'aboutir au même résultat. On peut distinguer au moins quatre domaines d'applications.

### **5. Clonage pour la diffusion génétique :**

Il serait souhaitable que certains troupeaux (bovins à viande, bovins laitiers en partie) pratiquant la monte naturelle puissent bénéficier des avantages de ce type de technique tout en accédant d'emblée au niveau génétique supérieur des reproducteurs utilisés en insémination artificielle. Dans ce cas, certains de ces reproducteurs pourraient être clonés et dirigés vers la monte naturelle. L'économie de ces troupeaux en serait alors améliorée tout en stimulant à long terme le progrès génétique. A ce stade du raisonnement, un minimum d'attention devrait être accordé au maintien de la variabilité génétique. Pour cela, il conviendrait de diffuser beaucoup de clones différents et si possible parmi les moins représentés dans les troupeaux.

Bien entendu, on peut aussi envisager de cloner des femelles ayant montré au cours de leur carrière tout un ensemble d'aptitudes zootechniques intéressantes, dans ce type d'application, le clonage permet simplement d'obtenir un certain niveau génétique souhaité, plus rapidement qu'au travers des méthodes de reproduction usuelles.

### **6. Clonage pour la production :**

Le clonage est ici un élément constitutif du système de production parce qu'apportant des bénéfices économiques immédiats à l'éleveur qui le pratique : en clair, le clonage permet d'inventer de nouveaux systèmes de production. Les exemples qui suivent illustrent ce type de possibilité.

En ce qui concerne les bovins laitiers, l'éleveur intéressé se fournit en clones (plusieurs) de vaches ayant un profil génétique très équilibré (bonne production mais pas de problèmes de fertilité ni de mammites), qui, de ce fait, ont une très grande longévité (diminution des frais d'amortissement).

L'éleveur reproduit ces animaux la plupart du temps en procédant à des croisements (valorisation des veaux), sauf lorsque le remplacement par d'autres clones plus récents est envisagé. Dans cette situation, l'équilibre du système est lié au prix de revient des clones. Il n'y a alors pas d'incidence sur le progrès génétique en race pure mais l'éleveur met à profit une génétique de combinaisons de caractères pour maximiser son profit immédiat.

Dans le cas des bovins à viande, une association "naisseurs de clones" et ateliers d'engraissement pourrait être à l'origine de labels économiquement intéressants. En effet, les

performances connues du donneur d'origine pourraient et devraient inclure non seulement les performances d'abattage mais aussi les caractéristiques détaillées de qualité de viande (elles sont partiellement d'origine génétique).

Les consommateurs sont de plus en plus exigeants vis-à-vis de la qualité de viande alors que les méthodes de sélection usuelles sont, ou trop imprécises, ou trop coûteuses (abattage de descendants). Le clonage apporterait une solution élégante à ce problème.

Dans les deux cas, on met à profit une génétique de combinaisons de caractères très rares parce que difficiles à obtenir simultanément en peu de temps par d'autres techniques, même avec l'aide de la génétique moléculaire.

Les applications potentielles sont donc très diversifiées et intéressantes. Il faut souligner que l'intérêt est intrinsèque, en particulier que le clonage n'est pas présenté comme une méthode alternative de création du progrès génétique. En effet, dans ce domaine, il faut tenir compte des avancées présentes et futures de la génétique moléculaire qui rendront la sélection plus efficace et moins coûteuse. Au contraire, la connaissance des génotypes des clones pour un certain nombre de gènes d'intérêt, en sus de leurs performances et de leurs index de sélection, permettra de mieux cibler les individus dignes du clonage et donc de renforcer les créneaux d'application du clonage.

Une transposition en vraie grandeur sur le terrain exige que la technique soit bien au point (ce n'est pas le cas actuellement car le taux de réussite moyen est encore trop faible et trop irrégulier) et que le prix d'achat des clones soit tolérable par l'utilisateur (ce qui dépendra très probablement de l'application envisagée).

### **7. Aspects économiques du clonage:**

Les applications du clonage décrites plus haut, sont étroitement liées aux considérations économiques. Les applications commerciales du clonage des animaux d'élevage resteront essentiellement limitées tant que la technique ne sera pas suffisamment fiable.

Elle doit encore faire l'objet de recherches approfondies tant pour résoudre des problèmes de biologie fondamentale que pour améliorer la méthode de clonage en tant que telle. Tout indique qu'une amélioration de la technique est possible et que cela se traduira par une baisse substantielle du prix de revient des clones destinés à l'amélioration des productions animales (**Farber et al., 2004**).



Les coûts du clonage chez les bovins, toute race confondue, sont actuellement les suivants. Le prix de revient actuel d'un veau cloné est d'environ 20 000 \$ et celui d'une vache clonée de 170 000 \$.

L'utilisation de la semence d'un taureau cloné pourrait apporter un gain annuel de 1 million de dollars (Powell, 2003). Ces prix sont à rapprocher de ceux des animaux sélectionnés par la reproduction classique. Une vache sélectionnée coûte, selon les races, de 2 000 à 20 000 \$ et un taureau de 3 000 à 30 000 \$. Des études prospectives indiquent que la technique de clonage des bovins bien maîtrisée permettrait un supplément de gain d'environ 1000 \$ par veau par rapport à l'insémination artificielle classique. Ceci devrait devenir progressivement une réalité dans les cinq ans qui viennent et au-delà. Il est en effet postulé que le prix d'un veau cloné pourrait baisser de manière continue avec l'amélioration de la technique jusqu'à atteindre le chiffre de 1000 \$ en 2010 (Farber et al., 2004).

#### **8. Composition du lait et de la viande:**

La composition du lait a été examinée indépendamment par au moins trois groupes (Seamark, 2003; Walsh et al., 2004 ; Norman et Walsh, 2004) sur un nombre significatif d'animaux, respectivement 15 et 13 vaches. Aucune différence significative n'a pu être observée concernant les paramètres suivants : quantité totale de matière solide, minéraux, protéines, lipides, lactose, pH, SCC (somatic cell counts), ADV (acid degree value). Un examen plus détaillé a également révélé que la proportion des différentes protéines du lait (caséines et protéines du lactosérum) ainsi que la concentration relative des différents acides gras est identique chez les vaches obtenues par clonage et chez les animaux contrôlés. Les premières expériences réalisées avec les descendants des clones confirment ces conclusions.

Les laits de vaches, chèvres, brebis contiennent plus d'un million de molécules différentes (Jenness 1988) dont la présence, donc la composition du lait, varie en fonction de la race de vache, du stade de sa lactation, de la phase de la lactation, de l'âge de la vache, de l'intervalle entre les traites, de la température ambiante, des maladies et de la saison de l'année (Walstra et Jenness, 1984 ; Kaufman et Hagemeyer, 1987) La détection des différences entre les clones et les vaches non clonées exigerait l'analyse de tous ces effets.

La composition globale de neuf parties de la carcasse des vaches clonées a été également évaluée sur la base des paramètres suivants : eau, protéines, lipides, carbohydrates, cendres et cholestérol (Takahashi et Ito, 2004). Aucune différence entre les animaux clonés et les contrôles n'a pu être observée.

Tian et al. (2005) ont analysé plus de 100 paramètres relatifs à la qualité de la viande de 2 bovins et à la composition du lait de 4 vaches laitières clonés. Ils ont également effectué des analyses histologiques des organes des 2 bovins autopsiés. Les résultats ne mettent pas en évidence de différence significative entre les animaux clonés et les témoins, ni d'anomalies histologiques dans les organes examinés (foie, rein, poumon, coeur, rate, surrénales et thyroïde). Cette étude, conduite sur un nombre limité d'animaux et sur des clones produits à partir d'une seule source génétique, nécessite d'être élargie à un plus grand nombre d'animaux clonés d'origines génétiques différentes.

### **9. Impact du clonage sur la réduction de la diversité génétique des populations en élevage :**

La sélection génétique classique, réalisée via l'insémination artificielle, s'accompagne déjà d'une réduction de la diversité génétique dans la population. Le clonage ne peut qu'amplifier ces effets si on ne prend pas certaines précautions (cf plus haut).

Cette réduction de la diversité génétique pourrait avoir plusieurs conséquences négatives. Elle pourrait, par exemple, rendre certains troupeaux plus sensibles à des agents pathogènes rares. Un tel événement pourrait induire des problèmes d'élevage inattendus. Il ne peut de même, en théorie, être totalement exclu qu'une exploitation aussi rationnelle que possible du clonage induise de tels effets. La probabilité faible mais non nulle qu'un tel scénario devienne une réalité pourrait être augmentée de manière imprévisible par des changements de conditions dans lesquelles les animaux sont élevés. Des modifications du climat pourraient ainsi favoriser l'émergence de certaines pathologies préférentiellement dans des troupeaux composés d'un nombre élevé de descendants de clones trop proches génétiquement.

Des études théoriques ont permis de définir les limites que ne devraient pas franchir les utilisateurs des techniques de clonage (**Colleau, 1993 ; Colleau et al., 1998 ; Wooliams et Wilmot, 1999**).

La recherche en génétique quantitative offre actuellement des solutions efficaces pour la gestion génétique des populations sélectionnées (**Bijma et al., 2002, Colleau et al., 2004**).

Ces solutions sont applicables aussi à des populations où des clones seraient exploités et elles permettent de gérer convenablement de tels troupeaux. Ainsi l'utilisation de clones de pedigrees très fréquents est faiblement recommandée tandis que l'utilisation de clones de

pedigrees rares est au contraire fortement recommandée, ce qui en pratique contribuera à augmenter la variabilité génétique.

Quelques exemples peuvent illustrer ces points. La sélection génétique classique a permis d'augmenter très considérablement la production laitière des vaches. Ceci s'accompagne d'effets secondaires néfastes qui tendent à s'amplifier au fur et à mesure que la sélection en faveur de la production laitière progresse.

Les vaches les plus productives présentent une fécondité qui est en diminution régulière. Il s'agit d'un phénomène complexe qui n'est pas expliqué à ce jour. La diminution de diversité génétique qui accompagne la sélection peut avoir co-sélectionné des gènes favorables à la lactation et d'autres défavorables pour la reproduction. Il est également concevable que les deux fonctions biologiques impliquées que sont la gestation et la lactation, qui sont naturellement en compétition métabolique, se retrouvent dans une situation de moins en moins compatible à la suite d'une sélection intense.

Dans le même ordre d'idée, il est bien établi que la fréquence des infections mammaires est plus élevée chez les vaches hautes productrices de lait.

Au cours des premières semaines qui suivent la mise-bas, les vaches laitières sont soumises à un déséquilibre métabolique qui oblige l'animal à puiser intensément sur ses réserves. Ce phénomène s'accompagne fréquemment de maladies métaboliques diverses (stéatoses hépatiques, acétoses, plus grande sensibilité vis à vis de fièvres vitulaires) qu'il est difficile de maîtriser.

Il est logique de penser qu'une utilisation non judicieuse de géniteurs obtenus par clonage puisse contribuer à renforcer ces tendances. A l'inverse, l'introduction du patrimoine génétique de géniteurs validés par une carrière de reproducteur pourrait au contraire contribuer significativement à maîtriser les dérives des méthodes de la sélection conventionnelle. Il existe en effet des individus dans les troupeaux qui sont à la fois des bons producteurs de lait et des animaux ne souffrant pas des désordres métaboliques cités plus haut. Le nombre de ces animaux est trop faible pour qu'on puisse les utiliser comme géniteurs capables d'avoir un impact génétique significatif sur les troupeaux, le clonage, s'il était techniquement bien maîtrisé et s'il était bien ciblé, permettrait la diffusion de ces "déviant" favorables et il contribuerait à résoudre le problème.

S'il y a un domaine où le principe de précaution doit être observé avant toute application, c'est bien celui du clonage, en raison des importantes modifications du génome (de type épigénétique notamment) fréquemment observées avec la technique actuelle et qui sont en relation avec le très fort taux de perte et (ou) d'anomalies au cours du développement.

Tant que la recherche n'aura pas réussi à mieux maîtriser ces phénomènes, il est préférable de ne pas envisager d'applications où l'animal issu de clonage participe à la reproduction, pour ne pas risquer d'altérer durablement le génome de l'ensemble de la population au bout de plusieurs générations.

Il est évidemment urgent de définir à partir de quels critères et de quelle méthodologie, un clone pourra être déclaré apte ou non à la reproduction. Très clairement, cette thématique doit être approfondie par les chercheurs. En tout état de cause, le clonage dit "de production" et décrit plus haut est libéré de ce souci. C'est sans doute là qu'une application rapide du clonage ne comporterait pas de risques mal appréhendés.

#### **10. Conséquences du clonage sur le bien-être des animaux d'élevage :**

La prise en compte de critères de bien-être dans les élevages d'espèces d'intérêt commercial depuis 20 ans est une donnée constante qui prend de plus en plus de poids dans l'évaluation des nouvelles techniques d'élevage. Le principe éthique énoncé dans le traité d'Amsterdam considère que nous avons une obligation morale envers les animaux qui nous interdit de les faire souffrir même si ces actions constituent un bénéfice pour l'homme.

Les règles générales de bien-être qui ont été énoncées peuvent se regrouper autour des cinq rubriques suivantes : éviter la faim et la soif, l'inconfort, les douleurs, les blessures et les maladies, la peur et l'angoisse ainsi que permettre un comportement normal.

Ainsi, le bien-être recouvre à la fois la santé des animaux et leur condition physique mais aussi leur état mental et leur capacité à faire face aux fluctuations défavorables de leur environnement.

Depuis environ 10 ans, les considérations sur le bien-être animal ont été appliquées aux nouvelles technologies de sélection animale. Dans ce contexte, il était logique que le clonage animal soit aussi évalué pour ses conséquences sur le bien-être des individus clonés. Cette question a fait l'objet de deux rapports en 1998 et 2004 de la part du FAWC (Farm Animal Welfare Council UK).

### 11. Impact sur le bien-être des animaux clonés :

Sans pour autant condamner a priori le clonage sur la base du non-respect des règles de bien-être des animaux, les experts du bien-être animal considèrent que plusieurs des opérations mises en œuvre lors du clonage posent de réels problèmes de bien-être.

**La première objection :** concerne le syndrome du "gros nouveau-né". Il n'est pas rare qu'à la suite d'une fécondation in vitro et d'un transfert nucléaire au cours desquels l'embryon est maintenu dans un milieu de culture in vitro avant d'être transféré chez une mère adoptive, on observe un développement fœtal anormal. Celui-ci conduit à la production d'un descendant ayant une taille anormalement élevée ce qui n'est pas sans poser des problèmes pour la mère et le nouveau-né au moment de la naissance.

**La deuxième critique concerne :** l'état de santé des animaux clonés. Comme il a été indiqué précédemment, trois situations sont observées actuellement :

- (i) Des clones qui présentent des anomalies graves et meurent au cours de la gestation,
- (ii) Des clones qui présentent des désordres réversibles mais survivent après la naissance,
- (iii) Des clones normaux. Dans ce contexte, les pratiques actuelles soulèvent des problèmes au regard des règles de bien-être animal dans la mesure où l'on peut affirmer que ces anomalies sont causées par la technologie utilisée (le clonage) et ne constituent pas un événement rare comme cela est observé dans les élevages classiques.

**La troisième critique du clonage :** porte sur le risque de perte de diversité génétique. En l'absence d'un contrôle génétique des individus obtenus par clonage, il existe un risque d'appauvrissement de la diversité génétique pouvant favoriser la dissémination d'anomalies à déterminisme génétique, l'apparition de nouveaux facteurs de susceptibilité à certaines maladies transmissibles ou au stress dans les conditions d'élevage.

Comme souvent dans les débats autour du bien-être des animaux d'élevage, les critiques des pratiques en vigueur font l'objet de travaux de recherche complémentaires et des solutions techniques le plus souvent acceptables sont proposées.

Cependant, dans la plupart des cas, ces recherches sont suivies par des modifications significatives des méthodes d'élevage. Le clonage doit être évalué de la même manière.

On peut raisonnablement imaginer que les problèmes soulevés aux points 1 et 3 puissent être mieux maîtrisés et donc devenir acceptables au regard des règles de bien-être.

---

Les réponses aux critiques portant sur la santé des animaux clonés seront plus difficiles à apporter dans la mesure où les anomalies observées semblent inhérentes à la technique du clonage.

Il est toutefois parfaitement concevable que les améliorations apportées aux techniques de clonage permettront d'atténuer les effets délétères actuellement observés.

---

## Conclusion générale

---

Les biotechnologies appliqués à la reproduction sont dans le droit prolongement de la démarche entamée lors de l'apparition de l'insémination artificielle : l'homme enrichit ses connaissances sur le fonctionnement des êtres vivants puis tente de le modifier. Ces technologies sont beaucoup plus complexes, plus exigeantes sur le plan technique et plus coûteuses que l'insémination artificielle.

Cependant, elles permettent de corriger les faibles capacités reproductives des femelles de certaines espèces, notamment l'espèce bovine, ouvrant ainsi toute la voie à une série d'applications en sélection et en élevage.

Ces potentialités nécessitent encore un double effort. D'une part, les coûts afférents aux techniques devront être impérativement diminués ce qui ne pourra être réalisé qu'à partir d'une meilleure compréhension des phénomènes biologiques impliqués. Par ailleurs, il conviendra de raisonner de manière plus rigoureuse qu'actuellement le devenir long terme des populations sélectionnées, notamment pour ne pas réduire inutilement leur variabilité génétique.

Ce risque, déjà bien mis en évidence avec le développement de l'insémination artificielle, s'accroît avec l'augmentation du pouvoir de diffusion des reproducteurs que permettent les biotechnologies.

Dans ce domaine, qui met en jeu l'avenir des ressources génétiques, le laissez-faire ne pourra seul prévaloir et il importe de susciter dès maintenant une prise de conscience internationale des nouveaux enjeux mais aussi des nouveaux risques qu'il faudra apprendre et maîtriser.



---

## Références bibliographiques

---

**Ariel M, Cedar H, McCarrey,** Developmental changes in methylation of spermato-genesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet* 1994 ; 7 : 59-63.

**Armstrong, D. T., Holm, P., Irvine, B., Peterson, B. A., Stubbings, R. B., McLean, D., Stevens,** Ascorbic acid exposure during biopsing and freezing of bovine in vivo embryos increases calving rate. *Proceeding du 26ème colloque de l'AETE*, 10-11 septembre 2010, Kuopio (Finlande), p. 184.

**AUSTIN EJ, MIHM M, EVANS ACO, KNIGHT PG, IRELAND JLH, IRELAND JJ, ROCHE JF** - Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of the follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle - *Biol Reprod*, 2001 ; 64: 839-848

**BENDER R. W., HACKBART K. S., CARVALHO P. D., SANDOVAL G. B., SOUZA A. H., DRESCH A. R., VIEIRA L. M., GUENTHER J. N., WILTBANK M. C.** Benet T. Martin RH. Sperm chromosome complements in a 47,XW man. *Hum Genet* 1988 ; 78

**Bernardini L, Borini A, Preti S, et al.** Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. *Hum Reprod* 1998 ; 13 : 3406-13.

**BO G. A., MAPLETOFT R. J. (2012).**

**Bonduelle M, A'toz A, Van Assche E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A.** Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998 ; 13 : 781-2.

**Bonduelle M, Camus M, De Vos A, et al.** Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod* 1999 ; 14 (suppl 1) : 243- 64.

**Boue J.G, Boue A.** Chromosomal anomalies in early spontaneous abortion (their consequences on early embryogenesis and in vitro growth of embryonic cells) . *Clin Top Pathol* 1976 ; 62 : 193-208.

**BOURGOIN G. et al. (2004).**

**Bowen JR, Gibson FL, Leslie GI, Saunders DM.** Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection [see comments] . *Lancet* 1998 ; 351 : 1529-34.

**Brackett, B. G., Bousquet, D., Boice, M. L., Donawick, W. J., Evans, J. F. et Dressel, M. A. 1982.** Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod*, 27. 147-58.

**CARVALHO P. D., SOUZA A. H., DRESCH A. R., VIEIRA L. M., HACKBART K. S., BENDER R. W., GUENTHER J. N., WILTBANK M. C., LUCHINI D., BERTICS S., BETZOLD N., SHAVER R. D. 2012,** Certification and identification of embryos (Chapter 9), *Manual of the International Transfer*

**Chan AW, Luegens CM, Dominko T, et al** Foreign DNA transmission by ICSI : injection of spermatozoa bound with exogenous DNA results in embryonic GFP expression and live rhesus monkey births. *Mol Hum &prad* 2000 ; 6 : 26-33.

**Chandley AC.** Chromosome anomalies and Y chromosome microdeletions as causal factors in male infertility. *Hum Reprod* 1998 ; 13 (suppl 1) : 45-50.

**CHASTANT-MAILLARD S, FOURNIER R, REMMY D -** Actualités sur le cycle de la vache - *Point Vet*, 2005 ; numéro spécial (36) : 10-15

**CHEVALIER P. (2012).** Clinical or ultrasound examination for selection of recipient heifers. *Proceeding du 30ème colloque de l'AETE*, 12-13 septembre 2014, Dresde (Allemagne), p. 104. *Clinical reproductive physiology of the cow. Current therapy in large animal theriogenology*, 2nd edition, Saunders Elsevier, pp. 258–269.

**DERIVAUX J, ECTORS F -** *Reproduction chez les animaux domestiques - 3ème édition revue.* Louvain-La-Neuve : Cabay, 1986, 1141 p.

**DOBSON H. (2003).** Does Flunixinmeglumin change the relation between pregnancy rate and a time of passage the transfer gun through uterus cervix into the place of embryo deposition in recipient heifers ? *Proceeding du 25ème colloque de l'AETE*, 11-12 septembre 2009, Poznan (Pologne), p. 156. Does the time needed to pass different transfer guns through the cervix and uterine body influence the pregnancy results in recipient heifers ? *Proceeding du 22ème colloque de l'AETE*, 8-9 septembre 2006, Zug (Suisse), p. 128.

Donor age effect on super ovulatory response of boer goat does. *Proceeding du 24ème colloque de l'AETE*, 12-13 septembre 2008, Pau (France), p. 190.

**Dozortsev D, De Sutter P, Dhont M.** Behaviour of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after intracytoplasmie spenn injection. *Hum. &prad* 1994 ; 9": 2139-44.

**Edwards RG, Tarin J, Dean N, Hirsch A, Tan SL.** Are spermatid injections into human oocytes now mandatory? *Hum Reprod* 1994 ; 9 : 2217-9. Effect of administration of FSH to prepubertal heifers on follicular developmental kinetics. *Proceeding du 17ème colloque de l'AETE*, 7-8 septembre 2001, Lyon (France), p. 116. Effect of family on number of bovine embryos obtained by flushing after superovulation. *Proceeding du 27ème colloque de l'AETE*, 9-10 septembre 2011, Chester (Angleterre), p. 210. Effect of lactation on circulating metabolic hormones postpartum and early embryo development in dairy cows. *Proceeding du 27ème colloque AETE*, 9-10 septembre 2011, Chester (Angleterre), p. 196. Effect of the modified superovulation protocol on the embryo development in cattle. *Proceeding du 29ème colloque de l'AETE*, 6-7 septembre 2013, Istanbul (Turquie), p. 146. Effect postpartum body weight change and circulating NEFAS on embryo production in super ovulated high producing dairy cows. *Proceeding du 28ème colloque de l'AETE*, 7-8 septembre 2012, Saint-Malo (France), p. 122. Efficacité génétique du transfert d'embryons dans les noyaux de sélection chez les bovins laitiers. *Génétique, Sélection, Evolution*, 17 (4), pp. 499-538.

**Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, et al.** Human male infertility : chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod* 2000 ; 6 : 93-105. Embryo genotyping from in vivo biopsied bovine embryos. *Proceeding du 24ème colloque de l'AETE*, 12-13 septembre 2008, Pau (France), p. 188.

**ENNUYER M** - Les vagues folliculaires chez la vache. Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction - *Point Vet*, 2000 ; 31 (209) : 377-383.

**ESTROUS CYCLES**, Characteristics. *Encyclopedia of dairy sciences*, 2nd edition (FUQUAY J. W. et al.), Academic Press, 4, pp. 428-433. Facteurs de variation de la production d'embryons chez la vache laitière de race Montbéliarde. Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 178 p. Fascicule Guide de la fertilité bovine, fourni par le laboratoire CEVA lors d'une conférence sur le site VetAgro-Sup (campus vétérinaire de Lyon) en 2014. Fate of donor cows and heifers after embryo flushing. *Proceeding du 26ème colloque de l'AETE*, 10-11 septembre 2010, Kuopio (Finlande), p. 234.

**Férec C, Verlingue C, Mercier B.** Le gène CFTR: agénésie des déférents et mucoviscidose, deux maladies pour un même gène. *Med Sei* 1996 ; 12 : 485-90.

**FIENI F, TAINTURIER D, BRUYAS JF, BATTU I** - Physiologie de l'activité ovarienne cyclique chez la vache – *Bull GTV*, 1995 ; 4 : 35-49

**Fishel S, Green S, Bishop M, et al.** Pregnancy after intracytoplasmic injection of sperm. Lancet 1995 ; 345 : 1641-2.

**G. et Seamark, R. F. 1992.** Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. Theriogenology, 38. 667-678.

**GELDHOT A. et al. (2000).** General hygiene and quality control practices in an embryo-production laboratory (Chapter 8), Manual of the International Transfer Society, 4th edition, pp. 73–85.

**GOVIGNON A., ROHOU A., PONSART C., DELCROIX P., HUMBLLOT P.** Guide de la fertilité bovine, CEVA.

**HAMILTON SH, GARVERICK HA, KEISLER DH, XU ZZ, LOOS K, YOUNGQUIST RS,** Characterization of follicle/cyst dynamics and associated endocrine profiles in dairy cows - Biol Reprod, 1995 ; 53 : 890-898

**Hamori M, Antoni K.** Chromosomal anomalies and malformations after ICSI without the use of PVP. Hum Reprod 1999 ; 14 (abstract book 1) : 58-9.

**Hewitson L, Dominko T, Takahashi D, et al.** Unique checkpoints during the first cell cycle of fertilization after intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkeys. Nat Med 1999 ; 5 : 431-3.

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/73-aete-proceedings-2000/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/74-aete-proceedings-2001/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/74-aete-proceedings-2001/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/75-aete-proceedings-2002/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/76-aete-proceedings-2003/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/76-aete-proceedings-2003/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/78-aete-proceedings-2005/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/79-aete-proceedings-2006/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/79-aete-proceedings-2006/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/80-aete-proceedings-2007/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/80-aete-proceedings-2007/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/81-aete-proceedings-2008/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/82-aete-proceedings-2009/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/83-aete-proceedings-2010/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/83-aete-proceedings-2010/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/83-aete-proceedings-2010/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/85-aete-proceedings-2012/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/85-aete-proceedings-2012/file>

<http://www.aete.eu/index.php/publications-aete/proceedings/87-aete-proceedings-2014/file>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4095965/>

<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00893660/document>

[https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/1317\\_UsageStimulaCroissProdAnimalPosExpertsGouv.pdf](https://www.inspq.qc.ca/pdf/publications/1317_UsageStimulaCroissProdAnimalPosExpertsGouv.pdf) (Consulté le 3 août 2016)

<https://www6.inra.fr/productions-animales/1998-Volume-11/Numero-1-1998/Les-biotechnologies-de-la-reproduction-chez-les-bovins-et-leurs-applications-reelles>

**HUMBLOT P. (1999).** Impact of the accuracy of the time interval between FSH injections on follicular quality in super ovulated cows. Proceeding du 20ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2001, Lyon (France), p. 190. In vivo production of bovine embryos using two feeding regimes differing in urea content. Proceeding du 18ème colloque de l'AETE, 6-7 septembre 2001, Rolduc (Pays-Bas), p. 194. Influence of an embryo or the recipient on pregnancy rate after embryo transfer in dairy cattle. Proceeding du 24ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France), p. 196. Influence of milk parameters on embryo production following superovulation in the montbeliard breed. Proceeding du 19ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2003, Rostock (Allemagne), p. 190. Influence of the different time components between flushing and transfer on pregnancy rates of fresh cattle embryos. Proceeding du 21ème colloque de l'AETE, 9-10 septembre 2005, Keszthely (Hongrie), p. 180.

**Jacobs P, Browne C, Gregson N, JoYce C, White H.** Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. ] Med Genet 1992 ; 29 : 103-8.

**Johnson MD.** Genetic risks of intracyto- plasmie sperm injection in the treatment of male infertility: recommendations for genetic counseling and screening. *Fertil Steril* 1998 ; 70 : 39T-411.

**Krausz C, Bussani-Mastellone C, Granchi S, McElreavey K, Scarselli G, Forti G.** Screening for microdeletions of Y chromosome genes in patients undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999 ; 14 : 1717-21. L'originalité de la surveillance sanitaire et vétérinaire du transfert embryonnaire bovin. *Bulletin Mensuel de la Société Vétérinaire Pratique de France*, 78 (4), pp. 193–204. La mortalité embryonnaire. 1. Aspects cliniques et facteurs étiologiques dans l'espèce bovine. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 143, pp. 91–118. La sécurité sanitaire dans le transfert d'embryons bovins, collectés in vivo, fécondés in vitro ou clonés. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 70 (2), pp. 183–194. La transplantation d'embryons chez les bovins. Thèse de doctorat vétérinaire, Toulouse, 294 p. La transplantation embryonnaire en France dans l'espèce bovine. Le stage de formation IMV-INRA. Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 132 p. La vache, un animal prédisposé à la torsion de l'utérus : étude de 145 cas. Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 96 p.

**LANDMAN B., RAMIREZ O., HAZELEGER W., MERTON S., MULLAART E.** Optimization of flushing procedures for embryo recovery in dairy cattle. *Proceeding du 22ème colloque de l'AETE*, 8-9 septembre 2006, Zug (Suisse), p. 138.

**Le Bourhis C, Krausz C, Dadoune JP, Fellous M.** Infertilité masculine : des anomalies moléculaires aux possibilités thérapeutiques. *Med Sei* 2000 ; 3 : 307-15.

**LE BOURHIS D., AMIGUES Y., CHARREAUX F., LACAZE S., TISSIER M., MOREL A., MERVANT G., MOULIN B., GONZALEZ C., HUMBLLOT P.** Le contrôle de qualité sanitaire du transfert d'embryons bovins : six années d'expérience française. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 66 (4), pp. 429–438.

**LEHLOENYA K. C., GREYLING J. P. G., GROBLER S.** Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles en sélection. *INRA productions animales*, 11 (1), pp. 41-56. Les hormones de la reproduction, *Reproduction Des Animaux D'élevage*. 3<sup>e</sup> édition. Educagri Editions, pp. 34–53.

**LINDEBERG H., KANADEN-ANTTILA K., VARTIA K., AALTO J., HALMEKYTO M., SALAHEDDINE M., DE LOOS F.** Lissens W, Mercier B, Tournaye H, et al. Cystic

fibrosis and infertility caused by congenital bilateral absence of the vas deferens and related clinical entities. *Hum Reprod* 1996 ; 11 (suppl 4) : 55-78 et 79-80.

**Loft A, Petersen K, Erb K, et al** A Danish national cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994-1997. *Hum Reprod* 1999 ; 14 : 2143-8.

**Iritani A.** Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. *Mol Reprod Dev* 1991 ; 28: 199-207.

**Luebens CM, Payne C, Schatten G.** Nonrandom chromosome positioning in human sperm and sex chromosome anomalies following intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1999 ; 353 : 1240.

L'usage des stimulateurs de croissance en production animale : position des experts et des gouvernements : revue des connaissances scientifiques [en ligne]. Direction de la santé environnementale et de la toxicologie, Institut national de santé publique du Québec, 57 p.

**MCNATTY KP, HEATH DA, LUNDY T, FIDLER AE, QUIRKE L, O'CONNELL A, SMITH P, GROOME N, TISDALL DJ** - Control of early ovarian follicular development - *J Reprod Fertil Suppl*, 1999 ; 54 : 3-16

**MEREDITH MJ** - Animal breeding and infertility - UK : Blackwell Science, 1995, 508 p.

**MIALOT JP, CONSTANT F, CHASTANT-MAILLARD S, PONTER AA, GRIMARD B** - La croissance folliculaire ovarienne chez les bovins : nouveautés et applications - Journées Européennes de la Société Française de Buiatrie, Paris, Novembre 2001 : 163-168.

Milk production and energy metabolism affect embryo production in montbeliarde dairy cattle in France. Proceeding du 17ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2001, Lyon (France), p. 142.

**MONGET P, FABRE S, MULSANT P, LECERF F, ELSEN JM, MAZERBOURG S, PISSELET C, MONNIAUX D** - Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic mammals - *Domest Anim Endocrinol*, 2002 ; 23 (1-2) : 139-154

**MONTMEAS L. (2013).** New insight on cryopreservation of oocytes and embryos. Proceeding du 30ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2014, Dresde (Allemagne), pp. 61-76.

**NOORDMAN J. W. J., MULLAART E., KNIJN H. M., MERTON J. S.** Organisation Mondiale de la Santé Animale Office International des Epizooties (2015). Collecte et manipulation des embryons du bétail et d'équidés collectés in vivo. Code sanitaire pour les animaux terrestres. 24ème édition, 1, pp. 148-155. Organisation Mondiale de la Santé



Animale Office International des Epizooties (2015). Collecte et manipulation des embryons du bétail et d'équidés collectés in vivo. Code sanitaire pour les animaux terrestres. 24ème édition, 1, pp. 148–155. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992 ; 340 : 17-8. Palermo GD, Schlegel PN, Sills ES, et al. Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med* 1998 ; 338 : 588-90.

**P, Brandenburg H, Verhoeff A, Dhont M, Los F.** Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 1995 ; 346 : 773. Intérêt de l'insémination artificielle et du transfert d'embryon dans l'amélioration génétique des bovins. *Le Point Vétérinaire*, 28 (185), pp. 9–16. Intérêt de la transplantation embryonnaire en race bovine Charolaise. Thèse de doctorat vétérinaire, Lyon, 77 p. It is possible to increase the number of viable embryos using progestagen ear implants 1-3 days before standard superovulation with low response cows or low fertility cows. *Proceeding du 16ème colloque de l'AETE*, 8-9 septembre 2000, Santander (Espagne), p. 186.

**Pang MG, Hoegerman SF, Cuticchia AJ, et al,** Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999 ; 14 : 1266-73.

**Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, et al.** Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 1999 ; 284: 1180-3.

**PETERS AR, BALL PJH** - *Reproduction in cattle*, second edition – UK : Blackwell Science, 1995, 234 p. Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes (Appendix D), *Manual of the International Transfer Society*, 4th edition, pp. 131–140.

**PINARD P. (1981).** PMSG priming during the cycle preceding superovulation improves embryo quality in dairy heifers. *Proceeding du 17ème colloque de l'AETE*, 7-8 septembre 2001, Lyon (France), p. 126.

**PONSART C., QUINTON H., ROHOU A., KEHLEMBO J., BOURGOIN G., HUMBLOT P.** Progesterone levels, corpus luteum quality and pregnancy rates in heifers treated with propylene glycol prior to embryo transfer. A Field trial. *Proceeding du 18ème colloque AETE*, 6-7 septembre 2002, Rolduc (Pays-Bas), p. 180.

**Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, et al.** Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997 ; 336: 534-9.

**PURSLEY J. R., MEE M. O., WILTBANK M. C.** Recent advances in the control of follicular development and superovulation protocols in cattle. Proceeding du 28ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2012, Saint-Malo (France), pp. 57–68. Recommendations for the sanitary handling of in vivo-derived embryos (Chapter 6), Manual of the International Transfer Society, 4th edition, pp. 65–68. Refining propylene-glycol dosage prior to embryo transfer. A Field trial. Proceeding du 21ème colloque de l'AETE, 9-10 septembre 2005, Keszthely (Hongrie), p. 144. Relations between energy balance and reproduction in high yielding dairy cows. Proceeding du 20ème colloque AETE, 10-11 septembre 2004, Lyon (France), p. 96. Repeatable use of Holstein-Friesian heifers as embryo donors in a commercial embryo recovery program. Proceeding du 21ème colloque de l'AETE, 9-10 septembre 2005, Keszthely (Hongrie), p. 164. Reproduction assistée chez les bovins. Insémination et transfert d'embryons : perspectives. *Le point Vétérinaire*, 37 (spécial : Reproduction des ruminants : gestation, néonatalogie et post-partum), pp. 26–31. Risks of transmissible diseases in relation to embryo transfer. Proceeding du 17ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2001, Lyon (France), pp. 71–81.

**ROBERTSON I., NELSON R. E. (2010).** Sanitary control in bovine embryo transfer : where practice meets science. Proceeding du 24ème colloque AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France), pp. 95–116.

**SANTOS FILHO A. S., GUIDO S. I., BARTOLOMEU C. C., OLIVEIRA J. C. V.** Super ovulatory response in old dairy cows. Proceeding du 26ème colloque de l'AETE, 10-11 septembre 2010, Kuopio (Finlande), p. 224.

**SCHIEWE M. C., HASLER J. F. (2010).** Schlegel PN. Debate : Is ICSI a genetic time bomb ? No : ICSI is safe and effective. *J Androl* 1999 ; 20 : 18-22.

**SERRE M. (1999).** Sex determination in bovine embryos by micro-aspiration results of five years practice under farm conditions. Proceeding du 16ème colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2000, Santander (Espagne), p. 150. Sexing and direct transfer of bovine biopsied frozen-thawed embryos under-on-farm conditions in a commercial program. Proceeding du 23ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2007, Alghero (Italie), p. 188.

**SLEZAKOVA M., HEGEDUSOVA Z., RIHA J.** Society, 4th edition, pp. 86–105. Sources of variation of embryo production after superovulation in prim Holstein dairy cows. Proceeding du 16ème colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2009, Santander (Espagne), p. 158. Sources of variation of pregnancy rates after transfer of bovine frozen embryos. Proceeding du 16ème colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2000, Santander (Espagne), p. 192. sperm cells. Hum Reprod 1998 ; 13 (suppl 1) : 1 17-27.

**SP, Payne D, Matthews CD.** Fertilization failures and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998 ; 13 (suppl 1) : 155-64. From non-surgical embryo transfer to somatic cloning in cattle : technical challenges and hurdles to the use of reproductive biotechnologies. Proceeding du 26ème colloque de l'AETE, 10-11 septembre 2010, Kuopio (Finlande), pp. 7–17.

**STEVENSON J. F. (2007).** Stress and reproduction. Proceeding du 19ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2003, Rostock (Allemagne), pp. 105–113.

**STRINGFELLOW D. A. (2010).** Super ovulation in perspective. Proceeding du 18ème colloque de l'AETE, 6-7 septembre 2002, Rolduc (Pays-Bas), pp. 120–128. Super ovulatory responses and embryo production in ruminants : lessons from ovary. Proceeding du 28ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2012, Saint-Malo (France), pp. 7–40. Superovulation by split FSH dose in beef cows. Proceeding du 26ème colloque de l'AETE, 10-11 septembre 2010, Kuopio (Finlande), p. 150. Sutcliffe AG, Taylor B, Li L, Thornton S, Grudzinski JG, Llebennan BA. Children born after intracytoplasmic sperm injection : population control study. Br Med J 1999 ; 319: 704-5. 111/S nO 1, vol. 17, janvier 2001 Synchronisation des chaleurs chez les vaches allaitantes par l'association GnRH-PGF2 $\alpha$ -GnRH. Thèse de doctorat vétérinaire, Maisons-Alfort, 68 p. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. Theriogenology, 44 (7), pp. 915–923.

**Tanaka M, Puchyr M, Gertsenstein M, et al.** Parental origin-specific expression of Mash2 is established at the time of implantation with its imprinting mechanism highly resistant to genome-wide demethylation. Mech Dev 1999 ; 87 : 129-42.

**Tesarik J, Mendoza C, Testart J.** Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. N Engl J Med 1995 ; 333 : 525.

**Testart J, Gautier E, Brami C, Rolet F, Sedbon E, Thebault A.** Intracytoplasmic sperm injection in infertile patients with structural chromosome abnormalities. Hum Reprod 1996 ; 11

1 : 2609-12. The effect of animal regrouping on the results of a bovine in vivo embryo production program. Proceeding du 24ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France), p. 164. The effect of ketoprofen on the growth of ovulatory follicle and ovulation in dairy cows. Proceeding du 19ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2003, Rostock (Allemagne), p. 171. The effect of season on the results of superovulation and embryo transfer in beef cattle. Proceeding du 23ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2007, Alghero (Italie), p. 234. The European embryo transfer industry in cattle - a challenge in 1984, a success in 2014 - and well supported and reported by the AETE. Proceeding du 30ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2014, Dresde (Allemagne), pp. 31–44. The ovarian cycle. *Reproduction in cattle*, 3rd edition. Blackwell Science, pp. 23–46. The use of agarose in the freezing of sexed bovine embryos. Proceeding du 22ème colloque de l'AETE, 8-9 septembre 2006, Zug (Suisse), p. 106.

**THIBIER M., GUERIN B. (1997).** Transplantation embryonnaire bovine - le transfert direct : une nouvelle opportunité. *Bulletin des Groupements Techniques Vétérinaires*, 1998 (5), pp. 13–19.

**Tuerlings JH, de France HF, Hamers A, et al** Chromosome studies in 1792 males prior to intra-cytoplasmic sperm injection : the Dutch experience. *EUT J Hum Genet* 1998 ; 6 : 194-200. Use of double-flush technique to improve embryo recovery results in super ovulated high producing dairy cows. Proceeding du 28ème colloque de l'AETE, 7-8 septembre 2012, Saint-Malo (France), p. 106. Using of sex-sorted insemination doses in superovulation. Proceeding du 25ème colloque de l'AETE, 11-12 septembre 2009, Poznan (Pologne), p. 186. Utilisation de l'insémination artificielle et du transfert embryonnaire en France, leur impact sur la limitation des problèmes sanitaires. Proceeding du colloque Biotechnologies de la reproduction animale et sécurité sanitaire des aliments, 29 septembre 1999, Paris (France), pp.

**Van Wagendonk-de Leeuw, A. M., Mullaart, E., de Roos, A. P., Merton, J. S., den Daas, J. H., Kemp, B. and de Ruigh, L., 2000,** Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring, *Theriogenology*, vol.53 (no.2), 575-97.

**Vanderzwalmen P, Lejeune B, Nijs M, Segal-Bertin G, Vandamme B, Schoysman R.** Fertilization of an oocyte microinseminated with a spennatid in an in vitro fertilization programme. *Hum Refrod* 1995 ; 10: 502-3. Variability of the different time components

between flushing and transfer or freezing of a cattle embryos. Proceeding du 20ème colloque de l'AETE, 10-11 septembre 2004, Lyon (France), p. 114.

**Viville S, lefevre L.** Empreinte génomique, comportement maternel et conflit d'intérêt reproductif. *Med Sei* 1999 ; 4 : 528-34.

**Viville S, Mollard R, Bach M, Falquet C, Gerlinger P, Warter S.** Case report: do morphological anomalies reflect chromosomal aneuploidies ? *Hum Refrod* 2000; 15 : 2563-6.

**WEBB R, CAMPBELL BK, GARVERICK HA, GONG JG, GUTIERREZ CG, ARMSTRONG DG** - Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection - *J Reprod Fertil Suppl*, 1999 ; 54 : 33-48

**WEBB R, GARNSWORTHY PC, GONG JG, ARMSTRONG DG** - Control of follicular growth : local interactions and nutritional influences - *J Anim Sci*, 2004 ; 82 (E. Suppl.) : E63-E74

**WEBB R, NICHOLAS B, GONG JG, CAMPBELL BK, GUTIERREZ CG, GARVERICK HA, ARMSTRONG DG** - Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle - *Reprod Suppl*, 2003 ; 61 : 71-90

**WOLGAST T., DETTERER J., REUSS W., SCHMIDT T., MEINECKE-TILLMANN S.** Improvement of embryo recovery rates by modified flushing techniques in Holstein cattle at a commercial embryo transfer station. Proceeding du 24ème colloque de l'AETE, 12-13 septembre 2008, Pau (France), p. 240.

**Xu X, Toselli PA, Russell LD, Seldin DC.** Globozoospermia in mice lacking the casein kinase II  $\alpha'$  catalytic subunit. *Nat Genet* 1999 ; 23 : 118-21.

**Zech H, Vanderzwalmen P, Prapas Y, Lejeune B, Duba E, Schoysman R.** Congenital malformations after intracytoplasmic injection of spermatozoa. *Hum Reprod* 2000 ; 15: 969-71.

