

(6)

BA_TH250
AG 178455

CIRAD-EMVT
Campus de Baillarguet
B.P. 5035
34032 MONTPELLIER Cedex 1

Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort
7, avenue du Général de Gaulle
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Institut National Agronomique
Paris-Grignon
16, rue Claude Bernard
75005 PARIS

Muséum National d'Histoire Naturelle
57, rue Cuvier
75005 PARIS

27 MAI 1999

**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

MEMOIRE DE STAGE

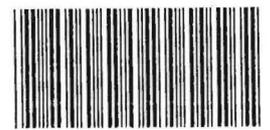
CIRAD-Dist .
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet

**TRANSFERT EMBRYONNAIRE CHEZ LES BOVINS :
FACTEURS DE VARIATION DES TAUX DE GESTATION APRES
TRANSFERT D'EMBRYONS BIOPSIES FRAIS ET CONGELES
DANS LE CADRE DU SEXAGE**

par

Samir OUBBEA

Année universitaire 1997-1998



TH02840

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

**TRANSFERT EMBRYONNAIRE CHEZ LES BOVINS :
FACTEURS DE VARIATION DES TAUX DE GESTATION APRES
TRANSFERT D'EMBRYONS BIOPSIES FRAIS ET CONGELES
DANS LE CADRE DU SEXAGE**

par

Samir OUBBEA

**CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet**

Lieu de stage : Maisons-Alfort (France)

Organisme d'accueil : Laboratoire de l'Union Nationale des Coopératives d'Élevage et
d'Insémination Artificielle (UNCEIA)

Période de stage : 15 avril 1998 - 21 septembre 1998

Rapport présenté oralement le : 9 octobre 1998

REMERCIEMENTS

*Je remercie Monsieur B. Guérin chef des services techniques de l'UNCEIA
Pour m'avoir permis de suivre mon stage au laboratoire de transfert
embryonnaire.*

*J'adresse mes remerciements les plus vifs au Docteur M. Nibart pour son
encadrement, son soutien, et ses précieux conseils. Je lui suis reconnaissant
pour toute son aide.*

Je remercie Docteur P. Humblot pour l'analyse statistique des résultats.

*Je remercie le Professeur Duvallet, directeur des études au CIRAD de
Montpellier pour tous ses efforts.*

*J'adresse toute ma gratitude au Docteur C. Meyer pour m'avoir aidé à
trouver ce stage.*

*Je remercie tous les enseignants du CIRAD, ainsi que les secrétaires.
J'exprime toute ma reconnaissance à Alexandre Morel pour la quantité et
la qualité de travail qu'il a fourni dans le cadre de cette étude, ainsi
que l'équipe de l'UCEAR (Châteauvillain).*

*Ma chaleureuse amitié va à toute l'équipe du laboratoire, et plus
particulièrement à S. Khodja, M. Lafri et A. Ambrona.*

SOMMAIRE

RESUME

INTRODUCTION	1
I PREMIERE PARTIE : TRANSFERT EMBRYONNAIRE	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	1
1- DEFINITION DU TRANSFERT EMBRYONNAIRE	2
2- DEVELOPPEMENT EN FRANCE ET DANS LE MONDE	2
3- ASPECTS ECONOMIQUES : INTERETS ET COUTS	2
4- ASPECTS TECHNIQUES	5
4.1 METHODES	5
4.1.1 PRODUCTION ET LA COLLECTE D'EMBRYONS	5
4.1.2 RECHERCHE , JUGEMENT DE LA QUALITE ET RINCAGE DES EMBRYONS	5
4.1.3 CONSERVATION	6
4.1.4 TRANSFERT EN RECEVEUSE	6
4.2 RESULTATS	7
5- CONCLUSION	7
II. DEUXIEME PARTIE : SEXAGE DE L'EMBRYON BOVIN	
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	8
1.1 METHODE ACTUELLE	
1.1.1 CHOIX ET RINCAGE DES EMBRYONS	8
1.1.2 BIOPSIE	9
1.1.3 CONSERVATION DE L'EMBRYON BIOPSIE AVANT TRANSFERT FRAIS	9
1.1.4 IDENTIFICATION	9
1.1.5 SEXAGE DES BIOPSIES	12
1.2 RESULTATS	15
1.2.1 SEXAGE	16
a) SPECIFICITE	15
b) SENSIBILITE	15
c) EFFICACITE	15

d) EXACTITUDE	15
e) SEX-RATIO	15
1.2.2 TAUX DE GESTATION APRES TRANFERT D'EMBRYONS BIOPSIES FRAIS	16
2. BUT DU TRAVAIL	20
3. STRUCTURE D'ACCUEIL	21
4. TRAVAIL PERSONNEL	22
4.1 TAUX DE GESTATION APRES TRANSFERT D'EMBRYONS BIOPSIES FRAIS ET CONGELES : SOURCES DE VARIATION DES TAUX DE GESTATION SELON LES PROTOCOLES UNCELA	22
4.2 MATERIEL ET METHODES	23
4.2.1 EMBRYON	23
4.2.1.1 CHOIX DES EMBRYONS	
4.2.1.2 BIOPSIE DES EMBRYONS	25
4.2.1.3 OPERATEUR	25
4.2.1.4 CONGELATION	27
4.2.1.5 DECONGELATION	33
4.2.1.6 TRANSFERT EN RECEVEUSES	33
4.2.2 ENREGISTREMENT DES DONNEES	33
4.3 RESULTATS	35
4.3.1 SEXAGE ET TAUX DE GESTATION	35
4.3.2 SEX-RATIO	41
4.4 DISCUSSION ET INTERPRETATION	45
4.5 CONCLUSION	49
CONCLUSION GENERALE	50
ANNEXES	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Technique de biopsie d'un embryon bovin

Figure 2 : Technique de biopsie par aspiration

Figure 3 : Technique de sexage

Figure 4 : Amplification de l'ADN par PCR

Figure 5 : Evolution d'un embryon et ses principales caractéristiques

Figure 6 : Technique de biopsie d'embryon de bovin par micro-couteau

Figure 7 : Programme de congélation équilibrée pour l'embryon bovin

Figure 8 : Congélation des embryons biopsiés en éthylène glycol pour transfert direct

Figure 9 : Congélation des embryons biopsiés en glycérol saccharose

Tableau 1 : Evolution récente de l'activité de transfert d'embryon bovin en Europe et en France.

Tableau 2 : Estimation après modélisation des coûts de production de 8 équipes françaises de T.E .

Tableau 3 : Taux d'efficacité du sexage d'embryons bovins selon la technique de prélèvement

Tableau 4 : Taux d'exactitude du sexe des embryons biopsiés par micro-couteau.

Tableau 5 : Sex-ratio d'embryons biopsiés et sexés et de veaux nés de transfert d'embryon non biopsiés.

Tableau 6 : Taux de gestation d'embryons bovins de qualité 1 biopsiés, sexés, et transférés frais.

Tableau 7 : Taux de gestation d'embryons bovins de qualité 1 et 2 selon leur condition de conservation.

Tableau 8 : Facteurs de variation et classes prises en compte dans l'analyse des taux de gestation

Tableau 9 : Sexage des embryons biopsiés au micro -couteau selon le nombre de cellules prélevées

Tableau 10 : Sexage des embryons biopsiés au micro -couteau selon la qualité

Tableau 11 : Sexage des embryons biopsiés au micro couteau selon le stade

Tableau 12 : Taux de gestation selon les méthodes de conservation et les opérateurs.

Tableau 13 : Taux de gestation selon la parité

Tableau 14 : Taux de gestation selon le sexe de l'embryon

Tableau 15 : Taux de gestation des embryons biopsiés puis congelés à l'éthylène glycol et transférés selon le stade

Tableau 16 : Taux de gestation des embryons jugés par l'opérateur 2 selon le stade

Tableau 17 : Taux de gestation des embryons congelés à l'éthylène glycol selon la qualité de l'embryon

Tableau 18 : Taux de gestation des embryons (frais et congelés) selon la qualité de l'embryon et la parité de la receveuse.

Tableau 19 : Sex-ratio selon la qualité des embryons biopsiés.

Tableau 20 : Source de variation de taux de gestation

RESUME

Parmi les biotechnologies au service de la reproduction, le transfert embryonnaire et le sexage des embryons sont celles qui sont l'objet des principales avancées scientifiques et techniques permettant leur développement sur le terrain.

Le sexage est désormais largement utilisé en France à partir de l'outil mis au point par la filière INRA-Rhône Merieux -UNCEIA. La méthode de sexage des embryons par mise en évidence dans quelques cellules (biopsié), par technique PCR, d'une séquence spécifique de l'ADN du chromosome Y, s'est avérée efficace (95 %) et exacte (100 %).

Le taux de gestation des embryons biopsiés (micro- couteau) et sexés sont intéressants si l'on modifie le milieu de congélation (éthylène glycol) : 57,9 %, ce taux est presque équivalent à celui des embryons sexés et transférés frais : 59,1 %.

En ce qui concerne les éleveurs, le sexage des embryons leur permet un certain retour de leur investissement, du fait de l'obtention à un très haut niveau de sécurité de veaux du sexe désiré à partir d'un accouplement donné, et d'une meilleure gestion de leurs receveuses. La congélation de l'embryon biopsié permettrait de dissocier les opérations de biopsies et de sexage et de réduire les coûts, encore élevés actuellement.

Mots clés :

Reproduction, transfert embryonnaire, biopsie, sexage, congélation, bovin ,France

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Il est classiquement reconnu quatre générations de biotechnologies au service de la reproduction (THIBIER, 1990). Les deux premières : l'insémination artificielle (I.A.) et le transfert embryonnaire (T.E.) sont les plus utilisées dans le monde. Le T.E. à été à l'origine de plusieurs autres générations, telles que le sexage de l'embryon, la production d'embryon In vitro, le clonage, la transgènes. Elles sont à ce titre l'objet d'intenses investigations scientifiques et techniques afin de permettre à l'éleveur de pouvoir en tirer tous les bénéfices dans des limites d'investissement compatibles avec la gestion de son entreprise agricole.

Les premières tentatives de sexage des embryons de mammifère avant leur transfert remontent aux années 1980. Elles étaient fondées sur les possibilités offertes par l'analyse du caryotype des cellules (PICARD et al., 1985). Avec cette méthode l'analyse chromosomique d'une vingtaine de cellules, voire de la moitié de l'embryon ne permet un diagnostic du sexe que dans 30 à 60 % des cas.

Une autre technique est la détection immunologique de l'antigène membranaire d'histocompatibilité H-Y considéré comme exprimé spécifiquement dans les tissus mâles (WACHTEL et al., 1988; BOOMAN et al., 1989). Faute de résultats satisfaisants, cette technique ne peut être utilisée en routine chez les bovins.

L'identification de sondes d'ADN du chromosome Y bovin (BISHOP et al., 1987; ELLIIS et HARPOLD, 1993) et le développement parallèle de techniques d'amplification de l'ADN par la réaction de polymérisation en chaîne (P.C.R.), ont permis de déceler le sexe à 95 %. Cette opération est réalisée à partir d'une biopsie comportant quelques cellules prélevées sur l'embryon (KOHEN et al., 1990 ; NIBART, 1991). Le sexage devint une réalité en France depuis 1990.

Dans une première partie, le T.E. sera présenté dans ses aspects techniques et économiques.

La deuxième partie, présente l'étude bibliographique qui concerne les techniques de biopsies et de sexage telles qu'elles sont utilisées actuellement en France.

Dans une troisième partie, seront présentés les facteurs de variations des taux de gestation après transfert d'embryons biopsiés et l'analyse des résultats.

Nos travaux pratiques au sein de l'UNCEIA (Châteauvillain et Maisons-Alfort) ont porté sur :

- La collecte des embryons sur des génisses ou des vaches en station
- La recherche et le jugement de la qualité des embryons
- La congélation des embryons
- La participation à des biopsies par micro-couteau réalisées au laboratoire T.E. de Châteauvillain(Isère)
- La participation au sexage des biopsies ainsi qu'aux activités T.E. et OPU (ovum pick up) de la station de Châteauvillain.

I- PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LE TRANSFERT EMBRYONNAIRE

1-DEFINITION

Le transfert embryonnaire est une méthode de reproduction artificielle qui consiste à prélever après fécondation le ou les embryons encore libres dans l'appareil génital d'une femelle, dite donneuse, pour le ou les transplanter dans l'appareil génital d'une ou plusieurs femelles, dites receveuses dans lequel le ou les embryons vont se développer jusqu'à la naissance (NIBART, 1991).

2-DEVELOPPEMENT EN FRANCE ET DANS LE MONDE

Le transfert embryonnaire s'est désormais élargi à l'ensemble de la planète (THIBIER, 1987) et représente environ 300 000 transferts en 1990.

L'Europe occidentale transfère approximativement autant d'embryons que l'Amérique du Nord. Cette biotechnologie connaît ces dernières années une progression régulière en Europe et en France. Cependant, le nombre de transplantation d'embryons reste très faible par rapport à celui des inséminations artificielles (23 millions en Europe, dont 5 millions en France en 1995).

Les statistiques de l'association européenne de transfert embryonnaire (AETE) 1993-1996, montrent qu'un peu plus de 117 000 embryons ont été transférés en Europe en 1996 (Tableau 1). La France occupe la première place avec plus de 28 000 embryons transplantés dont 54 % à l'état frais.

3- ASPECTS ECONOMIQUES, INTERETS ET COUTS

L'intérêt principal du T.E. est évidemment génétique ; il permet d'augmenter la descendance des meilleures femelles d'une race donnée. Il permet aussi la production de reproducteurs mâles en vue de leur utilisation en I.A. après testage.

Il y a également d'autres intérêts : transport facile du matériel génétique sous forme d'embryon congelé d'un pays à l'autre avec une haute sécurité sanitaire, conservation de races en voies de disparition ainsi que reconstitution plus rapide de troupeaux d'élite.

Bien que les applications du T.E. soient nombreuses, le développement est lent par rapport à l'I.A.; cette lenteur de développement tient principalement au coût de cette technique (Tableau 2) obtenu par modélisation des coûts de production en T.E.; le coût de l'I.A.et le coût de la synchronisation n'ont pas été pris en considération.

Etant donné les prix actuels pratiqués par les équipes de T.E.adhérentes à l'UNCEIA, le coût d'une gestation femelle s'établit à 3 700 FF selon ROHOU (1996).

Il est vrai que le transfert embryonnaire demeure une technologie bien plus coûteuse que l'I.A. Ceci est la raison pour laquelle, cette technique doit être seulement mise en œuvre là où elle est justifiée économiquement.

Tableau 1 : Evolution récente (1993-1996) de l'activité de transfert d'embryon bovins en Europe et en France (Source : Association Européenne de T.E. (AETE)).

	1993	1994	1995	1996
Nombre de femelle collectées	21 542	22 557	25.075	24 133
Dont en France	6 680	5 890	6 680	6 657
Nombre d'embryons collectés	176 470	194 589	215 046	214 293
Dont en France	50 270	55 249	60 298	56 797
Nombre d'embryons transplantés	96 470	102 887	112 531	117 948
Dont congelés (%)	46 263(48%)	54 485(53%)	60 848(54%)	55 786(47%)
Dont nombre transplantés en France	22 744	24 288	27 260	28 793
Dont congelés (%)	9 915(44%)	10 644(44%)	12 505(46%)	13 105(46%)
Stock d'embryons congelés	46 986	48 062	62 008	54 586
Dont en France	14 404	14 404	19 803	12 396

Tableau 2: Estimation, après modélisation, des coûts de production de 8 équipes françaises de T.E. : (1) à l'embryon, (2) à la gestation, (3) à la gestation femelle, cité par ROHOU (1996)

Coûts HT	Equipe 1	Equipe 2	Equipe 3	Equipe 4	Equipe 5	Equipe 6	Equipe 7	Equipe 8	Moyenne
Coût par embryon (1)	1 181,58 FF	862,63 FF	948,68 FF	763,68 FF	985,26 FF	876,32 FF	971,26 FF	888,95 FF	935 FF
Coût par gestation (2)	2 004,46 FF	1 463,39 FF	1 609,38 FF	1 295,54 FF	1 671,43 FF	1 486,61 FF	1 647,68 FF	1 508,04 FF	1 586 FF
Coût par gestation femelle (3)	4 008,92 FF	2 926,78 FF	3 218,76 FF	2 591,08 FF	3 342,86 FF	2 973,22 FF	3 295,36 FF	3 016,08 FF	3 172 FF

4-ASPECTS TECHNIQUES

Le T.E. est une technique qui regroupe 4 étapes indispensables, la stimulation ovarienne par traitement hormonal des femelles donneuses et leur insémination, la collecte des embryons 6 à 8 jours après l'insémination, le jugement de leur qualité avec la possibilité de les conserver par le froid, et leur implantation chez les femelles receveuses (NIBART et BOUYSSOU 1981; CHUPIN, 1985; NIBART, 1991).

4.1 METHODES

4.1.1 PRODUCTION ET COLLECTE D'EMBRYON

La stimulation ovarienne est effectuée par injection d'hormones gonadotropes à activité FSH pendant la phase lutéale à partir du 11^{ème} jour (9/14 j) du cycle sexuel ou au cours d'un traitement de maîtrise des cycles sexuels .

Deux types d'hormones sont utilisées pour la production d'embryons : La FOLLICULE STIMULATING HORMONE (FSH) par plusieurs injections intramusculaires (CHUPIN, 1988), ou une injection intramusculaire par la PREGNANT MARE SERUM GONADOTROPIN (PMSG) ou EQUINE CHORIONIQUE GONADOTROPINE (ECG) (SAUMANDE, 1995) . Les femelles sont généralement inséminées deux fois : 12 et 24 heures après le début des chaleurs (NIBART, 1991; CHEMINEAU et al., 1991).

Les embryons sont collectés dans l'utérus, entre j6 et j8 du cycle (j0=jour des chaleurs).

La collecte consiste à rincer les cornes utérines à l'aide d'une solution de tampon phosphate (PBS) additionnée d'albumine bovine sérique (BSA) et d'antibiotiques.

Un volume de 400 à 600 ml est injecté dans chacune des cornes utérines et récupéré par l'intermédiaire d'une sonde de collecte mise en place par le col de l'utérus.

4.1.2 RECHERCHE, JUGEMENT DE LA QUALITE ET RINCAGE DES EMBRYONS

La recherche et l'examen des embryons dans le liquide doit se faire avec du matériel stérile, dans les meilleurs conditions de propreté et à température du laboratoire (20-25°C).

Après décantation ou filtration du liquide de récolte, le décantât ou le filtrat est examiné à la loupe binoculaire (grossissement 10 à 60). Le jugement de la qualité des embryons est basé sur l'observation morphologique (voir la deuxième partie).

Avant utilisation immédiate ou conservation, il est obligatoire, tant au plan scientifique qu'au plan réglementaire, de laver les embryons à zone pellucide intacte dans dix bains successifs de solution tamponnée adéquate stérile. Ceci est destiné à l'obtention d'un milieu stérile dans lequel baigne l'embryon congelé ou transféré (Arrêté ministériel et Directive CEE France).

4.1.3 CONSERVATION

Entre le moment où ils sont récupérés et celui où ils sont remis en place dans l'utérus des receveuses, les embryons doivent être maintenus en survie. Le milieu de survie de courte durée est un milieu tamponné en phosphate de sodium (PBS). Ce milieu de pH 7,2 et pression osmotique de 290 milliosmoles, contient de nombreux sels minéraux, du glucose et des protéines (BSA ou sérum de veau fœtal) (WHITTINGHAM, 1971).

Dans les conditions pratiques, les meilleurs résultats de gestation sont obtenus lorsque les transferts sont réalisés dans les 6 heures après la récolte des embryons maintenus à 20°C in vitro. Au-delà de ce délai, il est nécessaire de réfrigérer l'embryon entre 0 et 4°C dans un milieu de conservation identique (THIBIER et NIBART, 1995). Dans ces conditions, l'embryon peut être conservé 24 heures avant transfert. Pour conserver l'embryon plus longtemps, il est nécessaire de le congeler et de le stocker dans l'azote liquide à -196°C (RENARD, 1985).

4.1.4 TRANSFERT EN RECEVEUSES

Après jugement de la qualité des embryons selon les critères morphologiques, ces derniers sont transférés sur des receveuses synchrones (après synchronisation ou chaleurs naturelles), dans la corne utérine adjacente à l'ovaire portant le corps jaune.

Les embryons à l'état frais ou congelés peuvent être transférés selon les deux méthodes suivantes :

-METHODE CHIRURGICALE

Elle consiste à déposer l'embryon à l'aide d'une pipette après perforation de la corne utérine adjacente au corps jaune. Cette méthode est réalisée grâce à l'incision du flanc de la receveuse (laparotomie) sous anesthésie locale. Cette méthode n'est pratiquement plus utilisée en France sauf pour remettre en place des embryons congelés de type Holstein de très haute valeur génétique importés de l'étranger.

-METHODE CERVICALE

Elle consiste à déposer l'embryon dans la lumière utérine à l'aide d'un pistolet de transfert en passant par les voies naturelles.

4.2 RESULTATS

Le transfert embryonnaire est en progression régulière en France : 6 657 femelles ont été collectées et plus de 28 000 embryons transplantés en 1996 dont 54 % à l'état frais (AETE, 1997). Le nombre moyen d'embryons collectés est de 9 (écarts de 0 à 50) et celui d'embryons utilisables est de 5 (écarts de 0 à 30). Cette variabilité des résultats est due à la donneuse et à d'autres facteurs de variations qui peuvent être regroupés en 3 types (NIBART, 1991 ; NIBART et HUMBLLOT, 1996) :

- ▶ Facteurs extérieurs : Les facteurs climatiques (les températures élevées ont un effet défavorable sur la fertilité des vaches laitières) et les conditions de conduite (entretien général, alimentation, hygiène)

- ▶ Facteurs physiologiques : Le mâle (utilisé en saillie naturelle ou en I.A.) peut intervenir sur la qualité des embryons. La femelle intervient en fonction de l'état physiologique de son appareil reproducteur

- ▶ Facteurs sanitaires : Les meilleurs résultats sont obtenus avec des femelles en bon état d'entretien, ne présentant pas de maladies organiques ou métaboliques et dont l'appareil génital est normal (absence de métrite et de kyste ovarien).

Taux de gestation après transfert et facteurs de variation :

- ▶ Méthode de transfert et technicité de l'opérateur :

Les taux de gestation après transfert sont de 60 % en frais et de 50 % en congelé. Les pourcentages de gestation se situent de 60 à 70 % pour la méthode chirurgicale et de 50 à 60 % pour la méthode cervicale (NIBART, 1986).

- ▶ La qualité de la receveuse : Le choix des receveuses est important (entretien, état sanitaire, alimentation) puisqu'il conditionne en grande partie les résultats de gestation après transfert.

- ▶ La qualité de l'embryon : le taux de gestation est de 60 à 70 % pour des embryons excellents et bons, 40 à 50 % pour les embryons moyens et de 25 à 30 % pour les embryons médiocres (NIBART, 1991).

5. CONCLUSION

Finalement, après un seul traitement de superovulation et transfert immédiat des embryons collectés, on peut obtenir en moyenne 3 veaux par donneuse traitée. Il est possible d'augmenter le nombre d'embryons produits, donc de descendants, en répétant les traitements. C'est ainsi qu'une donneuse d'élite superovulée 5 fois en un an peut avoir 15 descendants en moyenne. A l'aide de telles donneuses d'élite, il est possible de constituer des banques d'embryons congelés.

II .DEUXIEME PARTIE : SEXAGE DE L'EMBRYON BOVIN

Le sexage des embryons, est désormais réalisé régulièrement en France dans les conditions de terrain (NIBART et THIBIER, 1992). Cette technique repose sur les prélèvements de quelques cellules (biopsie) de l'embryon, et sur la recherche d'une séquence spécifique du chromosome Y sur cette biopsie.

La détermination du sexe de l'embryon n'est envisageable que sur des embryons de qualité 1 (excellent) ou 2 (bon) (THIBIER et NIBART, 1991) et au stade de développement où s'effectue le transfert (j6-j8). Le sexe peut être établi si on est capable de déceler la présence du chromosome Y spécifique du mâle.

La première partie de notre travail est constituée d'une analyse bibliographique où seront présentées les différentes techniques de biopsies et de sexage telles qu'elles sont utilisées en France.

La deuxième partie sera consacrée à l'interprétation des résultats obtenus par les services techniques de UNCEIA sur les taux de gestation après transfert d'embryons biopsiés frais et congelés et les facteurs de variation de ces taux de gestation.

1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 METHODE ACTUELLE

La méthode mise au point en France par l'INRA-Rhône Merieux-UNCEIA repose sur la mise en évidence indirecte du chromosome Y spécifique du mâle, à partir de quelques cellules prélevées sur l'embryon. La mise en évidence du chromosome Y est fondée sur la détection, après amplification à l'aide d'amorces, de séquences spécifiques (BC1.2) de l'ADN de ce chromosome (BREVET INRA, 1987). Des amorces spécifiques de l'ADN bovin mâle et femelle permettent de mettre en évidence la présence de la biopsie dans le tampon de reprise. L'ADN amplifié est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose, visualisé par fluorescence après coloration au bromure d'éthydiu.

1.1.1 CHOIX ET RINCAGE DES EMBRYONS

Les embryons destinés au sexage, sont prélevés généralement à J7 (j0= chaleurs), déposés dans un milieu classique PBS et sont l'objet de 10 lavages avant toutes micro manipulations afin de bien s'assurer de la stérilité du milieu dans lequel l'embryon va se trouver sans la barrière sanitaire que constitue la zone pellucide. Ils sont jugés sur des critères morphologiques (INRA-UNCEIA, 1990). Seuls les embryons de qualité 1 (excellent ou bon) du stade de morula compacté à blastocyste encore inclus dans la zone pellucide sont réservés à la biopsie.

1.1.2 BIOPSIE

La biopsie consiste à prélever 5 à 10 cellules (figure 1), sur un embryon qui en comporte 60 à 80. Deux procédures peuvent être utilisées. Soit le prélèvement par micro-biopsie, à l'aide d'un micro couteau, soit par aspiration à l'aide d'une micro-pipette de 30 μ de diamètre (figure 2).

Dans le cas de prélèvements issus de blastocystes, ce sont les cellules du trophoblaste qui sont l'objet de ces prélèvements.

Cette biopsie est faite à l'aide d'un microscope inversé à grossissement (x 100); elle est ensuite rincée puis placée dans un tube conique (dûment identifié par le numéro de l'embryon) contenant le tampon de reprise de biopsie dans lequel se trouvent les 2 amorces spécifiques Y et les 2 amorces d'ADN bovin commun aux 2 sexes témoins de présence de biopsie, plus la protéinase K.

1.1.3 CONSERVATION DE L'EMBRYON BIOPSIE AVANT TRANSFERT FRAIS

Les embryons sont maintenus à température du laboratoire, à l'abri de la lumière, quelques heures. Par ailleurs, la réfrigération de l'embryon entre 0 et +4° C présente l'avantage de ralentir fortement le métabolisme de l'embryon.

1.1.4 IDENTIFICATION

Pour s'assurer de l'identification d'un animal issu du transfert embryonnaire, il est important de procéder à :

- ▶ l'identification précise de la donneuse à l'aide de son certificat d'enregistrement ou d'identification.
- ▶ l'identification du taureau.
- ▶ l'identification des tubes contenant les biopsies.
- ▶ l'identification précise des receveuses dans lesquelles ont été transférés ces embryons.
- ▶ l'identification des embryons biopsiés montés en paillette pour transfert frais ou congelé.

Figure n°1 : Technique de biopsie d'un embryon bovin (d'après INRA-UNCEIA
blastographie, 1990)

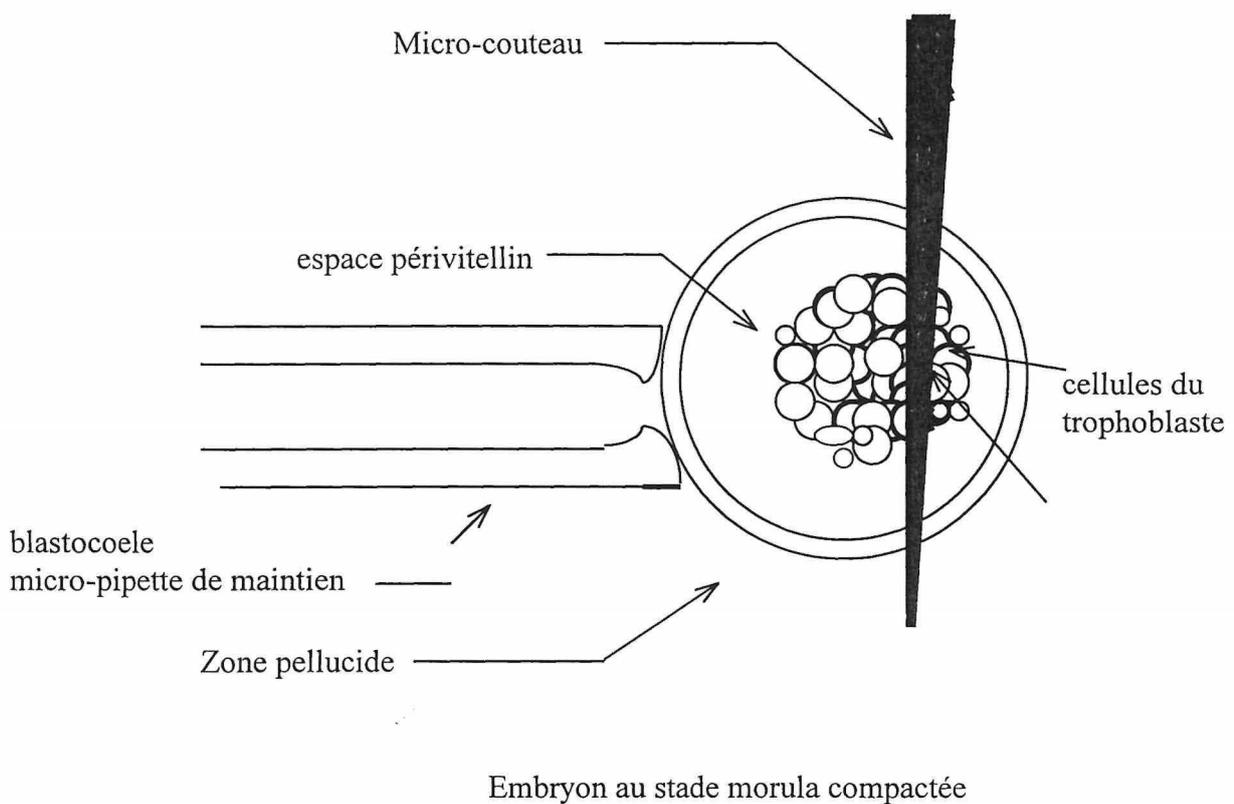
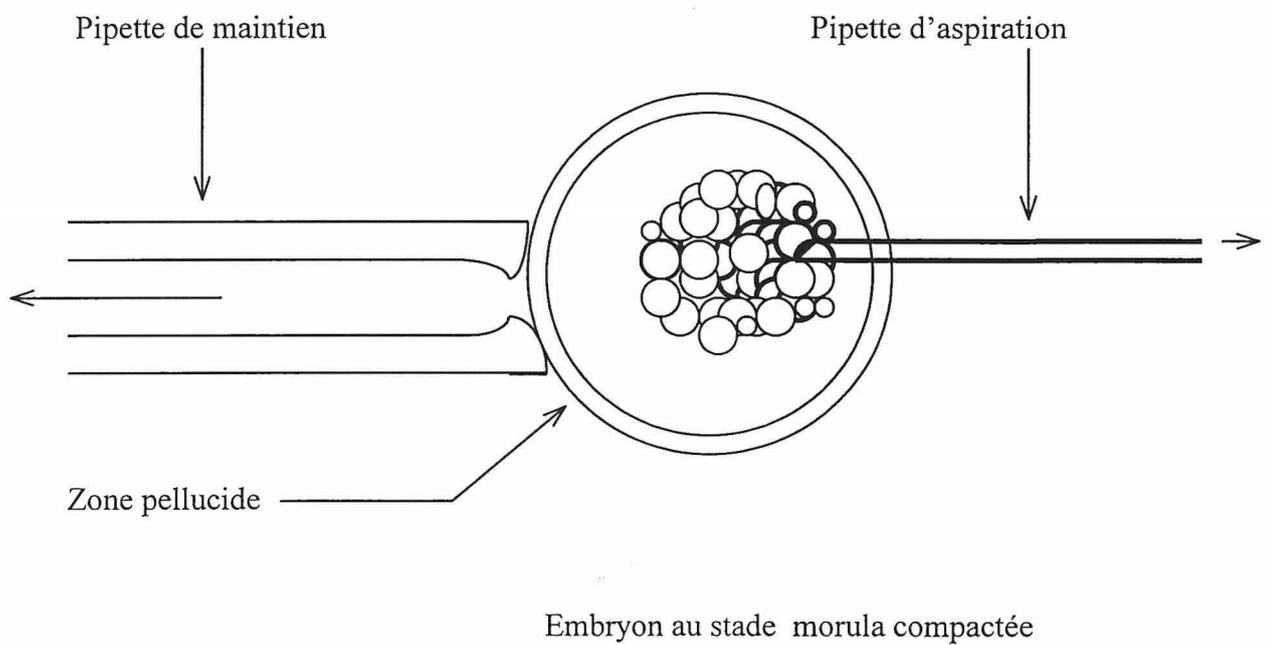


Figure 2 : Technique de biopsie par aspiration (d'après NIBART, 1997)



1.1.5 SEXAGE DES BIOPSIES

La première étape consiste dans la déprotéinisation des cellules à l'aide de la protéinase K puis dans la dénaturation de l'ADN par chauffage à 95°C. Dans les tubes coniques contenant les biopsies on ajoute ensuite le milieu réactionnel comprenant les nucléotides et la T.A.Q. polymérase nécessaires à l'amplification de la séquence (figure 3).

L'hybridation des amorces et l'amplification des séquences sont obtenues par la réalisation de 30 cycles par technique P.C.R.. A la fin des cycles, l'amplification de la séquence spécifique d'ADN du chromosome Y est de l'ordre de 100 000 fois (figure 4).

L'ADN spécifique amplifié est alors séparé par électrophorèse sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium.

L'observation du gel en fluorescence UV (312 nm) permet de visualiser la bande spécifique (148 paires de bases) 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 spécifique (443 paires de bases) de l'ensemble des chromosomes est amplifié par les amorces témoins. Ceci permet d'affirmer la présence ou l'absence d'ADN provenant de la biopsie dans le tampon de reprise de biopsie.

Figure 3 : Technique de Sexage (selon NIBART, 1991)

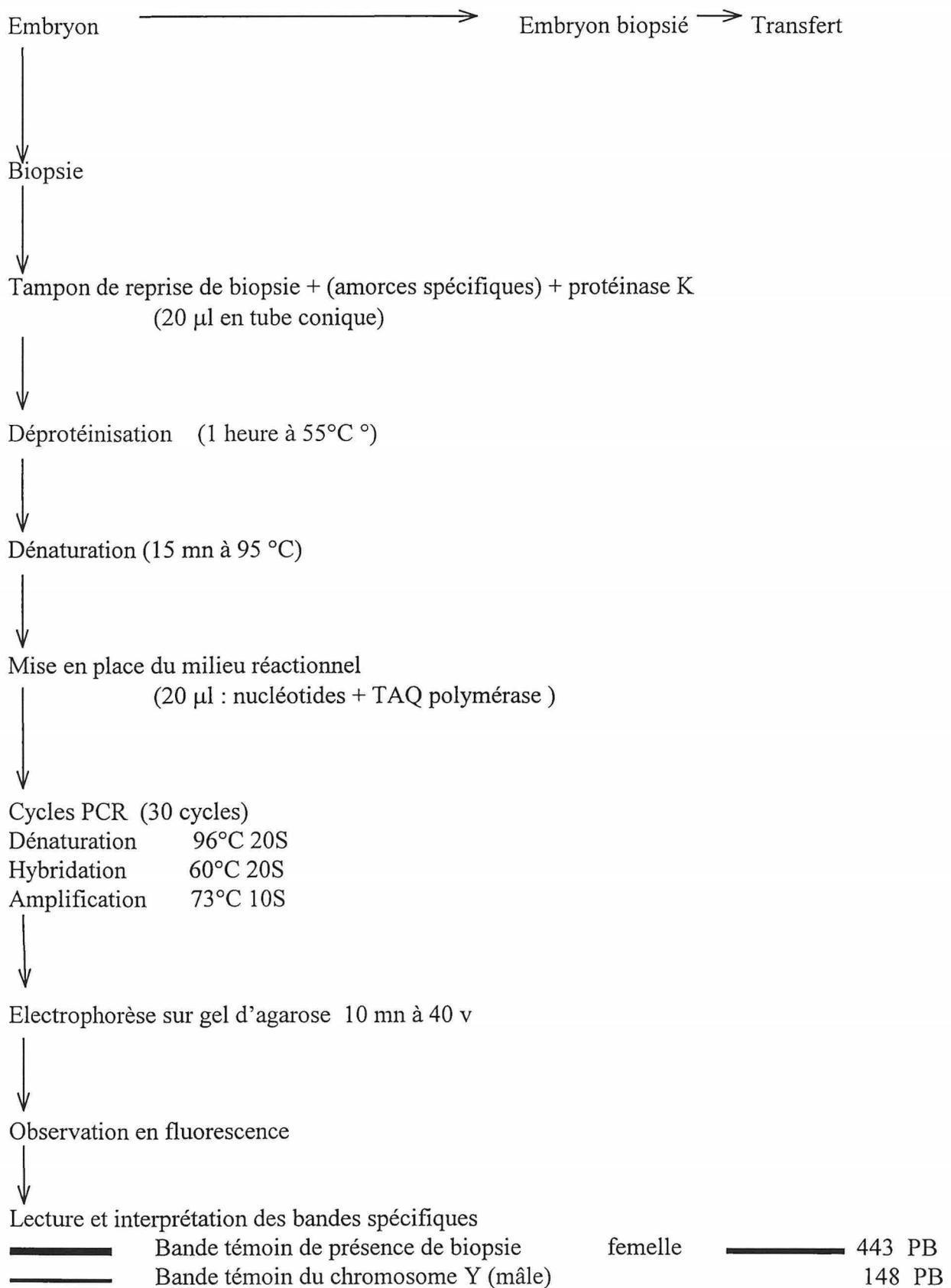
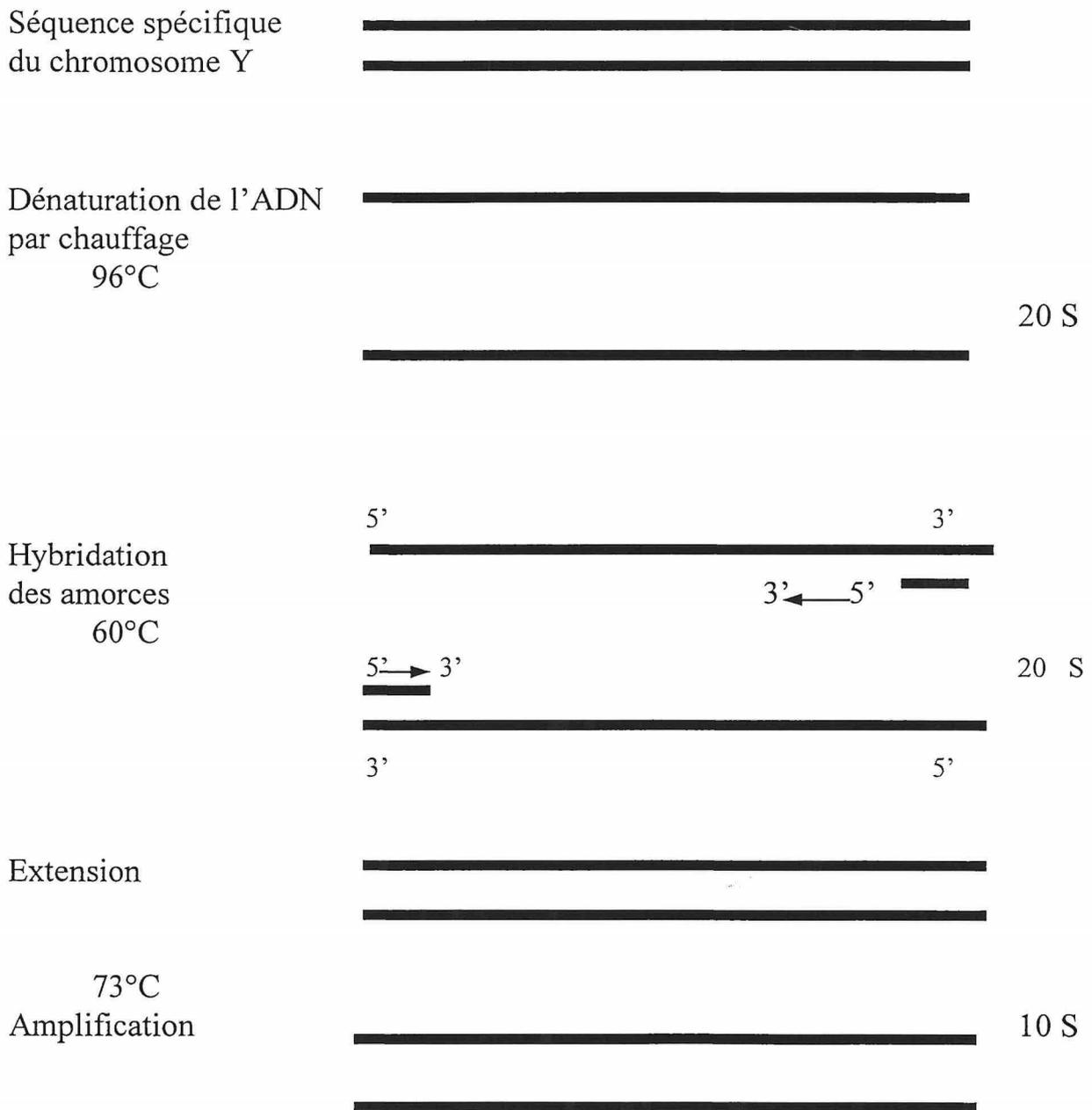


Figure 4 : Amplification de l'ADN par PCR (selon NIBART, 1991)



2 Brins → 4 Brins

30 Cycles : Amplification de l'ordre de 100 000 fois.

1.2 RESULTATS

1.2.1 SEXAGE

a) SPECIFICITE

La séquence de l'ADN du chromosome Y est spécifique du genre **BOS TAURUS** et **BOS INDICUS**.

b) SENSIBILITE

Elle peut s'apprécier par le nombre minimum de cellules nécessaires pour reconnaître avec 95 % de probabilité d'y parvenir, le sexe de l'embryon d'où proviennent la ou les cellules.

Une cellule peut suffire pour connaître le sexe mais pour des raisons pratiques, le praticien préfère pouvoir disposer d'un peu plus de cellules, cinq au minimum. NIBART et al (1992) ont montré que la sensibilité de détection avec de tels prélèvements ne différait pas significativement de celle d'une cellule entière.

c) EFFICACITE

C'est le rapport du nombre de biopsiés sexés, au nombre de biopsies testés ; il est égal à 94,7 % pour les embryons biopsiés par micro-couteau. La biopsie par aspiration qui, par ailleurs, donne des résultats intéressants pour la congélation ne procurait pas encore récemment un tel taux d'efficacité. Cependant, des résultats récents ont démontré la possibilité d'utiliser une telle technique avec une efficacité identique (NIBART et al.,1996) (Tableau 3).

d) EXACTITUDE

C'est le rapport du nombre d'embryons sexés mâles ou femelles déterminé en laboratoire et constaté sur le terrain après mise bas: 98,7 % d'exactitude pour les résultats actuels (Tableau 4).

e) SEX-RATIO

Pour 680 embryons sexés, 54 % des embryons étaient mâles et le pourcentage était significativement différent de 50 %. Par ailleurs, en se fondant sur le sexe phénotypique de veaux nés de transfert embryonnaire (n=684) la sex-ratio était de 52 % de mâles. Il n'y avait pas de différence significative avec la sex-ratio des embryons sexés (Tableau 5).

1.2.2 TAUX DE GESTATION APRES TRANSFERT D'EMBRYONS BIOPSIES FRAIS

Le taux moyen de gestation des embryons sexés, transférés à l'état frais est de 58 % (NIBART et al.,1992). Plusieurs paramètres peuvent l'influencer :

- La compétence des opérateurs a une influence sur les taux de gestation de 34 % à 59 % (Tableau 6).
- La qualité des embryons a aussi une influence significative, les embryons de qualité 1 et 2 ont fourni un taux de gestation de 53 %, pour 34 % chez les embryons de qualité 3 (moyen) (NIBART et al.,1996).
- Le stade de développement de l'embryon n'est pas négligeable. LACAZE (1996 non publié) rapporte des taux de gestation de 50,5 % (n=91) pour les morulas et de 74,4 % (n=43) pour les blastocystes.
- Les conditions dans lesquelles les embryons ont été conservés pendant le temps du sexage influencent aussi les taux de gestation (Tableau 7).

Tableau 3 : Taux d'efficacité du sexage d'embryons bovins selon la technique de prélèvement, le type d'embryon et le nombre de rinçage (NIBART et al., 1996).

Technique de prélèvement	Embryon	Nombre rinçage de la Biopsie	Nombre d'essais	Sexe		
				Déterminé	Douteux	Non déterminé
Biopsie Micro-couteau	Frais	3	1 660	94,7 %	2,2 %	3,1 %
	Congelé	3	67	89,7 %	4,0 %	6,3 %
Aspiration	Frais	0	98	51,0 %	18,4 %	30,6 %
		1	47	72,3 %	8,5 %	19,2 %
		3*	07	100 %		

* Rinçage selon une technique particulière

Tableau 4 : Taux d'exactitude du sexe des embryons biopsiés par micro-couteau (Résultats du 01-09-95) (NIBART et al., 1996).

Sexe déterminé au laboratoire	Nombre	Sexe phénotypique des veaux		% Exactitude
		Mâle	Femelle	
Mâle	38	37	1	97,3 %
Femelle	199	2	197	99,0 %
Mâle douteux	1	0	1	0 %
Femelle douteuse	21	8	13	61,9 %
Total	259	13+37+197=247		95,4 %

Tableau 5 : Sex-ratio d'embryons biopsiés et sexés, et de veaux nés de transfert d'embryons non biopsiés (NIBART et al., 1996).

EMBRYONS	Mâle	Femelle	Total
Embryons biopsiés micro-couteau Sexès	367 (54 %) (1)	313 (46 %)	680
Veaux nés d'embryon non biopsiés	356 (52 %) (2)	328 (48 %)	684

1,2 : $P < 0,05$

Tableau 6 : Taux de gestation d'embryons bovins de qualité¹, biopsiés, sexés et transférés frais (*) au cours de quatre exercices consécutifs par l'unité de sélection MIDATEST (LACAZE 1995, non publié)

Année	Nombre d'embryons transférés	Taux de gestation
1991	83	34,0 %
1992	61	59,0 %
1993	82	52,4 %
1994	65	52,8 %
Total (4 Années)	291	49,5 %

- Embryons biopsiés conservés 6 heures à 4°C

Tableau 7 : Taux de gestation des embryons bovins de qualité 1 et 2 selon leurs conditions de conservation (THIBIER et NIBART ; 1995)

Condition de conservation	Nombre	Gestation	
		Nombre	%
20° C (6 h)	170	82	48
4° C (6 h)	214	119	56
4° C (24 h)	53	21	40

2) BUT DU TRAVAIL

Pour l'éleveur, le principal intérêt du sexage est de transférer des embryons de sexe désiré (femelles) pour l'élevage à vocation laitière. Il permet également une meilleure utilisation des receveuses, qui représentent souvent un facteur limitant compte tenu des exigences de leur préparation et de leur sélection. Ces intérêts sont très nettement tempérés par 3 faits :

- ✓ Les frais de collecte et d'examen de tous les embryons, y compris de ceux du sexe non désiré.

- ✓ Le coût du sexage proprement dit : selon ROHOU(1996) : 3 700 FF pour une gestation femelle sans sexage et 6 100 FF avec sexage.

- ✓ Les contraintes de quota laitier qui limitent sévèrement les effectifs de femelles dans les troupeaux. On ne peut indéfiniment transférer des embryons femelles dans un troupeau.

En ce qui concerne l'organisation pratique, le sexage des biopsiés est difficile sur le terrain (Annexe 3) ; il exige un laboratoire et des mesures d'hygiène très strictes. Pour une série de 10 embryons à sexer il faut 4 heures ; ceci implique que l'embryon biopsié ne peut être transféré en frais (après connaissance du résultat de sexage) que 5 heures après la collecte, au plus tôt. Or dans les conditions pratiques, les meilleurs résultats de gestation sont obtenus lorsque les transferts sont réalisés dans les 6 heures après la récolte des embryons.

Parmi les contraintes pénalisant fortement la réussite du T.E de l'embryon biopsié sont :

- ✓ la durée du sexage (4 à 5 heures), qui influe sur le taux de survie des embryons biopsiés.

- ✓ la préparation des receveuses en nombre suffisant, qui n'est pas connu à l'avance. Afin d'y remédier, il y a deux solutions :

1- TRANSFERT EN FRAIS

Le transfert en frais est réalisé juste après la biopsie, cette dernière étant conservée et puis sexée ultérieurement. Après avoir identifié le sexe de l'embryon, l'éleveur garde les receveuses ayant reçu un embryon femelle et provoque un avortement (par injection de PGF2 α) des receveuses ayant reçu un embryon mâle.

2-TRANSFERT APRES DECONGELATION

Grâce à la congélation de l'embryon biopsié, les éleveurs auront à leur disposition des banques d'embryons femelles provenant de femelles et de mâles de haute valeur génétique. Dans ces conditions, il sera possible de dissocier les opérations de biopsie et de détermination du sexe. Ceci permet une meilleure gestion des opérations du sexage et de réaliser des économies d'échelles sur ce type d'opération qui nécessite aujourd'hui la disponibilité d'un personnel qualifié durant la journée entière qu'il y ait ou non sexage effectif. Par ailleurs, l'éleveur pourra bien mieux gérer ses receveuses.

Le but du travail est l'étude des différents facteurs de variation des taux de gestation après transfert des embryons biopsiés par différentes techniques (micro-couteau ou aspiration) avant congélation.

3. STRUCTURE D'ACCUEIL

L'UNCEIA

L'union nationale des coopératives agricoles d'élevage et d'I.A. rassemble près de 80 centres français d'I.A. agréés dans les espèces bovines, ovines, caprines et porcines et participe à la création et à la diffusion du progrès génétique ainsi qu' au développement sur le terrain des techniques de maîtrise de la reproduction.

A côté des différents services de l'UNCEIA (génétique, juridique), les services techniques ont pour mission l'amélioration permanente des techniques existantes : I.A. et qualité des semences , synchronisation des chaleurs, constat de gestation et transplantation embryonnaire, production d'embryon in vitro, fertilité mâle, fertilité femelle.

Ils assurent également:

- ✓ le suivi des opérations de production de semence et de fécondité femelle.
- ✓ la vérification de la fiabilité des techniques mises à disposition des C.E.I.A.
- ✓ l'expérimentation et la mise au point de nouvelles techniques.
- ✓ le transfert de technologie auprès des éleveurs.

La plupart de ces actions nouvelles sont menées sur la base d'un double partenariat avec des instituts de recherches (INRA en particulier), des industriels et les écoles vétérinaires (Maisons-Alfort en particulier).

L'activité du laboratoire est organisée autour de cinq services de l'UNCEIA :

- ▶ Andrologie,
- ▶ Hormonologie,
- ▶ T.E. et sexage
- ▶ Production d'embryons in vitro,
- ▶ Clonage par transfert nucléaire (en collaboration avec l'INRA).

LA STATION DE BIOTECHNOLOGIES UNCEIA-U.C.E.A.R

L'union des coopératives d'élevage Alpes-Rhône (UCEAR) est l'un des acteurs du progrès génétique dans la région Rhône-Alpes. Face à une demande de plus en plus accrue de matériel génétique de très haute valeur, l'UCEAR a décidé de créer une station de production d'embryons in vitro à Châteaufortain (Isère) en collaboration avec l'UNCEIA, dans un premier temps. Les missions de cette station se sont ensuite développées et ont concerné :

- ▶ la production et le transfert d'embryons in vitro à partir d'ovocytes collectés d'ovaires récupérés à l'abattoir,

- ▶ La Collecte d'ovocytes sous échographie et production d'embryons in vitro de femelles de haute valeur génétique

- ▶ la congélation des embryons in vitro,

- ▶ la production d'embryons in vivo pour l'étude de différents schémas expérimentaux (traitements de superovulation, techniques de biopsies et de congélation des embryons, sexage des embryons).

4. TRAVAIL PERSONNEL

4.1 TAUX DE GESTATION APRES TRANSFERT D'EMBRYONS BIOPSIES FRAIS ET CONGELES : SOURCES DE VARIATION DES TAUX DE GESTATION SELON LES PROTOCOLES UNCEIA

INTRODUCTION:

Les taux de gestation après transfert d'embryons biopsiés frais sont en moyenne de 58 % (NIBART et al., 1992), lorsque les embryons sexés sont de qualité 1. Cependant, les taux de gestation peuvent être nettement inférieurs à 35 % lorsque les embryons sont congelés après la biopsie (NIBART, 1987). Le facteur le plus important qui explique cette baisse de survie est probablement la perte de la zone pellucide au moment de la biopsie. Ces embryons sont ainsi congelés le plus souvent sans la protection de la zone pellucide et les cellules périphériques sont souvent lysées au moment de la cristallisation du milieu extérieur (FERNANDES et al., 1991).

Les embryons biopsiés au micro-couteau (zone pellucide ouverte) ne semblent pas bien supporter le processus de congélation en milieu classique. Selon NIBART et al. (1996), le taux de gestation obtenu après transfert d'embryons est de 25 % en moyenne. Ceci est la raison pour laquelle la technique d'aspiration cellulaire, bien que plus difficile en pratique, avait été mise en œuvre.

Seulement, il a été démontré, que l'efficacité du sexage était liée au mode de prélèvement des cellules de l'embryon (biopsie). Si les cellules sont prélevées au micro-couteau et rincées 3 fois avant leur mise en place dans le tube contenant le milieu de sexage, l'efficacité de celui-ci est de 95 %. Par contre pour les cellules qui sont prélevées par aspiration à l'aide d'une micro-pipette à travers la zone pellucide, l'efficacité du sexage au début était de 70 % du fait probablement de perte de cellules et des difficultés de rinçage. Cependant, des résultats récents ont démontré la possibilité d'utiliser une telle technique avec une efficacité identique à celle du micro couteau. Cependant, ce mode de prélèvement ne peut valablement être effectué que sur des embryons au stade morula compactée. Par cette technique les taux de gestation des embryons sexés congelés sont de 50 % (NIBART et al., 1996).

Récemment, NIBART et al. (1996 b) rapportent des taux de gestation de 55 % (n=27) après transfert direct d'embryons biopsiés au micro-couteau et congelés dans un milieu riche en sérum de veau fœtal (svf), additionné de 1,5 moles d'éthylène glycol. Il existe d'autres facteurs de variation du taux de gestation tels que le stade et la qualité de l'embryon, l'opérateur, le nombre de cellules, le mode de congélation, la parité et la qualité de la receveuse.

Dans cette partie seront présentés les résultats de l'UNCEIA sur les taux de gestation après transfert d'embryons biopsiés frais et congelés obtenus de 1995 à 1998 par trois équipes de transfert embryonnaire, agréées, appartenant à des coopératives d'insémination artificielle adhérentes à l'UNCEIA : EMBRYLOR équipe (550), UCEAR équipe (690), et UNCEIA équipe (940).

MATERIEL ET METHODES

4.2 MATERIEL ET METHODES

4.2.1 EMBRYONS

Les embryons sont manipulés avec précaution à l'aide de pipettes, et examinés sous toutes les surfaces pour observer, d'une part leur viabilité, et d'autre part l'intégrité de la zone pellucide. Cet examen doit être effectué après les 10 bains de rinçage contenant le milieu stérile.

4.2.1.1 CHOIX DES EMBRYONS

L'observation morphologique des embryons, réalisée à partir de la blastographie INRA-UNCEIA (1990), a permis d'estimer leur stade de développement et leur qualité (Figure 5). Quatre stades de développement, morula (4), jeune blastocyste (5), blastocyste (6) blastocyste épanoui (7), ont été distingués.

Le jugement de la qualité a été réalisé en tenant compte de l'intégrité de la membrane pellucide, de la forme générale de l'embryon (opacité, régularité, aspect des structures visibles, trophoblaste, bouton embryonnaire, blastocoele), et de l'aspect de la masse cellulaire (degré d'agrégation des cellules, présence de cellules détachées, taille des cellules, signe de dégénérescence cellulaire).

Les embryons peuvent avoir l'un des classements suivants :

Qualité 1 : excellent: stade normal de développement

- *masse cellulaire
- *couleur normale (gris)
- *pas de cellule échappée
- *membrane pellucide intacte

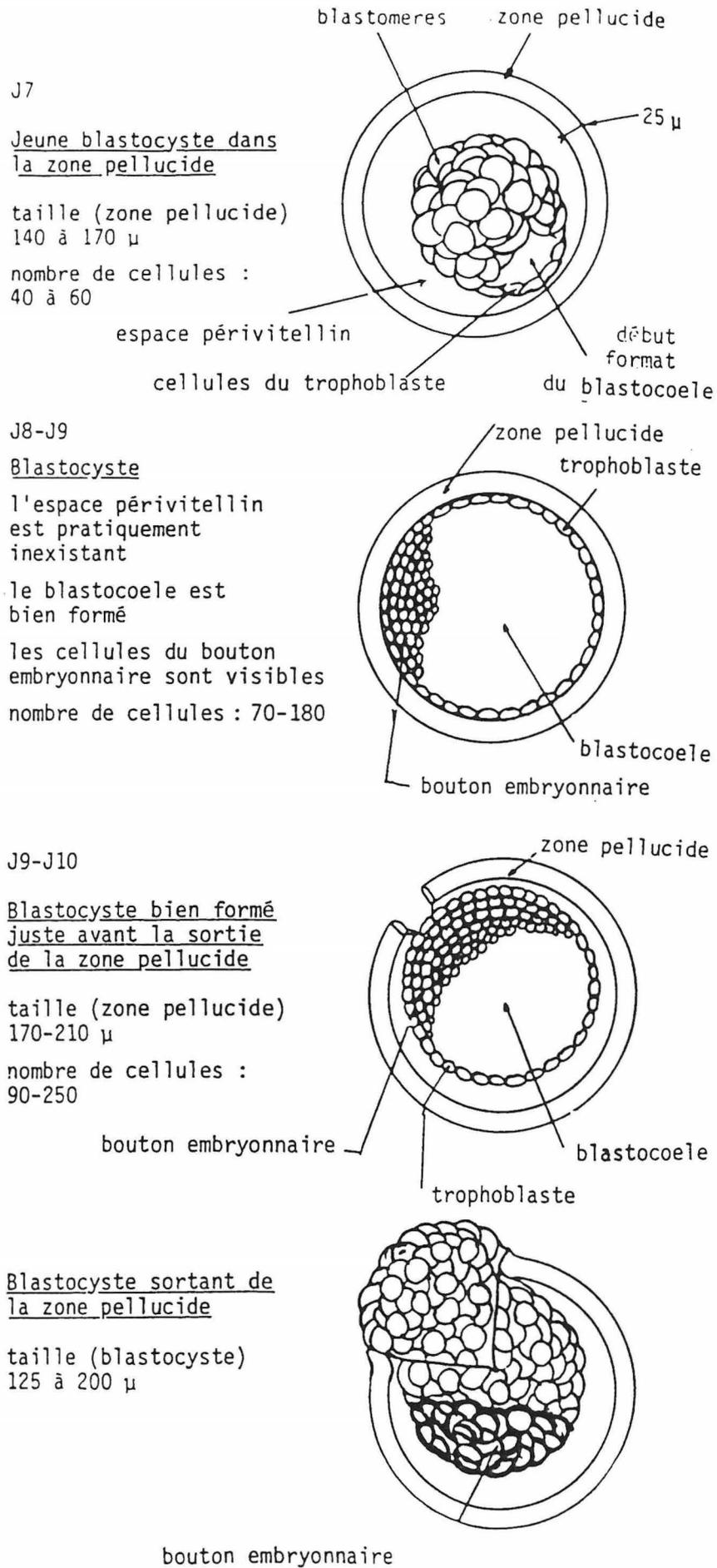
Qualité 2 : bon avec quelques défauts

- *masse cellulaire moins homogène
- *couleur hétérogène
- *quelques cellules échappées.

Qualité 3 : embryon en retard de développement ou présentant de nombreuses anomalies

- *taille des cellules hétérogènes
- *présence de cellule vacuolisée
- *couleur hétérogène, noirâtre.

Figure 5 : Evolution d'un embryon (Blastocyste) et ses principales caractéristiques (INRA-UNCEIA, 1990)



4.2.1.2 BIOPSIE DES EMBRYONS

a) MATERIEL UTILISE

Toutes les manipulations ont été effectuées sous microscope inversé NIKON (modèle TMS), aux grossissements X 16 et X 80, en utilisant deux micromanipulateurs (Narishighe) ; l'un sert pour le maintien de l'embryon par aspiration au moyen d'une micro-pipette de diamètre de 80 à 100 micro-m et de diamètre intérieur de 20 à 30 micro-m. Et l'autre porte le support sur lequel a été collé un fragment de lame pour la chirurgie des yeux : le micro couteau. Dans le cas d'une biopsie par aspiration cette lame est remplacée par une pipette d'aspiration (30 μ de diamètre extérieur), biseautée.

b) TECHNIQUE DE BIOPSIE

L'embryon était dans une boîte de pétri contenant du milieu F1 (PBS + BSA). Les biopsies ont été réalisées soit au laboratoire fixe, soit chez l'éleveur dans un camion laboratoire.

Après la coupe on obtient deux parties de tailles inégales provenant du même embryon : la partie principale (90 à 95 % du volume) qui peut parfois rester dans sa membrane pellucide et la biopsie (5 à 10 % du volume) (Figure 6).

Pour les blastocystes, il est important de placer le bouton embryonnaire (futur fœtus) en face de la pipette de maintien afin d'épargner ses cellules au moment de l'opération ; le but étant de réaliser l'ablation de quelques cellules (5) du trophoblaste (futur placenta). Après la biopsie l'embryon est remis dans la zone pellucide.

c) MANIPULATION DES EMBRYONS BIOPSIES

Après chaque opération de biopsie, l'embryon était aspiré à l'aide d'une micro-pipette, puis déposé dans une boîte contenant le milieu F1. Ces embryons ont été congelés ou transférés au frais. Les biopsies ont été aspirées et rincées dans un milieu KCl à l'aide d'une fine micro-pipette déposées dans le tampon de reprise réservé au sexage.

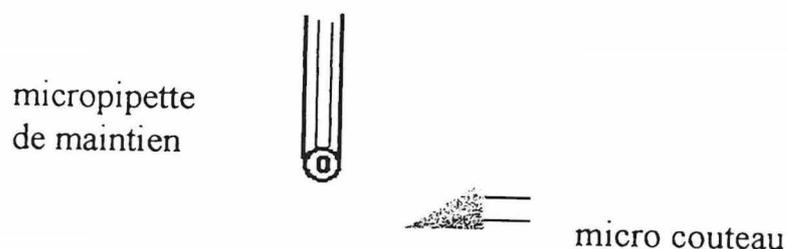
4.2.1.3 OPERATEUR

Les opérations des biopsies, sexage et congélation ont été réalisées par 2 opérateurs expérimentés de l' UNCEIA. Par contre les transferts embryonnaires ont été effectués par les techniciens de différentes équipes (EMBRYLOR, UNCEIA, UCEAR, AGIRE).

Figure 6 : Technique de biopsie d'embryons de bovin par micro couteau sous microscope inversé

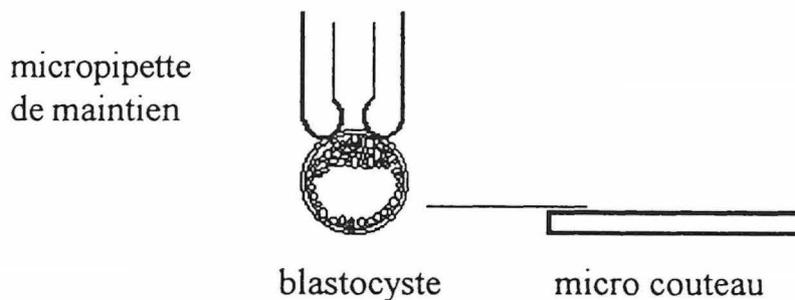
* Etape n°1 : réglage de l'installation

Le micro couteau doit être perpendiculaire à la micro pipette de maintien (vue de face)



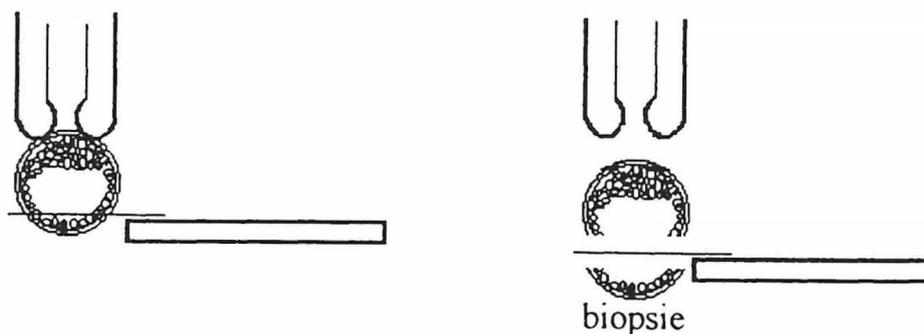
* Etape n°2 : mise en place de l'embryon, cas du blastocyste (vue de dessous)

En exerçant une légère dépression, l'embryon est maintenu à l'extrémité de la micro pipette



* Etapes n° 3 : opération de biopsie (vue de dessous)

Le micro couteau est abaissé délicatement. Sous sa pression, la membrane pellucide s'affaisse un instant puis cède. 5 à 10 cellules du trophoblaste ainsi qu'une partie de la membrane pellucide se trouvent séparées de la partie principale de l'embryon.



4.2.1.4 CONGELATION

La première gestation obtenue à partir d'un embryon congelé a été rapportée en 1973 par WILMUT et ROWSON.

Les facteurs connus qui affectent la survie des embryons congelés sont :

- les facteurs intrinsèques : l'espèce, le stade de développement des embryons, la qualité de l'embryon, la perméabilité à l'eau et aux cryoprotecteurs.

- les facteurs extrinsèques : les cryoprotecteurs et les méthodes de congélation.

a) PRINCIPES DE CRYOCONSERVATION

La conservation des embryons à basse température permet l'arrêt de tous les processus biologiques se produisant normalement au cours du temps. Les protocoles élaborés visent à protéger les membranes cellulaires contre la formation de cristaux de glace au cours du refroidissement et la recristallisation au cours du réchauffement.

Ainsi la survie des cellules dépend des conditions de changement de phase de l'eau intracellulaire et de l'action des cryoprotecteurs. L'addition de cryoprotecteurs modifie les propriétés physico-chimiques des solutions de congélation. Le choix des vitesses de refroidissement et de réchauffement permet de contrôler la croissance des cristaux de glace.

On peut distinguer trois classes de cryoprotecteurs :

- * Les cryoprotecteurs de faible poids moléculaire (pm) : tels que le méthanol (pm : 32), l'éthylène glycol (pm : 62), le diméthyl sulfoxyde, ou DMSO (pm : 78), le glycérol (pm : 92).

Ils agissent principalement dans l'espace intra-cellulaire, ils remplacent osmotiquement une partie de l'eau intracellulaire avant le refroidissement, atténuent les changements brutaux du volume des cellules et réduisent la taille des cristaux de glace lors du refroidissement. Ce sont pour la plupart des alcools. Ils sont capables de se lier aux molécules d'eau par des liaisons hydrogène (STEINER, 1989); Ils rendent donc une partie de l'eau incongelable.

Ceci a pour conséquences :

- ✓ une diminution du point de cristallisation de la solution de congélation,
- ✓ une réduction de la cinétique de sortie d'eau à travers les membranes cellulaires,
- ✓ un volume minimal cellulaire qui s'éloigne du volume critique (volume reconnu pour avoir des conséquences délétères sur le matériel biologique),
- ✓ une dilution de la solution saline en limitant la quantité d'eau qui se transforme en glace (diminution de l'effet de solution, toxique pour les cellules),

- ✓ une augmentation de la viscosité du cytoplasme,
- ✓ Un maintien d'eau libre extracellulaire diminuant les lésions des membranes par le front de glace,
- ✓ Une modification de la forme des cristaux (cristaux arrondis) (MAZUR, 1980 ; ANGELIER, 1982 ; LARESE et EHRMANN, 1982 ; STEINER, 1989 ; MANDELBAUM, 1990).

* Les cryoprotecteurs non perméables de poids moléculaires faible tels que le saccharose (pm : 342), le glucose, galactose. Ces sucres agissent principalement dans l'espace extracellulaire (RENARD, 1985) et empêchent les échanges rapides d'eau de l'extérieur vers l'intérieur des cellules.

* Les cryoprotecteurs non perméables de poids moléculaires élevés : tels que le polyvinylpyrrolidone (pm : 10 000), le dextran (pm : 70 000). Ils protégeraient l'extérieur de la membrane cellulaire des hautes concentrations ioniques (WHITTINGHAM, 1971), l'albumine bovine sérique très utilisée dans les milieux.

b)-TECHNIQUE DE CRYOCONSERVATION :

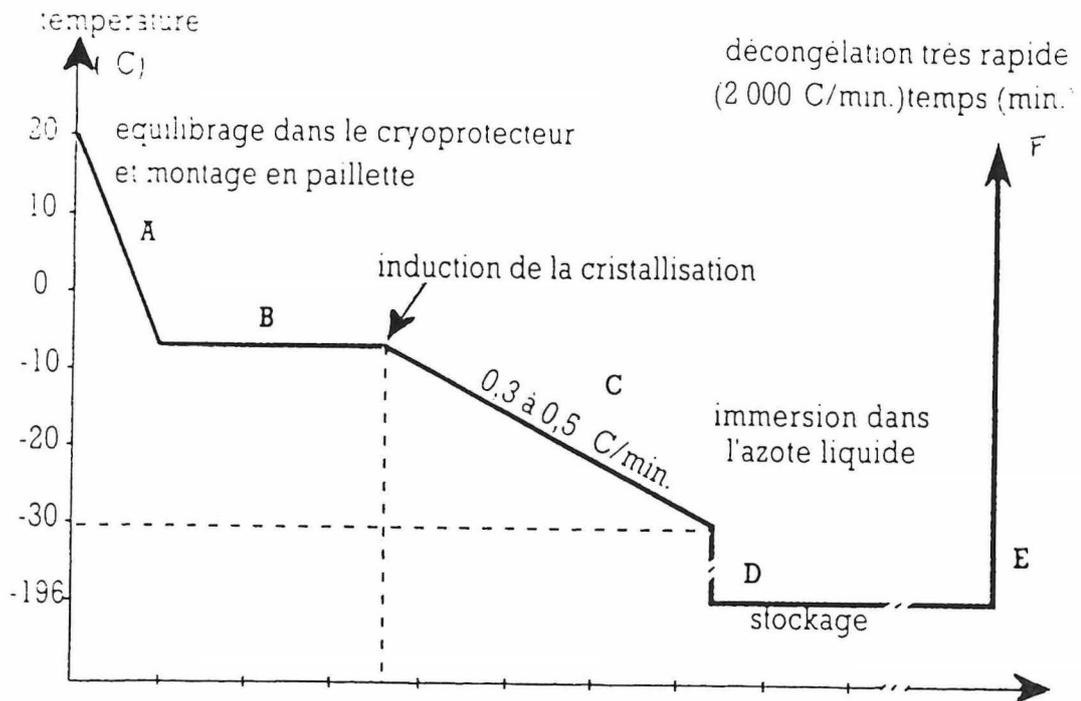
La congélation équilibrée induit une déshydratation progressive des embryons par substitution d'une partie de l'eau intracellulaire par une solution de cryoprotecteurs perméable. Ceci implique l'utilisation d'un congélateur programmable afin de contrôler précisément l'équilibre de température lors de l'application de la courbe de Congélation pratique. Les techniques de congélation équilibrée comprennent les étapes suivantes expliquées dans la (figure 7).

La mise au point d'une méthode de congélation est donc le résultat d'un compromis entre les effets dus aux différents paramètres tels que le choix d'un cryoprotecteur pénétrant les différents types de cellules, sa concentration optimale compatible avec une toxicité limitée, les vitesses de refroidissement et de réchauffement qui vont régir les mouvements de l'eau à travers la membrane plasmique des cellules embryonnaires.

c)-CONGELATION DES EMBRYONS BOVINS BIOPSIES PAR MICRO COUTEAU SELON LES PROTOCOLES UNCEIA :

Des embryons ont été collectés à j7 (j0= chaleurs), par trois équipes (UNCEIA, EMBRYLOR, UCEAR) au stade morula compactée à blastocyste (inclus dans la zone pellucide), jugés de qualité 1 ou 2 (excellent ou bon), rincés 10 fois puis biopsiés par la méthode de micro-couteau .

Figure 7 - Programme de congélation équilibrée utilisée pour l'embryon bovin.
(I.E.IBO, 1983)



- exposition des embryons à une solution de cryoprotecteurs de faible poids moléculaire (1,5 M) à température ambiante jusqu'à ce que l'équilibre osmotique soit atteint de part et d'autre des membranes cellulaires;
- **A**: refroidissement rapide (1 à 3 °C/ min) jusqu'à la température d'induction de la cristallisation;
- **B**: induction de la cristallisation dans le milieu extracellulaire à -7°C;
- **C**: refroidissement progressif à des vitesses de 0,3 à 0,5°C /min jusqu'à -25 , -35°C;
- **D**: immersion et stockage des embryons dans l'azote liquide (-196°C);
- **E** : décongélation rapide (environ 2500°C/min) par immersion de la paillette dans un bain-marie à 25-30°C.
- **F**: réhydratation par retrait du cryoprotecteur à température ambiante, soit par la réduction progressive de la concentration en cryoprotecteur, soit par l'augmentation de la concentration osmotique du milieu extracellulaire.

***PROTOCOLE 1 :**

Embryons biopsiés, sexés et transférés en frais.

*** PROTOCOLE 2 :** congélation d'embryons biopsiés au micro-couteau dans deux milieux différents.

MILIEU 1 : éthylène glycol + sérum (Figure 8) .

Les embryons biopsiés ont été équilibrés dans le milieu de congélation :

PBS + 4g/l BSA + 40 % SVF (sérum de veau fœtal) +1,5 M éthylène glycol.)
10 à 30 min maximum puis aspirés individuellement en paillettes 0,25 ml (IMV, France).

* courbe de refroidissement :

- refroidissement à -7°C dans un congélateur programmable
- attente 10 min
- induction de la cristallisation, en dehors de l'embryon, attente 5 à 10 min
- refroidissement jusqu'à -32°C à la vitesse de 0,5°C/min
- mise en place des paillettes dans l'azote liquide et stockage.

MILIEU 2 : glycérol + saccharose + sérum (Figure 9).

Les embryons biopsiés ont été équilibrés dans un milieu de congélation :

PBS + 4g/l BSA + 40 % SVF (sérum de veau fœtal) +1,5 M glycérol + 0,25 M saccharose pendant 10 mn maximum (conditionnement inclus), puis aspirés individuellement en paillettes 0,25 ml (IMV, France), le montage des paillettes se fait sur le principe de séparer les milieux de congélation et de décongélation par des bulles d'air dans la même paillette (NIEMANN, 1991).

L'embryon est placé dans une colonne de 1 cm d'un milieu à base de : PBS + 4g/l BSA + 40 % SVF +1,5 M glycérol + 0,25 M saccharose (milieu de congélation). Les 9/10 ème restant de la paillette sont remplis par du PBS + 4g/l BSA + 40 % SVF + 0,5 M saccharose (milieu de décongélation).

Chaque paillette est alors fermée puis déposée horizontalement sur un portoir. Celui-ci est placé dans l'enceinte d'un congélateur biologique programmable prérefroidi à -7 °C (MS 21-CFPO France). Après 4 à 5 min, la cristallisation est amorcée manuellement au moyen d'une pince métallique dont l'extrémité est refroidie dans l'azote liquide. Après un laps de temps de 10 mn, les embryons sont refroidis de -7°C à -25 °C à raison de 0,3 °C/min puis plongés directement dans l'azote liquide.

Figure 8 : Congélation des embryons biopsiés en éthylène glycol pour transfert direct (NIBARTet al.,1997).

Paillette longue 0,25 ml
(IMV, France)

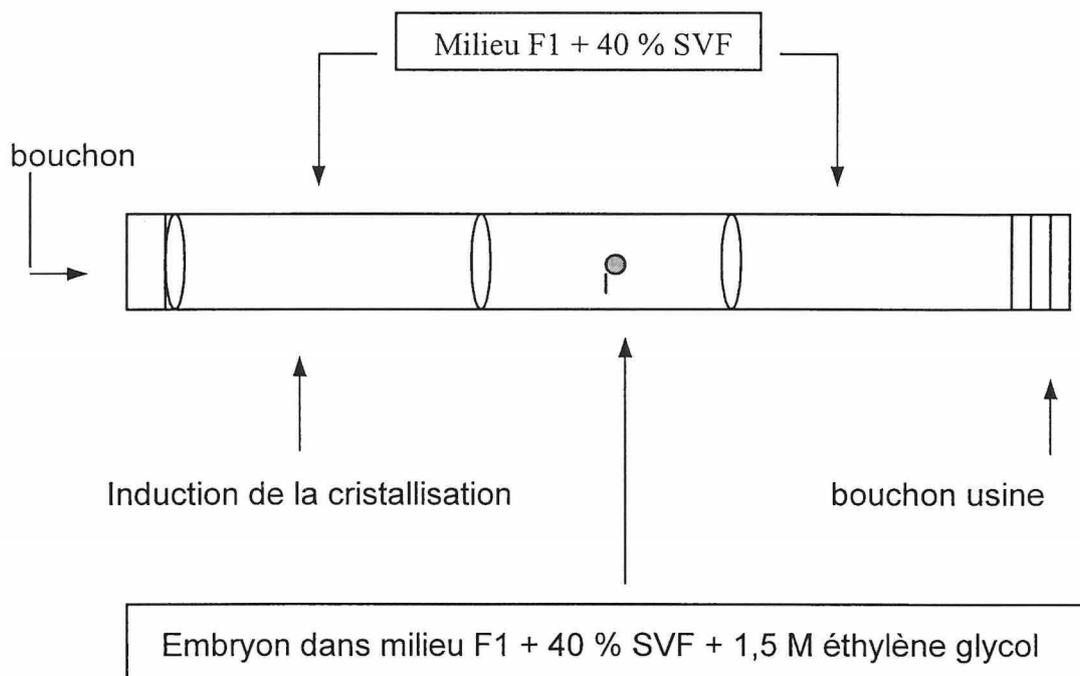
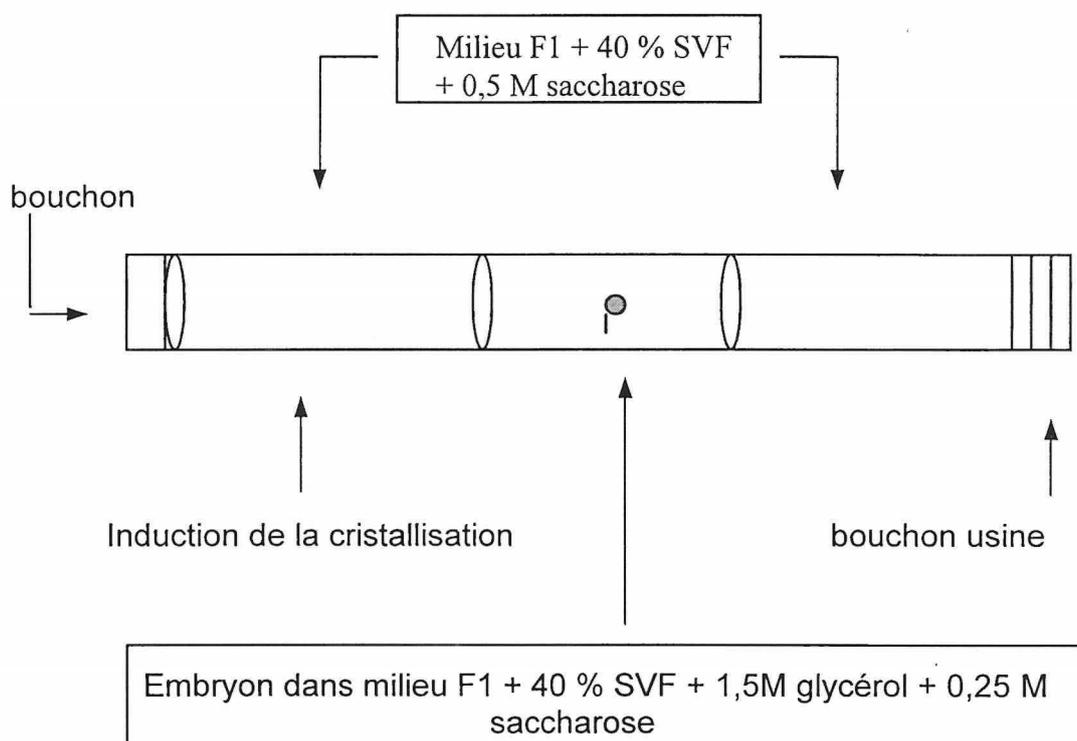


Figure 9 : Congélation des embryons biopsiés en glycérol saccharose pour transfert direct (NIBART et al.,1997).

Paillette longue 0,25 ml
(IMV, France)



4.2.1.5 DECONGELATION

Un réchauffement rapide des paillettes est nécessaire :

- 10 secondes à l'air libre permet d'évacuer l'azote liquide encore présent au niveau des bouchons et d'éviter des explosions ultérieures.
- 20 à 30 secondes en bain-marie 20-25°C.

4.2.1.6 TRANSFERT EN RECEVEUSES :

Après décongélation, les paillettes (non secouées) ont été placées dans les pistolets de transfert (IMV, France) et les embryons mis dans l'utérus des receveuses le plus rapidement possible, par voie cervicale.

Les transferts ont été effectués en ferme par les techniciens des équipes TE (EMBRYLOR, UCEAR, UNCEIA) sur des receveuses (génisses ou vaches) jugées de qualité 1, 2 ou 3 à $j7 \pm 1$ ($j0$ = chaleurs), soit après chaleurs naturelles, soit après chaleurs synchronisées par un traitement de maîtrise des cycles sexuels.

4.2.2 ENREGISTREMENT DES DONNEES

Toutes les données ont été enregistrées dans un fichier sous EXCEL. L'ensemble des facteurs de variation des résultats et les classes correspondantes, retenues pour la réalisation des analyses statistiques, sont décrits dans le Tableau 8.

Les effets des différents facteurs sur les taux de gestation ont été analysés en effectuant des ajustements pour les effets des autres facteurs. Toutes ces variables ont été étudiées par analyse de variance non orthogonale à effet fixe (ANOVA, PROC GLM ; SAS 1987), réalisée par Patrice HUMBLLOT de l'UNCEIA.

Une probabilité inférieure à 0,05 a été retenue comme seuil de signification.

Tableau 8 . Facteurs de variation et classes prises en compte dans l'analyse des taux de gestation

FACTEURS	NIVEAUX				
N° enregistrement	3 chiffres				
N° équipe	3 chiffres				
Date collecte	6 chiffres				
N° donneuse	10 chiffres				
N° embryon	2 chiffres				
Stade	1 chiffre	4(me)	5(jb)	6(b)	7(be)
Qualité	1 chiffre	1(excellent)	2(bon)	3(moyen)	
Opérateur	1 chiffre	1: JMT 2: AM			
Méthode biopsie	1 chiffre 1: coupe				
Nombre cellules	2 chiffres				
ZP	1 chiffre	1: oui			
Sexe biopsie	1 chiffre 1= femelle 2= mâle 3= douteux 4= non identifié				
Frais /congelé	1 chiffre 1= frais 2= congelé 3= congelé décongelé sexé				
Méthode congélation	1 chiffre 1= éthylène g 2= glycérol s				
Date transfert	6 chiffres				
Receveuse parité	1 chiffre 0= génisse 1= vache				
Qualité receveuse	1 chiffre 1 2 3				
Gestation 35 j	1 chiffre 0= non 1= oui				
Gestation 60-90 j	1 chiffre 0= non 1= oui				
Avortement	1 chiffre 0= non 1= oui				
Date mise -bas	6 chiffres				
Sexe	1 chiffre 1= femelle 2= mâle				

4.3 RESULTATS

4.3.1 SEXAGE ET TAUX DE GESTATION

a) SEXAGE

* EFFICACITE : à partir d'un nombre de 324 embryons biopsiés par micro-couteau, 95 % des embryons étaient sexés (Tableau 9) avec un taux d'efficacité qui varie en fonction du nombre de cellules prélevées (≤ 4) et (> 4) : 92,7 % versus 98,6 % avec une différence significative $P < 0,009$. Par contre la qualité et le stade de l'embryon biopsié n'ont aucun impact sur la détermination du sexe de l'embryon (Tableaux 10,11).

Pour les deux types d'opérateurs, aucune différence significative n'a été observée.

* EXACTITUDE : l'exactitude s'apprécie par la comparaison des sexes déterminés en laboratoire et le produit de conception, elle était à 100 % pour $n = 24$ mise bas (même sexe)

b) TAUX DE GESTATION

A partir d'un total de 207 embryons biopsiés par micro-couteau et sexés (avant congélation) dont une partie a été congelée (à l'éthylène glycol, glycérol saccharose) et l'autre partie a été transférée à l'état frais, 55,6 % des receveuses étaient gravides (Tableau 12).

- le taux de gestation des embryons sexés et congelés à l'éthylène glycol est de 57,9 % ($n=133$)

- le taux de gestation des embryons sexés et transférés à l'état frais est de 59,5 % ($n=44$)

- le taux de gestation des embryons sexés et congelés au glycérol saccharose est de 36,8 % ($n=19$)

- le taux de gestation des embryons congelés, décongelés puis sexés est de 45,5 % ($n=11$) (transfert immédiat avant connaissance du sexe).

* FACTEURS DE VARIATION

✓ METHODE DE CONSERVATION : il n'y a aucune différence significative entre les deux méthodes embryon sexé et congelé à l'éthylène glycol ou sexé et transféré à l'état frais : 57,9 % versus 59,5 %.

Par contre il y a une différence entre la méthode de congélation à l'éthylène glycol et au glycérol saccharose : 57,9 % versus 36,8 %. Par contre les méthodes de congélation glycérol saccharose et décongelé sont moins bonnes que les deux premières méthodes (frais et congelé à l'éthylène glycol) avec $P = 0,06$

Tableau 9 : Sexage des embryons biopsiés au micro-couteau selon le nombre de cellules prélevées.

Nombre de cellules	Nombre d'embryons biopsies	Sexe Déterminé	%
≤ 4	181	167	92,3 (1)
> 4	143	141	98,6 (2)
Total	324	308	95,1

(1), (2) : P < 0,009

Tableau 10 : Sexage des embryons biopsies au micro couteau selon la qualité

Qualité	Nombre D'embryons biopsies	Sexe déterminé	%
1	133	126	94,7
2	164	156	95,1
3	21	20	95,2
Total	318	302	95,0

P : NS

Tableau 11 : Sexage des embryons biopsiés au micro-couteau selon le stade

Stade	Nombre d'embryons	Sexe déterminé	
		Nombre	%
Morula	180	171	95
Jeune blastocyste	82	79	96,3
Blastocyste	57	53	93,0
Blastocyste expansé	5	5	100
Total	324	308	95,1

P : NS

✓ **PARITE DES RECEVEUSES** : les taux de gestation ont été significativement plus élevés ($P < 0.05$) lorsque les embryons étaient transférés chez des receveuses génisses que chez des receveuses vaches : 66,2 % versus 44 % (Tableau 13).

✓ **SEXE** : le taux de gestation des embryons sexés femelles n'est pas différent de celui des embryons sexés mâles : 58,2 versus 54,5 % (Tableau 14)

✓ **STADE DES EMBRYONS** : le stade des embryons biopsiés et congelés à l'éthylène glycol avec l'opérateur 1 et 2 n'a aucun effet sur le taux de gestation. Il n'y a aucune différence significative (Tableau 15).

Par contre, il y a une influence significative $P < 0,01$ des embryons (jugés par l'opérateur 2) sur le taux de gestation : 51,2 % ($n=41$) pour les morulas, 50 % ($n=28$) jeune blastocyste et 84,6 % ($n=26$) pour les blastocystes (Tableau 16).

On remarque que les meilleurs résultats du taux de gestation ont été obtenus avec des embryons biopsiés au stade blastocyste : 84,6 % (mais les nombres d'embryons sont faibles).

✓ **L'EQUIPE DU T.E.** : Il n'y a aucune influence significative des équipes du T.E. sur le taux de gestation.

✓ **LA QUALITE** : la qualité des embryons a une influence significative sur le taux de gestation : Le taux de gestation selon la méthode éthylène glycol était de 65,8 % de qualité 1, et 46,3 % de qualité 2, avec une influence significative ($P < 0,02$) (Tableau 17).

Les taux de gestation des embryons de qualité 1 et de qualité 2 transférés à des génisses n'ont pas été significativement différents : 64,2 % versus 59,2 % (Tableau 18).

Par contre les taux de gestation des embryons de qualité 1 et de qualité 2 transférés à des vaches ont été significativement différents : 58,8 % versus 11,1 % (mais le nombre des vaches est très faibles) avec $P < 0,01$. Les taux de gestation des embryons de qualité 1 et 2 transférés chez les receveuses (vache et génisse) ont été significativement différents avec $P < 0,02$.

Tableau 12 : Taux de gestation selon les méthodes de congélations et les opérateurs

Méthode de congélation	Nombre d'embryons transférés	Nombre de gestations	%
Frais	44	26	59,1 (a)
Ethylène glycol (opérateur 1)	38	20	52,6
Ethylène glycol (opérateur 2)	95	57	60
TOTAL	133	77	57,9 (a)
Glycérol saccharose (opérateur 1)	19	7	36,8 (b)
Décongélation	11	5	45,4 (b)
Total	207	115	55,5

a, b : P = 0,06

Tableau 13 : Taux de gestation selon la parité.

Parité de la receveuse	Nombre de transferts	Nombre de gestation	%
Génisse	77	51	66,2 (1)
Vache	25	11	44,00 (2)
Total	102	62	62,8

(1), (2) : $P < 0,05$

Tableau 14 : Taux de gestation selon le sexe d'embryon

Sexe	Nombre d'embryons	Nombre de gestations	Taux
Femelle	103	60	58,2 (a)
Mâle	33	18	54,5 (a)
Non identifié	12	9	75 (b)

a : différence non significative

b : l'effectif est faible (12)

4.3.2 SEX-RATIO

Comme il est illustré dans le tableau 19, 47,4 % (n=143) des embryons sexés étaient femelles.

- **LA QUALITE** : qualité de l'embryon biopsié n'a pas d'effet significatif sur le sexe.

- **LE STADE** : le stade de l'embryon au moment de la biopsie n'a pas d'effet significatif sur la sex ratio :

54,4 %, 51,9 %, et 50,9 %, d'embryons mâles ont été trouvés respectivement pour les morulas (n=171), les jeunes blastocystes (n=79), et les blastocystes (n=53), (40 % pour 5 blastocystes expansés).

Tableau 15 : Taux de gestation des embryons biopsies puis congelés à l' éthylène glycol et transférés selon le stade.

Stade	Nombre d'embryons transférés	Nombre de gestations	%
Morula	53	29	54,7 (1)
Jeune blastocyste	32	16	50,00 (2)
Blastocyste + blastocyste expansé	48	32	60,6 (3)
Total	133	77	57,8

1 ,2 et 3 : $P > 0,05$

* Nombre très faible de blastocystes expansés

Tableau 16 :Taux de gestation des embryons (jugé par l'opérateur 2) selon le stade.

Stade	Nombre d'embryon Transférés	Nombre de gestation	%
Morula	41	21	51,2 (1)
Jeune blastocyste	28	14	50,00 (1)
Blastocyste	26	22	84,62 (2)
Total	95	57	60,00

1 ,2 : $P < 0,01$

Tableau 17 : Taux de gestation des embryons congelés a l'éthylène glycol selon la qualité de l'embryon

Qualité de l'embryon	Nombre d'embryons transférés	Nombre de gestations	%
Q1 (excellent)	79	52	65,8 (1)
Q2 (bon)	54	25	46,3 (2)
Total	133	77	57,3

1, 2 : $P < 0,02$

Tableau 18 : Taux de gestation (frais et congelé) selon la qualité de l'embryon et la parité de la receveuse (génisse)

LA PARITE DE LA RECEVEUSE	QUALITE DE L'EMBRYON	
	Q 1	Q 2
Génisse	64,2 % (35/56) (a)	59,7 % (40/67) (a)
Vache	58,8 % (10/17) (a)	11,1 % (1/9) (b)
Total	63 % (46/73) (c)	53,9 % (41/76) (d)

a, b : $P < 0,01$ c, d : $P < 0,02$

Tableau 19 : Sex-ratio selon la qualité des embryons biopsies

Qualité des embryons	Nombre d'embryons sexés	SEXE			
		Femelles	%	Mâles	%
1	126	62	49,2 (1)	64	50,8
2	156	76	48,7 (2)	80	51,3
3	20	5	25,0	15	75,0
Total	302	143	47,3	159	52,6

1, 2 : P > 0,05

DISCUSSION ET INTERPRETATION

4.4 DISCUSSION ET INTERPRETATION

TAUX DE GESTATION

* Globalement les taux de gestation des embryons biopsiés au micro-couteau en vue de la détermination du sexe ont été de **55,5 %** (115 / 207).

* Les taux de gestation après transfert d'embryon biopsie frais était de 59,1 % (26/44), ce taux est un peu supérieur au taux cité par NIBART et al., (1996) : 54 % (n=800), par contre il correspond bien au taux cité par NIBART et al., (1992) : 58 % en moyenne.

* Pour le protocole (éthylène glycol) le taux de gestation des embryons biopsiés au micro-couteau et congelés à l'éthylène glycol, était de 57,9 % (77/133), ce taux est équivalent à celui obtenu par NIBART et al., (1997) : 55,2 % (n =34); NIBART et al., (1996 b) : 55 % n=27 ; BONDIOLI et al., (1989); HERR et REED, (1991) ont trouvé des taux de gestation de 41 à 63 % .

* Pour le protocole utilisant le glycérol saccharose le taux de gestation a été de 36,8 % (7/19). Ce taux est équivalent aux résultats cités par KOHEN et al .(1990) : 33 % (6/18).

Les facteurs de variation des taux de gestation n'ont pas été tous pris en considération étant donné la difficulté de récupérer des données chez les éleveurs ou les équipes de TE.

- Il existe plusieurs effets sur le taux de gestation :

* L'effet de la parité des receveuses, déjà significatif pour les embryons entiers et qui s'amplifie pour les embryons biopsiés (génisses versus vaches : 66,2 % et 44 %), ces résultats confirment les résultats cités par NIBART et al., (1997) (génisses versus vaches : 59,4 % et 34,8 %).

* Il y a une influence significative $P < 0,01$ des embryons (jugés par l'opérateur 2) sur le taux de gestation. On a constaté que les meilleurs résultats du taux de gestation ont été obtenus avec des embryons biopsiés au stade blastocyste : 84,6 %, morula (51,2 %), jeune blastocyste (50,0 %).

Ces résultats peuvent être comparés avec des résultats trouvés par LACAZE (1996 non publié), des taux de gestation de : 50,5 % (n=91) pour les morulas et de 74,4 % (n=43) pour les blastocystes avec une influence significative de $P < 0,01$, après transfert à l'état frais.

* La qualité des embryons a une influence significative sur le taux de gestation. Pour un taux moyen de gestation de 57,9 % (n=133) (qualité 1 et 2) : 65,8 % (n=79) de qualité 1, et 46,3 % (n=54) de qualité 2 , avec une influence significative ($P < 0,02$).

Ce taux est un peu supérieur au taux cité par NIBART (1996) : 53 % (n=301) de qualité 1 et 2, et 34 % (n=103) de qualité 3, avec une influence significative $P < 0,05$.

Il y'a une interaction entre la qualité de l'embryon et la parité de la receveuse :

Les embryons de qualité 2 transférés chez les génisses et les vaches sont significativement différents : 59,7 % (40/67) versus 11,1 % (1/9) avec $P < 0,01$.

* Il n'y a pas de différence significative entre les 3 équipes de TE. Cependant de tels résultats ne peuvent être obtenus que si les inséminateurs ont été extrêmement bien formés aux méthodes de choix des receveuses et à la technique de transfert cervical.

Par contre il n'y a aucun effet de la méthode de congélation (éthylène glycol ou frais) sur le taux de gestation.

D'après les résultats obtenus, on peut constater que le taux de gestation des embryons sexés et congelés (PBS + BSA + 40 % SVF + 1.5 M éthylène glycol) est équivalent à celui des embryons sexés et transférés frais : 57,9 % versus 59,9 %. Ces résultats sont aussi identiques pour les embryons non micro-manipulés. Cependant pour optimiser les taux de gestation il faut prendre en considération les sources de variation (Tableau 20).

SEXAGE

EXACTITUDE : pour n= 24 mises bas, on a trouvé une exactitude de 100 %. Ce taux est supérieur à celui trouvé par LACAZE (1996) : 105 veaux étaient de sexe femelle (98 % d'exactitude)

EFFICACITE : 95 % (308/324) des embryons étaient sexés ; ce résultat est en concordance avec celui publié par NIBART et al.,(1996) : 95 % ,et LACAZE (1996) : 93 % (n=660), CARBORNNEAU et al.,1997 : 95,7% (244/255).

Le taux d'efficacité varie en fonction du nombre de cellules prélevées (≤ 4 , > 4) : 92,7 % versus 98,6 % avec une différence significative $P < 0,009$, LACAZE (1996) avait publié des taux d'efficacité (n=510) selon le nombre de cellules biopsiées : 96 % (plus de 5 cellules), 88 % (4 à 5 cellules)et 76 % (2 à 3 cellules) $P < 0,01$.

NIBART et al., (1992), avaient trouvé un taux d'efficacité proche de 90 % pour les embryons congelés et puis décongelés et biopsiés. Ceci est intéressant pour des embryons actuellement présents dans les banques d'embryons.

Ils ont montré que la sensibilité de détection avec de tels prélèvements n'était pas significativement différente de celle d'une cellule.

La méthode de biopsie par aspiration n'a pas été prise en compte vu le manque de données et d'effectif , cependant CARBORNNEAU et al., (1997) précisent que la méthode de biopsie par micro couteau est significativement plus efficace que celle par aspiration : respectivement 95,7 % et 85,3 % , $P < 0,001$.

Tableau 20 : Sources de variation des taux de gestation

Pas d'effet	Effet
Equipe	Stade de l'embryon
Opérateur	Qualité de l'embryon
Nombre de cellules biopsiées	Parité de la receveuse
	Interaction qualité de l'embryon* parité de la receveuse
	Méthode de conservation

SEX-RATIO :

47,3 % (n=143) des embryons sexés étaient femelles. Ce résultat correspond bien à celui obtenu par LACAZE et al (1996) : 48 % femelles. Selon NIBART et al.,(1996), 54 % des embryons biopsies étaient mâles et ce pourcentage est significativement différent de 50 % $P < 0,05$, mais non significatif pour une sexe-ratio de 52 % de veaux mâles nés après transfert d'embryons congelés entiers.

Le stade de l'embryon au moment de la biopsie n'a pas d'effet significatif sur la sex-ratio, nos résultats sont identiques à ceux cités par NIBART et al., (1996) : 51 % (morulas n=356) mâles , 56 % (jeune blastocyste n=122) mâles et 48 % (blastocyste n=82) mâles, $P > 0,05$.

La qualité de l'embryon, et les 2 opérateurs utilisés ici n'ont aucun effet sur la sex-ratio.

4.5 CONCLUSION :

Dans nos conditions, la congélation de l'embryon biopsié semble donc opérationnelle avec des taux de gestation semblables à ceux obtenus avec des embryons entiers congelés pour transfert direct.

Le taux de gestation des embryons sexés et congelés (congélation classique) selon NIBART et al., (1996) était de 25 %, ce qui implique que la biopsie par micro couteau a entraîné des taux de gestation médiocres. La méthode fondée sur l'aspiration des cellules de la biopsie s'est révélée intéressante avec un taux de gestation de 50 % (NIBART et al., 1996) ; seulement cette méthode est plus difficile en pratique.

Nous avons pu avoir des résultats intéressants en modifiant le milieu de congélation (protocole éthylène glycol) avec un taux de gestation de 57.9 % ; ce n'est pas statistiquement différent de celui des embryons sexés et transférés frais (59,1 %).

Par ailleurs, grâce à cette congélation en milieu modifié, les éleveurs auront à leur disposition des banques d'embryons femelles provenant de femelles et de mâles de haute valeur génétique.

Dans ces conditions il sera possible de dissocier les opérations de biopsies et de sexage, de prévoir quelques receveuses pour les embryons médiocres, de diminuer le coût du sexage ce qui permettra à l'éleveur de bien gérer ses receveuses.

CONCLUSION GENERALE:

Les éleveurs disposent désormais d'une méthode fiable de détermination du sexe de l'embryon avant son transfert en receveuse et ceci grâce au sexage des embryons bovins par la mise en évidence par la technique PCR, d'une séquence spécifique de l'ADN du chromosome Y (séquence BC 1.2 brevet INRA).

D'après les résultats obtenus, cette méthode est sensible, efficace et exacte.

Les taux de gestation des embryons biopsiés sexés et congelés à l'éthylène glycol sont équivalents à ceux d'embryons sexés transférés frais et aussi à ceux des embryons non micro manipulés.

Les bons taux de gestation obtenus après transfert d'embryons biopsiés, sexés et congelés , permettent d'envisager de dissocier les opérations de sexage et de réduire les coûts. Ceci devrait entraîner un intérêt accru pour l'éleveur de race laitière qui préfère transférer des embryons sexés femelles.

Les embryons congelés pourront être échangés entre fermes, régions et pays en respectant les conditions de manipulation *in vitro*, préconisés par les instances vétérinaires internationales.

Par ailleurs, le sexage pourrait entraîner la production de 80 % de femelles et de 20 % de mâles, à l'opposé des 100 % de mâles obtenus parfois (NIBART,1992 ; NIBART et al.,1993). Ainsi il peut optimiser la gestion des receveuses (LACAZE et al.,1993).

Pour l'éleveur cette méthode assure, avec une haute sécurité l'obtention de veaux du sexe désiré, et lui permet une gestion plus facile et moins onéreuse de ses receveuses.

ANNEXES

ANNEXE 1 : BESOIN PHYSIOLOGIQUES DE L'EMBRYON BOVIN

1. IONS MINERAUX PRINCIPAUX (IDEM SERUM SANGUIN)

NA , K , CA , MG , CL , PO4 , SO4 , H CO3

2. OSMOLARITE : 0.3 OSMOLES

IONS NA ET CL PRINCIPAUX RESPONSABLES

3. pH : 7.2 7.4

TAMPON PHOSPHATE
TAMPON BICARBONATE

PBS DE DULBECCO
B2 MENEZO

4. SOURCES D'ENERGIE :

GLUCOSE 1 MG/ ML
PYRUVATE DE NA , LACTATE , ACETATE

5. ACIDES AMINES

6. VITAMINES

7. MACROMOLECULE : ALBUMINE BOVINE

BSA DU COMMERCE : (SOUS FORME LYOPHYLISEE) (FRACTION V APRES ELECTROPHORESE) 2 - 8 G/L

SV FOETAL , NOUVEAU-NE , BOEUF , MOUTON (40 G ALBUMINE / LITRE DE SERUM).

DECOMPLEMENTE 56 °C 30 MN
CONSERVE CONGELE

8. DIFFERENTS FACTEURS :

ANTIBIOTIQUES
HORMONES
EAU
STERILITE (FILTRATION SUR MILLIPORE)

**ANNEXE 2 : COMPOSITION DU MILIEU PBS : PHOSPHATE
BUFFEREDSALINE (WHITTINGHAM 1971)**

EAU DESIONISEE	1 LITRE
NACL	8 G
PYRUVATE DE NA	0.036 G
KCL	0.20 G
NA ₂ HPO ₄	1.150 G
KH ₂ PO ₄	0.20 G
GLUCOSE (D+) ANHYDRE	1.0 G
MG CL ₂ 6H ₂ O	0.1 G
CA CL ₂ 2H ₂ O	0.1 G
PENICILLINE	100 000 UI
STREPTOMYCINE	50 MG
ALBUMINE BOVINE LYOPHILISEE	2 A 4 G

ANNEXE 3 : TROIS TYPES D'ORGANISATION DU SEXAGE EN PRATIQUE

Type d'organisation	Conditions	Avantages et inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> * Biopsie et sexage en ferme (ou laboratoire proche) * Transfert en frais des embryons de sexe désiré après résultats de sexage 	<ul style="list-style-type: none"> * Techniciens très compétents pour la biopsie et le sexage 	<ul style="list-style-type: none"> *Organisation difficile *Nombre de receveuses difficile à prévoir *Intervalle collecte -transfert des embryons : 6 h
<ul style="list-style-type: none"> * Biopsie en ferme (ou laboratoire proche) *Tous les embryons transférés a l'état frais * Biopsies expédiées à un laboratoire centralisé 	<ul style="list-style-type: none"> * Techniciens très compétents pour la biopsie * Sexage dans les 8 jours * PGF2 alpha aux receveuses ayant reçu un embryon de sexe non désiré pour retour en chaleurs dans leur cycle 	<ul style="list-style-type: none"> *Organisation plus difficile *Nombre de receveuses plus facile à prévoir * Coût du sexage diminué
<ul style="list-style-type: none"> * Biopsie en ferme (ou laboratoire proche) * Embryons biopsiés congelés * Biopsies expédiées à un laboratoire centralisé * Transfert différé des embryons stockés congelés, de sexe désiré 	<ul style="list-style-type: none"> * Techniciens très compétents pour la biopsie *Méthode de congélation efficace 	<ul style="list-style-type: none"> * Organisation plus difficile *Prévoir quelques receveuses pour les embryons médiocres * Coût du sexage diminué * Meilleure gestion des receveuses

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. ANGELIER (N.),1982. *Données de base des transformations liquide- solide au cours de la congélation des milieux biologiques. France cryo , Ed .D.r.j Gerota.*
2. BISHOP (C.E.), COTTINOT (C.), FELLOUS (M.), KIRZEN-BAUM (M.) et VAIMAN (M.), 1987.*Sonde d'ADN spécifique du génome mâle des ruminants, leur préparation et utilisation.- Application Filed with european patent office (EPO).-Publication n° 23 5046 A1.*
3. BONDIOLI (K.R.), ELLIS (S.B.), PRYOR (J.H.), WILLIAMS (M.W.) and HARPOLD (M.), 1989.-*The use of male- specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos.-Theriogenology,31 : 95-104.*
4. BOOMAN (P.) et al. 1989. -*Sexing bovine embryos with monoclonal antibody against the H-Y antigen. Livestock Prod Sci 23.1-16.*
5. CHUPIN (D.),1985. *Applications pratiques du transfert d'embryons chez les bovins. Elevage et insémination , 206. 3-16.*
6. CHUPIN (D.),1988. *Super ovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. Coll. Soc. Fr. Etudes fert., 213-232.*
7. CHEMINEAU (P.), CHUPIN (D) ,COGNIE (Y) ,THIMONIER (J.), 1991. *La maîtrise de la reproduction des mammifères domestiques Dans : La reproduction chez les mammifères et l'homme. Thibault C., Levasseur M. C . Editions Eclipses INRA, 1991, 655-676.*
8. CHUPIN (D.) et THIBIER (M.), 1994 . *Résultats d'une enquête sur l'état d'insémination artificielle dans les pays développés. Elevage et insémination. 263 ,1-18.*
9. COLLEAU (J.J.), HEYMAN (Y.), RENARD (J.P.), 1998 . *Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leur applications réelles ou potentielles en sélection. INRA, prod. Anim., 11, 41-56.*

10. CARBONNEAU (G.), MORIN (N.), DUROCHER (J.) and BOUSQUET (D.), 1997. Viability of bovine IVF Embryos biopsied with micro section or micro aspiration technique for sexing-Theriogenology. Vol 47 N° 1.
11. ELLIS (S.B.) et HARPOLD (M.N.), 1993. -Nucleic acid probes for prenatal sexing-International application published under the patent cooperative treaty (PCT).-World intellectual property organisation; publication n° wo 86/07095.
12. FERNANDES (M.), ESPOSITO (L.) et NIBART(M.), 1991 - Congélation des embryons biopsiés de souris et de vache Non publie.
13. HERRC (M) et REED (KC).-1991- Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. Theriogenology ,35 : 45-54.
14. INRA-UNCEIA, 1990. Blastographie. El. et ins., 235 : 39 p.
15. KOHEN (G) .,BAUDU (P)., NIBART (M) .,ESPOSITO (L)., DESMETTRE (P).,THIBIER (M).1990 . Sexage rapide des embryons bovins par amplification d'ADN. In; 6 ème réunion AETE., septembre 1990 ,Lyon (France) ,P 162 (Abstr).
16. LARESSE (A.), ERSHAM (A.), 1982. Les agents cryoprotecteurs ;leur nature et fonctions en cryobiologie. France cryo, Ed. D .r . j Gerota.
17. LEIBO (S.P.), 1983. A one- step in situ dilution method for frozen-thawed bovine embryos. -Cryo letters.,4 :387-400
18. LACAZE (S.), COUPET (H.) et BLATTES (M.), 1993.- Bilan et intérêt de la technique du sexage des embryons bovins de race laitière.- In : 9 ème colloque scientifique de l'AETE Fondation Marcel Merieux (Lyon, France),10-11 sept. 1993.-p.220.
19. LACAZE (S.), LESCLAUX (J.), COUPET (H.), 1996. The sexing of bovine embryo in the south-west of France (Efficiency, accuracy and pregnancy rates after three years activity : In compte rendu du 12 eme colloque scientifique de l'AETE : 156.
20. MAZUR (P.), 1980. Limits to life at low temperatures and at reduced water activities. Orig.life,10,137 (Abstr).

21. MANDELSAUM (J.), 1990. *La congélation des embryons humains. Contracept Fert. Sex, 18, 341-353*

22. MALAFOSSE (A.), 1995. *L'insémination des différentes espèces animales dans le monde. Document UNCEIA, paris.*

23. MENEZO (Y.), 1976 -*C. r. heb. Acad. Sci. Ser. D, Paris, 1976, 282, 1967-1970.*

24. NIBART (M.) et BOUYSSOU.(B.), 1981. *Le transfert embryonnaire chez les bovins. : Rec. Méd. Vét.,vol.157(1):71-87.*

25. NIBART (M.), 1986. *Le transfert embryonnaire chez les bovins et l'importance des receveuses. In : Banques de gènes et technologies de la reproduction bovine. Symposium de Pau Juin 1986,15-39.CEIA de Pau. Ed. Lescar France*

26. NIBART (M.), 1987. *Taux de gestation des embryons biopsiés transférés selon le mode de conservation. In : compte rendu d'activité des services techniques de l'UNCEIA (1986-1687*

27. NIBART (M.), 1991. *Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquées: bissection et sexage . Rec . Méd ., 167,261-290 .*

28. NIBART (M.), KOHEN (G.), ESPOSITO (L.), DESMETTRE (P.) et THIBIER (M.), 1991. *Sexage des embryons. In jornadas técnicas sobre transplante de embriones en vacuno , Olite (Espagne), 28-29 juin 1991 : 7-13*

29. NIEMANN (H.), 1991. *Cryopreservation of ova and embryos from livestock : current status and research needs. Theriogenology, 35 ; 109-124.*

30. NIBART (M.), KOHEN (G.), ESPOSITO (L.), BAUDU (P.), THUARD (J.M.), DESMETTRE (P.) et THIBIER (M.), 1992. *-Rapid bovine embryo sexing by DNA probe:Field Resultats -In: 12 th international congress on animal Reproduction. -23-27 aout (La Haye,Hollande)- congress proceedings,vol.2.-P.727-729 (Paper n°212).*

31. NIBART (M.), 1992.-*Practical application of two advanced biotechnologies to bovine embryo-transfert : Splitting and sexing. -In : < Embryonic developpment and manipulation in animal production : Trends in research and application > (LAURIA A. GANDOLFI F.)- Portland press ltd -. Londres .-p.215-224 (paper n°18)*

32. NIBART (M.) et THIBIER (M.), 1992. *Premiere réunion de la société Italienne de transfert embryonnaire et symposium international de biotechnologie de la reproduction- El. et ins., 250 (Août) : 19-23.*
33. NIBART (M.), THUARD (J.M.), ESPOSITO (L.), HERPE (P.), HASCOET (J.), MARREC (C.), LEBRU (D.) et ROHOU (A.), 1993.- *Bovine embryo sexing and modelization in attempt to produce female calves by embryo transfert .-In : 9eme colloque scientifique de l'AETE . Fondation marcel Merieux (lyon,Fance),10-11 sept 1993.-p.224.*
34. NIBART (M.), THUARD (J.M.) et HUMBLLOT (P.), 1996 - *Le programme Français du sexage des embryons bovins -El. et Ins., 271 (Fevrier 1996).-10-18.*
35. NIBART (M.) et HUMBLLOT (P.), 1996. *Utilisation des hormones gonadotropes hypophysaires chez les bovins*
36. NIBART (M.), THUARD (J.M.), DURAND (M.), GUYADER-JOLY (C.), PONCHON (S.) et HUMBLLOT (P.), 1996 b. *Pregnancy rates after tranfer of frozen and biopsied bovine embryos.-In: 12 éme reunion AETE.*
37. NIBART (M.), PIUMI (F.), MOREL (A.), GELDHOF (A.) et LACAZE (S.), 1997. - *Compte rendu de la visite auprès de l'équipe TE du CIA D'Oosterzele (BELGIQUE) les 15 et 16 octobre 1997.*
38. NIBART (M.), MOREL (A.), DURAND (M.), PIUMI (F.), GUERIN (B.) and HUMBLLOT (P.), 1996 b. *Pregnancy rates and accuracy of sexing after tranfer of frozen biopsied bovine embryos. AETE .*
39. PICARD (L.), KING (W.A.) et BETTERIDGE (K.J.), 1985. *Production of sexed calves from frozen-Thawed embryos.-Vet.Record,117:603-608.*
40. RENARD (J.P.) ,PHILIPPON (A.), MENEZO (Y.), 1980. - *J. Reprd. Fert., 58 ,161-164.*
41. RENARD (J.P.), 1985. *La conservation de l'embryon de mammifères. Thèse Doctorat d'état. Université Pierre et Marie Curie, Paris.*
42. ROHOU (A.), 1996. *Les nouvelles biotechnologies de la reproduction. Mémoire de fin d'étude (ENSA) .*

43. SAUMANDE (J.), 1995. *La production d'embryons chez les bovins : Quelles voies de recherche pour augmenter l'efficacité des traitements de super ovulation*, INRA Prod. Anim., 1995, 8(4),275-283.
44. STEINER (M.), 1989 . *Contribution à l'étude de la congélation du demi embryon de souris. Thèse de Doctorat Vétérinaire ,ENV. Nantes, France, 93 P.*
45. THIBIER (M.) et NIBART.(M.), 1987. *Disease control and embryo importations. In : Theriogenology,27(1):37-45.*
46. THIBIER (M.), 1990 . *New biotechnologies in cattle production. In 7th congress of the fava 4-7 nov. Pattaya (Thailand). P.513-524 .*
47. THIBIER (M.) et NIBART (M.), 1991. *-Transfert embryonnaire chez les bovins avec référence particuliere à l'interaction embryons-agents pathogènes. Maîtrise de la reproduction animale. Critt-isis,Tours,29-31 mai 1991.*
48. THIBIER (M.), 1994. *Statistics of the embryo transfer industry around the world. IETS news letter .12,13-16 .*
49. THIBIER (M.), NIBART (M.), 1995. *The sexing of bovine embryos in the field. Theriogenology, 43, 71-80.*
50. WACHTE (L.)et al 1988.-*Sex sélection with monoclonal H-Y antibody.Fert Ster 50,355-360.*
51. WHITTINGHAM (D.G.), 1971. *Survival of mouse embryos after fressing and thawing. Nature ,233,125-126.*
52. WILMUT (I.) et ROWSON (L.E.A.), 1973. *Experiments on the low temperature preservation of cow embryos.Vet Rec.1973 ;92:686-690.*