

Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* et *in vitro* chez la brebis et la chèvre

En raison de sa complexité et de son coût, le transfert d'embryons ne saurait prétendre remplacer l'insémination artificielle comme technique de reproduction de routine. En effet, 850 000 brebis et 75 000 chèvres sont inséminées alors que seulement une centaine de femelles de chaque espèce sont concernées par la collecte d'embryons en France chaque année. Cependant, utilisé à partir des embryons de géniteurs soigneusement choisis, le transfert d'embryons permet un progrès génétique supplémentaire non négligeable (Colleau *et al* 1998) et peut servir à des objectifs commerciaux ou sanitaires. Pour tous les échanges de gènes, la voie du transfert embryonnaire est plus économique que le déplacement d'animaux vivants, et surtout très sécurisante sur le plan sanitaire. L'embryon transféré au stade morula ou blastocyste bénéficie d'une protection naturelle contre les agents infectieux constituée par la zone pellucide. Les lavages successifs effectués selon les recommandations de l'IETS (Stringfellow et Seidel 1990) permettent de réduire fortement le risque de transmission d'agents infectieux.

L'induction d'ovulations multiples et la transplantation embryonnaire (MOET) néces-

sitent la stimulation hormonale des femelles donneuses pour produire des embryons *in vivo*. Ce mode de production a initié le développement de la technologie du transfert d'embryons, mais récemment est apparue la production d'embryons en culture après maturation et fécondation *in vitro* d'ovocytes prélevés sur l'animal vivant. Les connaissances acquises ces dernières années sur la croissance folliculaire, la maturation ovocytaire, la fécondation et le développement de l'embryon ont été enrichies par le développement des techniques de biologie moléculaire (Thibault et Levasseur 2001). Ces connaissances nouvelles ont contribué d'une part, à simplifier et à rendre davantage opérationnelle cette technique chez les petits ruminants pour qu'elle trouve sa place demain dans les élevages comme c'est le cas aujourd'hui chez les bovins, et d'autre part, à proposer des alternatives de production d'embryons *in vitro* pour faciliter la mise en place des nouvelles biotechnologies.

1 / Production d'embryons *in vivo*

La production d'un nombre important d'embryons suppose que les étapes successives de la stimulation ovarienne, de la fécondation, de la collecte de ces embryons et la possibilité de répéter plusieurs fois ces opérations chez la même donneuse soient maîtrisées.

1.1 / Augmenter l'efficacité du traitement de superovulation

a / Le traitement associé progestagène et gonadotrophines

L'administration de progestagène à l'aide d'éponge vaginale doit précéder la stimula-

Résumé

Cet article décrit les bases des techniques de production *in vivo* et *in vitro* des embryons ovins et caprins. Malgré les améliorations apportées à la technique, les limites de la production d'embryons *in vivo* sont précisées : variabilité de la réponse au traitement hormonal, fécondation difficile des femelles fortement superovulées, importance de la régression prématurée des corps jaunes chez la chèvre. Les nouvelles perspectives offertes par les ponctions répétées des ovocytes chez une même femelle, suivies de la production des embryons *in vitro*, sont présentées avec leurs limites actuelles et les recherches à mettre en œuvre pour les dépasser. Les progrès récents des techniques de transfert et de congélation des embryons devraient permettre dans le futur une plus grande utilisation du transfert embryonnaire dans les programmes d'éradication d'épizooties et d'amélioration génétique des petits ruminants.

tion ovarienne par les gonadotrophines, d'une part, parce que la brebis et la chèvre ne présentent pas de cycles sexuels tout au long de l'année, d'autre part, parce que cela permet de synchroniser l'état physiologique des donneuses et des receveuses d'embryons. Avec ce type de traitement, la production d'embryons est possible aussi bien en saison sexuelle que hors saison.

La première gonadotrophine utilisée pour obtenir une superovulation a été la PMSG (maintenant nommée eCG pour equine Chorionic Gonadotropin), administrée par voie intramusculaire en une seule injection de 1000 à 2000 UI, un ou deux jours avant le retrait de l'éponge. Cependant, cette gonadotrophine présente deux inconvénients : d'une part, la forte activité LH de eCG peut induire une activation prématurée de la méiose ovocytaire, et d'autre part, l'action prolongée de eCG due à sa longue demi-vie (plusieurs jours) provoque des modifications des événements endocriniens défavorables au transport des gamètes dans les voies génitales. Ces effets conjugués peuvent expliquer les faibles performances obtenues avec eCG (2 à 3 embryons transférables en moyenne par donneuse) et son abandon au profit de FSH, obtenue à partir d'extraits hypophysaires. Des études comparatives ont montré la supériorité de ces extraits hypophysaires porcins (pFSH) ou ovins (oFSH) en terme de production d'embryons aptes au transfert, mais aussi la nécessité de les administrer de façon séquentielle (6 à 8 injections à 12 h d'intervalle les 3 ou 4 derniers jours du traitement progestagène, la dernière injection ayant lieu 12 h après le retrait du progestagène) étant donné leur courte demi-vie (quelques heures).

Des extraits purifiés de oFSH (par OvagenND-Immuno Chemical Products, Nouvelle-Zélande) et de pFSH (par FolltropinND-Vetrepharm, Canada et StimufolND-Merial, France) sont disponibles sur le marché. En ce qui concerne la pFSH, elle est administrée en doses décroissantes et est enrichie en pLH (FSH/LH de 0,3 à 0,4) lors des deux dernières injections réalisées à l'arrêt du traitement progestagène et 12 h plus tard (Baril *et al* 1993).

Un traitement 'cocktail', associant en une seule injection la FSH avec une dose modérée de eCG (400 à 800 UI), a été utilisé avec succès chez la brebis Mérimos australienne afin d'éviter les désavantages liés à la durée d'activité biologique de chacune des gonadotrophines (Ryan *et al* 1991).

b / Diminuer la variabilité de la réponse au traitement de superovulation

La variabilité de la réponse ovulatoire des donneuses rend difficile la planification rigoureuse du nombre de femelles receveuses et limite le développement du transfert embryonnaire. En effet, 20 % des brebis Lacaune et 10 % des chèvres Alpine et Saanen ont moins de 5 ovulations après le traitement pFSH et par conséquent sont éliminées de la collecte d'embryons tandis que 17 à 20 % des femelles traitées ont plus de 20 ovulations

(Brebion *et al* 1992). L'état de la population folliculaire au moment où débute la stimulation ovarienne étant le facteur principal de variation de la réponse à FSH (Saumande 1995), plusieurs approches visant à contrôler cette population folliculaire ont été étudiées.

La première approche a consisté à augmenter la concentration des gonadotrophines endogènes chez la donneuse, en limitant la rétroaction négative de l'ovaire sur le système hypothalamo-hypophysaire par immunisation active contre l'androstenedione ou contre l'inhibine. Cette approche, qui permet d'augmenter le nombre d'ovulations et la prolificité des femelles immunisées, n'a pas diminué la variabilité de la réponse au traitement de superovulation et n'a pas été poursuivie (Cognie 1988).

Une autre stratégie, qui a donné des résultats encourageants chez la génisse (Gong *et al* 1995), consiste à stimuler la synthèse d'IGF1 afin d'augmenter la population de follicules recrutables par administration de somatotrophine (hormone de croissance ou GH) la semaine précédant la stimulation gonadotrope. Cependant, chez les brebis et les chèvres ayant été traitées dans les mêmes conditions avec l'hormone de croissance, la réponse ovarienne après FSH n'est pas améliorée. Un effet bénéfique de l'hormone de croissance sur la qualité et le nombre d'embryons ovins transférables a été mis en évidence lorsque celle-ci est administrée seulement le jour du retrait du support de progestagène, au moment des deux dernières injections de FSH lors de la croissance folliculaire préovulatoire (Folch *et al* 2001). Ces auteurs attribuent cet effet bénéfique soit à une action directe sur la maturation ovocytaire soit à une action indirecte à travers l'environnement utérin.

Enfin, une autre possibilité largement étudiée chez les ovins, consiste à accroître le nombre de follicules dans la classe de taille qui précède la dépendance de ces follicules vis-à-vis des gonadotrophines (1 à 2 mm), en inhibant les sécrétions endogènes de LH et FSH. Il est possible de freiner de façon réversible cette sécrétion des gonadotrophines soit par une désensibilisation hypophysaire au GnRH avec un agoniste (buséreline- 40µg/j, ReceptalND-Intervet) administré pendant 2 semaines, soit plus directement par un antagoniste (Antarelix - 0,5mg/j, TeverelixND-Europeptides) administré pendant 10 jours avant le début de la stimulation gonadotrope. Après ce traitement, le nombre de follicules dans la classe 1-2 mm est doublé, le taux d'atrésie folliculaire est significativement diminué dans cette classe de taille et la réponse au traitement de superovulation est augmentée de 50 % (Brebion *et al* 1992). Appliqué chez la brebis laitière de race Lacaune, ce pré-traitement permet d'éliminer les faibles réponses (moins de 5 ovulations), assure en moyenne la production de 10 embryons transférables et la naissance de 6 à 7 agneaux par donneuse traitée (Cognie 1999). La variabilité du taux d'ovulation (22,3 ± 7,5) demeure élevée mais comme le nombre d'ovulations chez une même donneuse est hautement répétable avec ce protocole (r = 0,76), il est possible

Pour optimiser la réponse des brebis et des chèvres au traitement de superovulation, on peut accroître le nombre de follicules aptes à répondre à la stimulation gonadotrope en bloquant la sécrétion de LH et FSH.

que cette variabilité entre donneuses reflète des différences génétiques dans l'aptitude à la superovulation (Cognié *et al* 2000). Lorsque le traitement FSH est appliqué sans la préparation de l'ovaire induite par l'application de l'antagoniste, la répétabilité du nombre d'ovulations après deux traitements successifs est plus faible : $r = 0,55$ (Bari *et al* 2001), le facteur génétique étant sans doute masqué par la variabilité de l'état de l'ovaire (nombre et taille des follicules présents) au moment du début du traitement.

1.2 / Diminuer les échecs de fécondation après superovulation

Dans le cas de l'insémination artificielle (IA) programmée à un moment déterminé après l'arrêt du traitement, le succès de la fécondation des ovocytes est en partie limité par la variabilité du moment de l'ovulation par rapport à l'IA.

Chez la brebis superovulée avec pFSH, les premières ovulations sont observées en moyenne $58,4 \pm 5,6$ heures après le retrait de l'éponge et environ 6 heures s'écoulent entre la première et la dernière ovulation. Le passage des spermatozoïdes à travers le cervix est perturbé chez la brebis superovulée (Evans et Armstrong 1984) et le taux de fécondation après une IA cervicale est corrélé négativement au taux d'ovulation. Cependant, le dépôt de la semence 48-50 heures après le retrait de l'éponge, directement dans les cornes utérines (80×10^6 spermatozoïdes) sous contrôle laparoscopique, permet d'obtenir des taux de fécondation élevés chez les donneuses ayant moins de 30 ovulations (tableau 1). Les ovocytes des

femelles fortement superovulées conservent donc leur aptitude à être fécondés et à se développer normalement. Pour les femelles ayant plus de 30 ovulations, le problème de fécondation persiste associé à une plus faible proportion d'embryons transférables et il reste à déterminer si les ovocytes peuvent être normalement fécondés *in vitro*. Si c'est le cas, le franchissement de l'isthme reliant la corne utérine et l'oviducte par les spermatozoïdes dans ces conditions extrêmes pourrait être mis en cause.

Chez la chèvre superovulée, les premières ovulations sont observées en moyenne $62,4 \pm 6,0$ h après le retrait de l'éponge et environ 12 h s'écoulent entre la première et la dernière ovulation. Le taux de fécondation des ovocytes est souvent inférieur à celui observé chez la brebis et il est aussi plus faible chez les femelles qui présentent une réponse ovulatoire élevée, sauf dans le cas de l'utilisation de sperme frais par voie intra-utérine (tableau 2). Un contrôle plus précis du moment d'ovulation est possible en bloquant la décharge endogène de LH par un antagoniste de la GnRH administré 12 à 24 heures après le retrait du progestagène. Le jour suivant, l'injection de pLH mime le pic préovulatoire et permet une insémination programmée 16 heures plus tard (Baril *et al* 1996).

1.3 / Le traitement de superovulation et la collecte des embryons peuvent être répétés

La collecte des embryons est effectuée 6 à 7 jours (brebis) ou 7 à 8 jours (chèvre) après

Tableau 1. Taux d'œufs collectés, fécondés et qualité des embryons collectés après IA utérine avec du sperme frais (80×10^6 spz/brebis) selon le niveau de superovulation chez la brebis laitière (Y. Cognié et al, résultats non publiés).

Nombre d'ovulations	Nombre de brebis	Œufs collectés (%)	Œufs fécondés / collectés (%)	Embryons transférables / collectés (%)
5-9	26	60	84 ^b	69 ^a
10-14	39	62	93 ^a	76 ^a
15-19	41	62	89 ^a	79 ^a
20-24	17	67	85 ^{ab}	73 ^a
25-29	13	67	82 ^b	77 ^a
≥ 30	18	53	72 ^c	47 ^c

Test de Chi² : a vs b, b vs c : P<0,01 ; a vs c : P<0,001 dans la colonne considérée.

Tableau 2. Taux de fécondation des ovocytes en fonction de la méthode de fécondation et du niveau de superovulation chez les chèvres Alpine et Saanen (G. Baril et al, résultats non publiés).

Méthode de fécondation des chèvres donneuses	Nombre d' ovulations		Total
	<15	≥15	
Saillie (2 saillies/chèvre)	82 ^a (335-44)	72 ^b (889-65)	75 (1224-109)
IA cervicale (2 IA - 400×10^6 spz congelés/chèvre)	66 ^a (371-59)	47 ^b (487-39)	55 (858-98)
IA intra-utérine / endoscopie : - sperme congelé : 1 IA - 200×10^6 spz /chèvre	63 ^a (467-74)	52 ^b (1031-79)	55 (1498-153)
- sperme frais : 1IA - 200×10^6 spz /chèvre	68 (431-69)	65 (712-57)	66 (1143-126)

(x-y) : œufs collectés - chèvres donneuses.

Test de Chi² : sur une même ligne les valeurs suivies des lettres a et b sont significativement différentes (P< 0,001).

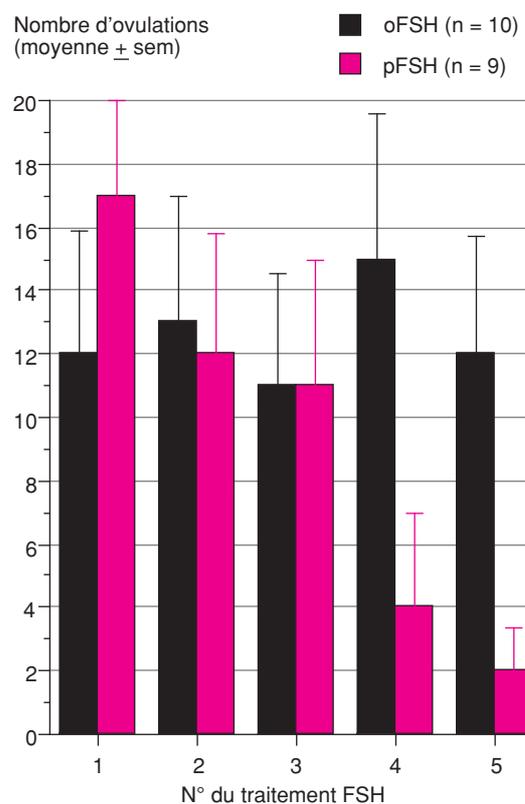
l'oestrus par perfusion des cornes utérines avec un milieu tamponné (PBS) après laparotomie médioventrale. La présence d'adhérences post-opératoires à partir de la deuxième collecte peut compromettre tant la fertilité que la réussite des collectes ultérieures. Avec le développement de techniques de collecte moins invasives, il est possible, en utilisant la laparoscopie, de répéter les collectes d'embryons tous les deux mois chez une même femelle, sans provoquer des adhérences post-opératoires (Vallet *et al* 1991).

Chez la brebis, avec un intervalle de 2 mois entre traitements pFSH successifs, une diminution significative de la réponse n'est observée qu'à partir du quatrième traitement (Brebion *et al* 1991). Bien que non clairement identifiée chez les ovins, l'apparition d'anticorps anti-FSH pourrait être la cause de cette diminution de la réponse comme cela a été montré chez la chèvre traitée de façon répétitive avec pFSH, chez laquelle une forte corrélation négative existe entre le titre d'anticorps et le nombre d'ovulations (Remy *et al* 1991). Cependant, l'administration répétée de oFSH ne provoque pas de diminution du nombre d'ovulations chez les brebis (Bari *et al* 2001) et les chèvres donneuses (figure 1).

1.4 / Régression prématurée des corps jaunes

Chez la chèvre Alpine ou Saanen, la régression partielle ou totale des corps jaunes est observée au moment de la collecte des embryons (6 à 8 jours après l'oestrus) pour 10 à 15 % des femelles superovulées avec FSH et ce taux peut être plus élevé encore chez d'autres

Figure 1. Induction répétée de la superovulation chez la chèvre avec FSH ovine (oFSH) et porcine (pFSH) (Baril *et al* 1992).



La répétition des traitements de superovulation avec la FSH ovine ne modifie pas la réponse des brebis et des chèvres, mais la diminue avec la FSH porcine.

races (30 %) ou après induction de la superovulation avec eCG. Chez la brebis, ce phénomène est plus rare et n'est signalé que chez des femelles superovulées ayant un déficit alimentaire énergétique (Jabbour *et al* 1991).

Ce phénomène, dont les causes restent méconnues, existe tant en saison de reproduction qu'en période d'anoestrus et par conséquent il constitue un facteur limitant important de la transplantation embryonnaire dans l'espèce caprine. En effet, dans le cas où la lutéolyse prématurée est totale, le nombre d'embryons aptes au transfert est le plus souvent nul pour cette donneuse.

L'inhibition de la synthèse de la prostaglandine F2 α , et par conséquent de la lutéolyse, peut être obtenue par l'administration biquotidienne de flunixin méglumine depuis le jour de l'ovulation jusqu'au jour de la collecte des embryons. Ce traitement permet de réduire le phénomène de régression prématurée des corps jaunes et conduit ainsi à une augmentation du nombre d'embryons transférables par chèvre donneuse (Traldi 1995).

2 / Production d'embryons *in vitro*

Depuis la naissance, il y a 15 ans, des premiers agneaux et chevreaux obtenus après maturation *in vitro* et fécondation *in vitro* (FIV) des ovocytes (Crozet *et al* 1987), la technique a été simplifiée et améliorée au fur et à mesure des connaissances acquises sur la maturation ovocytaire et les premiers stades du développement embryonnaire.

2.1 / FIV et culture des embryons jusqu'au stade blastocyste

La capacitation du sperme, après décongélation et centrifugation sur gradient Percoll pour éliminer les spermatozoïdes non mobiles, est induite par l'incubation pendant une heure dans un milieu supplémenté avec 10 % de sérum de brebis en chaleur. L'héparine qui est un activateur puissant de la capacitation du sperme de taureau, n'agit efficacement sur le sperme de bélier et de bouc qu'en présence de sérum.

Dans notre laboratoire, les ovocytes matures sont mis en contact pendant 17 heures avec les spermatozoïdes (10⁶/ml) dans le milieu SOF (Synthetic Oviduct Fluid) sous huile minérale et dans une atmosphère à 5 % de CO₂ maintenue à 38,5°C et en moyenne 75 à 80 % d'œufs normalement fécondés sont obtenus en routine. Le jour suivant l'insémination, les zygotes présumés sont mis en culture dans des microgouttes de SOF et sont maintenus ainsi pendant 7 jours dans une atmosphère contenant 5 % CO₂, 5 % O₂ et 90 % N₂. Les blastocystes obtenus après une semaine de culture en présence de sérum (35 à 50 % des ovocytes mis en FIV) ont un taux de développement, après transfert chez une receveuse, très proche de celui des embryons obtenus *in vivo* (tableau 3) et donnent naissance à des jeunes normaux. Cependant,

Tableau 3. Taux de mise bas et de survie embryonnaire (chevreaux nés /embryons transférés) après transfert d'embryons frais produits *in vivo* ou *in vitro* chez la chèvre (Cognié et al 2001).

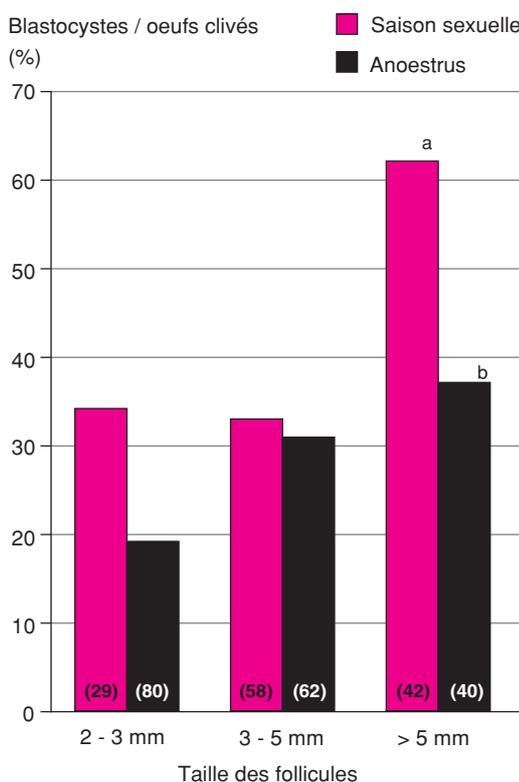
Méthode de production des embryons	Receveuses		Mise bas		Survie embryonnaire	
	Nb	(embryons)	%	(Nb)	%	(Nb)
<i>In vitro</i>	18	(36)	61 ^a	(11)	47 ^c	(17)
<i>In vivo</i>	19	(38)	89 ^b	(17)	71 ^d	(27)

a vs b ; c vs d : P<0,05

dans quelques laboratoires, il a été observé que la culture des embryons en présence de sérum peut induire des poids à la naissance anormalement élevés (Holm *et al* 1996) et que cette anomalie n'existe pas lorsque la culture a lieu dans un milieu SOF dépourvu de sérum, supplémenté avec de l'albumine bovine et différents acides aminés (Thompson *et al* 1995).

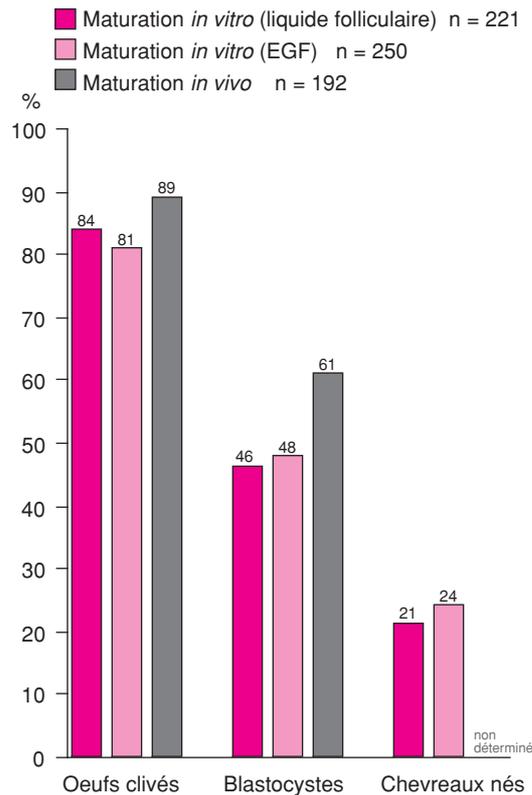
2.2 / Améliorer les conditions de maturation des ovocytes *in vitro*

Après FIV et culture pendant une semaine, 60 à 70 % des ovocytes ovulés (maturation *in vivo*) se développent jusqu'au stade blastocyste alors que le taux de développement n'est que de 35 à 50 % pour des ovocytes maturés *in vitro*. Afin d'améliorer les rendements obtenus après maturation *in vitro* des ovocytes, deux stratégies sont développées. La première consiste à essayer de sélectionner les ovocytes ayant acquis cette aptitude au développement et la seconde consiste à adapter au mieux le milieu de maturation aux besoins des ovocytes. La compétence de l'ovocyte à terminer spontanément sa méiose (maturation nucléaire) hors du follicule est acquise lorsqu'il est issu d'un follicule de diamètre supérieur à 2 mm. Ensuite, l'acquisition de la compétence au développement (maturation cytoplasmique) augmente progressivement avec la taille du follicule dont l'ovocyte est issu (figure 2). Cependant, ce processus est décalé chez la brebis porteuse du gène Booroola, le taux de développement des ovocytes d'une classe de taille folliculaire donnée est plus élevé que celui de la même classe des ovocytes d'une brebis non porteuse du gène, indiquant ainsi qu'un seul gène peut réguler la cinétique de la maturation ovocytaire dans le follicule en croissance (Cognié *et al* 1998). *In vivo*, la compétence au développement des ovocytes est influencée par leur environnement folliculaire (Mermillod *et al* 1999), lui-même régulé pendant la phase folliculaire du cycle sexuel par le niveau de pulsativité de LH (Oussaid *et al* 1999). Chez la chèvre, les ovocytes prélevés dans des follicules de plus de 5 mm de diamètre ont une plus grande aptitude au développement après fécondation en saison sexuelle qu'en période d'anoestrus saisonnier où que ceux prélevés dans des follicules de plus petite taille (figure 2). Cependant, afin d'améliorer le milieu de maturation, l'identification précise des facteurs folliculaires régulant l'acquisition de la compétence au développement de l'ovocyte reste à faire, quoiqu'une liste des candidats possibles existe : facteurs de croissance, hormones ou peptides intra-ovariens (Bever *et al* 1997).

Figure 2. Influence de la taille du follicule ponctionné et de la saison sur le développement embryonnaire *in vitro* chez la chèvre (Y. Cognié et al, résultats non publiés). (n) : nombre d'oeufs clivés. a vs b : P<0,05

La méthode initialement proposée pour la maturation ovocytaire consistait à co-cultiver pendant 24 heures les complexes ovocyte-cumulus avec des cellules de granulosa dans un milieu supplémenté avec FSH, LH, oestradiol et sérum de veau foetal dans des conditions non statiques. Le système a été simplifié par la suite, en maturant les ovocytes dans un milieu seulement complémenté avec 10 % de fluide folliculaire et 100 ng/ml de oFSH. Les études en cours dans notre laboratoire semblent indiquer que le fluide folliculaire pourrait être remplacé avec succès par un milieu défini contenant de l'EGF (Epidermal Growth Factor ; 10 ng/ml) et de la cystéamine (100 µM) qui stimule la synthèse du glutathion impliqué, après la fécondation, dans la décondensation de la tête du spermatozoïde et sa transformation en pronucleus mâle (figure 3). Dans ces conditions de maturation, après la FIV et 7 jours de culture, en moyenne 50 % des ovocytes de chèvre se développent jusqu'au stade blastocyste. Après transfert chez des femelles receveuses, 47 % de ces blastocystes donnent naissance à des chevreaux (figure 3).

Figure 3. Rendements de la production d'embryons *in vitro* chez la chèvre. Pourcentages moyens d'œufs clivés, de blastocystes et de chevreaux nés du transfert d'embryons frais obtenus après maturation d'ovocytes *in vitro* (en présence de liquide folliculaire + FSH + cystéamine ou EGF + cystéamine) ou après maturation d'ovocytes *in vivo* (Y. Cognié et al, résultats non publiés).



Après FIV et culture, 50 % des ovocytes de chèvre maturés *in vitro* se développent jusqu'au stade blastocyste et, après transfert dans une femelle receveuse, la moitié d'entre eux donneront naissance à des chevreaux.

2.3 / Mise au point de la collecte d'ovocytes chez l'animal vivant

L'aspiration du contenu folliculaire sous faible dépression sur des ovaires prélevés à l'abattoir permet d'obtenir en moyenne de 1 à 2 complexes ovocyte-cumulus utilisables par ovaire. Un supplément de 4 à 5 ovocytes peut être obtenu après découpage de l'ovaire en fines lames (*slicing*) à l'aide d'une lame de rasoir ; mais ces ovocytes issus des petits follicules sont moins aptes à se développer après la FIV. La collecte d'ovocytes peut également être réalisée chez des animaux vivants, indemnes de pathologies, sous contrôle laparoscopique et de façon répétitive chaque semaine. Contrairement à l'espèce bovine où la ponction folliculaire est pratique courante, seules quelques équipes dans le monde emploient cette méthode chez les ovins et caprins. Après stimulation par oFSH,

le groupe de Ruakura en Nouvelle-Zélande récupère avec cette méthode 6 à 8 ovocytes en moyenne par femelle qui, après maturation, FIV et transfert des blastocystes obtenus après culture, résultent en la naissance de 1,5 agneaux en moyenne par brebis et par ponction (Tervit 1996). Chez la chèvre prépubère stimulée par un cocktail FSH + eCG 36 heures avant la collecte laparoscopique, le nombre plus élevé d'ovocytes récupérés par rapport à la chèvre adulte donneuse (tableau 4) compense en partie la faible viabilité des embryons issus de ces femelles prépubères obtenus après FIV : 3 chevreaux nés pour 30 zygotes transférés (Baldassare *et al* 2002).

2.4 / Implications potentielles de la production d'embryons *in vitro* pour la sélection chez les petits ruminants

La collecte laparoscopique répétée d'ovocytes suivie de la FIV et de la culture des zygotes jusqu'au stade blastocyste doit permettre d'obtenir un plus grand nombre d'embryons et donc d'augmenter la descendance des femelles d'élite par rapport à la production d'embryons *in vivo*. Elle permet en outre de produire, en un temps relativement court, des embryons de plusieurs mâles pour une même femelle. En effet, la ponction folliculaire est moins invasive et plus simple que la collecte des embryons dans les cornes utérines, elle peut être répétée un plus grand nombre de fois sans obligation d'un traitement hormonal (Besenfelder *et al* 1999) et est efficace à des stades physiologiques (pré-puberté ou début de gestation) auxquels la production *in vivo* d'embryons est impossible. De plus, chez la chèvre, cette approche permet d'éliminer le problème de la régression prématurée des corps jaunes rencontré chez un pourcentage élevé de femelles superovulées.

La viabilité après transfert des embryons obtenus *in vitro* chez la femelle adulte est acceptable, puisque près de la moitié des embryons transférés évoluent normalement jusqu'au terme de la gestation. Elle est néanmoins plus faible que la viabilité des embryons obtenus *in vivo* (cf tableau 3).

L'estimation du coût de l'embryon produit par ponction folliculaire et FIV (la main d'œuvre constituant environ la moitié du coût total) chez les petits ruminants est du même ordre que le coût de l'embryon produit *in vivo*, évalué à environ 100 euros. Comme pour l'espèce bovine, le jeune né après transfert embryonnaire a un prix de revient environ 10

Tableau 4. Nombre de follicules ponctionnés et d'ovocytes récupérés après stimulation gonadotrope (moyenne \pm sem) par collecte laparoscopique de chèvres Alpine et Saanen d'âges différents (d'après Baldassare et al 2002).

Age	2 – 3 mois	3 – 5 mois	Adulte
Nombre de femelles	20	36	21
Nombre de follicules ponctionnés par femelle	59 \pm 6 ^a	34 \pm 3 ^b	19 \pm 1 ^c
Nombre d'ovocytes collectés par femelle	50 \pm 5 ^a	27 \pm 2 ^b	16 \pm 2 ^c
Taux de récupération (%)	84	80	84

a vs b : P<0,001 ; b vs c : P<0,01

fois plus élevé qu'après insémination artificielle. Lorsque les méthodes de congélation des embryons produits *in vitro* seront améliorées (voir § 3.2), la ponction folliculaire associée à la FIV sera une technique dont pourront bénéficier, d'une part les schémas d'amélioration génétique des reproducteurs (voir Colleau *et al* 1998) et, d'autre part, les technologies qui modifient les caractéristiques génétiques des embryons (voir Houdebine 1998).

3 / Manipulation des embryons

3.1 / Transfert

Le transfert des embryons au stade morula ou blastocyste est effectué dans l'utérus d'une femelle receveuse dont l'oestrus a été préalablement synchronisé par traitement hormonal avec celui de la donneuse ou avec le jour de la FIV. Cette opération est réalisée très rapidement (3 minutes par receveuse) par laparoscopie, sous anesthésie locale et tranquilisant, et avec la même efficacité (70 à 75 % de taux de gestation) qu'après laparotomie (Baril *et al* 1993).

3.2 / Cryoconservation

Vingt-cinq ans après la naissance des premiers agneaux issus d'embryons ayant subi la congélation (Willadsen *et al* 1976), cette technique a été améliorée et simplifiée. Dans le cas de la congélation lente, l'éthylène glycol utilisé comme cryoprotecteur a permis d'obtenir des taux de survie après transfert approchant ceux obtenus avec des embryons frais. La méthode récemment mise au point de congélation rapide (vitrification) ne nécessite pas de matériel de refroidissement coûteux, est facile à mettre en oeuvre et devrait trouver plus facilement sa place dans les élevages. Avec cette nouvelle méthode, les embryons sont immergés directement dans l'azote liquide après avoir été déposés dans une solution contenant 25 % de glycérol et 25 % d'éthylène glycol (Baril *et al* 2001). Chez les ovins, lorsque les embryons (2 par paillette) sont transférés directement (sans

Tableau 5. Taux de mise bas et de survie embryonnaire (agneaux nés / embryons transférés) après transfert direct ou traditionnel d'embryons ovins produits *in vivo* et ayant subi la vitrification (2 embryons / receveuse) (Baril *et al* 2001).

Transfert	Traditionnel	Direct
Nombre de receveuses	43	36
Mise bas (%)	67	75
Survie embryonnaire (%)	49	53

Tableau 6. Taux de mise bas et de survie embryonnaire après transfert d'embryons vitrifiés obtenus *in vivo* ou *in vitro* (2 embryons / receveuse) (Traldi *et al* cité par Cognié 1999).

Espèce Type d'embryons	Ovine		Caprine	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Nombre de receveuses	33	34	27	20
Mise-bas (%)	70 ^b	15 ^a	52	45
Survie embryonnaire (%)	49 ^d	9 ^c	37	30

a vs b ; c vs d : P<0,001

retrait des cryoprotecteurs ni réexamen de leur qualité après dégel) dans une corne utérine de la receveuse, les résultats sont identiques à ceux obtenus après transfert traditionnel (pour lequel seuls les embryons évalués comme transférables après décongélation sont remis en place, soit 84 % des embryons dans l'essai rapporté dans le tableau 5). Le transfert direct, en évitant l'évaluation morphologique et l'élimination de 15 à 20 % des embryons après décongélation permet un gain potentiel de 7 à 8 % en terme d'agneaux nés, tout en simplifiant l'opération de mise en place des embryons (expertise moins importante du technicien réalisant le transfert).

Chez les ovins, l'aptitude des embryons obtenus *in vitro* à supporter la congélation est pour l'instant très inférieure à celle des embryons obtenus *in vivo* (tableau 6). Cet état de fait existe également chez les bovins. Chez la chèvre, la même tendance est observée bien que les résultats de survie après transfert d'embryons vitrifiés obtenus jusqu'à présent *in vivo* et *in vitro* ne soient pas significativement différents (tableau 6). Cette viabilité plus faible est associée à des modifications du métabolisme des lipides induites par la culture et suscite des recherches pour améliorer les conditions de culture *in vitro* et pour adapter la méthode de congélation à ce type d'embryons (Massip 2001).

3.3 / Sexage et typage génétique pré-implantatoire

La détermination du sexe de l'embryon par détection de séquences ADN du chromosome Y à partir de cellules biopsées est suffisamment précise et rapide après l'amplification de l'ADN par polymérisation en chaîne (PCR) de l'échantillon prélevé pour permettre son exploitation commerciale dans l'espèce bovine (Garcia 2001). Les kits disponibles dans le commerce pour le sexage des embryons bovins peuvent être utilisés avec succès pour les embryons ovins (Kochhar *et al* 2000), mais, à l'heure actuelle, le coût dissuasif de l'agneau ainsi produit limite l'utilisation de cette technique. Cependant avec les progrès réalisés sur les techniques de biologie moléculaire et sur la connaissance du génome, la possibilité de typage génétique de l'embryon avant son transfert ouvre des perspectives d'utilisation de méthodes de sélection assistée par marqueurs (Bishop 1995).

3.4 / Bisection et clonage

La production de deux individus génétiquement identiques est facilement réalisable

Les embryons obtenus *in vitro* supportent moins bien la congélation que ceux obtenus *in vivo*, ce qui nécessite d'améliorer les conditions de culture et d'adapter la méthode de congélation.

Tableau 7. Résultats de bissection et transfert d'embryons chez les ovins (Chesné et al cité par Cognié 1999).

Nombre d'embryons de 8-10 jours bisséqués	101
Nombre de brebis receveuses de 2 demi-embryons	101
Nombre de brebis mettant bas	62
Nombre de brebis produisant des jumeaux	37 (60%)
Nombre de brebis produisant des simples	25 (40%)
Nombre d'agneaux nés pour 100 embryons	98

après bissection symétrique et transfert des 2 demi-embryons chez une receveuse synchronisée. Dans ces conditions le taux de gestation est identique à celui obtenu après le transfert des embryons entiers et plus de la moitié des gestations donnent naissance à des jumeaux monozygotiques. La productivité totale en terme d'agneaux nés pour 100 embryons sectionnés est proche de 100 (tableau 7). La bissection de l'embryon est utilisée pour répondre aux demandes en expérimentation animale nécessitant des jumeaux monozygotiques.

La transplantation de noyaux de blastomères d'embryons au stade 8-16 cellules ou de cellules du bouton embryonnaire dans des ovocytes énucléés a connu chez l'espèce bovine au début des années 90 un engouement commercial vite retombé, étant donné la grande variabilité dans le développement des embryons reconstitués et dans les taux de gestation après transfert (Colleau *et al* 1998). Récemment, une étape supplémentaire a été franchie avec la naissance d'un clone de deux agneaux issus de cellules embryonnaires cultivées, et finalement, la naissance d'une brebis (*Dolly*) à partir d'un noyau issu de cellules somatiques adultes, maintenues en culture pendant plusieurs semaines (Wilmut *et al* 1997). Les perspectives d'application de cette technique en pleine évolution ont été largement analysées dans la revue de Colleau *et al* (1998). A l'heure actuelle, les chèvres transgéniques produisant une protéine d'intérêt dans leur lait sont rapidement multipliées par clonage somatique (Baldassare 2002).

Conclusion

La transplantation embryonnaire est actuellement peu pratiquée chez les petits ruminants à l'exception d'échanges commerciaux

ponctuels (Thibier 2000), étant donné son coût élevé par rapport à la valeur économique de l'animal. Les progrès réalisés pour minimiser la variabilité de la réponse ovarienne au traitement de superovulation, pour simplifier et améliorer les procédés de congélation et de transfert des embryons auront-ils un impact suffisant pour stimuler à court terme l'utilisation de cette technique dans le cadre de l'amélioration génétique des troupeaux ? Aujourd'hui, cette technique permet la création rapide de populations indemnes de pathologies, pour l'introduction en France de chèvres créoles (Chemineau *et al* 1986) et de brebis Martinik indemnes du virus de la *Blue Tongue* ou la création aux USA d'un troupeau indemne de la tremblante à partir de brebis infectées (Wang *et al* 2002). La production des embryons *in vitro* après prélèvements répétés des ovocytes sur la même femelle, en augmentant la descendance de ces femelles élites, devrait permettre dans un futur proche, l'amélioration des schémas de sélection et l'introgession à moindre coût de gènes d'intérêt. Il s'avère donc nécessaire d'améliorer encore ces techniques en poursuivant les recherches pour mieux comprendre les mécanismes biologiques impliqués dans la maturation ovocytaire, dans la capacitation des spermatozoïdes et dans l'aptitude à la congélation des embryons obtenus *in vitro*.

Remerciements

Les auteurs remercient la coopérative Ovitest, la Confédération des éleveurs de Roquefort, l'unité expérimentale INRA-PRC de Nouzilly ; B. Leboeuf, Y. Forgerit et J.L. Pognard de l'INRA-Rouillé, le Professeur J.F. Beckers, de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Liège (Belgique), N. Poulin et P. Mermillod pour leur contribution efficace à la réalisation des expérimentations.

Références

- Baldassare H., Wang B., Kafidi N., Keefer C., Lazaris A., Karatzas C.N., 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*, 57, 275-284.
- Bari F., Khalid M., Wolf B., Haresign W., Murray A., Merrell B., 2001. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, 56, 147-155.
- Baril G., Remy B., Leboeuf B., Vallet J.C., Beckers J.F., Saumande J., 1992. Comparison of porcine FSH, caprine FSH and ovine FSH to induce repeated superovulation in goats. 8th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon- France, 126 (Abstr.).
- Baril G., Brebion P., Chesné P., 1993. Manuel de formation pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre. FAO, 115, ISSN 1014-1099.
- Baril G., Pognard J.L., Freitas V.J.F., Leboeuf B., Saumande J., 1996. A new method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. *Theriogenology*, 45, 697-706.
- Baril G., Traldi A.-L., Cognié Y., Leboeuf B., Beckers J.-F., Mermillod P., 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56, 299-305.
- Besenfelder U., Möblaher G., Brem G., 1999. Oocyte collection. *Reprod. Dom. Anim.*, Suppl. 6, 38-44.
- Bevers M.M., Dieleman S.J., Van der Hurk R., Izadyar F., 1997. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, 47, 17-22.
- Bishop M.D., Hawkins G.A., Keefer C.L., 1995. Use of DNA markers in animal selection. *Theriogenology*, 43, 61-70.

- Brebion P., Beckers J.-F., Guerin Y., Boomarov, 1991. High performance of Booroola x Romanov ewes as permanent embryos donors. In: Elsen J.M., Bodin L. and Thimonier J. (eds), Major genes for reproduction in sheep, Colloques de l'INRA n°57, 171-174. Editions INRA, Paris.
- Brebion P., Baril G., Cognié Y., Vallet J.-C., 1992. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann. Zootech.*, 41, 331-339.
- Chemineau P., Procureur R., Cognié Y., Lefèvre P.C., Locatelli A., Chupin D., 1986. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. *Theriogenology*, 26, 279-290.
- Cognié Y., 1988. Applications of immunological techniques to enhance reproductive performance in the ewe. 11th ICAR, Dublin, vol.5, 192-200.
- Cognié Y., 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51, 105-116.
- Cognié Y., Benoit F., Poulin N., Khatir H., Driancourt M.-A., 1998. Effect of follicle size and of the Pcb Booroola gene on oocyte function in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 112, 379-386.
- Cognié Y., Baril G., Poulin N., Beckers J.-F., 2000. The ovulation rate obtained after a superovulatory treatment associating GnRH antagonist and pFSH is highly repeatable. 16th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Santander, 130, (Abstr.).
- Cognié Y., Poulin N., Baril G., Guignot F., Beckers J.F., Mermillod P., 2001. Embryo survival after transfer of in vitro and in vivo produced goat embryos. 17th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, 110, (Abstr.).
- Colleau J.-J., Heyman Y., Renard J.-P., 1998. Les biotechnologies de la reproduction chez les bovins et leurs applications réelles ou potentielles en sélection. *INRA Prod. Anim.*, 11, 41-56.
- Crozet N., Huneau D., DeSmedt V., Theron M.C., Torrès S., Sevellec C., 1987. In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Res.*, 16, 159-170.
- Evans G., Armstrong D.T., 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fert.*, 70, 47-53.
- Folch J., Ramòn J.P., Cocero M.J., Alabart J.L., Beckers J.-F., 2001. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology*, 55, 1777-1785.
- Garcia J.F., 2001. Practical considerations of embryo manipulation: preimplantation genetic typing. *Theriogenology*, 56, 1393-1399.
- Gong J.G., Wilmot I., Bramley T.A., Webb R., 1995. Pre treatment with recombinant somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*, 43, 221, (Abstr.).
- Holm P., Walker W.H., Seamark R.F., 1996. Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or in vivo. *J. Reprod. Fert.*, 107, 175-181.
- Houdebine L.M., 1998. La transgénèse animale et ses applications. *INRA Prod. Anim.*, 11, 81-94.
- Jabbour H.N., Ryan J.P., Evans G., Maxwell W.M.C., 1991. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of Merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod. Fert. Dev.*, 3, 699-707.
- Kochhar H.S., Buckrell B.C., Pollard J.W., King W.A., 2000. Production of sexed lambs after biopsy of ovine blastocyst produced in vitro. *Can. Vet. J.*, 41, 398-400.
- Massip A., 2001. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim.*, 36, 49-55.
- Mermillod P., Oussaid B., Cognié Y., 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 54, 449-460.
- Oussaid B., Mariana J.-C., Poulin N., Fontaine J., Lonergan P., Beckers J.-F., Cognié Y., 1999. Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *J. Reprod. Fert.*, 117, 71-77.
- Remy B., Baril G., Vallet J.C., Dufour R., Chouvet C., Saumande J., Chupin D., Beckers J.F., 1991. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone? *Theriogenology*, 36, 389-399.
- Ryan J.P., Hunton J.R., Maxwell W.M.C., 1991. Increased production of sheep embryos following superovulation of Merino ewes with a combination of PMSG and FSH-P. *Reprod. Fert. Dev.*, 3, 551-560.
- Saumande J., 1995. La production d'embryons chez les bovins : quelles voies de recherches pour augmenter l'efficacité des traitements de superovulation ? *INRA Prod. Anim.*, 8, 275-284.
- Stringfellow D.A., Seidel S.M., 1990. Manual of the International Embryo Transfer Society, 2nd edition, Champaign IL, IETS.
- Tervit H.R., 1996. Laparoscopy / laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 227-238.
- Thibault C., Levasseur M.C., 2001. La reproduction chez les mammifères et l'homme. Coédition INRA-Ellipse, Paris, 928 p.
- Thibier M., 2000. The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999. *Embryo Transfer Newsletter*, 18, 24-28.
- Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., McMillan W.T., Tervit H.R., 1995. Lamb birth weight is affected by cultured system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol. Reprod.*, 53, 1385-1391.
- Traldi A.S., 1995. Superovulação com a gonadotrofina da menopausa humana (hMG) e prevenção da regressão prematura dos corpos lúteos em caprinos. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor. Universidade de São Paulo - Brasil, 155 p.
- Vallet J.-C., Casamitjana P., Brebion P., Perrin J., 1991. Techniques de production, de conservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants. *Rec. Med. Vet.*, 167, 293-301.
- Wang S., Cockett N.E., Miller J.M., Shay T.L., Maciulis A., Sutton D.L., Foote W.C., Holyoak G.R., Evans R.C., Bunch T.D., Beaver J.E., Call J.W., Taylor W.D., Marshall M.R., 2002. Polymorphic distribution of the ovine prion protein (PrP) gene in scrapie-infected sheep flocks in which embryo transfer was used to circumvent the transmissions of scrapie. *Theriogenology*, 57, 1865-1875.
- Willadsen S.M., Polge C., Rowson L.E.A., Moor R.M., 1976. Deep-freezing of sheep embryos. *J. Reprod. Fert.*, 46, 151-154.
- Wilmot I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H.S., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810-813.

Abstract

State of the art in sheep-goat embryo transfer.

This paper reviews the technical bases of in vivo and in vitro embryo production in sheep and goat. The current limitations of in vivo embryo production : the variability of response to the hormonal treatment, the fertilization failure in females showing a high ovulatory response, the importance of premature regressed corpus lutea in goat are described. The new prospects offered by ovum pick-up allowing multiple recoveries from the same female and in vitro embryo production

are presented with their limiting steps and research priorities. The recent improvements of embryo transfer and embryo freezing technologies could be use for constitution of flocks without risks of disease transmission and will allow in the future larger propagation of valuable genes in small ruminants populations.

COGNIE Y., BARIL G., 2002. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus in vivo et in vitro chez la brebis et la chèvre. *INRA Prod. Anim.*, 15, 199-207.

