



Institut des Sciences  
Vétérinaires- Blida

Université Saad  
Dahlab-Blida 1-



Projet de fin d'études en vue de l'obtention du  
**Diplôme de Docteur Vétérinaire**

**Etude bibliographique sur la fécondation in vitro chez la vache**

Présenté par  
**BEN ACHOUR MOHAMED AMINE**

**ZIEDI SEIFEDDINE**

Devant le jury :

Président(e) :	KELANAMER R.	MCB	ISV Blida
Examineur :	SAIDI A.	MAB	ISV Blida
Promoteur :	ADEL D.	MAA	ISV Blida

**Année : 2016/2017**

# DEDICACE

C'est avec profonde gratitude et sincères mots, que je dédie ce modeste travail de fin d'étude à mes chers parents **MABROUK** et **SOUAD** qui ont sacrifié leur vie pour ma réussite et m'ont éclairé le chemin par leurs conseils judicieux,

J'espère qu'un jour je pourrais rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que dieu les prête du bonheur et de longue vie.

Je dédie aussi ce travail à mon cher frère **ZIED**, mes chères sœurs **IMEN** et **WEJDEN** et en particulier ma chère nièce **NOUR ELYAKIN**.

Pour leur grand amour et leur soutien qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute gratitude.

Je dédie ce travail ;

À toute ma famille ;

À tous mes chers amis en Tunisie ;

À tous mes chers amis en Algérie ;

À toutes personnes qui m'ont encouragé ou aidé au long de ma vie et mes études.

**BAMA.**

# Dédicaces

C'est avec respect et gratitude que je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma sympathie à :

Mes très chers parents (mon père *Mekki* et ma mère *Hayet*) qui étaient toujours à mes cotés avec leurs encouragements et avec leurs sacrifices surtout . c'est grâce à eux que je vienne d'accomplir ce travail. je vous aime.

Ma sœur *Hiba*, la meilleure confidente de tous les temps, qu'Allah te protèges et t'aides à réaliser tes rêves.

Ma grand-mère *Naima*, mon grand-père *Hédi*.

Mes grands-parents maternels *Jilani* et *Zina*, partis il y a si peu du temps, paix à vos âmes.

Mes cousins et cousines, je vous adore tous ...bien que *Hammouda* et *Maryouma* resterons les meilleurs !

Mes oncles, mes tantes.

Mes très chers amis de Gmissa ,de Takelsa, et mes anciens amis de LPN .

Tous mes amis d'Algérie.

Toute la famille *Ziedi* de Takelsa.

Je terminerai ces remerciements par une personne qui m'est très chère :*Radia*. Te dédier cette mémoire est bien peu de chose en regard de ce que tu m'apportes.

*Seif*

# Sommaire

Introduction.....1

## Chapitre I: Anatomie et physiologie de l'ovaire

I. Anatomie et histologie de l'ovaire.....2

I.1. L'épithélium germinatif.....2

I.2. L'albuginée.....2

I.3. Le stroma.....2

II. Physiologie de l'ovaire.....4

II.1. La folliculogénèse.....4

II.1.a. Le follicule ovarien primordial.....5

II.1.b. Le follicule ovarien primaire.....5

II.1.c. le follicule ovarien secondaire.....5

II.1.d. le follicule ovarien mur.....5

II.2. L'atrésie folliculaire.....7

II.3. Régulation du cycle œstral.....8

II.4. L'ovogénèse.....	11
II.5. Formation des gamètes femelles.....	12
III. Régulation de la maturation ovocytaire.....	15

**Chapitre II : maturation in vitro**

I. Introduction.....	16
II. Maturation ovocytaire in vitro.....	16
II.1. Collecte des ovocytes.....	16
II.2. Classification et sélection des complexes ovocytes cumulus (COC).....	18
II.3. Technique de la maturation ovocytaire in vitro.....	20

**Chapitre III : Fécondation et développement embryonnaire in vitro**

I. Fécondation in vitro.....	26
I.1. Préparation et capacitation des spermatozoïdes.....	26
I.2. Fécondation.....	27
II. Développement embryonnaire in vitro.....	33
II.1. Généralités sur la culture des embryons.....	33

II.2. Systèmes de culture.....	35
--------------------------------	----

## **Chapitre IV : Autres biotechnologies utilisant les ovocytes maturés in vitro**

I. Cryoconservation.....	40
--------------------------	----

II. Diagnostic préimplantatoire.....	41
--------------------------------------	----

III. Technique de micromanipulation.....	42
--	----

## Liste des tableaux

Tableaux	Page
<b>Tableau 1</b> : Classification des complexes ovocytes cumulus en MIV synthèse ( Stojkovitch et al 2001),(De witt et al 2000).	19
<b>Tableau 2</b> : Composition du milieu tvrode albumine lactate pyruvate  ou TALP utilisé pour la FIV bovine (1671).	30
<b>Tableau 3</b> : Composition de milieux chimiquement définis utilisés pour la culture  d'embryons de ruminants (communication de P.Guérin).	39

## I. Anatomie et histologie de l'ovaire :

Les ovaires sont les gonades femelles, elles se situent dans la cavité pelvienne, en dessous des trompes de Fallope (aussi appelées oviductes) et de part et d'autre de l'utérus (Figure1) **(Marieb , 1998)** .Ils sont maintenus à cet endroit par différentes structures :

- Le ligament ovarien .
- Le ligament suspenseur qui les rattache à la paroi pelvienne.
- Le mésovarium qui les rattache au ligament large.

On distingue trois parties distinctes à l'ovaire : **(Figure 2)**

### I. 1. L'épithélium germinatif :

C'est la couche externe de l'ovaire. Elle est très épaisse et constituée d'un épithélium simple cubique ou pavimenteux : une seule couche de cellules de forme cubique ou pavimenteuse **(Wassef, 1999 )**.

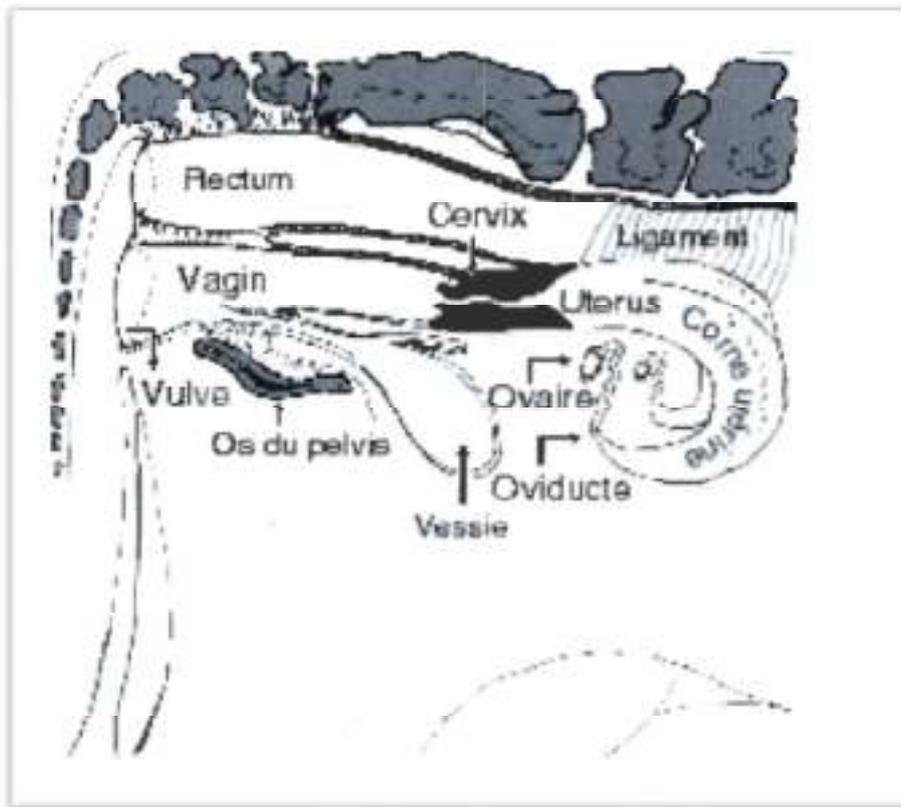
### I.2. L'albuginée :

Cette partie est située sous l'épithélium germinatif. Elle est constituée de tissus conjonctifs denses *(Anatomie de l'appareil reproducteur chez la femme)*.

### I.3. Le stroma :

Cette zone se divise en deux pour former le cortex du stroma (couche externe) et la médulla du stroma (couche interne). Le cortex est un tissu de soutien formé de tissu conjonctif et de cellules du stroma. Ces cellules forment des amas denses et sont disposées en spirales. Quand à la médulla, elle se compose d'ovocytes et de cellules folliculaires *(Anatomie de l'appareil reproducteur chez la femme)*.

C'est dans le cortex du stroma que se déroule l'activité folliculaire. Dans la médulla, on y retrouve beaucoup de vascularisation qui se fait par les artères ovariennes **(Wassef, 1999 )**



**Figure 1** : Illustration des différentes parties du système reproducteur femelle bovin.

(<http://academicos.cualtos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/data/tdg/FREPRO/ch1 .pdf>.)

## II. Physiologie de l'ovaire :

### II.1. La folliculogénèse :

Le follicule est une structure en forme de sac, formée par un amas de cellules mésodermiques, entourant une cellule ou un autre ensemble de cellules (**Marieb ,1998**). La folliculogénèse se définit comme étant l'évolution des follicules dans l'ovaire.

À l'âge adulte, chez les mammifères, les ovaires contiennent plusieurs follicules, lesquels sont à différents stades de croissance et de maturation. Seulement une minorité de ces follicules vont se rendre jusqu'à l'ovulation; les autres vont dégénérer par un processus appelé atresie folliculaire ( La croissance et la maturation des follicules sont dirigées par deux hormones gonadotropes d'origine hypophysaire soit l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) (**Marieb ,1998**). La production de FSH et de LH est, quant à elle, modulée par diverses hormones ovariennes; l'œstradiol, la progestérone et l'inhibine (**Marieb ,1998**). Le niveau de ces hormones est contrôlé par différentes molécules. Il a été rapporté que l' $\alpha$ 2-macroglobuline et l' $\alpha$ 2-M récepteur sont des substances qui semblent avoir un rôle paracrine ou autocrine important sur les cellules de la granulosa pour que ces dernières produisent de l'œstradiol (**Ireland et al ,2004**). Aussi, la GnSAF (gonadotrophin surge-attenuating factor) est un autre facteur qui a pour fonction de réguler négativement la sécrétion pulsatile de LH lors de la première moitié de la phase folliculaire (**Fowler et al ,1999**)

Chaque follicule contient un ovocyte entouré d'une ou plusieurs couches de cellules. Si une seule couche de cellules est présente, on appelle ces cellules : cellules folliculaires. Par contre, s'il y a plusieurs couches cellulaires, les cellules vont porter le nom de cellules granuleuses, communément appelées cellules de la granulosa (**Marieb,1998**)

L'évolution folliculaire est caractérisée par plusieurs stades de follicules :

**II.1.a. Le follicule ovarien primordial :**

Ce type de follicule est caractérisé par le fait que l'ovocyte qu'il contient n'est entouré que d'une seule couche de cellules (**Marieb,1998**).

**II.1.b. Le follicule ovarien primaire :**

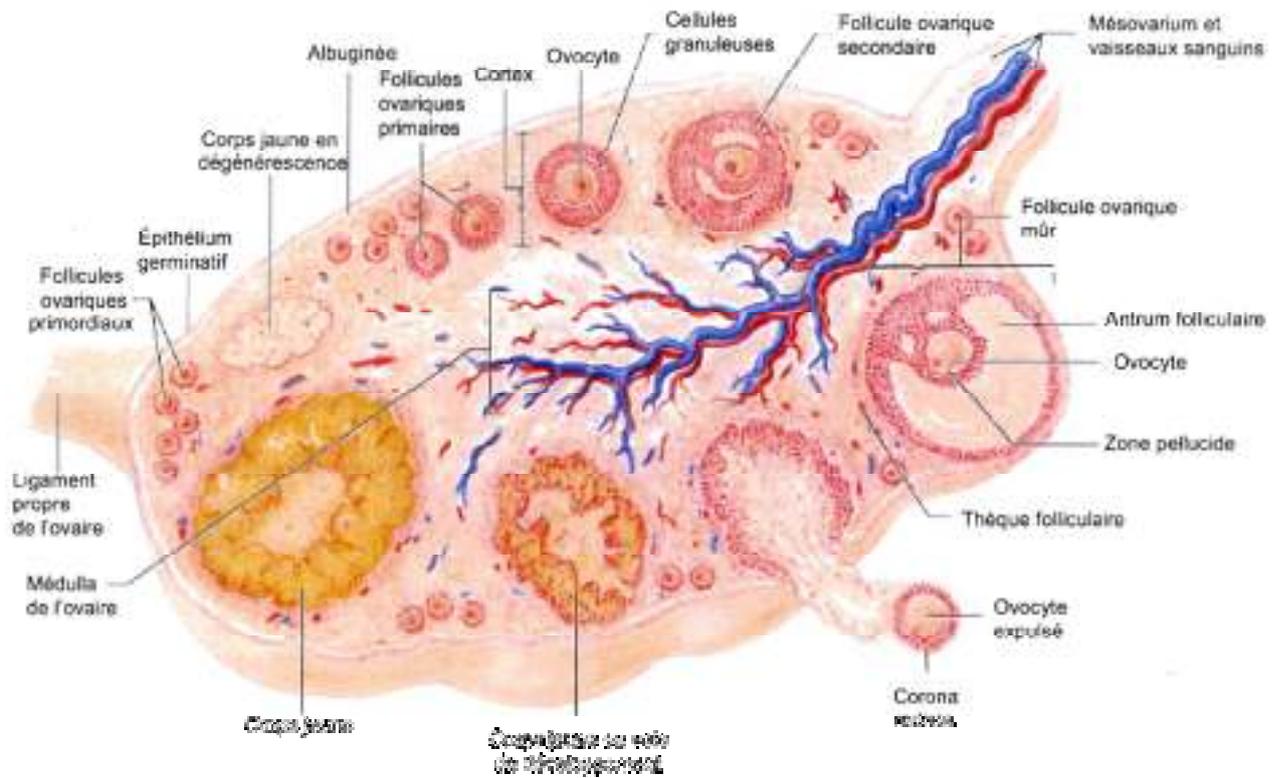
Ce type de follicule se caractérise par le fait que l'ovocyte qu'il contient est entouré de **deux ou plusieurs couches de cellules (Marieb,1998)**. Les cellules de la granulosa sont liées entre elles par des jonctions perméables, communément appelées gap-jonctions (**Mermillod,1999**) Ce sont des jonctions ouvertes qui laissent passer des ions, des métabolites et des molécules de signalisation. Un des signaux transmis de la granulosa à l'ovocyte est responsable du déclenchement de la maturation de ce dernier (**Mermillod,1999**).

**II.1. c. Le follicule ovarien secondaire :**

Rendu à ce stade, des espaces remplis de liquide apparaissent entre les cellules granuleuses et s'associent pour former une cavité nommée l'antrum folliculaire. La présence de cet antrum folliculaire est la caractéristique distinctive de ce type de follicule. Aussi, il y a formation de cellules thécales : une couche de tissu conjonctif qui se forme autour du follicule. Il y a collaboration entre les cellules granuleuses et les cellules thécales pour produire les œstrogènes (**Marieb,,1998**). En effet, les cellules de la thèque produisent des androgènes que la granulosa transforme en œstrogène.

**II.1.d. Le follicule ovarien mûr :**

Ce type de follicule ressort à la surface l'ovaire et chaque mois, lors de l'ovulation, un ovocyte est expulsé (**Marieb ,1998**).



**Figure 2 :** Illustration des différents stades de croissance folliculaire. Tirée et adaptée de (Marieb,1998).

Le temps requis pour qu'un follicule primordial parvienne au stade de follicule pré-ovulatoire s'estime en terme de mois chez la vache et chez l'Homme (**Webb et al, 2004**). Le follicule doit obligatoirement subir une maturation pré-ovulatoire (phase folliculaire) pour le rendre apte à répondre à la décharge ovulante qui induira la rupture folliculaire, la libération d'un ovocyte mûr et la transformation du follicule en corps jaune (**Demeestere et al, 2005**), l'initiation de la croissance des follicules dépendrait, entre autre, du système Kit (système paracrine constitué de deux protéines, le récepteur kit et son ligand kit) activé par l'AMPc. L'augmentation d'AMPc serait quand à elle, induite par l'action de facteurs locaux (**Demeestere et al, 2005**) Kit ligand, est aussi régulé par GDF-9 (growth differentiation factor 9). De plus, la FSH agirait avec des facteurs locaux comme : EGF (epidermal growth factor), activin A, GDF9, TGF 3 (transforming growth factor beta), FGF2 (fibroblast growth factor 2), KGF (kératinocyte growth factor) et HGF (hépatocyte growth factor) pour stimuler la croissance des divers follicules (**Demeestere et al, 2005**).

## II.2. L'atrésie folliculaire :

Selon plusieurs études, pas moins de 99% des follicules qui entrent en croissance dégénèrent. Pourquoi cette dégénérescence? Plusieurs scientifiques tentent d'élucider ce mystère. Jusqu'à maintenant, les causes de cette dégénérescence, appelée atrésie folliculaire, ne sont pas toutes connues, cependant plusieurs hypothèses ont été proposées dont :

- 1) Le follicule est prédestiné dès sa formation à ovuler ou à dégénérer.
- 2) Le processus d'atrésie s'opère à chaque stade de développement au hasard, par tirage au sort dans un pool de follicules ayant tous les mêmes potentialités (**Monniaux et Monget, 1999**).

Les causes de l'atrésie folliculaire ne sont pas encore bien connues, mais les symptômes de ce processus sont nombreux et beaucoup mieux connus. Cette dégénérescence est le résultat d'un processus apoptotique (**Hughes et Gorospe, 1991**). Le premier signe d'atrésie se manifeste par la dégénération des cellules de la granulosa.

L'ovocyte n'est affecté que vers les derniers stades du processus d'atréxie folliculaire (**Driancourt et al ,1991**). L'apoptose massive des cellules de la granulosa marque à coup sûr l'atréxie des follicules à antrum. Cependant la présence de quelques cellules apoptotiques (taux < 0,2%) dans la granulosa est observée dans la presque totalité des follicules en croissance (**lolly et al ,1997**). Plusieurs marqueurs d'atréxie ont été découverts. Notamment, il y a, relativement à la granulosa, une perte précoce de la P450 aromatasase, une perte tardive des récepteurs FSH et LH, une diminution progressive de la connexine 43, une augmentation des récepteurs de l'IGF 2/mannose 6 phosphate, une augmentation tardive de la lamine, de la fibronectine, du collagène IV ainsi que des héparane sulfate protéoglycanes (**Monniaux et Monget ,1999**) Du côté de la thèque folliculaire, on dénote une diminution tardive de la P450 17 $\alpha$ -hydroxylase, de la C17-20 lysase, une augmentation de l'IGFBP-2 et -4 de même qu'une perte précoce des récepteurs de F IGF 2/mannose 6 phosphate et une perte précoce de la fibronectine cellulaire (**Monniaux et Monget,1999**). Quant au liquide folliculaire, les changements fonctionnels observés au cours de l'atréxie des follicules sont une chute précoce des œstrogènes, une augmentation des androgènes, une augmentation progressive de l'IGFBP -2, -4, -5, une augmentation précoce et progressive des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 et finalement une augmentation de l'héparane sulfate protéoglycanes et de la prorénine (**Monniaux et Monget ,1999**).

### II.3. Régulation du cycle œstral :

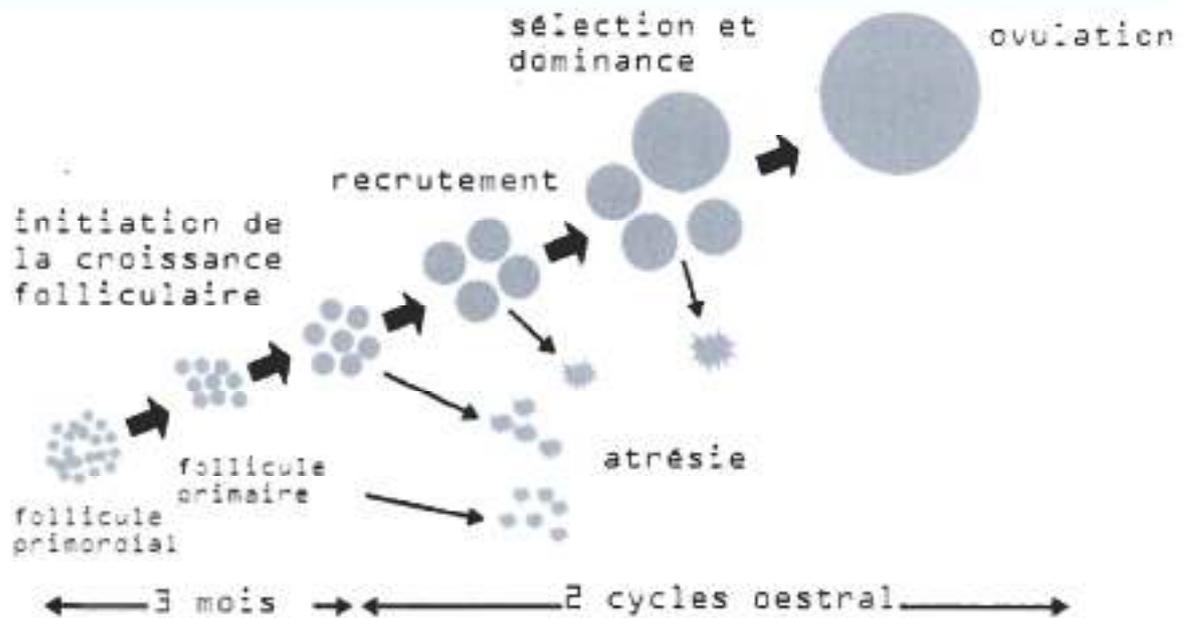
Le cycle ovarien débute par la phase folliculaire, laquelle est caractérisée par la croissance simultanée de plusieurs follicules (**Parker Ron ,2002**) À l'intérieur des follicules en croissance, les ovocytes grossissent et sont entourés, graduellement, de plusieurs couches cellulaires (**Parker Ron ,2002**). Chez la vache, comme chez l'Homme, un seul follicule par mois arrive à maturité. Le follicule qui a ovulé se transforme en phase lutéale (*La régulation des hormones sexuelles* et ensuite en corps jaune. C'est le corps jaune qui sécrète les hormones durant la dernière p de la femme).

- Cinq hormones participent à la régulation du cycle ovarien (**Parker Ron ,2002**):

1. La GnRH (gonadolibérine) produite par l'hypothalamus.

2. La FSH (hormone folliculo-stimulante).
3. La LH (hormone lutéinisante).
4. L'œstrogène (hormone sexuelle propre à l'ovaire).
5. La progestérone (hormone sexuelle propre à l'ovaire).

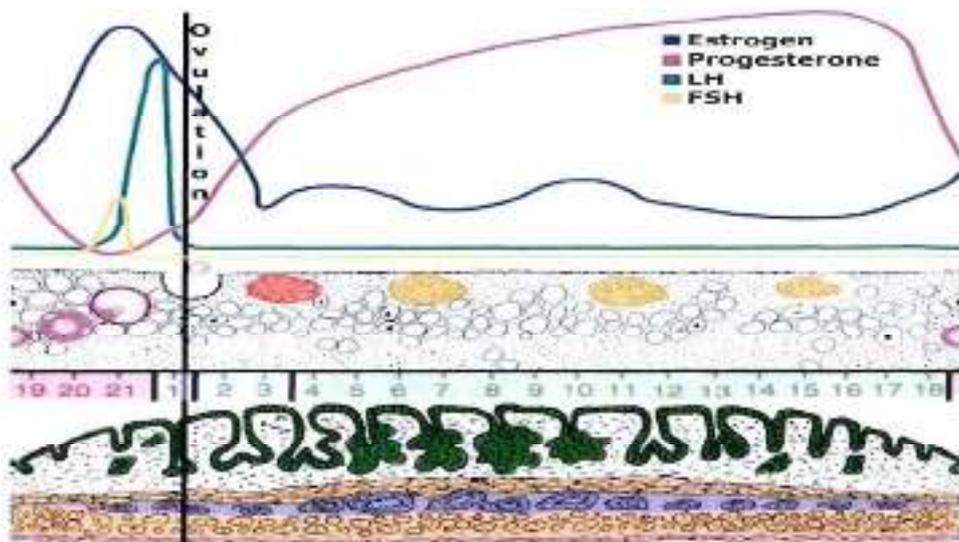
Durant la phase folliculaire du cycle ovarien, l'hypothalamus sécrète la GnRH, ce qui va stimuler la libération, par l'adénohypophyse, de faible quantité de FSH et de LH. À cet instant, comme les cellules des follicules de l'ovaire ont uniquement des récepteurs FSH, seule cette dernière va pouvoir exercer son effet, celui de stimuler la croissance des follicules (**Perry,2004**).



**Figure 3 :** la croissance folliculaire. tirée et adaptée de (Webb et al, 2004).

À mesure que les follicules croissent, les cellules folliculaires, surtout les cellules de la granulosa, se munissent de récepteurs à LH et peuvent alors réagir à cette dernière et transférer leur dépendance à la FSH contre une dépendance à la LH permettant ainsi aux follicules de poursuivre leur croissance (Webb et al, 2004). L'augmentation de LH entraîne la maturation finale du follicule dominant. Chez la vache, vingt-quatre heures après le pic de LH survient l'ovulation (Thibault et Levasseur, 2001). Durant la phase lutéale du cycle ovarien, il se produit une transformation tissulaire du follicule qui a ovulé; il se transforme en corps jaune (Thibault et Levasseur, 2001). Cette modification est due à la forte concentration de LH. En réponse à la LH, le corps jaune va produire une hormone stéroïde, la progestérone. Arrivé à pleine maturité le corps jaune va commencer à dégénérer dû à la chute de LH provoquer par un mécanisme de rétro- inhibition (Thibault et Levasseur, 2001) et dû au largage de PGF<sub>2α</sub>. Les fortes concentrations d'œstrogènes et de progestérone vont mettre fin à la sécrétion de GnRH, donc de FSH et de LH (Thibault et Levasseur, 2001). Cela signifie que vers la fin de la phase lutéale, les concentrations en œstrogènes et en progestérone sont très basses (*La régulation des hormones sexuelles de la femme*),

(Thibault et Levasseur , 2001). La diminution de ces hormones va supprimer l'effet de la rétro-inhibition sur l'hypothalamus et l'adénohypophyse. L'adénohypophyse va alors sécréter la bonne quantité de FSH pour qu'un nouveau cycle ovarien puisse s'amorcer (Thibault et Levasseur , 2001). Il est impératif de noter que chez la vache, la croissance folliculaire est caractérisée par des vagues folliculaires. Une vague folliculaire se définit comme étant le développement synchrone d'un groupe de follicules à des temps différents et est engendrée par des pics de FSH. C'est la baisse de FSH qui conduit à l'apparition du follicule dominant ainsi qu'à l'apparition du récepteur de LH sur celui-ci. Pendant la folliculogénèse terminale, la cohorte sera réduite au nombre d'ovulation caractéristiques de l'espèce, soit 1 chez la vache (espèce monoovulatoire) (Thibault et Levasseur , 2001).



**Figure 4:** illustration schématique du cycle oestral bovin.

([http://www.cvm.okstate.edu/instruction/mm\\_curr/histology/fr/HiFRp\\_15.htm](http://www.cvm.okstate.edu/instruction/mm_curr/histology/fr/HiFRp_15.htm)) .

#### II.4.L'ovogénèse

L'ovocyte est la seule cellule connue capable de reprogrammer un noyau de cellule somatique et d'initialiser le développement embryonnaire via la parthénogénèse (Pangas et Rajkovic,2006). Seul un ovocyte compétent est apte à réaliser ce travail. Cette compétence, il l'obtient grâce à un processus nommé ovogénèse.

On entend par ovogenèse la formation des gamètes femelles, aussi appelés ovules, de même que la maturation de ces derniers. L'ovogenèse se déroule dans les ovaires et débute durant la vie embryonnaire (**Marieb, 1998**).

## II.5. Formation des gamètes femelles

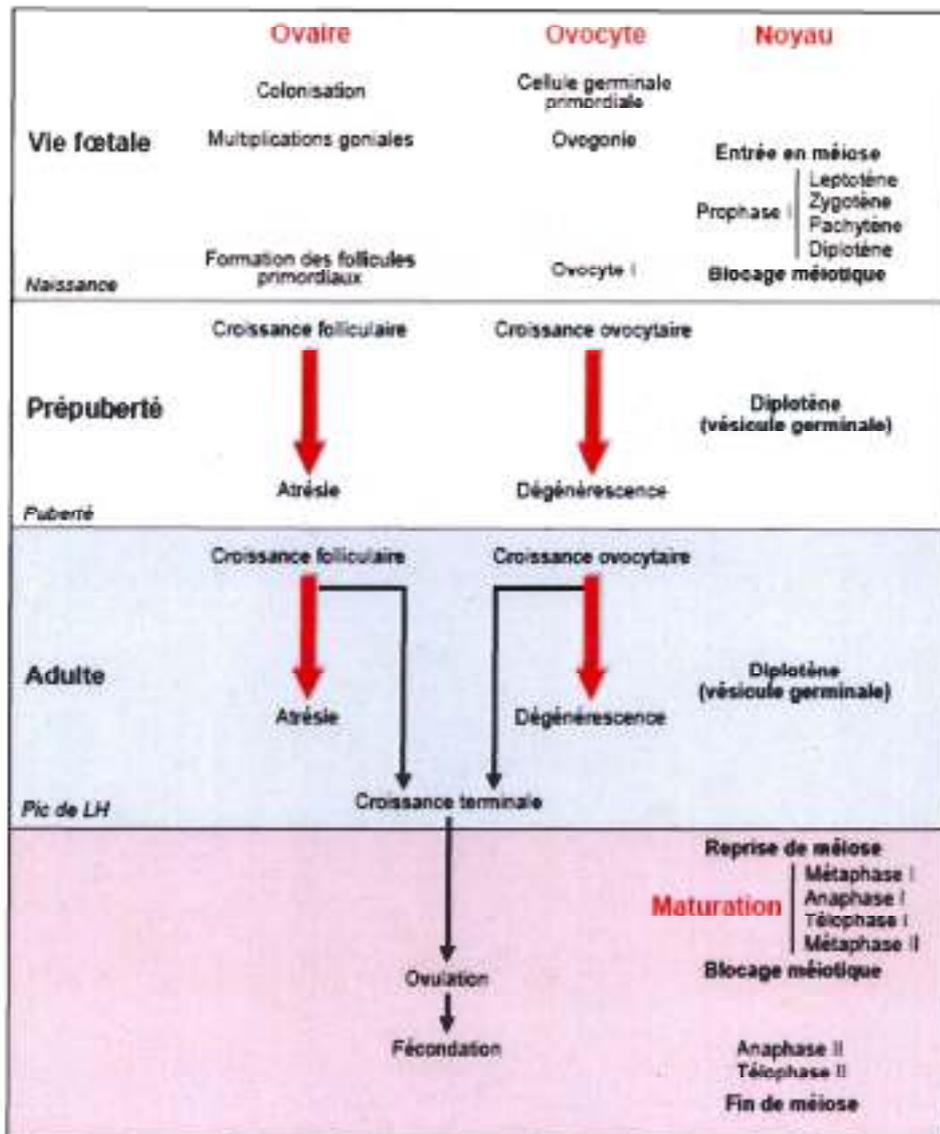
Chez la souris, les ancêtres des cellules germinales sont induites à partir de l'épiblaste proximal du cylindre ovocytaire au jour embryonnaire 6.5 en réponse à Bmp4 (bone morphogenetic protein 4) et Bmp8 (bone morphogenetic protein 8b) (**Pangas et Rajkovic, 2006**). Au jour 7, c'est une population d'environ 45 cellules germinales primordiales (CGPs) qui donnent naissance aux cellules germinales proprement dites, soit les ovocytes (**Pangas et Rajkovic, 2006**).

En tout premier lieu, il y a la migration des cellules germinales primordiales, aussi appelées CGPs. Chez le bovin, les CGPs apparaissent après 30 jours de gestation. Ce sont des cellules d'origine extra-embryonnaire qui migrent vers les ovaires en exécutant des mouvements améboïdes (**Richards, 2005**).

En second lieu, il y a la différenciation des cellules germinales primordiales en ovogonies. Les ovogonies sont des cellules germinales diploïdes se multipliant rapidement par mitose (**Marieb, 1998**). En fait, les ovogonies sont formées à partir des quelques CGPs colonisées dans les ovaires qui se mettent à se diviser de façon synchronisée grâce à des ponts cellulaires entre eux. C'est la phase ovogoniale. On se retrouve, une fois les divisions terminées, avec 5 à 7 millions d'ovogonies (**Richards, 2005**). Quelques unes des ovogonies vont se transformer en ovocytes de premier ordre, les autres vont dégénérer durant le développement fœtal. Un ovocyte de premier ordre est en fait un ovocyte entouré d'une couche de cellules folliculaires plates, aussi appelées cellules du cumulus. Les ovocytes de premier ordre vont débiter leur première division méiotique sans la compléter; celle-ci va se bloquer en prophase 1. Jusqu'ici, toutes les étapes de l'ovogenèse décrites précédemment

se déroulaient dans l'embryon femelle; les subséquentes surviendront lorsque le nouveau-né aura entamé sa puberté **(Marieb,1998)**.

La puberté enclenchée, plusieurs ovocytes de premier ordre seront activés mensuellement chez les espèces mono-ovulantes. Cette activation a pour but de terminer la méiose 1, laquelle s'était arrêtée en prophase 1. Une fois la méiose 1 terminée, on se retrouve avec l'ovocyte de deuxième ordre **(Marieb,1998)**. Cet ovocyte va débiter une seconde méiose, mais il ne la complétera pas, il va s'arrêter en métaphase 2 jusqu'à ce qu'il soit expulsé lors de l'ovulation. Lors de l'ovulation, c'est-à-dire lorsque la membrane du follicule mature se rompt et libère l'ovocyte, il peut y avoir fécondation ou non. S'il n'y a pas fécondation, l'ovocyte va dégénérer et il va y avoir apparition des menstruations chez la femme, mais s'il y a fécondation, l'ovocyte va terminer sa deuxième méiose ce qui va donner naissance à un ovule **(Marieb,1998)**.



**Figure 5** : Schéma illustrant les principales étapes de la vie de l'ovocyte, depuis la cellule germinale primordiale jusqu'à la fécondation. Tirée de (Mermillod, 1999).

### III. La régulation de la maturation ovocytaire

La reprise de la méiose 1 (GVBD pour germinal vesicle breakdown), lorsqu'il y a ovulation, est une étape critique. Elle correspond au passage du stade G2 au stade M du cycle cellulaire (**Mermillod, 1999**). Cette reprise de la méiose repose sur l'activation du M-phase-promoting factor (MPF) (**Mermillod, 1999**). Il s'agit d'un hétérodimère composé de la protéine p34<sup>cdc2</sup> et d'une cycline B (**Mermillod,1999**). L'activation du MPF est possible grâce à la formation du complexe p34<sup>cdc2</sup> - cycline B et à la déphosphorylation des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de la p34<sup>cdc2</sup> (**Mermillod,1999**). La déphosphorylation est dépendante des produits des gènes weel et cdc25 (**Mermillod,1999**). Le MPF est aussi responsable de la phosphorylation de l'ARN polymérase 2 et de facteurs d'élongation; cela signifie qu'il est probablement impliqué dans la synthèse protéique de novo lors de la reprise méiotique (**Mermillod,,1999**). Il est à noter que le mécanisme d'activation du MPF diffère selon les espèces (**Mermillod,1999**). Il s'en suit la transition de la première méiose avec la seconde méiose. Cette transition est assurée par Cdk2 (cyclin-dépendant kinase 2). Chez le porc, un blocage de l'activité de Cdk2 résulte entre autre en une mauvaise induction de la seconde méiose (**Sugiura et al ,2005**) L'arrêt en métaphase 2 de la seconde méiose est dû à un facteur cytotatique (CSF) connu comme dépendant de l'hétérodimère Cycline B/ p34<sup>cdc2</sup> du complexe MPF.

Il y a aussi la protéine C-MOS (oocyte maturation factor Mos) qui est impliquée dans l'arrêt en métaphase 2 avec le CSF (**Hirao et Eppig ,1997**). De plus, récemment, il a été mis en évidence chez xénopus que Emi2 (endogenous meiotic inhibitor 2) agirait lui aussi pour maintenir l'arrêt cytotatique en métaphase 2 (**Shoji et al ,2006**) Finalement, la reprise de la seconde méiose est attribuée aux PKCs (protein kinase C).

Toutefois, il est suggéré que la reprise de la seconde méiose soit due à l'activité de CamK2 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2). Son activité, qui nécessite un niveau élevé de calcium, serait maintenue par la voie des PKCs (**Madgwick et al,2005**).

## I. Introduction :

Les techniques de production d'embryons *in vitro* chez la vache sont les techniques de PIV les mieux maîtrisées. L'impact zootechnique est considérable puisqu'elles permettent une sélection sur la voie femelle, venant ainsi compléter le schéma d'amélioration génétique. La collecte d'ovocytes par ponction peut être effectuée sur des ovaires isolés ou sur l'animal vivant. En effet, la PIV associée à l'OPU (ovum pick up) ou ponction ovocytaire guidée par ultrasonographie (ou par endoscopie chez les petits ruminants) permet d'amplifier la descendance femelle par rapport à la production embryonnaire *in vivo* suite au protocole de superovulation, (inséminations) et collecte embryonnaire avant transfert sur femelles receveuses (3,8 gestations en OPU/PIV contre 1,2 gestations par vache collectées) (**Alberio et al, 2000**). L'OPU n'est pas la seule méthode de collecte d'ovocytes : la ponction d'ovaires après ovariectomie ou après abattage est également possible (mais elle n'est pas reproductible !). Les gonades doivent alors être manipulées avec certaines précautions comme nous le verrons ultérieurement.

## II. Maturation ovocytaire in vitro :

### II.1. Collecte des ovocytes :

Seuls quelques ovocytes peuvent être collectés à partir de follicules pré-ovulatoires (1-2 chez la vache). A l'opposé, la collecte d'ovocytes non matures à partir de follicules antraux permet d'obtenir un grand nombre d'ovocytes maturables et fécondables *in vitro*.

La ponction de follicules antraux non pré-ovulatoires est utilisée chez plusieurs espèces, notamment chez la vache, à partir de follicules dont l'antrum mesure 0,3-0,5 mm de diamètre (follicules antraux précoces) jusqu'à 3-8 mm de diamètre (ceux d'un diamètre supérieur sont exclus, en début d'atréxie ou de maturation ce qui hétérogénéiserait les lots). Un faible pourcentage d'ovocytes issus de follicules antraux précoces va acquérir la compétence méiotique. Au contraire, les ovocytes issus de follicules de diamètre 3-8 mm sont aptes à reprendre leur méiose. C'est donc essentiellement à partir de ces follicules que les ovocytes sont collectés (**Coskun et al, 1991**) ; (**Fukui et al, 2000**) ; (**Hazeleger et al. 1995**).

La collecte d'ovocytes à partir d'ovaires isolés d'abattoir est la méthode la moins

Onéreuse. Cette technique a ainsi permis la mise au point de la technique MIV/F1V/DIV, selon les équipes, les ovaires sont transportés jusqu'au laboratoire dans les 3 h qui suivent l'abattage des animaux et dans des tampons à 30-35°C. Certains auteurs suggèrent qu'une température de 20°C serait plus appropriée, d'autant plus que la durée de transport est longue (pouvant alors aller jusqu'à 24 h).

Au laboratoire, les COCs sont ponctionnés sur les follicules antraux visibles à l'œil nu à l'aide d'une aiguille de 18 G ou 12/10<sup>^</sup> reliée à une seringue de 5-10 ml ou à une pompe à vide. La collecte peut également être effectuée après sections multiples de l'ovaire à l'aide d'une lame de scalpel dans un milieu de culture et après lavage des fragments obtenus (technique trois fois plus longue avec un rendement horaire identique). Ces sections peuvent enfin être faites en complément de l'aspiration afin d'augmenter encore le rendement de collecte (jusqu'à 30 ovocytes par ovaires) **(Coskun et al,1991)** ; **(Fukui et al,2000)** ; **(Hazeleger et al.1995)** ; **(Rivera et al,2000)** ; **(Zuelke et Brackett,1990)**.

Une moyenne de 4-10 COCs peut être collectée par ovaire de vache et on évalue entre 30 et 60 % le pourcentage d'ovocytes récoltés à partir des follicules ponctionnés (jusqu'à 100 % après dissection de l'ovaire) **(Rivera et al, 2000)**.

La dissection des follicules antraux peut enfin être utilisée, follicules intacts ou partiels placés en maturation (hemi-section de follicules avec quelques cellules folliculaires). Cette technique permet d'exclure les follicules atrétiques (observation de la vascularisation, de la transparence, de la régularité des couches de la granulosa) et d'obtenir des ovocytes de meilleure qualité. Cette dernière constatation pourrait s'expliquer par le fait que l'aspiration est à l'origine d'un traumatisme des cellules du cumulus **(Fouladu et al,1998)**.

Des travaux pour développer des techniques de collecte plus rentables qualitativement et quantitativement ont été menés comme ceux basés sur l'utilisation de la trypsine : après une heure de digestion trypsique du tissu ovarien bovin, plus de 200 ovocytes par ovaires ont été récoltés **(Fouladu et al,1998)**.

La collecte *in vivo* ou OPU offre, depuis 1988 et les premiers travaux aux Pays Bas, l'avantage d'utiliser des animaux identifiés. En outre, elle permet de répéter les collecte sur des femelles de haute valeur génétique **(Elde et Dale,2001)**.

La première collecte a été réalisée par laparoscopie en 1985 (fosse paralombaire droite) sur

femelles superovulées, puis le développement de l'échographie en gynécologie animale a permis l'utilisation de la ponction transvaginale écho-guidée (**Pierce et al ,1988**), ou OPU. Cette technique ne nécessite pas de stimulation hormonale et peut être réitérée deux fois par semaine chez la même femelle (**Seneda ,2001**). Le prétraitement hormonal peut néanmoins être mis en place afin d'augmenter le rendement de la collecte (**Mayes et Sirard ,2001**). De plus, elle n'est pas douloureuse puisque réalisée sous anesthésie épidurale sur vache debout. Les vaches pleines sont utilisées jusqu'à 3 mois de gestation. Cette technique échoguidée a été transposée dans d'autres espèces animales et est maintenant appliquée chez la brebis, la chèvre et la jument (**Seneda ,2001**).

Récemment, l'utilisation de veaux pré pubères comme donneurs d'ovocytes permettrait de réduire l'intervalle de générations (**Salamone ,2001**).

## II.2. Classification et sélection des complexes ovocytes cumulus (COC) :

La ponction des follicules a permis de récolter des ovocytes entourés de cellules péri-ovocytaire (cumulus oophorus) dans un tampon type PBS ou un milieu de culture tissulaire comme le milieu TCM 199 (Sigma) avec des agents protecteurs (antibiotiques, voire antimycosiques), les classifications actuelles sont établies à partir de l'observation des cellules du cumulus.

Les COCs sont alors classés en trois ou quatre catégories selon le nombre et l'uniformité des couches de cellules de la granulosa qui les entourent et selon la densité et l'homogénéité du cytoplasme ovocytaire. : Classes A à C ou D, ou catégories 1 à 3 ou 4 (de la qualité optimale à la plus médiocre) .Le plus souvent, on utilise la classification à trois compartiments (qui peuvent eux- mêmes être subdivisés) (**Rivera et al ,2000**).

Les COCs utilisés en PIV sont les COCs de qualité 1 ou 2, c'est-à-dire entourés d'un cumulus compact (composé de plusieurs couches de cellules couvrant au moins les  $\frac{3}{4}$  de la zone pellucide) et ayant un cytoplasme dense. De nombreuses études ont montré que la compétence au développement (relation non valable pour la compétence méiotique) est proportionnelle à la qualité des COCs avec une différence des taux de développement significative entre les COCs de classe 1 et 2, acceptables, et les COCs de classe 3, non acceptables (**Cetica et al ,1999**). C'est une bonne valeur prédictive en PIV.

**Tableau 1** : classification des complexes ovocyte cumulus en MIV synthèse : (Stojkovitch et al 2001),(De witt et al 2000).

	<i>critères folliculaires</i>	<i>critères ovocytaires</i>
A Ou 1	Cumulus compact Aspect général brillant et transparent	cytoplasme poli, brillant Noyau au stade VG : 85-90 % à la ponction
B Ou 2	Cumulus en voie d'expansion Dissociation de la corona radiata en général plus sombre et moins transparent	cytoplasme sombre (apparition de vacuoles en périphérie de l'ooplasmе)
C Ou 3	cumulus expansé	cytoplasme avec spots sombres (vacuoles)au stade VG ; 65-70 % à la ponction

Après sélection, les COCs sont lavés 2 fois dans un tampon ou dans le milieu de maturation, puis mis à maturer.

Lorsqu'on utilise les follicules, la sélection s'effectue à partir de critères d'atrésie. Environ 50 % des follicules récoltés peuvent montrer des signes d'atrésie chez la vache : présence de cellules thécales au sein de la granulosa, transparence et irrégularité de cette dernière, diminution de la vascularisation et apparition de particules libres flottant dans le fluide folliculaire, blanchiment de la thèque interne. Ce système de sélection peut nous permettre d'évaluer la qualité ovocytaire et ainsi d'améliorer les systèmes de PIV.

La qualité ovocytaire est également liée de façon claire avec la taille folliculaire. Cependant, cette relation est bornée : au-delà de 8 mm de diamètre folliculaire, la compétence au développement de l'ovocyte chute (3 fois plus faible). Cela est probablement dû à une modification de la composition du milieu folliculaire (hormones, cytokines...).

Les techniques de MIV sont nombreuses.

### II.3. Techniques de maturation in vitro :

La conception des milieux de maturation utilisés en PIV chez les bovins va être évoquée en premier lieu. Selon les espèces étudiées, les milieux de maturation diffèrent. Par exemple, on emploie couramment chez le porc les milieux NCSU23 ou OMM37, tandis qu'on aura le plus souvent recours aux milieux Ham's F10, au MEM ou au TCM199 chez la vache. Il s'agit de milieux de synthèse, conçus par différents laboratoires afin de soutenir des cultures tissulaires ou cellulaires divers, et dont la pression osmotique, le pH, l'équilibre ionique sont adaptés au plus près des conditions biologiques.

Ces milieux sont supplémentés avec d'autres composants pour calquer la composition du milieu étudié *in vivo*. Ainsi, les milieux de maturation ovocytaire sont enrichis avec du sérum (de veau foetal ou de vache en œstrus) plus ou moins inactivé par la chaleur (inactivation des facteurs du complément) et/ou du liquide folliculaire, de facteurs de croissance tel que l'EGF, des hormones gonadotropes (FSH notamment) et de l'œstradiol- 17p. Selon les auteurs, la composition globale varie : les concentrations diffèrent mais également les osmolytes. Par exemple, (**Funahashi et al,1996**) ont montré l'intérêt de la taurine et du sorbitol dans les milieux de maturation ovocytaire chez le porc, (**Lorenzo et al,1994**) ont testé les effets bénéfiques de l'ajout d'IGF en MTV bovine tandis que (**Kobayashi et al,1994**) faisaient le même type de test avec le TGF- $\alpha$ .

La supplémentation en sérum, notamment chez les ruminants, pose actuellement un

problème sanitaire. Vecteur possible du prion, le sérum doit disparaître de la composition de milieux de PFV. De plus, le sérum est à lui seul un milieu très complexe dont la composition exacte n'est pas connue, donc pas maîtrisée, ce qui limite la précision et la rigueur des systèmes. Plusieurs études ont été conduites dans le but de remplacer le sérum en MIV : **(Chanson et al,2001)** ont utilisé la BSA, le sérum de veau fœtal ou un substitut de sérum synthétique et ont obtenus de meilleurs résultats en terme de blastocystes avec le sérum pouvant être remplacé de façon optimale par le substitut (avec une bonne supplémentation protéique) ; **(Mizushima et al,2000)** ont utilisé un milieu chimiquement défini (sans sérum ni protéine d'origine animale telle que la BSA ou le SVF) avec une supplémentation du milieu de base (TCM199) en polyvinyl alcool (PVA) et en hypotaurine et p-mercaptoéthanol, donnant des résultats similaires à ceux habituellement obtenus ; **(Geshi et al,2000)** ont quant à eux supplémentés le TCM199 avec du milieu Hepes, du PVA et du pyruvate de sodium, ce dernier semblant stimuler la maturation ovocytaire des ovocytes dénudés et permettre un développement embryonnaire normal.

Les hormones gonadotropes utilisées dans les protocoles de MIV sont la FSH associée ou non à la LH. De nombreuses publications exploitent leur intérêts et les résultats sont caractérisés par une grande variabilité. **(Choi et al,2001)** les ont étudiées en MIV bovine (d'une durée de 22 h) en supplémentation d'un milieu TCM199 avec BSA, glutamine et œstradiol. Les résultats sont de meilleures expansions du cumulus en présence de gonadotrophines mais leur présence, seules ou en association, semble dépourvue d'effet positif sur la maturation et le développement embryonnaire *in vitro* en l'absence de facteurs de croissance.

La variété des préparations hormonales et la présence de sérum de composition non définie pouvant contenir divers hormones et facteurs de croissance expliquent la variabilité des résultats. On sait néanmoins que la LH augmente le métabolisme du glucose dans les COCs mais diminue les taux d'expulsion du globule polaire, de clivage et de blastocystes à fortes concentrations, FSH ralentit la reprise de la méiose en allongeant la durée de condensation des chromosomes. Par ailleurs, la LH classiquement utilisée est contaminée par la FSH voire par des hormones de croissance ou autre supplémentation protéique potentialisatrice : FSH représente un pour dix mille du poids de LH. Les concentrations utilisées en LH et/ou FSH sont alors de 2 ng/mL de milieu à 10 pg/mL, concentrations optimales selon la maturité folliculaire à la collecte (densité en récepteurs).

Les effets de la GnRH ont également été observés : à 100 ng/mL de GnRH bovine, on a observé un retard à la maturation cytoplasmique (**Becker et al, 2000**).

L'utilisation d'œstradiol est également controversée. La plupart des équipes P utilisent chez les bovins à la concentration de 1 gg/mL ce qui correspond approximativement à la concentration présente dans le liquide folliculaire dans le follicule pré-ovulatoire juste après le pic de LH. La supplémentation en œstradiol et prolactine ne semblerait pas avoir d'effet sur la reprise de la méiose mais stimulerait son achèvement et augmenterait les taux de clivage . (**Silva et al,2000**) ont étudié les effets des stéroïdes sur la compétence au développement des ovocytes maturés *in vitro* : tandis que la progestérone n'aurait aucun effet, voire un effet négatif sur les taux de clivage et de blastocystes, la testostérone et la dihydrotestostérone stimuleraient les premiers stades de développement embryonnaire.

L'utilisation de facteurs de croissance, voire de cytokines, est actuellement en cours d'étude. L'addition d'hormone de croissance à la concentration de 100 ng/mL augmente significativement le taux d'obtention de blastocyste chez la vache (**Izadyar et al,2000**). GH, TSH, TGF- $\alpha$  et p ont également des effets bénéfiques sur la maturation d'ovocytes bovins (**Bevers et al ,1997**). Watson (**Watson et al,2000**) a observé, qu'en absence de sérum, la supplémentation du milieu en aminoacides et EGF permet d'augmenter les taux d'obtention de blastocystes. L'EGF a une action synergique avec les gonadotrophines, à condition que leur concentration globale reste faible (à cause d'interactions sur les récepteurs), c'est-à-dire autour de 500 ng/mL . Chez la truie et de nombreux vertébrés, IGF-1 a des effets bénéfiques. L'association de facteurs de croissance a aussi été étudiée. Le couple EGF (facteur de régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire ovarienne) et IGF-I (facteur mitogène) semble être le plus efficace, potentialisant l'effet des gonadotrophines . Cette combinaison de facteurs de croissance accélère la maturation ovocytaire (expansion du cumulus et expulsion du globule polaire) sauf en présence de sérum (contenant des IGF-BP) (**Sakaguchi et al,2000**).

L'EGF est le facteur de croissance à retenir dans la supplémentation des milieux de MIV. Des récepteurs et de nombreux sites de liaison sont présents dans l'ovaire de vache (thèque, granulosa, corps jaune), molécules dont la synthèse est stimulée par les gonadotrophines (**Sakaguchi et al,2000**). De plus, des cellules ovariennes produisent un EGF-like, ce qui explique l'efficacité de la molécule. On utilise à la concentration de 5-10 ng/mL ; des concentrations trop élevées (50 ng/mL) entraînent un accroissement des taux de polyspermie sans effet positif

sur les taux de fécondation (**Coskun et al,1991**). Le VEGF (vascular endothelial growth factor) a été détecté chez la truie comme EGF-like, inducteur d'angiogénèse dont le taux varie selon le stade oestral et l'adjonction ou non de gonadotrophines (**Avery et al,2000**).

Chez la truie, le milieu de maturation semble devoir être supplémenté en composés soutirés: glutathion réduit (GSH), cystéine ou N-acétyl cystéine (NAC) (**Sawai et al ,1997**). La présence de ces composés thiol serait indispensable au maintien du pool endogène de GSH, pool permettant de maintenir le potentiel redox intracellulaire. GSH est en outre le substrat de la glutathion peroxydase, enzyme clé des défenses anti-oxydantes et il intervient *dans* la décondensation de la chromatine du spermatozoïde et la formation du pronucleus mâle. On attribue un troisième rôle au GSH chez les bovins : il augmente la cryorésistance des embryons.

Chez la vache, la supplémentation du milieu en cystéamine, cystéine, cystine et/ou (3-mercaptopéthanol induit la synthèse de GSH par l'ovocyte bovin et permet d'obtenir de meilleurs taux de clivage, de morulas et de blastocystes . L'hypotaurine, l'hypoxanthine et le sorbitol auraient également un effet antioxydant chez le porc ( **Tatemoto et al ,2000**),

Il s'agit en effet d'une voie métabolique importante dans la maturation cytoplasmique de l'ovocyte bovin : les taux de GSH sont importants en MIV et en DIV dans cette espèce. Métabolite du cycle  $\gamma$ -glutamyl, les mécanismes de sa synthèse dans le follicule sont complexes et schématisés en annexe (**Nagai ,2001**). En prévention des dommages oxydatifs sur les gamètes et l'embryon bovins, le milieu de maturation peut également être enrichi en GSH (à la concentration de 0 à 10 mM, avec un effet variable selon l'origine de la semence) . Le GSH n'entre pas dans les cellules incubées mais aurait un effet en tant que composant du milieu de maturation. On considère qu'il faut que le rapport glutathion réduit sur glutathion oxydé soit d'au moins vingt. L'ajout de N-acétylcystéine, de cystéine et de CSH, précurseurs du glutathion pénétrant dans la cellule, est également décrite.

Le milieu de maturation doit aussi être supplémenté avec des nutriments. Le pyruvate, le lactate, le glucose, des acides aminés sont ajoutés améliorant la compétence au développement de l'ovocyte bovin. En présence de concentrations physiologiques, le métabolisme ovocytaire est potentialisé : voie des pentoses, glycolyse, synthèses protéiques (**Krisher et Bavister ,1999**) ; (**Lim et al, 1999**). Il faut néanmoins respecter ces concentrations ou s'abstenir de supplémenter le milieu de maturation : des concentrations excessives sont néfastes à l'ovocyte.

Les antibiotiques, les antimycosiques peuvent faire partie de la composition du milieu de maturation en prévention d'éventuelles contaminations. Les Co-cultures sur cellules folliculaires (cellules de granulosa) ont été développées et sont largement utilisées chez les ruminants et le porc.

De nombreuses études ont montré l'effet positif de la présence de cellules du cumulus : comme nous l'avons déjà évoqué, les COCs sont plus aptes à maturer *in vitro* que les ovocytes dénudés.

Les cellules de granulosa sont prélevées par aspiration du contenu des follicules lors de la collecte des COCs puis mises en culture dans le milieu de maturation. On en compte entre  $10^6$  et  $7,5 \cdot 10^6$  par mL de milieu. Elles sont utilisées soit en suspension (système non-statique) soit en monocouche (système statique). Il semblerait que le système optimum soit le système non-statique chez les bovins (taux de blastocystes maximum), le système statique comportant de trop nombreuses cellules et ayant un effet délétère sur les ovocytes. Rappelons que ces cellules somatiques doivent être actives pour exercer leurs activités endocrines, paracrines et autocrines et nécessitent par là même des substrats énergétiques (**Nagai ,2001**).

Les besoins de l'ovocyte bovins ont été partiellement déterminés et nous tenterons de composer un milieu apte à soutenir la maturation ovocytaire grâce à ces informations.

Cependant la composition du système de culture n'est pas le seul critère fondamental pour la MIV. Les conditions de maturation doivent être observées avec précision : température, osmolarité (de 275 à 285 mOsmoles par kg d'eau), pH (de 7,2), teneur en oxygène et dioxyde de carbone, volume de milieu, durée de maturation, densité des ovocytes incubés semblent être les critères les plus importants.

Les ovocytes de ruminants et de porcs (de qualité jugée suffisante) sont incubés à 38,5°C ou 39°C, sous 5 % de CO<sub>2</sub> dans l'air (incubateur à CO<sub>2</sub>). Contrairement à ce qui a été démontré pour la culture de l'embryon bovin, la réduction des taux d'oxygène de 20 % (taux dans l'air) à 5 % pendant la MIV n'a pas permis d'améliorer les résultats. En effet, le taux d'ovocytes en métaphase II et la concentration ovocytaire en ATP en fin de MIV sont très nettement inférieurs sous 5 % d'O<sub>2</sub>. Pourtant ces observations ne sont plus valables lors de l'ajout de glucose dans le milieu de maturation (1,5 à 20 mM) au rôle important dans la maturation ovocytaire : une

faible pression partielle en oxygène du milieu devient alors bénéfique avec une meilleure compétence au développement des ovocytes maturés sous 5 % d'O<sub>2</sub> (**Hashimoto et al, 2000**).

L'osmolarité doit être contrôlée. En effet, à partir de 315 mOsmoles/kg d'eau, il y a mort des ovocytes bovins (**Guyader, 1998**),

La durée de MIV est de 24 h (certains se limitent à 22 h) chez les ruminants et de 44 h chez le porc, dans un environnement faiblement exposé à la lumière. L'utilisation de lumière inactinique permet de limiter le stress induit par l'exposition des cellules à la lumière.

Le volume de milieu de maturation varie selon les équipes de 10 pL (microgouttes sous huile minérale) à 1 mL (plaques multipuits). L'huile minérale (paraffine) évite l'évaporation et les modifications de pression osmotiques consécutives. Le nombre d'ovocytes par puits ou goutte varie de 1 (gouttes de 10 pL) à plusieurs dizaines (puits de 1 mL). Les systèmes de culture individuelle, en milieu chimiquement défini, semblent être déficients : l'absence d'interactions ovocytaire pénaliserait la maturation cytoplasmique des ovocytes bovins (**Fukui et al, 2000**). On parle d'effet de groupe.

La cryoconservation est une méthode en plein essor dans les biotechnologies de la reproduction. Toutefois, la congélation des ovocytes n'est pas un processus maîtrisé. Asada et Fukui ont étudié les effets de la congélation d'ovocyte maturés (18 à 24 h de MIV) sur la fécondation et le développement embryonnaire et ont souligné la nécessité d'une reculture de 6 h des ovocytes maturés décongelés afin de limiter les effets néfastes de la congélation (polyspermie augmentée, diminution des taux de développement).

Enfin, la "pré-maturation, mériterait des études plus approfondies. Récemment, de nombreuses publications ont en effet porté sur ta mise en évidence l'intérêt d'une première étape de blocage de la maturation nucléaire en MIV par l'utilisation d'inhibiteurs tels la 6-diméthylaminopurine (inhibant les phosphorylations préalables à GVBD), l'IBMX (inhibant les phosphodiesterases), la roscovitine (inhibant la MPF kinase). Ainsi, les ovocytes restent bloqués au stade vésicule germinale pendant un temps défini (par exemple de 24 h avec la roscovitine) avant de reprendre leur méiose ce qui améliorerait la maturation cytoplasmique. Les résultats sont globalement plutôt défavorables, ces inhibiteurs étant plus ou moins toxiques pour F ovocyte et n'améliorant pas significativement la compétence au développement (**Guixue et al, 2001**). On préfère encore l'effet du fluide folliculaire et des cellules folliculaires, inhibiteurs de la reprise de la méiose ovocytaire, qui optimisent la compétence au développement (**Fouladi et al, 1998**).

## I. Fécondation in vitro :

Une première évaluation de la qualité de la maturation *in vitro* se fait immédiatement après par simple observation morphologique des COCs : ils doivent présenter une expansion du cumulus, un globule polaire et le noyau ovocytaire doit être en métaphase II. Les caractéristiques de l'ovocyte mature ont été décrites infra.

C'est à la compétence au développement que l'on s'intéressera dans ce paragraphe, puisque seuls les COCs matures sont aptes à la fécondation et au développement embryonnaire.

Pour soumettre les COCs matures à la fécondation, il faut évidemment les mettre en présence de spermatozoïdes ayant subi certaines manipulations.

### I.1. Préparation et capacitation des spermatozoïdes :

La fertilité de la semence doit préalablement être connue afin d'évaluer au plus près la qualité de la maturation ovocytaire. En effet, le mâle est un facteur de variabilité en FIV, selon la qualité du sperme (concentration en spermatozoïdes, motilité, aptitude à la congélation. .) mais cette observation ne sera pas développée dans cet exposé.

Une étape de pré-incubation est nécessaire à l'utilisation de semence fraîche en FIV. Chez les bovins, la semence utilisée est congelée dans l'azote liquide. Après décongélation rapide (immersion de la paillette dans de l'eau à 37°C pendant 30 secondes), les spermatozoïdes sont séparés du plasma séminal et des spermatozoïdes morts soit par lavages, soit par migration ascendante (*swim up*), soit par centrifugation sur gradient de Percoll.

La méthode la plus employée (et la moins traumatique) est la nage ascendante. Le sperme est centrifugé, le surnageant (plasma séminal) éliminé et un milieu de culture est délicatement ajouté sur le culot de cellules en évitant la remise en suspension de celles-ci. Les milieux les plus fréquemment utilisés chez les bovins sont le TALP modifié (sperm TALP ou tyrode albumin lactate pyruvate) et le BO (Blackett et Oliphant). Après une incubation de 60 minutes à 38,5°C sous 5 % CO<sub>2</sub>, la partie supérieure (contenant les spermatozoïdes mobiles) est récupérée .

La capacitation est initiée pendant le swim up, consistant en des modifications métaboliques, de mobilité, de concentrations ioniques intracellulaires, de fluidité membranaire et en des réorganisations des protéines de surface. Sa durée est de 4-6 h chez les bovins (**Guérin ,1996** ). Elle permettra l'induction de la réaction acrosomique par élimination de composés de surface (séminaux ou testiculaires), déstabilisation de la membrane plasmique et augmentation de la perméabilité aux ions calcium, et ainsi la pénétration du spermatozoïde dans la zone pellucide . Elle se poursuivra pendant l'incubation en présence des ovocytes maturés. C'est pourquoi des facteurs capacitants (épinéphrine, agents chélateurs sous la forme du système PHE par exemple) sont incorporés aux milieux de FIV par la plupart des équipes. Ainsi, chez les bovins (et non chez tous les ruminants), l'héparine est un facteur capacitant (**Parrish et al,1998**) qui est ajouté au milieu de fécondation.

Une étude récente a mis au point un nouveau protocole de sélection des spermatozoïdes. Il s'agit d'une sélection des spermatozoïdes les plus performants par liaisons physiques et chimiques aux cellules épithéliales de l'oviducte (contact de spermatozoïdes avec une monocouche de cellules d'oviducte en milieu sperm TALP). On observe que les spermatozoïdes non adhérents à la monocouche sont porteurs d'anomalies. L'utilisation d'héparine après lavage de la monocouche permet de libérer des spermatozoïdes capités, avec un acrosome intact et sans anomalies chromosomiques, aptes à la fécondation avec un moindre risque de polyspermie. On mime en effet le phénomène physiologique qui a lieu dans l'isthme caudal de l'oviducte : on observe un arrêt des spermatozoïdes jusqu'à l'ovulation puis une libération des spermatozoïdes qui progressent alors dans l'ampoule tubaire (**Bosh et al 2001**).

## **I.2.Fécondation :**

Rappelons brièvement les étapes de la fécondation. Il s'agit de l'entrée d'un spermatozoïde dans un ovocyte permettant l'incorporation du contenu nucléaire mâle dans le gamète femelle. Les gamètes sont des partenaires actifs à différents stades et on pourrait comparer l'ovocyte à une cellule phagocytaire : après une phase de fusion des membranes au niveau du segment équatorial de l'acrosome avec l'ovocyte, on observe une quasi-phagocytose avec incorporation de la tête du spermatozoïde dans une vésicule et élongation de microvillosités autour du spermatozoïde fécondant. La zone pellucide et les oligosaccharides

adhèrent au spermatozoïde, mécanisme empêchant les fécondations croisées, interspécifiques et activant la réaction acrosomique (libération d'enzymes dispersant la zone pellucide et activant la protéine G et les granules corticaux) . Après entrée du spermatozoïde et activation de P ovocyte (1 h après fécondation), on assiste à la décondensation du noyau spermatique (d'une durée de 3 h) et à la formation des pronoyaux, simultanée et d'une durée de 4 h (**Gomez et al,1998**).

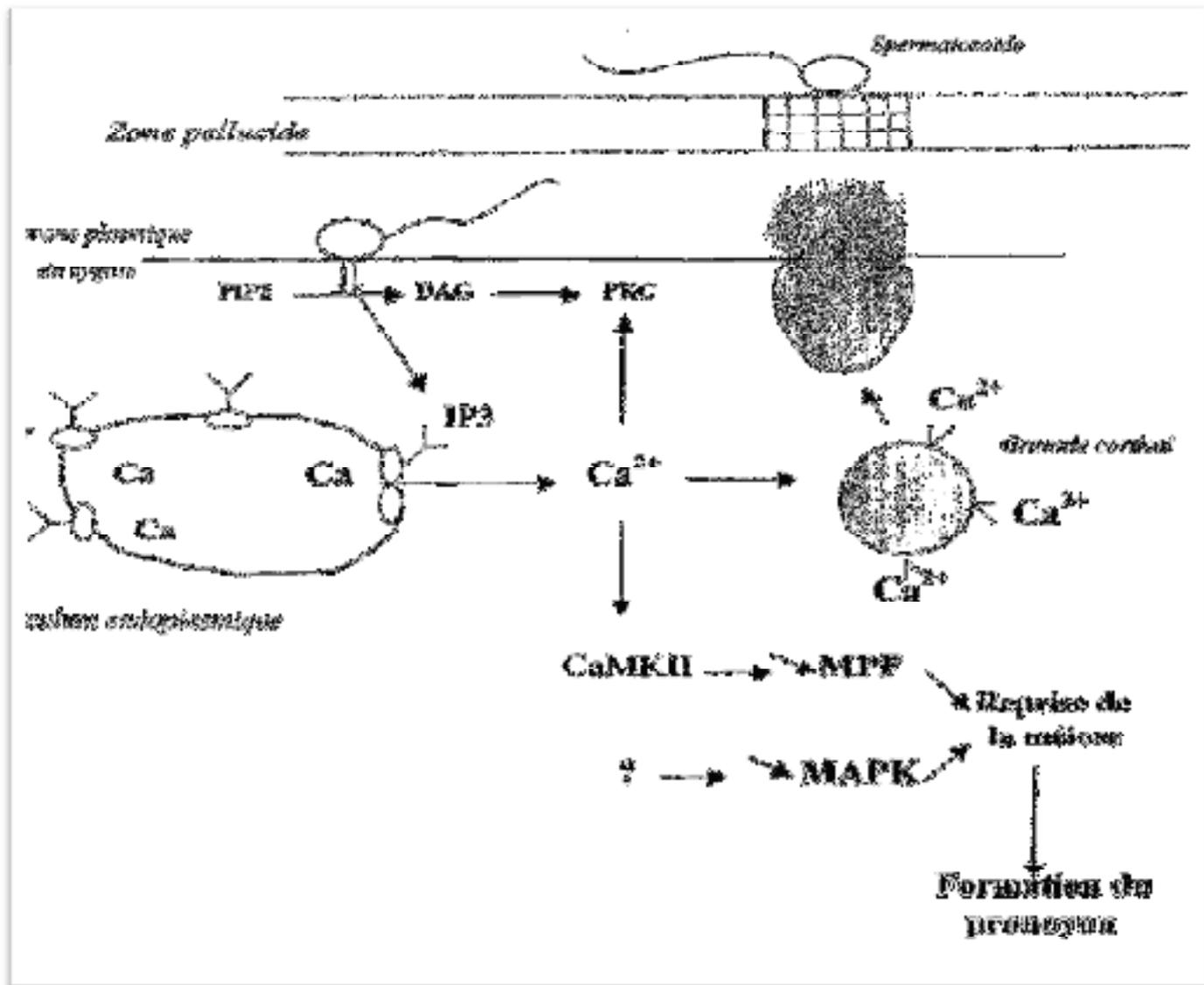


Figure 6 : Schématisation de la réaction corticale.

**Tableau 2 :** composition du milieu tvrode albumine lactate pyruvate ou TALP utilisé pour la FIV bovine (1671).

Composé	Sperm TALP	Fert TALP
NaCl (m M )	100	114
KCl (m M )	3,1	3,1
NhCO3(m M )	25	25
Nh2PO4(m M )	0,3	0,3
Lactate(m M )	21,6	10
CaCl2(m M )	2	2
MgCL2(m M )	0,4	0,5
Hepes(m M )	10	0
Pyruvate(m M )	1	0,2
Glucose(m M )	0	5
BSA(m M )	6	6
Penicillamine(m M )	0	20
Hypotaurine( $\mu$ M )	0	10
Epinephrine ( $\mu$ M)	0	1
Gentamycine ( $\mu$ g/mL)	50	50

Comme pour la MIV, les techniques de FIV ont fait l'objet de nombreuses variantes,

concernant le milieu de culture, le nombre de cellules co-incubées, la durée de co- incubation. Le milieu de fécondation le plus utilisé chez les bovins est le TALP modifié ou Fert TALP avec un pH de 7,4 et une pression osmotique comprise entre 280 et 300 mOs .

Il permet la fécondation mais également la fin de la capacitation et les premiers stades de développement embryonnaire, rôle assuré *in vivo* par les sécrétions tubaires. On incorpore à ce milieu de rhyptaurine , de la pénicillamine et de répinéphrine :

le système PHE, améliorant la mobilité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Chez le porc, on a montré que le système adrénérgique intracellulaire induit la réaction corticale et donc réduit le fort taux de polyspermie observé dans cette espèce. Notons, que ce mélange PHE doit être préparée et conservée dans des conditions strictes de par la faible stabilité des catécholamines (sensibles à l'oxydation).

Le milieu de base SOF (synthetic oviductal fluid) a été testé pour soutenir toutes les étapes de la PIV bovine et comparé à des milieux classiquement employés. Les résultats semblent favorables et même optimisés par la supplémentation en sérum ce qui pourrait simplifier les manipulations (Gandhi AP et al, 2000).

La fécondation est réalisée en présence de cellules de granulosa le plus souvent, l'addition d'agents inducteurs de la réaction acrosomique tels que les ionophores calciques a été utilisée. Mais les risques de réaction acrosomique prématurée rendent difficile l'utilisation de ces produits. Des agents stimulant la mobilité des spermatozoïdes sont ajoutés au milieu de FIV : l'épinéphrine est le plus usité à l'heure actuelle. Les inhibiteurs de la phosphodiesterase entraînant l'accumulation intracellulaire d'AMPc (caféine, IBMX. ) ont également été employés ; ils stimulent la mobilité des spermatozoïdes de 25-100 % et augmentent le taux de pénétration ovocytaire. Le glutathion à la concentration de 5 mM peut accroître la mobilité et le pouvoir fécondant des spermatozoïdes bovins décongelés (Kim et al, 1999).

Les ovocytes sont généralement incubés par groupe de 10 à 30, sélectionnés selon des critères morphologiques à partir des ovocytes mis en MIV 24 h plus tôt, Le nombre de spermatozoïdes par ovocyte est de l'ordre de  $10^4$  chez la plupart des espèces. Les équipes respectent une teneur de  $10^6$  spermatozoïdes par mL de milieu de FIV .

La FIV est réalisée en puits (avec 20-30 ovocytes) ou en microgouttes (50 gL en moyenne) sous huile minérale, incubés à 38,5°C sous 5 % de CO<sub>2</sub> dans l'air saturé en eau (Fukui Y, 2000).

Une incubation de 18-24 h est souvent utilisée. Récemment, une courte durée de fécondation (1-3 h) a été proposée dans l'espèce humaine. Cette durée est en effet suffisante pour obtenir la fécondation et permet d'éliminer les spermatozoïdes morts qui risquent de rendre le milieu néfaste pour les ovocytes. Cependant, chez les animaux domestiques, et notamment chez les bovins, une co-incubation de 8 h semble donner les

meilleurs résultats.

Différentes techniques de fécondation assistée ont été décrites et sont, selon les espèces envisagées, plus ou moins classiquement employées. Elles sont essentiellement utilisées dans l'espèce humaine en cas d'échec de FIV et d'oligo et/ou d'asthénospermie sévères. Le zona drilling et la partial zona dissection ou PZD consistent à faciliter la pénétration des spermatozoïdes dans l'ovocyte par atteintes mécaniques de la zone pellucide. Ces techniques ont été supplantées par l'ICSI (intracytoplasmic sperm injection) que nous verrons ultérieurement.

## **II. Développement embryonnaire in vitro :**

Le développement embryonnaire est le reflet de l'état de différenciation ovocytaire et de la qualité des étapes de maturation, de fécondation et des conditions de culture embryonnaire (**Marchal,2001**).Après fécondation (clivage de l'ovocyte fécondé et expulsion du second globule polaire), les jeunes embryons sont décoronés (grâce au vortex ou à la technique du « pipetage-refoulement ») et mis en culture.

### **II.1. Généralités sur la culture des embryons :**

La culture des embryons est une étape cruciale de la production d'embryons. Chez les mammifères domestiques, c'est au stade blastocyste que l'embryon est transférable dans l'utérus de la femelle porteuse. La culture jusqu'à ce stade embryonnaire est donc indispensable. Elle a en outre un effet de sélection en permettant l'élimination des embryons non viables (porteurs d'anomalies chromosomiques, géniques ou biochimiques). De plus, au stade blastocyste, l'embryon est plus apte à supporter la congélation/décongélation, sans doute du fait de la petite taille des blastomères. La culture de l'embryon pendant plusieurs jours, indispensable, peut suivre plusieurs protocoles. Le développement préimplantatoire est séparé en 2 phases : la première (2-3 premiers jours) correspond à l'utilisation de transcrits stockés dans l'ovocyte au cours de la maturation

ovocytaire (ARNm maternels) ; après quelques jours de développement (stade 2, 4, 8 ou 16 cellules selon l'espèce considérée), les transcrits maternels s'épuisent alors que la lecture du génome embryonnaire devient quantitativement importante. Un relai transcrits maternels-transcrits embryonnaires se produit donc : c'est l'activation du génome zygotique ou MZT (maternal to zygotic transition). Or, cette période progressive correspond fréquemment à un blocage du développement (stade 8-16 cellules chez les bovins) : l'activité transcriptionnelle est régulée par les protéines maternelles et les produits du génome embryonnaire interfèrent avec la stabilité des informations maternelles . Il semble en outre qu'elle corresponde à une évolution du métabolisme et donc des besoins de l'embryon Avant la lecture du génome de l'embryon, la machinerie cellulaire fonctionne grâce aux transcrits stockés en fin de maturation ovocytaire. La mise en route de la lecture du génome embryonnaire ou MZT semble constituer une période clé du développement pré-implantatoire, mise en évidence par marquage de la chromatine hétérogène du noyau (ARNm) et des sphères vacuolisées (ARNr). Au début du développement, le métabolisme embryonnaire nécessite moins d'apport extérieur en oxygène. Au stade morula-blastocyste, les besoins en oxygène augmentent : la mórula bovine consomme 2 nL d'oxygène par heure.

Un des problèmes de la maîtrise du DIV réside dans le fait que les conditions de culture (teneur en protéines notamment) ont un impact sur la teneur en ARNm de différents gènes et ainsi sur la MZT (**Schmidt et al ,2001**).

Les conditions de culture doivent permettre à l'embryon de passer du stade 1 cellule au stade blastocyste (obtenu après 150 h de culture) qui comporte 100 à 200 cellules (96). Les besoins de l'embryon sont très différents d'une espèce à l'autre. Ainsi, l'embryon de souris se développe dans des milieux simples de type M16, contrairement aux autres espèces qui nécessitent souvent des milieux plus complets de type TCM199 ou Ménézo B2 qui comportent de nombreux composés dans leur formulation : vitamines, aminoacides, purines, nucléotides.

De plus, les besoins de l'embryon évoluent au fil du développement. Par exemple, le métabolite énergétique préférentiel est le pyruvate au début du développement, avant l'activation du génome embryonnaire alors que les besoins en glucose augmentent de manière exponentielle après cette activation.

Le milieu de culture doit contenir tous les composés dont l'embryon a besoin, et ceci à concentration optimale. De plus, un équilibre entre les différents composés doit être respecté. Par exemple, l'excès d'un aminoacide peut perturber le transport d'autres aminoacides.

L'accumulation de sous-produits du métabolisme (ammoniac notamment) peut rendre le milieu de culture toxique pour les embryons, en particulier dans le cas de culture sous huile. Les effets bénéfiques des co-cultures peuvent s'expliquer en partie par l'élimination de ces sous-produits par les cellules co-cultivées.

Des interactions dynamiques se produisent entre le milieu et les embryons d'une part, et entre les embryons eux-mêmes d'autre part. Ainsi, augmenter le nombre d'embryons cultivés dans le même volume augmente les taux d'obtention de blastocystes. Rappelons qu'il en va de même pour les ovocytes mis en maturation (**Khurana et al,2000**). Cet effet de groupe serait lié à des facteurs produits par les embryons (activité paracrine et rôle des cellules du cumulus persistantes). L'interféron tau semblerait avoir une telle fonction. Cette molécule, nécessaire au maintien de la gestation, est produite par les embryons, production proportionnelle à la densité d'embryons mis en culture et à l'efficacité de la culture. En effet, à partir du stade 8 cellules et jusqu'au stade blastocyste, on a pu observer que les taux de blastocystes, d'éclosion de blastocystes et le nombre de cellules des blastocystes allaient décroissants lors de mise en culture individuelle des embryons.

## II.2. Les systèmes de culture :

Plusieurs solutions ont été proposées afin d'ajuster la composition des milieux de culture aux besoins de l'embryon.

Dans un premier temps ont été développés des milieux riches (Ham's F10 ; TCM199) supplémentés en sérum. L'insuffisance des résultats obtenus a initié des recherches sur les

besoins spécifiques de l'embryon au cours de son développement pré-implantatoire.

Dans les années 70 ont été mis au point des milieux dont la composition est basée sur celle du liquide tubaire (0,5 % de fluide folliculaire avec dérivés plasmatiques et sécrétions épithéliales), liquide dans lequel se déroule la plus grande partie du développement préimplantatoire. Il s'agit du milieu Ménézo B2 (**Ménézo Y,1997**) et du milieu SOF (synthetic oviductal fluid). Certaines concentrations doivent être prises en compte telles que les concentrations en taurine (moitié du taux sérique), en hypotaurine (2 à 3 fois le taux sérique), et en cystéamine, en vitamine C, en glucose, phospholipides et triglycérides (inférieures aux taux sériquesX97).

Plus récemment, on a obtenu le développement d'embryons ovins jusqu'au stade blastocyste dans le TCM199 additionné de sérum avec des cellules épithéliales tubaires. Des lignées non établies d'origine génitale (tubaires ou utérines) puis des cellules trophoblastiques permettent d'améliorer les taux d'obtention de blastocystes et la qualité de ces blastocystes chez les ruminants.

Des lignées établies d'origine rénale de singe vert (cellules Véro) ou de bovin (cellules MDBK) ont été utilisées avec succès chez la vache et la brebis. Ces cellules qui ont la même origine embryologique que les cellules génitales présentent l'avantage de ne présenter aucun risque sanitaire et de permettre une meilleure répétabilité. La transmission d'infections aux embryons par les cellules tubaires ou utérines ne peut en effet être totalement exclue. Les cellules Véro sont congelées et remises en culture jusqu'à l'obtention d'une monocouche de cellules confluentes sur laquelle sera ajoutée le milieu de culture contenant les embryons à cultiver. Elles sont largement utilisées pour la PIV bovine .

Les interactions entre les embryons et les cellules co-cultivées ont fait l'objet de controverses. Les cellules co-cultivées produisent peut-être des facteurs embryotropiques tels que les facteurs de croissance, remplaçant alors en partie le sérum (**Ménézo Y,2002**). Elles peuvent aussi avoir un effet bénéfique sur les embryons en participant à l'élimination de composés toxiques, sous-produits du métabolisme embryonnaire (ammoniac à l'origine d'anencéphalie, dérivés actifs de l'oxygène ..) qui s'accumulent dans le milieu de culture au cours du développement.

Rappelons que le métabolisme embryonnaire varie au cours de son développement, notamment lors de la phase de transition à la mise en route de la lecture du génome embryonnaire.

La consommation d'oxygène varie selon le stade de développement embryonnaire : importante dès les stades précoces (2 nL/h chez l'embryon bovin), elle est due aux 2/3 aux phosphorylations oxydatives au stade blastocyste, au métabolisme dépendant des oxygénases au stade précoce, et au stress oxydatif et à la production de radicaux libres oxygénés (RLO) à chaque stade de développement. Ce stress oxydatif est à l'origine de la plupart des blocages du DIV (la production de RLO est plus importante *in vitro* qu'*in vivo*) D'où la supplémentation des milieux de culture avec divers anti-oxydants par les équipes de PIV.

Les stades précoces du développement embryonnaire, *in vivo*, sont soumis à une faible pression partielle en oxygène (lumière de l'oviducte), inférieure à celle de l'atmosphère (1,5 à 7 % chez la souris). La culture d'embryons sous une faible pression en oxygène paraît alors idéale en particulier dans l'espèce bovine . Les incubateurs classiques, à CO<sub>2</sub>, permettent d'obtenir une ambiance de température variable avec 5 % de CO<sub>2</sub> et 20 % d'O<sub>2</sub> (air), saturée en humidité (permettant une plus grande stabilité de pH). Etant donné leur coût important, les variations d'ambiance dues aux ouvertures et le fort taux d'oxygène, une équipe a proposé un système d'incubation « en bocal » (Anaerojar<sup>11</sup>) avec une atmosphère générée par une réaction chimique (réaction exothermique à l'air d'une poudre d'acide ascorbique) : 6 % de CO<sub>2</sub> et 15 % d'O<sub>2</sub> sans résidu toxique (**Avery et al, 2000**). Ce système a permis de meilleurs résultats mais le système optimal reste l'incubateur alimenté par le mélange gazeux suivant : 5 % d'O<sub>2</sub>, 5 % de CO<sub>2</sub> et 90 % de N<sub>2</sub>. Il permet de plus de limiter les supplémentations en anti-oxydants .

Tout comme le liquide tubaire, la composition du milieu de culture des embryons doit respecter certaines propriétés physico-chimiques (**Ménézo et Guérin, 1999**) :

\*Pression oncotique inférieure à la pression oncotique sérique

\*Potentiel redox de -0,1 mV (nombreux réducteurs et faible pO<sub>2</sub>)

\*Variabilité des concentrations en  $K^+$  et  $HCO_3^-$  dont dépend la capacitation des spermatozoïdes; l'embryon supporte mieux les milieux à tendance basique (propriété corrélée à l'équipement cellulaire en canaux ioniques)

\*Fortes concentrations en acides aminés (sauf en acides aminés hydroxylés) et ratios équilibrés (exemple du ratio glycine sur méthionine qui doit être de 50 chez l'homme), taurine et hypotaurine et taux de protéines totales faible (5-10% PT sérum).

Le métabolisme énergétique de l'embryon évolue au cours de son développement. Ainsi, aux stades précoces, l'embryon utilise les composés entrant directement dans le cycle tricarboxylique, et notamment le pyruvate. Le glucose (taux  $>1$  mM) est alors toxique, toxicité accentuée par la présence de  $HP04^2$  à forte concentration : on assiste à une accumulation de glycogène, à une augmentation importante du volume cytoplasmique conduisant à la formation de fragments cytoplasmiques (pour maintenir le rapport cytonucléoplasmique). Aux stades ultérieurs à MZT, l'embryon remplace le pyruvate par le glucose, à partir duquel il produit lipides, acides aminés, ribose et désoxyribose par les voies classiques .

Ces observations nous conduisent à la formulation de plusieurs milieux de culture d'embryons (au moins 2), s'adaptant aux besoins et au métabolisme embryonnaire. On parle de milieux séquentiels, actuellement en développement (**Gardner ,1999**). Dans l'avenir, on privilégiera sans doute des milieux chimiquement définis comme en MIV, milieu qui ne présentent aucun risque sanitaire ni conséquences sur les taux de gestation, d'avortement et de problèmes congénitaux (**Hasler ,2000**). Des descendants ont été obtenus chez tes bovins et les ovins après culture des embryons dans des solutions salines tamponnées simples additionnées de composés énergétiques et d'une source de protéines .

**Tableau 3** : Composition de milieux chimiquement définis utilisés pour la culture d'embryons de ruminants (communication de P.Guérin).

<i>Composants</i> (mM.L <sup>1</sup> )	CDM (Seidel, 1991)	CRI (Rosenkrans, 1993)	SOF+a.a.+BSA (Tervit, 1972)
NaCl	81,0	114,7	107,7
KCl	8,0	3,1	7,2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	1,2
MgCl <sub>2</sub>	0,5	-	0,5
NaHCO <sub>3</sub>	25,0	26,2	25,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0	-	U
Na Pyruvate	0,5	0,4	0,3
Na Lactate	-	-	3,3
Ca Lactate	-	5	-
Glucose	2,0	-	1,5
Glutamine	1,0	1,0	1,0
Acides Aminés (a.a.)	MEM*+ 5mM GLY	MEM*+BME	MEM*
EDTA	0,1	-	-
BSA (mg/mL)	-	3,0	8,0
PVA (mg/mL)	0,1	*	-

\*MEM : *Minimum essential medium*.

Nous pouvons remarquer que certains préconisent l'ajout d'EDTA au milieu de culture : ce chélateur des ions Fe et Cu , poisons précoces à l'origine de radicaux libres oxygénés (RLO) peut être assimilé à la transferrine in vivo (**Ménezo et Guérin ,1999**). Tous les embryons ne sont pas de qualité égale et n'ont pas les mêmes aptitudes au développement.

Le jugement et la sélection des embryons pour le transfert constituent certainement une étape cruciale en permettant d'éliminer les embryons de qualité inférieure. L'évaluation de l'aptitude au développement des blastocystes (obtenus en moyenne après 7 jours de DIV) cultivés par des méthodes amples et non invasives a fait l'objet de nombreuses recherches. Cependant, seuls les critères morphologiques et la cinétique du développement sont utilisables aujourd'hui. Les embryons d'apparence morphologique supérieure et qui se développent plus rapidement donnent de meilleurs taux de gestation après transfert .

La variation de morphologie embryonnaire entre les embryons produits *in vivo* et les embryons produits *in vitro* est notable, accru par la présence de sérum : la compaction de la morula (vers 5 jours de DIV) est plus ou moins complète comme le couplage cellulaire, le nombre total de blastomères chute et, au niveau cellulaire, la densité volumique de différents organites diffère (vacuoles, mitochondries) avec un rapport cytonucléoplasmique diminué en PIV (**Croisier et al,2000**). Ces différences se répercutent sur les taux de gestation mais aussi sur le nombre de fœtus survivants, le développement placentaire et la taille moyenne des conceptus .

Plusieurs critères morphologiques ont alors été utilisés tels que le nombre de cellules et le taux d'apoptose dans les blastocystes, le taux de ré-expansion après congélation (**Chauhan et al ,1998**). Cependant, ces critères ne permettent que d'éliminer les embryons de mauvaises qualité La vitesse de développement semble être un meilleur critère. En effet, tout retard de développement sera difficilement rattrapé après transfert. La sélection des embryons qui se développent le plus rapidement est donc un excellent critère mais cette méthode favorise les embryons mâles dont la cinétique de développement est légèrement accélérée par rapport aux embryons femelles.

Bien que l'activité métabolique de l'embryon soit intense, aucun indicateur métabolique n'est actuellement utilisable pour juger les embryons après culture et les sélectionner avant transfert.

## I. Cryoconservation :

L'utilisation des basses température (-196°C) pour conserver les tissus et cellules vivantes ou cryoconservation est aujourd'hui courante : les spermatozoïdes ont été les premières cellules à y être confrontées. La cryoconservation du sperme associée à l'insémination artificielle a été développée dès les années 1960 et a permis de décupler le potentiel reproducteur des animaux en passant par la voie mâle.

Les embryons surnuméraires à la suite d'un protocole de FIV/PïV/transfert en frais peuvent être conservés avec succès dans l'azote liquide ce qui augmente les taux de gestation à partir d'une ponction ovarienne. La cryoconservation des embryons produits in vitro en une étape indispensable à maîtriser pour accroître l'impact de cette biotechnologie. En effet, en dissociant dans le temps et l'espace les opérations de production et de transplantation, la cryoconservation facilite les échanges d'embryons et la mise en œuvre de la transplantation embryonnaire sur le terrain.

Cependant, les premières tentatives de cryoconservation des embryons produits in vitro par les méthodes classiques utilisées pour les embryons bovins produits in vivo ont mis en évidence leur plus grande sensibilité à la conservation à de basses températures (surcharge lipidique). De nombreux protocoles ont été proposés et les données font état de taux de survie embryonnaire jusqu'à éclosion du blastocyste élevés (44 % à 92 %) et supérieurs à ceux obtenus après transplantation des embryons cryoconservés. En effet, les taux de gestation après transfert d'un embryon cryoconservé selon les méthodes classiques de congélation lente ou de vitrification sont relativement faibles et très variables d'une étude à l'autre (de 11 à 38 %). Des taux supérieurs sont parfois obtenus après transplantation de plusieurs embryons. L'adaptation des méthodes de cryoconservation (addition de lécithine au milieu de congélation) et la modification des propriétés osmotiques des membranes cellulaires avant congélation (addition d'anti-oxydants, déshydratation au stade 1 cellule) sont des premières améliorations des méthodes classiques, mais les recherches sur le sujet doivent être poursuivies afin d'optimiser les nouvelles biotechnologies de la reproduction (**Guyader, 1998**).

La cryoconservation d'ovocytes est également un sujet de recherches depuis la fin des années 1990, surtout dans l'espèce humaine (avant un traitement de chimiothérapie par

Exemple). Après ponction, les ovocytes sont placés dans un milieu de base contenant de l'éthylène glycol, puis dans un milieu de vitrification. Les résultats obtenus ne permettent pas encore d'utiliser couramment la méthode comme nous pouvons actuellement le faire avec les embryons. Cependant, quelques publications donnent d'assez bons résultats : (**Dinnyes et al, 2000**) indiquent un taux de survie des ovocytes de l'ordre de 80 %. La congélation d'ovocytes immatures peut constituer une alternative : la méiose est arrêtée au stade diplotène de la prophase I, avec des chromosomes protégés par la membrane nucléaire ce qui élimine le risque de dégradation du fuseau méiotique.

La cryoconservation et le stockage de tissu ovarien est une autre stratégie de conservation de la fertilité chez la femme, du potentiel génétique chez les animaux de rente. Après biopsie ou ovariectomie, des études semblent nous permettre de croire dans l'avenir de cette technique, applicable chez la femme ou la fillette. De forts taux de survie des ovocytes après congélation tissulaire ont déjà été décrits chez la souris, la brebis et la femme.

## **II. Diagnostic pré-implantatoire :**

Le diagnostic pré-implantatoire est une forme précoce de diagnostic prénatal, développé chez l'homme dans les années 1980, en premier lieu afin de limiter la transmission de maladies génétiques à l'embryon issu d'une assistance à la procréation. Une biopsie de l'embryon, équivalant à l'amniocentèse, ou une cytoponction (moins lourde) est alors réalisée.

La PIV bovine voit son intérêt économique accru par l'application de nouvelles techniques permettant de sexer voire même d'analyser les gènes de l'embryon produit. Une analyse multiple du génome permet en effet un sexage et la détermination de 3 gènes marqueurs à partir d'un blastomère isolé par micro-aspiration (méthode non invasive n'altérant pas le potentiel de développement) sur un embryon au stade 8-16 cellules. Les gènes marqueurs sont des gènes d'intérêt zootechnique : ils codent pour la caséine K, la GH et la prolactine. L'efficacité de cette analyse PCR est d'environ 90 % (**Chrenek et al,2001**).

### III. Techniques de micromanipulations :

La micromanipulation des cellules date de la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle quand les biologistes et les physiologistes employaient divers systèmes permettant de manipuler et de disséquer les cellules. D'abord pour étudier les mécanismes de la fécondation, les micromanipulations des gamètes ont commencé dans les années 1960. Les équipes ont alors montré que la fusion des membranes n'est pas une étape obligatoire pour l'activation ovocytaire dans toutes les espèces et notamment chez l'homme. L'espèce la plus étudiée reste la souris, permettant des essais peu coûteux, reproductibles et permettant des comparaisons. Le problème est que les observations faites pour la souris ne sont pas extrapolables aux autres espèces de Mammifères (ainsi, on s'aperçoit que le modèle bovin est plus proche de l'homme que le modèle murin).

Le Clonage et autres transferts nucléaires nécessitent non seulement une étape de M1V mais aussi une activation des ovocytes maturés.

Un des problèmes majeur du clonage et des transferts nucléaires (avec gènes de cellule somatique) est la reprogrammation nucléaire, diminuant la viabilité des embryons qui en sont issus. On observe en particulier des problèmes de transcription des gènes ayant un rôle important dans l'implantation embryonnaire et le développement post-implantatoire (**Daniels et al,2000**). Le raccourcissement des télomères est un autre inconvénient de ces techniques (sauf lors de transferts à partir de cellules du cumulus), mais l'impact physiologique n'est toujours pas connu (exemple de Dolly).

L'activation ovocytaire, nécessaire au transfert nucléaire et à FIC SI bovine (intracytoplasmic sperm injection), s'observent lors de la parthénogénèse. Elle est induite par l'adjonction de certaines substances dans le milieu de culture tels les ionophores calciques, le cycloheximide, ou encore des associations comme Fiomycine et la 6-diméthylaminopurine (utilisée seule, elle favorise la triploïdie). Ces substances provoquent une dépolarisation ovocytaire et des pics de calcium (libéré par le réticulum endoplasmique), mimant l'effet des facteurs solubles libérés par le spermatozoïde lors de sa fusion à la zone pellucide (**Dale et Russo, 1999**).

Jusqu'à 60 % des ovocytes traités sont ainsi activés : ils présentent un pronoyau femelle et une dégranulation des granules corticaux .

L'ICSI, biotechnologie découverte chez l'homme puis développée dans les différentes espèces animales, consiste en injection du matériel paternel, sous forme de spermatozoïde ou de spermatide, dans l'ovocyte, nécessairement activé sauf chez l'homme et la souris. La première naissance par cette technique dans l'espèce bovine date de 1990. De nombreuses études cherchent à améliorer les résultats dans diverses espèces animales. En effet, hormis dans l'espèce humaine, des dommages dans le développement terminal embryonnaires en réduisent l'utilisation (**Catt et Rhodes, 1995**).

La spermiogenèse, étape de sur-maturation ou de spécialisation de la spermatogenèse, n'est donc pas indispensable à cette technique shuntant la fécondation ce qui permet alors de pallier les anomalies liées au génome paternel (notamment dans l'espèce humaine où le sperme peut être de très mauvaise qualité). La seule exigence est que des spermatozoïdes soient vivants, ce qui permet une dissociation entre le génotype et le phénotype du spermatozoïde.

Faisant suite à la PDZ (partial zona dissection ou altération de la zone pellucide) et à la SUZI (subzonal sperm injection ou injection du spermatozoïde dans l'espace périvitellin), l'ICSI a permis de limiter les pertes mâles : on utilise un seul spermatozoïde (ou une spermatide, ronde ou allongée) par ovocyte (**Testart J, 1997**). Un prétraitement du sperme reste néanmoins nécessaire, similaire à celui appliqué en PIV classique, associé ou non à un traitement au DÎT (dithiethreitol, promoteur de la décondensation du spermatozoïde).

L'injection du gamète mâle est une micromanipulation réalisée sous microscope inversé (au grossissement 100 ou 400) qui, lorsqu'elle est maîtrisée, s'avère plus rentable en terme de taux de clivage et de blastocyste que l'injection Piézo guidée que certains auteurs ont pu promouvoir. Elle est facilitée par la centrifugation ou l'aspiration-refoulement des ovocytes incubés dans 2 % de hyaluronidase pendant 30 secondes c'est-à-dire la décoronisation (**Chung et al, 2000**), (**Hamamah et al, 1999**). Les ovocytes en métaphase II sont sélectionnés, activés. Dans des microgouttes de PVP (polyvinylpyrrolidone) sous huile, on effectue l'injection des spermatozoïdes sélectionnés par migration sur microgouttes de PVP et dont la queue a été sectionnée (immobilisation et déstabilisation membranaire). Le fuseau mitotique de l'ovocyte

doit être protégé ; le globule polaire doit être situé à 12 h ou à 6 h par rapport à la micropipette de contention.

Le protocole doit être parfaitement maîtrisé. Toutes les conditions doivent être stables (température, pH, bulles d'air éliminées...) et le spermatozoïde doit être correctement immobilisé tout comme l'ovocyte dont on a efficacement rupturé la membrane plasmique.

Les taux de fécondation, décevants pour les précédentes techniques (SUZI et PDZ avec 15-20 % de fécondation), sont très satisfaisants chez l'homme : 35 % de fécondation soit environ 50 % des ovocytes injectés ce qui explique qu'une fois sur quatre l'assistance médicale à la procréation se solde par une ICSI .

Lorsqu'on compare la FIV classique et l'ICSI dans l'espèce ovine, on peut observer une certaine accélération des événements : la durée de l'activation ovocytaire post-insémination est doublée lors de FIV classique et celle de la décondensation du matériel génétique paternel est triplée par rapport à l'ICSI. La formation des pronoyaux est non seulement plus rapide en ICSI mais aussi asynchrone (2 h pour la formation du pronoyau femelle contre 3 pour celle du pronoyau mâle) tandis qu'elle est simultanée en FIV et dure 4 h. Cet avancement des événements en ICSI n'induit pas d'augmentation du pourcentage de fécondations anormales (**Gomez et al, 1998**). Les conséquences sur le développement de l'embryon semblent être les mêmes que celles provoquées par toute manipulation physique des cellules germinales et des embryons (problèmes périnataux, anomalies morphologiques comme les atrophies thymiques, l'augmentation du ventricule droit, l'hypoplasie lymphoïde, l'anémie, diverses affections rénales, hépatiques, cérébrales ). Néanmoins, il est évident que les anomalies génétiques plus ou moins graves accompagnant les stérilités mâles pourraient voir leur incidence augmenter par l'utilisation de l'ICSI. Le risque d'introduction de matériel étranger à l'ovocyte est un problème inhérent à la technique. Le manque de recul sur cette biotechnologie doit nous inciter à l'employer avec prudence (**Ménézo et Guérin,1999**).

Terminons cette partie bibliographique en soulignant l'importance des contrôles sanitaires en production embryonnaire *in vitro*. Des services désignés, agréés (DSV pour la PIV bovine par exemple) procèdent à des visites annuelles des laboratoires agréés. Les laboratoires commercialisant leurs produits doivent également réaliser un échantillonnage sanitaire des

matériaux utilisés. Ces derniers font eux-mêmes leurs prélèvements, de façon aléatoire à différents niveaux de leurs manipulations : mélange de fluide folliculaire pour chaque lot d'ovaires collectés, milieu de maturation, embryons, ovocytes dégénérés, milieux de lavage. Le laboratoire national de contrôle des reproducteurs analyse ces échantillons à l'état frais ou, le plus souvent après congélation (dénombrement bactérien, recherche de mycoplasmes et de virus). Ces contrôles ont permis d'identifier les agents pathogènes transmissibles en PIV, la nature de leur association aux embryons et leur résistance à la cryoconservation, les contaminations microbiennes des milieux de culture. Ils assurent également une épidémiosurveillance indispensable pour un domaine aussi récent. La procédure de traitement actuelle des embryons est relativement simple on élimine tout d'abord les sources d'agents pathogènes par le testage des semences et par l'utilisation d'animaux de statut sanitaire connu; les milieux sont supplémentés en antibiotiques voire même en antifongiques; et enfin, les lavages successifs des cellules suffisent à diluer sinon éliminer, inactiver ou déplacer les agents pathogènes (**Sakaguchi et al,2000**).

## **Abréviations:**

AMP : adénosine mono-phosphate.

ARN : acide ribo-nucléique (ARNm : ARN messenger, ARNr ; ARN ribosomal).

ATNC : agent transmissible non conventionnel.

ATP : adénosine tri-phosphate.

BSA : bovine serum albumin.

CamK2 : Calcium/calmodulin-dependant protein kinase 2.

CdK2: cyclin-dependant kinase 2.

CGPs : cellules germinales primordiales.

C-MOS: oocyte maturation factor Mos.

COC : complexe ovocyte-cumulus.

DIV : développement embryonnaire *in vitro*.

ECG : equine chorionic gonadotropin.

EGF : epithelial growth factor.

FGF2 : fibroblast growth factor 2.

FIV : fécondation *in vitro*.

FSH : follicle stimulating hormon ou follitropine.

GDF9 : growth differentiation factor 9.

GH : growth hormone.

GnRH : gonadotropin releasing hormone.

GSH : glutathione.

GV : vésicule germinale.

GVBD : germinal vesicle breackdown ou rupture de la vésicule germinale hCG : human chorionic gonadotropin IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine.

HGF : hepatocyte growth factor.

IGF : insulin growth factor (facteurs de croissance, de type I, II...).

IGF-BP : insulin growth factor's binding protein.

LH : luteinizing hormon ou lutropine.

MAPK : mitosis activated protein kinase.

MIS : meiosis inhibiting substance.

MIV : maturation *in vitro*.

MPF : mitosis promoting factor.

MZT : maternal to zygotic transition.

OMI : oocyte maturation inhibitor.

OPU : ovum pick up.

PBS : phosphate buffered saline ou tampon phosphate.

PCR : polymerase chain reaction.

PIV : production embryonnaire *in vitro*.

PKCs : protéine kinase C.

PIV: production in vitro.

PVA : polyvinyl alcool.

PVP : polyvinylpyrrolidone.

RLO : radicaux libres oxygénés.

SPZ : spermatozoïdes.

S VF : sérum de veau fœtal.

TCM 199 : tissular and cellular medium n°199.

TGF-a et 0 : tumoral growth factor a et 0.