



HAL
open science

Intérêts diagnostique et pronostique de l'échographie foetale chez les bovins clonés

Chloé Jullien

► **To cite this version:**

Chloé Jullien. Intérêts diagnostique et pronostique de l'échographie foetale chez les bovins clonés. Sciences du Vivant [q-bio]. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 2003. Français. NNT: . tel-02825918

HAL Id: tel-02825918

<https://hal.inrae.fr/tel-02825918>

Submitted on 7 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2003

Intérêts diagnostique et pronostique de l'échographie fœtale chez les bovins clonés.

THESE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL

le.....

par

Chloé JULLIEN

Née le 31 juillet 1979 à Tourcoing (Nord)

JURY

Président : M.

Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres :

Directeur : M. MIALOT

Professeur à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort

Assesseur : M. MAILLARD

Maître de conférences à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort

Invitée : Mme CHAVATTE-PALMER

Maître de conférences à l'INA-PG, UMR INRA/ENVA

LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT

Directeur : M. le Professeur COTARD Jean-Pierre

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs PARODI André-Laurent, PILET Charles

Professeurs honoraires: MM. BORDET Roger, BUSSIERAS Jean, LE BARS Henri, MILHAUD Guy, ROZIER Jacques, THERET Marcel, VUILLAUME Robert

DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)

Chef du département : M. BOULOIS Henri-Jean, Professeur - Adjoint : M. DEGUEURCE Christophe, Professeur

<p>-UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur* M. DEGUEURCE Christophe, Professeur Mlle ROBERT Céline, Maître de conférences M. CHATEAU Henri, AERC</p> <p>-UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE, MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur* M. BOULOIS Henri-Jean, Professeur Mme VIALE Anne-Claire, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE M. BRUGERE Henri, Professeur * Mme COMBRISON Hélène, Professeur M. TIRET Laurent, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur * Mme HUYNH-DELERME, Maître de conférences contractuel M. TISSIER Renaud, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE M. CRESPEAU François, Professeur * M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur Mme BERNEX Florence, Maître de conférences Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences</p> <p>-UNITE DE BIOCHIMIE M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences* M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE VIROLOGIE M. ELOIT Marc, Professeur * Mme ALCON Sophie, Maître de conférences contractuel</p> <p>-DISCIPLINE : PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES M. MOUTHON Gilbert, Professeur</p> <p>-DISCIPLINE : BIOLOGIE MOLECULAIRE Melle ABITBOL Marie, Maître de conférences contractuel</p> <p>-DISCIPLINE : ETHOLOGIE M. DEPUTTE Bertrand, Professeur</p>
---	---

DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)

Chef du département : M. FAYOLLE Pascal, Professeur - Adjointe : Mme BEGON Dominique, Professeur

<p>-UNITE DE MEDECINE M. POUHELON Jean-Louis, Professeur* M. CLERC Bernard, Professeur Mme CHETBOUL Valérie, Professeur M. MORAILLON Robert, Professeur M. BLOT Stéphane, Maître de conférences M. ROSENBERG Charles, Maître de conférences contractuel Melle MAUREY Christelle, Maître de conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE CLINIQUE EQUINE M. DENOIX Jean-Marie, Professeur * M. TNIBAR Mohamed, Maître de conférences contractuel M. AUDIGIE Fabrice, Maître de conférences Mme DESJARDINS-PESSON Isabelle, Maître de confér..contractuel</p> <p>-UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE M. MIALOT Jean-Paul, Professeur * (rattaché au DPASP) M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie, Maître de conférences (rattachée au DPASP) M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences M. REMY Dominique, Maître de conférences (rattaché au DPASP) Melle CONSTANT Fabienne, AERC (rattachée au DPASP)</p>	<p>- UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE M. FAYOLLE Pascal, Professeur * M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences M. MOISSONNIER Pierre, Professeur Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Maître de conférences M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences Mlle RAVARY Béatrice, AERC (rattachée au DPASP) M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de Conférences contractuel M. HIDALGO Antoine, Maître de Conférences contractuel</p> <p>- UNITE DE RADIOLOGIE Mme BEGON Dominique, Professeur* M. RUEL Yannick, AERC</p> <p>- UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES M. CHERMETTE René, Professeur * M. POLACK Bruno, Maître de conférences M. GUILLOT Jacques, Professeur Melle MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences contractuel</p> <p>M. PARAGON Bernard, Professeur (rattaché au DEPEC) M. GRANDJEAN Dominique, Professeur (rattaché au DEPEC)</p>
--	---

DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)

Chef du département : M. CERF Olivier, Professeur - Adjoint : M. BOSSE Philippe, Professeur

<p>-UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES M. TOMA Bernard, Professeur M. BENET Jean-Jacques, Professeur* Mme HADDAD HOANG XUAN Nadia, Maître de confér.contractuel M. SANAA Moez, Maître de conférences</p> <p>-UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE M. BOLNOT François, Maître de conférences * M. CARLIER Vincent, Professeur M. CERF Olivier, Professeur Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences</p>	<p>- UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE M. BOSSE Philippe, Professeur M. COURREAU Jean-François, Professeur* Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Maître de conférences Mme LEROY Isabelle, Maître de conférences M. ARNE Pascal, Maître de conférences M. PONTER Andrew, Maître de conférences</p> <p>- UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR Mme BRUGERE-PICOUX Jeanne, Professeur M. MAILLARD Renaud, Maître de conférences associé M. MILLEMANN Yves, Maître de conférences* M. ADJOU Karim, Maître de conférences</p>
---	---

Ingénieurs Professeurs agrégés certifiés (IPAC) :
Mme CONAN Muriel, Professeur d'Anglais
Mme CALAGUE, Professeur d'Education Physique

* Responsable de l'Unité

AERC : Assistant d'Enseignement et de Recherche Contractuel

REMERCIEMENTS

A Monsieur le professeur de la Faculté de médecine de Créteil,
Qui nous a fait l'honneur de présider notre jury de thèse,
Hommage respectueux.

A Monsieur Mialot, professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
Pour son aide et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce travail.

A Madame Chavatte-Palmer, maître de conférences de l'Institut National
d'Agronomie,
Qui a bien voulu me confier cette étude, m'accorder sa confiance et me guider par
ses conseils.

A Monsieur Maillard, maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort,
Pour sa participation bienveillante à ce jury.

A Monsieur Laigre et à tout l'équipe de Bressonvilliers,
Pour leur accueil chaleureux, pour l'aide et les connaissances qu'ils m'ont
apportées.

Et mille mercis du fond du cœur,

A mes parents,

Pour votre soutien, votre amour et votre confiance depuis toujours, qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici.

A Gaëlle,

Nous serons bientôt deux Dr Juillien, je serai très fière de partager ça, et plein d'autres choses encore, avec toi.

A toute ma famille et à tous mes amis,

Qui, de près ou de loin, m'ont soutenue jusqu'à maintenant.

A Xavier,

Pour tous les moments passés ensemble, et pour tout ce qu'il nous reste à construire à deux.

SOMMAIRE

TABLE DES ABREVIATIONS	4
I. INTRODUCTION	5
II. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	7
L'ECHOGRAPHIE DANS LE SUIVI DE LA GESTATION BOVINE.....	9
I. LE PRINCIPE DE L'ECHOGRAPHIE.....	9
II. LES UTILISATIONS DE L'ECHOGRAPHIE DANS LE PREMIER TIERS DE GESTATION CHEZ LES BOVINS.....	12
1. <i>Le diagnostic de gestation.....</i>	<i>12</i>
2. <i>Le dénombrement fœtal.....</i>	<i>16</i>
3. <i>Le sexage fœtal.....</i>	<i>16</i>
4. <i>La détermination de l'âge du fœtus.....</i>	<i>19</i>
5. <i>La mortalité embryonnaire.....</i>	<i>21</i>
6. <i>L'amniocentèse.....</i>	<i>22</i>
III. LES UTILISATIONS DE L'ECHOGRAPHIE DANS LES DEUXIEME ET TROISIEME TIERS DE GESTATION CHEZ LES BOVINS.....	23
1. <i>L'examen fœtal.....</i>	<i>23</i>
1.1 <i>L'examen par voie transrectale.....</i>	<i>23</i>
1.2. <i>L'examen par voie transabdominale.....</i>	<i>24</i>
2. <i>L'examen des annexes fœtales.....</i>	<i>25</i>
2. 1. <i>Chez la jument.....</i>	<i>25</i>
2. 2. <i>Chez la vache.....</i>	<i>28</i>
3. <i>La mise en place d'un profil biophysique.....</i>	<i>28</i>
3.1. <i>Le profil biophysique en médecine humaine.....</i>	<i>29</i>
3.2. <i>Le profil biophysique en médecine des grands animaux.....</i>	<i>30</i>
LE CLONAGE	36
I. LES TECHNIQUES DE CLONAGE.....	36
1. <i>La bissection embryonnaire.....</i>	<i>36</i>
2. <i>Le transfert nucléaire.....</i>	<i>36</i>
II. L'INTERET DU CLONAGE DES ANIMAUX DE RENTE.....	38
1. <i>Les études fondamentales sur la différenciation cellulaire.....</i>	<i>38</i>
2. <i>La diminution du nombre d'animaux nécessaires en expérimentation animale.....</i>	<i>39</i>
3. <i>L'utilisation en sélection.....</i>	<i>39</i>
4. <i>La sauvegarde d'animaux en voie de disparition.....</i>	<i>40</i>
5. <i>L'obtention d'animaux transgéniques.....</i>	<i>40</i>

III. LES CARACTERISTIQUES DES GESTATIONS DES PORTEUSES DE CLONES.....	40
1. L'efficacité générale du clonage.....	40
2. Les pertes rencontrées au premier trimestre.....	42
3. Les pertes rencontrées aux deuxième et troisième trimestres.....	43
4. Les pertes néonatales.....	43
5. Le syndrome du gros veau.....	44
IV. LES CAUSES POTENTIELLES DES ANOMALIES RENCONTREES CHEZ LES CLONES.....	44
1. La culture <i>in vitro</i>	44
2. L'environnement utérin.....	45
3. Les mutations génétiques: les mitochondries et les cellules somatiques adultes.....	46
4. L'empreinte parentale.....	46
5. Le statut immunitaire.....	47
III. PARTIE EXPERIMENTALE.....	50
MATERIELS ET METHODES.....	52
I. PRODUCTION DES EMBRYONS.....	52
1. Production des embryons clones.....	52
2. Production des témoins.....	52
II. TRANSFERT DES EMBRYONS.....	53
III. SUIVI DES GESTATIONS.....	53
1. Progesteronémie.....	53
2. Echographies transrectales.....	54
3. Echographies transabdominales.....	54
IV. VELAGES.....	55
V. TRAITEMENT DES DONNEES.....	55
1. Images de début de gestation.....	55
2. Données de fin de gestation.....	56
3. Formation des lots.....	57
4. Etudes statistiques.....	58
RESULTATS.....	60
I. FORMATION DES LOTS DEFINITIFS.....	60
1. Comparaison des lots de témoins.....	60
2. Comparaison des lots de clones.....	60
3. Cas des avortements à plus de 150 jours de gestation.....	60
4. Cas des mesures effectuées à 54 jours de gestation.....	60
II. COMPARAISON CLONES ET TEMOINS.....	64
III. INTERET DIAGNOSTIQUE.....	66
IV. INTERET PRONOSTIQUE.....	66
V. VALIDATION DES MESURES.....	69
DISCUSSION.....	72

I. FORMATION DES LOTS DEFINITIFS.	72
II. COMPARAISON CLONES ET TEMOINS.	73
III. INTERET DIAGNOSTIQUE.....	74
IV. INTERET PRONOSTIQUE.....	75
V. VALIDATION DES MESURES.	76
VI. PROPOSITIONS.	76
IV. CONCLUSION.....	82
BIBLIOGRAPHIE.....	86
ANNEXE 1	94
ANNEXE 2	98
ANNEXE 3	99

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique.
Ao : Diamètre aortique.
ARN : Acide ribonucléique.
BVD : Diarrhée Virale Bovine.
CMH-1 : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1.
CSA : Clone Somatique Adulte.
CSF : Clone Somatique Fœtal.
ECUP : Epaisseur Combinée de l'Utérus et du Placenta.
EHV-1: Herpès virus équin de type 1.
FC: Fréquence Cardiaque.
F: Femelle.
FIV : Fécondation In Vitro.
FSH : Follicle Stimulating Hormon.
Hz : Hertz.
IA : Insémination Artificielle.
IGF2: Interféron Gamma Facteur 2.
IGF2r : Recepteur à l' Interféron Gamma Facteur 2.
INRA : Institut National de Recherche Agronomique.
LH : Luteinising Hormon.
LOS : Large Offspring Syndrom, syndrome du gros veau.
M: Mâle.
MHz : Méga-hertz.
PBP : Profil biophysique.
RSV : Virus Respiratoire Synthétial.
SOF : Synthetic Oviductal Fluid.
SONAR : SOund NAVigation and Ranging.
TCM: Tissue Culture Medium.
TGC: Time Gain Compensation.
TE :Transfert Embryonnaire.
TN: Transfert Nucléaire.
UV : Ultra Violet.

I. INTRODUCTION

Le clonage fait partie des nouvelles biotechnologies, et, dans le domaine animal, se développe de manière importante depuis une vingtaine d'années. Si l'on sait aujourd'hui produire des clones de nombreuses espèces animales, le rendement de ces manipulations reste faible. En ce qui concerne le clonage bovin, des problèmes surviennent au cours des différentes étapes de production des embryons mais surtout au cours des gestations : les avortements sont nombreux et répartis sur l'ensemble de la gestation, le développement du fœtus et de ses annexes peut être modifié, conduisant à la formation d'un « gros veau ». Ce syndrome, qui entraîne une mauvaise adaptabilité du jeune à la vie extra-utérine et une mortalité élevée, est très étudié mais reste encore aujourd'hui méconnu dans ses mécanismes, et surtout imprévisible.

Pour tenter de mieux cerner les anomalies de la gestation et de découvrir leur signes les plus précoces, l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA) a lancé en 1998 un protocole échographique de suivi des gestations de clones au sein d'une de ses fermes expérimentales. Son but est de réaliser des mesures à différents stades de gestation, de les comparer aux valeurs issues de gestations non clones, afin de trouver des éléments diagnostiques, ou mieux pronostiques pour l'évolution de la gestation.

L'objectif de ce travail est de réaliser les mesures souhaitées, sur une banque d'images échographiques relevées au cours des gestations de clones, d'octobre 1998 à mai 2003, d'analyser les données obtenues et ainsi de dresser un bilan du protocole utilisé afin de l'améliorer au besoin.

Dans une première partie bibliographique nous ferons le point sur l'échographie, ses utilisations au cours de la gestation bovine et les nouvelles perspectives apportées par la médecine humaine et équine, puis sur le clonage bovin, ses techniques, ses résultats, ses intérêts, les connaissances et les hypothèses actuelles de recherche.

La partie expérimentale présentera le détail des travaux effectués, les résultats obtenus, leur interprétation et les conséquences sur la poursuite du protocole.

II. PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

L'étude présentée ici porte sur l'intérêt de l'échographie appliquée à la détection des anomalies de développement des clones bovins.

La partie bibliographique de cette thèse est ainsi l'occasion de présenter les nombreuses utilisations possibles de l'échographie au cours de la gestation, certaines étant largement utilisées en élevage, d'autres n'étant encore que des techniques d'expérimentation et de recherche. Les progrès et les nouvelles applications des techniques d'imagerie étant principalement mis au point en médecine humaine, puis adaptées aux grandes espèces animales et d'abord dans le monde équin, il aurait été réducteur de ne pas regarder ce qui est fait chez la femme et chez la jument, afin d'envisager de nouvelles possibilités pour les bovins, espèce d'intérêt pour l'étude du clonage.

En effet, pour les recherches sur le clonage chez les grands animaux, les ruminants sont au premier plan. Nous expliquerons d'abord le principe du clonage de manière générale, puis nous tenterons de dresser un bilan des résultats obtenus chez les bovins et des connaissances actuelles sur le sujet. De nombreuses équipes dans le monde travaillent sur le clonage, bovin ou autre, et depuis la rédaction de cet ouvrage, de nouvelles découvertes ont pu être publiées.

L'ECHOGRAPHIE DANS LE SUIVI DE LA GESTATION BOVINE

L'échographie repose sur l'effet piézo-électrique, découvert par Pierre et Jacques Curie en 1880. La formation d'ondes ultrasonores et l'interprétation de leurs échos par ce principe a trouvé sa première application pratique au cours de la Deuxième Guerre Mondiale, pour équiper les sous-marins d'un système de détection des autres bateaux : le SONAR (SOund NAVigation and Ranging). L'électronique l'utilisa ensuite comme générateur de fréquences électriques avant que l'imagerie médicale trouve là la possibilité de visualiser les structures internes d'un organisme, vers 1970. Principalement destinée aux hommes, l'échographie se développa rapidement pour les animaux, après sa première utilisation dans l'espèce équine dans le début des années 80 (Palmer et Driancourt, 1980 a/b).

I. LE PRINCIPE DE L'ECHOGRAPHIE.

Les ultrasons correspondent à la propagation d'une onde de pression dans l'espace. En imagerie, on utilise des ondes dont la fréquence est comprise entre 1 et 12 MHz, ce qui est beaucoup plus élevé que la gamme de fréquences audibles par l'oreille humaine (20 à 20 000 Hz) : ce sont des ultra-sons (Mai 1994 et 1999).

La formation des ultrasons.

La propriété de piézo-électricité est la capacité à transformer une énergie électrique en énergie mécanique et inversement. Les ultrasons sont produits par un élément piézo-électrique, appelé transducteur (cristaux), contenu dans la sonde : la différence de potentiel qui arrive aux bornes du transducteur le fait vibrer à haute fréquence, produisant des ondes de pressions qui se propagent dans le milieu.

La propagation des ultrasons.

A une fréquence donnée, la vitesse de déplacement de l'onde ultrasonore dans un milieu dépend de sa capacité à transmettre les ondes. Cette capacité est nommée impédance acoustique.

Impédance de l'air : 400 Rayleigh.

Impédance de l'os : 5 Mégarayleigh.

Impédance des tissus mous : 1.5 Mégarayleigh en moyenne.

Lorsqu'une onde aborde la limite de séparation entre deux milieux d'impédance différente, appelée interface, elle subit une réflexion, sur les mêmes bases que dans le domaine de l'optique. C'est lorsque l'onde arrive perpendiculairement à l'interface que le faisceau réfléchi retourne directement au transducteur et peut être le mieux interprété. Le faisceau réfléchi est d'autant plus important que la différence d'impédance acoustique entre les deux milieux est importante. Ceci explique l'hyperéchogénicité des interfaces tissus mous / air et tissus mous / os.

Une réflexion multidirectionnelle se produit lorsque l'onde rencontre une structure réfléchissante de très petite dimension par rapport à sa longueur d'onde. Seules les ondes réfléchies en direction de la sonde pourront être utiles à la formation de l'image de ces structures internes aux organes.

Le passage de l'onde dans un milieu entraîne pour elle une perte d'énergie sous forme de chaleur communiquée aux particules du milieu. C'est l'absorption de l'onde.

L'absorption et les réflexions font perdre à l'onde ultrasonore de l'intensité. C'est l'atténuation qui est proportionnelle à la fréquence des ultrasons. Pour obtenir une image homogène en profondeur il existe donc des systèmes électroniques qui compensent cette atténuation en amplifiant les signaux reçus des zones profondes (TGC : Time Gain Compensation). L'atténuation explique également que plus la fréquence de la sonde augmente, moins la profondeur d'exploration sera importante.

La formation de l'image.

L'image échographique provient de l'analyse des échos qui reviennent à la sonde. Ces échos excitent l'élément piézo-électrique de la sonde qui vibre alors et transforme cette vibration en signal électrique. L'amplitude du signal est proportionnelle à l'intensité de l'onde réfléchie par la structure et dépend donc du tissu rencontré et de la différence d'impédance entre les milieux.

L'analyse de ces signaux électriques multiples se fait sous plusieurs modes :

- Mode A : amplitude. L'abscisse désigne la profondeur de l'interface et l'ordonnée l'intensité du signal. (Figure 1)
- Mode B : brillance. L'intensité du signal est traduite par la brillance de points lumineux dont l'abscisse reflète la profondeur. (Figure 2)
- Mode TM : temps-mouvement. L'écran de l'oscilloscope montre la juxtaposition d'images du mode B prises dans une seule direction au cours du temps. Cela permet de suivre l'évolution d'une structure en mouvement, comme une coupe de cœur. (Figure 3)
- Mode BD : bidimensionnel. C'est le mode le plus utilisé car il permet d'obtenir des plans de coupe. C'est la juxtaposition d'une multitude d'images du mode B, grâce à un balayage du plan de coupe désiré par les ondes ultrasonores. (Figure 4)

Figure 1 : Analyse des échos en mode A.

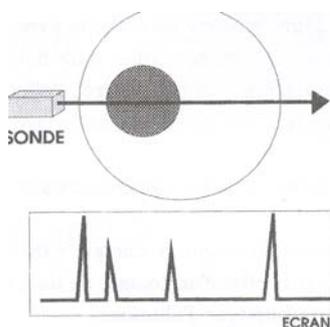


Figure 2 : Analyse des échos en mode B.

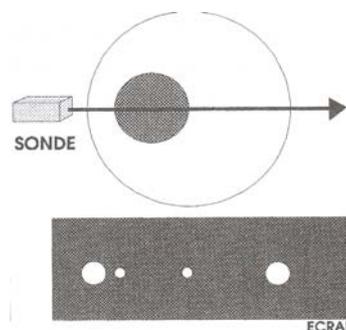


Figure 3 : Analyse des échos en mode TM.

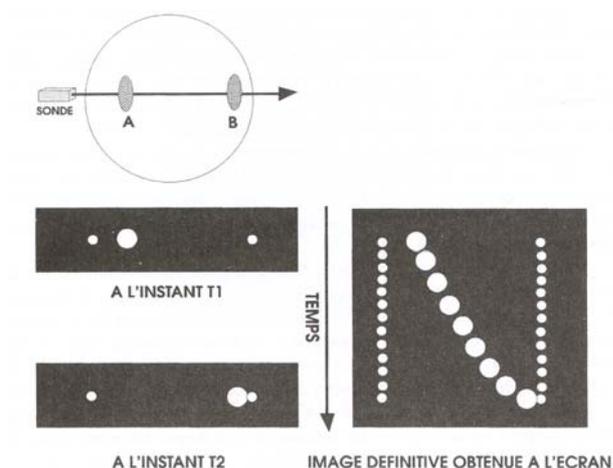
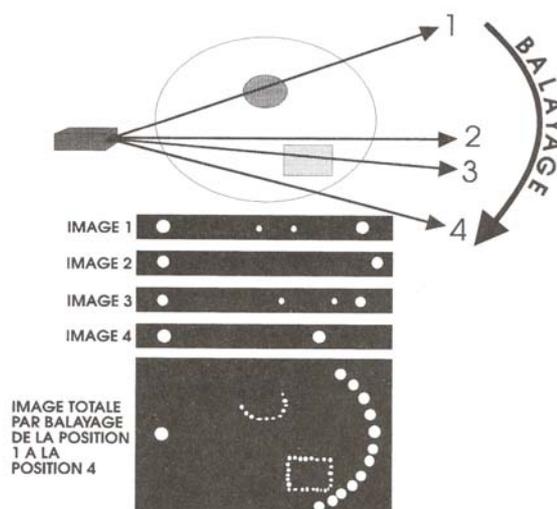


Figure 4 : Analyse des échos en mode BD.



Les sondes échographiques.

Dans une sonde linéaire l'élément piézo-électrique est divisé en une centaine de petits éléments dont l'activation séquentielle permet un balayage de la zone sous la sonde. L'image obtenue est rectangulaire.

Dans une sonde sectorielle l'élément piézo-électrique oscille autour d'un axe et oriente donc les ultrasons dans plusieurs directions. L'image obtenue est donc sectorielle.

Le choix d'une sonde échographique.

Les sondes linéaires sont bien adaptées aux examens transrectaux et à l'étude des tendons chez les chevaux. Les sondes sectorielles, dont la surface de contact est plus faible, sont d'utilisation plus facile pour la plupart des examens externes.

La fréquence choisie dépend de la profondeur des organes à étudier. Une sonde de 5 MHz permet une pénétration des échos sur 10 cm environ, c'est la mieux adaptée en gynécologie bovine. Une sonde de 3.5 MHz permet une profondeur d'examen plus importante, ce qui ne présente pas d'intérêt par voie transrectale à cause du plancher du bassin et est même défavorable car la définition de l'image est moins bonne. Une sonde de 7.5 MHz a un grand intérêt pour l'examen de petites structures comme les ovaires car elle présente une très bonne définition d'image sur une profondeur de 5 cm environ (Mialot *et al.* 1991).

Pour s'équiper d'un échographe, il faut donc savoir pour quelles utilisations il est destiné. En pratique bovine, c'est un échographe portable ou portatif et une sonde linéaire de 5 MHz pour examen transrectal qui forment l'équipement de base permettant d'effectuer les interventions courantes.

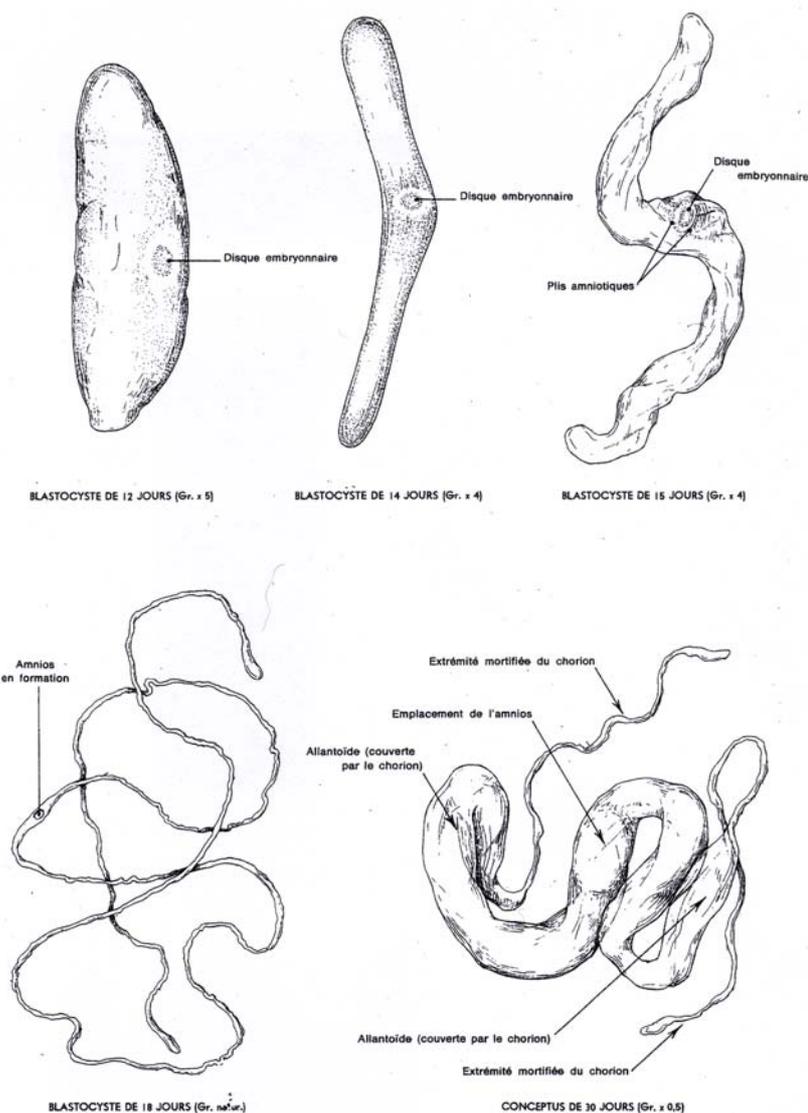
II. LES UTILISATIONS DE L'ECHOGRAPHIE DANS LE PREMIER TIERS DE GESTATION CHEZ LES BOVINS.

1. Le diagnostic de gestation.

Les étapes du développement embryonnaire.

L'embryon bovin arrive dans la cavité utérine le 4^{ème} jour post-fécondation, au stade morula et mesure alors un dixième de millimètre. Au 8^{ème} jour c'est un blastocyste sphéroïde de 0,2 mm environ. Au 9^{ème} jour, il perd sa forme sphéroïde et sa croissance s'effectue en longueur : le diamètre de la vésicule embryonnaire reste constant, à 2 mm en moyenne, entre le 12^{ème} et le 20^{ème} jour. La corne ipsilatérale au corps jaune est totalement envahie vers le 17^{ème} jour, et entre le 20^{ème} et le 32^{ème} jour pour la corne controlatérale : c'est la phase d'élongation qui aboutit à un cordon de plus d'un mètre de longueur (Curran *et al.* 1986a, Barone 1990). Au moment de l'implantation, vers le 35^{ème} jour, les extrémités du cordon que constitue alors le conceptus se sont flétries et sa longueur n'excède pas 30 cm, avec une largeur de 5-6 cm. Ces étapes sont schématisées dans la figure 5.

Figure 5 :
Schématisation de la croissance de la vésicule embryonnaire (Barone 1990).



Le diagnostic de gestation précoce, limité par le pouvoir de résolution de l'échographe (3-5 mm), est donc assez tardif chez la vache, comparé à celui de la jument, dont l'embryon se développe sphériquement : 14 jours chez la jument contre 35 jours chez la vache (Ginther 1986).

Les images de gestation précoce.

La vésicule embryonnaire bovine peut être détectée avec une sonde de 7.5 MHz dès le 9^{ème} jour suivant l'ovulation (Boyd *et al.* 1988) et dès le 12^{ème} jour avec une sonde de 5 MHz. Elle se présente sous la forme d'une zone anéchogène de 2 mm de hauteur et de 7-12 mm de longueur. Elle est sphérique dans 73% des cas et ovale dans 27% des cas (Curran *et al.* 1986a, Pierson et Ginther 1984b). Kastelic *et al.* (1991) ont montré que des zones circulaires anéchogènes peuvent être mises en évidence entre 10 et 14 jours après l'insémination aussi bien chez des vaches gestantes que non gestantes. Au moment de la régression lutéale, les vésicules prennent une forme allongée, correspondant à l'accumulation de liquide utérin chez les vaches non gravides ou à l'élongation du blastocyste au cours de la gestation. L'échographie à ce stade de gestation n'a pas un degré d'exactitude suffisant pour en envisager une application routinière : Kastelic *et al.* (1989) ont montré qu'avant 18 jours, un diagnostic de gestation par échographie sur une génisse n'était pas plus fiable qu'un tirage au sort.

L'embryon peut être détecté au plus tôt vers le 20^{ème} jour de gestation avec une sonde de 5 MHz (Curran *et al.* 1986a). Il se présente sous la forme d'une ligne plus échogène d'environ 4 mm de longueur. Cependant sa visualisation se fait en pratique vers le 28^{ème} jour de gestation (Pierson et Ginther, 1984). Entre le 22^{ème} et le 30^{ème} jour, l'embryon présente une configuration dite « en C » due à la flexion de ses parties postérieures et antérieures. Au cours de la semaine suivante, avec l'allongement du cou et le redressement de la tête, l'embryon adopte une forme « en L » (Curran *et al.* 1986b).

Les premiers battements cardiaques peuvent être observés chez l'embryon vers le 21^{ème} jour de gestation (Curran *et al.* 1986b). La visualisation des pulsations cardiaques est un signe de viabilité de l'embryon.

L'application pratique au diagnostic de gestation.

Les caractéristiques d'une bonne méthode de diagnostic de gestation sont :

- la précocité dans un but économique, pour détecter rapidement les animaux vides
- l'exactitude pour éviter des interruptions de gestation ou des réformes injustifiées
- l'innocuité vis à vis de la gestation en cours.

Le dosage de la progestéronémie est l'outil diagnostique le plus précoce car il se réalise entre 21 et 24 jours de gestation, seule période pendant laquelle on peut différencier une vache cyclée d'une vache gestante. Cependant le dosage de progestérone est surtout un diagnostic de non-gestation : exactitude négative de 95% tandis que l'exactitude positive n'est que de 75%.

Les tableaux I et II, réalisés par Hanzen *et al.* (1993), comparent les résultats de différentes études publiées sur la fiabilité des diagnostics de gestation par échographie. Globalement, cette étude montre que l'échographie est plus apte à détecter les animaux gestants (sensibilité : 91% (51-99)) que non-gestants (spécificité : 74% (74-95)). Le degré d'exactitude des diagnostics de gestation (91% (70-99)) est supérieur à celui des diagnostics de non-gestation (80% (57-97)). Le degré d'exactitude totale est de 87% (63-98).

Mais, on observe de grandes différences de résultat en fonction du stade de gestation étudié, ainsi que de la fréquence de la sonde utilisée, dont dépend la définition de l'image. Ainsi les résultats obtenus après 35 jours de gestation sont nettement meilleurs par rapport aux plus précoces (exactitude totale de 93% contre 72%), et, pour un même stade, il vaut mieux utiliser une sonde de 5 MHz que de 3.5 MHz (exactitude totale entre 49 et 59 jours de 97%(1) contre 84%(2)).

A partir de 35 jours de gestation, l'exactitude globale est de 100% chez des vaches de moins de 7 ans (Hansen et Delsaux 1987). Chez les génisses, cette exactitude serait obtenue dès 20 à 22 jours (Kastelic *et al.* 1988) mais dans des conditions de suivi quotidien expérimental.

En ce qui concerne l'innocuité du diagnostic par échographie, Baxter et Ward (1997) ont réalisé une étude en ferme qui montre un taux de mortalité embryonnaire équivalent (5.5%) dans des troupeaux avec ou sans diagnostic par échographie entre 30 et 40 jours de gestation.

L'échographie propose donc un diagnostic de gestation fiable dès 35 jours de gestation, sans augmentation du risque de mortalité embryonnaire s'il est réalisé délicatement (Tainturier et BenCharif, 2002).

Tableau I:

Résultats comparés des résultats des diagnostics de gestation par échographie avant 35 jours. (Hanzen *et al.* 1993)

Caractéristiques	Références							Bilan
	1	2	3	4	5	6	7	
Stade (jours)	28-35	<30	21-33	<30	16-31	10-24	<30	<35
Sonde (MHz)	3,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	
Résultat écho / Réalité								
+ / +	27	12	56	42	80	92	13	322
+ / -	0	5	11	6	35	12	16	85
- / -	24	3	64	7	107	65	32	302
- / +	7	1	17	2	77	48	8	160
n examens	58	21	148	57	299	217	69	869
Sensibilité	79	92	77	95	51	65	62	67
Spécificité	100	38	85	54	75	84	67	78
Exactitude +	100	71	84	88	70	88	45	79
Exactitude -	77	75	79	78	58	57	80	65
Exactitude totale	88	71	81	86	63	72	65	72

1. Taverne *et al.* 1985.

2. Hanzen et Delsaux 1987.

3. Pieterse *et al.* 1990.

4. Hanzen et Laurent 1991.

5. Badtram *et al.* 1991.

6. Kastelic *et al.* 1989.

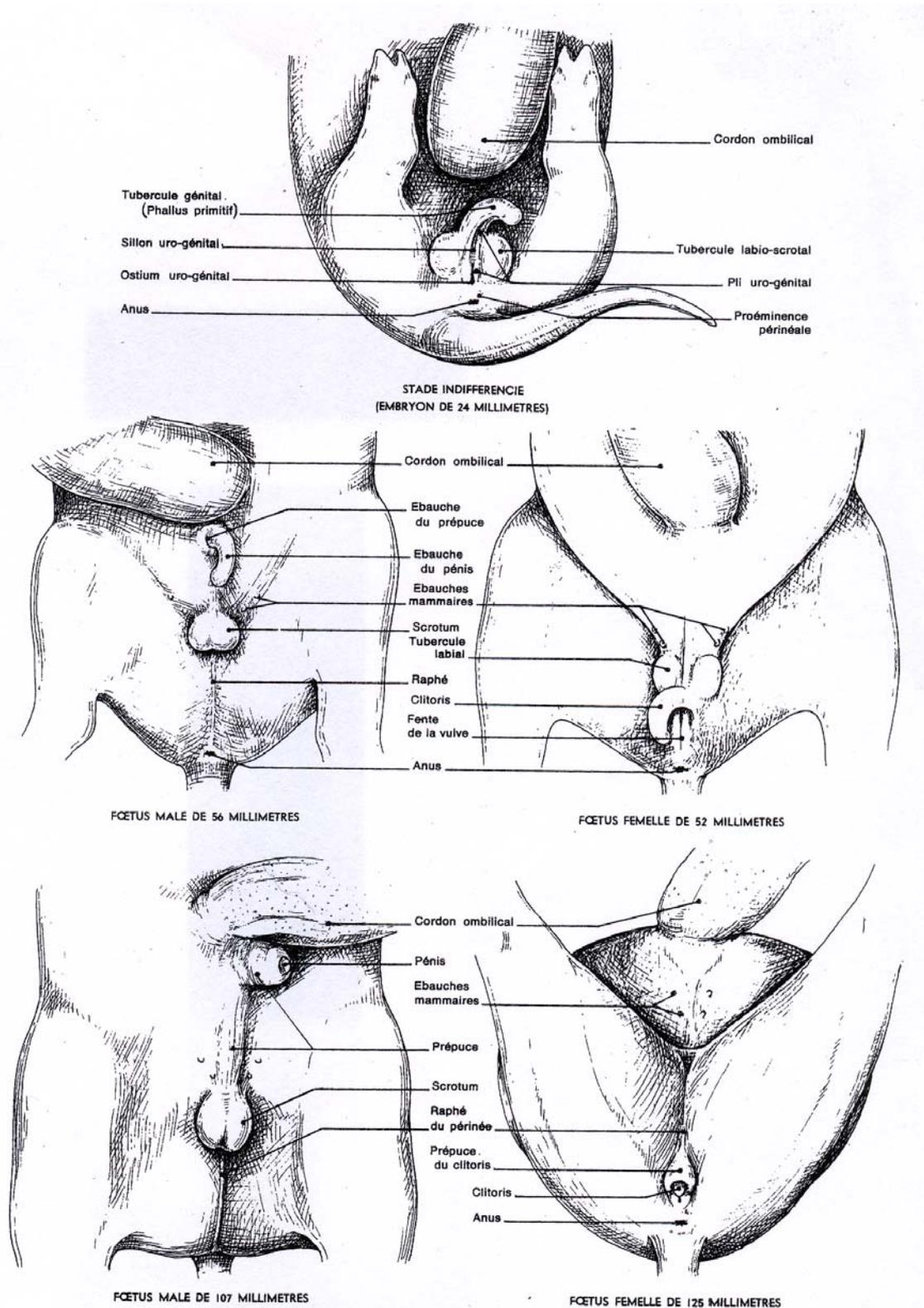
7. Chaffaux *et al.* 1986.

Tableau II:
 Résultats comparés des résultats des diagnostics de gestation par échographie après 35 jours.
 (Hanzen *et al.* 1993)

Caractéristiques	Références						Bilan
	1	2	3	4	4	4	
Stade (jours)	40-49	40-49	36-49	40-49	50-59	60-70	>35
Sonde (MHz)	5,0	3,0	3,0	5,0	5,0	5,0	
Echo / Réalité							
+ / +	73	32	43	444	232	32	856
+ / -	2	10	3	39	17	1	72
- / -	17	22	17	129	60	21	266
- / +	1	0	0	8	3	1	13
n examens	93	64	63	620	312	55	1207
Sensibilité	98	100	100	98	98	97	99
Spécificité	89	69	85	77	77	95	79
Exactitude +	97	76	93	92	93	97	92
Exactitude -	94	100	100	94	95	95	95
Exactitude totale	97	84	95	93	94	96	93

Le sexage repose sur la recherche des organes génitaux externes fœtaux. La figure 6 présente l'évolution anatomique de ces organes au cours du développement et montre qu'en fonction du stade de gestation, les structures recherchées ne seront pas les mêmes.

Figure 6 :
Les organes génitaux externes fœtaux (Barone 1990).



Le sexage précoce, entre 55 et 70 jours, se fait selon la position du tubercule génital : à 45 jours de gestation il est dans sa position initiale, entre les membres postérieurs, à mi-distance du cordon ombilical et de la queue, et ce quel que soit le sexe du fœtus. C'est la migration du tubercule génital que l'on cherche à apprécier : elle débute au 50^{ème} jour pour se terminer au 60^{ème} jour. Chez le mâle, il migre vers le cordon ombilical, chez la femelle, il migre vers la queue. D'autres éléments de diagnostic chez le mâle sont le pénis, qui apparaît sous la forme d'une ligne échogène entre l'anus et le cordon, et les bourrelets scrotaux qui forment comme deux points échogènes entre les membres postérieurs, de part et d'autre du corps du pénis, bien visibles à partir du 57^{ème} jour (Tainturier, 2001).

Le sexage tardif, entre 75 et 100 jours selon Tainturier (2001), entre 70 et 120 jours selon Lebastard (1998) repose sur la visualisation du scrotum et du pénis chez le mâle, des bourgeons mammaires chez la femelle.

Pour réaliser le sexage, trois coupes sont utilisées : (Lebastard 1998)

- la coupe transversale semble la plus utile : elle permet de bien visualiser le scrotum et les trayons lorsqu'elle est réalisée en région abdominale postérieure ou inguinale.
- la coupe sagittale peut permettre de visualiser le scrotum, mais surtout le pénis, à la base de l'attache abdominale du cordon ombilical.
- la coupe horizontale peut en théorie montrer les trois éléments mais elle n'est pas toujours simple à interpréter.

Dans son étude, Tainturier a observé un taux d'avortement de 2 %, ce qui correspond aux taux généralement rencontrés en élevage laitier : cet examen paraît donc sans danger pour la gestation.

Lebastard (1998) propose un degré de fiabilité du diagnostic en fonction des éléments de diagnose rencontrés. Tableau III.

Tableau III :

Diagnostic du sexe du fœtus bovin entre 70 et 120 jours de gestation : éléments de diagnose et fiabilités relatives des diagnostics. (Lebastard 1998)

Eléments fœtaux observables (ou non observables)	Diagnostic	Fiabilité
scrotum	M	++
scrotum + pénis	M	+++
absence de scrotum et de pénis	F	+
absence de pénis et de scrotum + trayons	F	+++

M = mâle ; F = femelle.

Les différentes études (Curran *et al.* 1991 et 1992, Stroud 1996, Wideman *et al.* 1989) annoncent des résultats très satisfaisants quant à l'exactitude de leur diagnostic : 96, 97 et 100% respectivement. Le taux de réussite plus faible de l'étude de Tainturier, 81%, s'explique selon lui par la moindre expérience du manipulateur.

4. La détermination de l'âge du fœtus.

Ceci est particulièrement intéressant dans les élevages allaitants, pour compenser le manque d'informations sur les saillies : avec le stade de gestation, on peut prédire la date de terme d'une vache et ainsi mieux maîtriser la surveillance des vêlages. En élevage laitier, il sert aussi à vérifier si la fécondation a bien eu lieu lors de la dernière insémination artificielle et non pas lors d'une précédente.

Cette détermination peut se faire de manière globale, en fonction des structures visualisées connaissant leur date d'apparition à l'échographie. Curran *et al.* (1986b) ont ainsi échographié 15 génisses Holstein quotidiennement entre 20 et 60 jours de gestation et ont noté pour chaque organe le premier jour de sa détection. Leurs résultats sont présentés dans le tableau IV.

Tableau IV :

Premier jour de détection des caractères du fœtus bovin par échographie. (Curran *et al.* 1986b)

Caractère	Nombre de génisses	Premier jour de détection		
		Moyenne	Ecart type	Intervalle
Embryon	15	20,3	0,3	19-24
Battement cardiaque	15	20,9	0,3	19-24
Allantoïde	9	23,2	0,3	22-25
Allure en C de l'embryon	11	25,4	0,8	22-30
Moelle épinière	14	29,1	0,5	26-33
Ebauche des antérieurs	14	29,1	0,3	28-31
Amnios	14	29,5	0,5	28-33
Orbite	14	30,2	0,4	29-33
Ebauche des postérieurs	13	31,2	0,3	30-33
Allure en L de l'embryon	12	32,7	1,1	29-39
Placentomes	6	35,2	1,0	33-38
Séparation des onglons	10	44,6	0,7	42-49
Mouvements fœtaux	9	44,8	0,8	42-50
Côtes	7	52,8	0,5	51-55

De nombreux auteurs ont cherché à mettre en relation une mesure échographique objective, chiffrée, avec l'âge du fœtus. La mesure la plus utilisée est la longueur tête-croupe : il existe en effet une excellente corrélation entre cette longueur et l'âge ($r = + 0.98$) (Hansen et Delsaux 1987). Cette corrélation peut s'exprimer de façon pratique en équation. Hugues et Davies (1989) la présentent sous la forme :

$$A = G \times \ln(L) + C$$

avec A = âge en semaines, G = coefficient de croissance, L = longueur en cm, C = constante.

L'analyse de leurs résultats, sur des vaches Frisonnes, leur donne l'équation suivante :

$$A = 2.85 \times \ln(L) + 4.08$$

Il suffit alors de mesurer la longueur du fœtus et l'insérer dans l'équation pour avoir une estimation de son âge.

Sans procéder à ces calculs, ces auteurs proposent également un tableau donnant les longueurs moyenne, minimale et maximale d'un fœtus en fonction de son âge : il faut alors comparer sa propre mesure aux données (tableau v). Même si cette étude montre que 95% de la variabilité de longueur d'un fœtus est liée à son âge, il reste toujours une part de variabilité individuelle qui fait de ce calcul une approximation à quelques jours près. White *et al.* (1985) ont trouvé avec leur équation des résultats à 1 à 10 jours près.

Tableau v :

Longueur tête-croupe en fonction de l'âge du fœtus. (Hugues et Davies 1989)

Longueur tête-croupe (cm)

Tableau VI :
Relations entre différentes structures fœtales et l'âge de l'embryon. (Kähn 1989)

Structure fœtale	Type mesure (y en mm)	Equation	Intervalle observation	Coeff.	Nombre observations
Cage thoracique ext.	diamètre	$y = -13,91 + 0,523x$	61-209	0,97	104
Cage thoracique int.	diamètre	$y = -16,18 + 0,438x$	61-196	0,96	105
Longueur tête-croupe	longueur	$y = -10,76 + 0,0199x^2$	31-83	0,99	107
Œil	diamètre	$y = -13,20 + 0,315x - 0,00061x^2$	60-268	0,97	249
Fémur	longueur	$y = -0,74 + 0,00187x^2$	60-201	0,99	108
Fréquence cardiaque	batt/min	$y = 193,96 - 0,609x + 0,00193x^2$	60-252	0,70	261
Humérus	longueur	$y = -1,25 + 0,00193x^2$	60-191	0,96	78
Métacarpe	longueur	$y = -1,33 + 0,00165x^2$	65-217	0,98	108
Métatarse	longueur	$y = -0,52 + 0,00166x^2$	63-190	0,96	54
Ilium	longueur	$y = -0,09 + 0,00135x^2$	67-201	0,95	52
Ischium	longueur	$y = -0,0003 + 0,00109x^2$	60-211	0,97	50
Radius et ulna	longueur	$y = -1,32 + 0,00187x^2$	63-206	0,96	103
Côte	diamètre	$y = -5,20 + 0,105x$	61-208	0,96	189
Epaule	longueur	$y = -2,71 + 0,00215x^2$	63-208	0,97	65
Scrotum	diamètre	$y = -7,78 + 0,197x$	62-211	0,92	53
Estomac	diamètre	$y = -29,70 + 0,623x$	60-211	0,96	153
Tibia	longueur	$y = -1,01 + 0,00208x^2$	63-201	0,98	86
Trachée	diamètre	$y = -2,57 + 0,065x$	87-252	0,81	58
Tronc	diamètre	$y = -13,81 + 0,495x + 0,00173x^2$	31-163	0,97	185
Cordon ombilical	diamètre	$y = 2,24 + 0,00121x^2$	60-206	0,97	228
Vessie	diamètre	$y = -5,13 + 0,149x$	60-201	0,94	86
Veine cave	diamètre	$y = -6,49 + 0,099x$	65-201	0,93	64
Vertèbre :					
cervicale	diamètre	$y = -5,40 + 0,106x$	61-246	0,95	137
coccygienne	diamètre	$y = -5,75 + 0,099x$	88-191	0,99	7
thoracique	diamètre	$y = -4,44 + 0,095x$	62-132	0,91	18
lombaire	diamètre	$y = -3,53 + 0,081x$	84-211	0,92	21

x = âge en semaines.

5. La mortalité embryonnaire.

Les échecs de gestation constituent un problème économique important chez les bovins. De très nombreuses causes peuvent être à l'origine d'un arrêt de gestation (Hagen-Picard *et al.* 2002) : avortements d'origine immunitaire, anomalies génétiques de l'embryon, développement insuffisant, insuffisance lutéale de la mère, désynchronisation âge du fœtus- âge de l'utérus, problèmes infectieux...

Il est donc important, lors d'un suivi de gestation, d'identifier rapidement les pertes embryonnaires ou fœtales.

Des études récentes (Pinto *et al.* 2000, Dunne *et al.* 2000), ont confirmé des données plus anciennes (Ayalon 1978, Humblot 1983), en montrant que la mortalité embryonnaire est essentiellement précoce, avant 16 jours. Pour le montrer, Dunne *et al.* ont séparé les génisses de leur étude en deux groupes : dans un groupe les génisses ont été opérées au 14^{ème} jour de gestation pour effectuer un lavage des cornes utérines et récupérer les éventuels embryons, l'autre groupe étant suivi par échographie à J30, J72 et J84 puis laissées jusqu'au vêlage. A J14 ils ont ainsi trouvé 68% d'embryons dont la taille et la morphologie étaient normales, donc supposés viables. Une étude statistique a montré que les résultats à J14 n'étaient pas différents de ceux de l'autre groupe à J30 et à terme (respectivement 76 et 72% de gestation). Ces pertes embryonnaires très précoces passent inaperçues et sont confondues avec une non-fécondation car l'animal revient en chaleur à 21 jours, sans décalage.

Lors de mortalité embryonnaire tardive, après 16 jours, suivant l'origine du dysfonctionnement, la diminution des concentrations de progestérone peut précéder ou suivre la mort embryonnaire. Si la mortalité embryonnaire est consécutive à la lutéolyse, elle se caractérise par une expulsion rapide (en quelques jours) du conceptus non dégénéré. Si l'interruption de gestation est consécutive à la mort embryonnaire, le maintien du corps jaune entraîne la rétention prolongée du conceptus dans l'utérus (jusqu'à plusieurs semaines), jusqu'à la survenue des chaleurs et la dégénérescence du conceptus (Kastelic et Ginther, 1989). Le volume du conceptus peut ne pas être modifié plusieurs jours après la mort embryonnaire. Dans ce cas le diagnostic échographique repose sur l'arrêt de battements cardiaques, une taille insuffisante de l'embryon par rapport à son stade de gestation et sur l'aspect dégénéré.

Dans le suivi quotidien des gestations de son étude, Curran *et al.* (1896b) a pu observer une mort embryonnaire au 26^{ème} jour de gestation, diagnostiquée par l'absence de battements cardiaques. L'échogénicité des structures embryonnaires a alors progressivement augmenté tandis que la quantité de liquides fœtaux a elle diminué, jusqu'à expulsion au cours de l'œstrus, 17 jours plus tard.

Le stade fœtal, de 45 jours à la mise bas, présente moins de pertes : 2.5-3.5% de mortalité (Pinto *et al.* 2000).

6. L'amniocentèse.

Le prélèvement de liquides fœtaux n'est aujourd'hui utilisé qu'expérimentalement. Il permet l'étude de la composition de ces liquides et, grâce aux cellules fœtales qu'ils contiennent, la détermination du sexe fœtal et l'étude du génotype du fœtus dans les cas de transgénèse par exemple.

De nombreuses méthodes plus ou moins invasives ont été utilisées, jusqu'à la mise au point de techniques transvaginales assistées par échographie, dans le même principe que la ponction ovocytaire. Cependant, le risque de mort fœtale secondaire à une contamination bactérienne de l'utérus ou à la manipulation intempestive de celui-ci n'est pas à négliger (Vos *et al.* 1990). En 1997, Garcia et Salaheddine publient une étude dans laquelle aucune mortalité n'est survenue dans les 45 jours suivant l'amniocentèse effectuée entre 78 et 90 jours de gestation. Ils expliquent cette réussite par les grandes précautions d'hygiène qu'ils ont pris (lavage vaginal bétadiné, sédation de la génisse pour éviter les mouvements engendrant un risque de contamination ...) et surtout par l'utilisation d'une aiguille très fine (22g), qui limiterait les dommages causés au placenta. Une étude comparable, l'année précédente (Bellow *et al.* 1996), comptait un taux d'avortement de 16% après l'utilisation d'aiguille 17g.

Les applications de l'échographie en début de gestation sont donc nombreuses, même si sur terrain le diagnostic de gestation et la détermination de l'âge fœtal, puis le sexage dans une moindre proportion, représentent la quasi-totalité des interventions.

D'autres indications importantes et courantes de l'échographie ne seront pas développées ici car elles ne concernent pas directement la gestation : le contrôle d'involution utérine et le diagnostic de métrite, le suivi ovarien, la ponction ovocytaire (ovum pick-up ou OPU) ...

III. LES UTILISATIONS DE L'ECHOGRAPHIE DANS LES DEUXIEME ET TROISIEME TIERS DE GESTATION CHEZ LES BOVINS.

Si l'utilisation de l'échographie dans le premier tiers de gestation est aujourd'hui largement répandue, tant dans le domaine de la recherche que sur le terrain, il existe encore peu de donnée sur l'échographie de fin de gestation. C'est d'abord le monde équin qui a adapté des méthodes humaines d'échographie transabdominale pour identifier des complications avant poulinage. Chez les bovins, seul le milieu de la recherche commence à utiliser cette technique.

Lorsque la gestation avance, l'échographie présente deux objectifs: visualiser et évaluer le fœtus lui-même, mais aussi l'intégrité du placenta.

1. L'examen fœtal.

1.1 L'examen par voie transrectale.

1.1.1. L'accessibilité du fœtus.

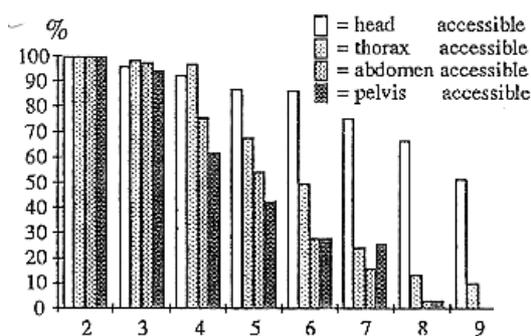
Si à deux mois le fœtus mesure 6-7 cm et peut encore être visualisé dans son ensemble, il mesure déjà 14-15 cm à trois mois, 25 cm à quatre mois et près de 40 cm à cinq mois (Barone, 1990) : l'échographie ne peut alors se focaliser que sur certains organes et non plus sur le fœtus entier.

De plus, la position du fœtus dans l'utérus est très variable et la distance le séparant de la paroi du rectum, donc de la sonde, augmente rapidement au cours de la gestation : le facteur limitant de l'échographie transrectale est généralement le pouvoir de pénétration limité des ultrasons. Il est souvent nécessaire de passer à une sonde de 3,5 MHz pour mettre en évidence les structures éloignées. Les sondes sectorielles semblent également plus adaptées que les sondes linéaires car elles ont une profondeur d'exploration et une maniabilité à l'intérieur du rectum supérieures qui facilitent l'obtention des différents plans de coupes du fœtus.

Dans une étude portant sur 19 génisses Simmental, échographiées à l'aide de sondes sectorielles et linéaires de 5,0 et 3,5 MHz, Kähn (1989) a relevé au cours des gestations l'accessibilité des différentes parties du corps du fœtus. Ses résultats sont présentés dans la figure 7. Il montre ainsi que l'accessibilité par voie transrectale du fœtus diminue rapidement au cours de la gestation, dès le quatrième mois, et que c'est la tête que l'on peut voir le plus régulièrement. Durant les sept premiers mois, au moins un organe ou une partie du corps du fœtus a pu être observé à chaque échographie, tandis que plus tard près d'un tiers des échographies ne permettait aucune visualisation du fœtus.

Figure 7 :

Accessibilité des différentes parties du fœtus par échographie transrectale au cours de la gestation. (Kähn 1989)



1.1.2. La fœtometrie.

Dans cette même étude, Kähn a établi la relation existant entre la mesure de nombreux organes ou parties du corps du fœtus et son âge, comme nous l'avons vu précédemment (voir II.4.). En fin de gestation, le choix de la mesure est restreint par l'accessibilité des différentes parties du fœtus.

1.2. L'examen par voie transabdominale.

Pour palier le défaut d'accessibilité du fœtus en fin de gestation par voie transrectale, il est possible d'obtenir des images échographiques du fœtus par voie transabdominale. Cette méthode est également intéressante pour les petits équidés, ponettes, ânesses ou ceux dont le caractère rend l'examen transrectal difficile. Les principales données sur le sujet proviennent d'études équinnes.

1.2.1. Le suivi de fin de gestation normale.

Lors de l'examen échographique d'une jument gestante, les deux premières choses à regarder sont l'absence de gestation gémellaire et l'orientation du fœtus dans l'utérus car il s'agit des deux causes de mortinatalité liées aux poulains les plus importantes. En effet, chez les juments la majorité des dystocies est liée à un défaut de présentation du poulain (présentation postérieure, mauvais engagement d'une extrémité dans la filière pelvienne), et il y a peu d'excès de poids du poulain, contrairement à l'espèce bovine. La présence de jumeaux menés à terme augmente les risques de dystocie et de rétention placentaire.

Pipers et Adams-Brendemuehl (1984) ont réalisé le suivi échographique de 50 juments gestantes, par voie transabdominale, utilisant des sondes linéaires et sectorielles de 2,25 et 3 MHz. Au cours de l'étude, les examens ont mis en évidence des jumeaux à trois reprises, et une présentation postérieure, tous confirmés à la mise-bas et sans aucun faux-négatif. Malgré le faible effectif présenté, ceci montre l'intérêt de l'échographie pour dépister des poulinsages à risque et permettre ainsi une surveillance accrue si nécessaire.

1.2.2. Le suivi de gestation présentant un risque de souffrance fœtale.

Les causes de souffrances fœtales peuvent être nombreuses. Sanstsch (1994 et 1995) propose de l'évaluer dans un certain nombre de cas.

- Antécédents d'anomalies de la reproduction : avortement, mortalité néonatale, prématurité, dysmaturité, gémellité.
- Pathologie maternelle durant la gestation : endotoxémie, coliques, torsion utérine, chirurgie, traumatismes.
- Signes cliniques anormaux : développement mammaire et lactation prématurés, écoulements vulvaires purulents ou sanguinolents, augmentation du volume abdominal, durée de gestation supérieure à 360 jours.

Cette évaluation se réalise grâce à l'observation de quelques paramètres :

Taille du fœtus : évaluer la taille du fœtus permet d'objectiver un éventuel retard de croissance dont l'étiologie est le plus souvent une insuffisance utéro-placentaire entraînant une hypoxie chronique du fœtus, ou une anomalie congénitale.

En médecine humaine, on utilise la mesure de la longueur du fémur, ce qui n'est pas applicable aux grands animaux, chez qui on utilise la mesure du diamètre aortique. Adams-Brendemuelh (1987) a établi une relation entre cette mesure (Ao en cm) et le poids de naissance du poulain :

$$P(\text{kg}) = -19,62 \pm 29,21 \text{ Ao}$$

Cette équation possède un coefficient de corrélation de $\pm 0,78$: l'évaluation du poids du poulain se fait à 3,5 kg près lorsque la mesure est réalisée dans les sept jours précédant la mise-bas.

Mouvements du fœtus : les mouvements sont très fréquents, d'autant plus en fin de gestation. On observe souvent des cycles d'activité, toutes les 10 minutes environ. L'immobilité fœtale qui dure plus d'une heure est anormale. En cas de doute, comme la durée des examens est limitée, il faut renouveler l'examen le lendemain.

Fréquence cardiaque : signe de viabilité, la fréquence cardiaque peut varier beaucoup de manière physiologique en fonction de l'activité du fœtus, et dans une moindre mesure en fonction du stade de gestation: on observe une légère diminution de la fréquence au cours de la gestation. Les valeurs normales vont de 60 à 100 battements par minute environ.

Une bradycardie est souvent due à une hypoxie, généralement liée à un décollement placentaire. Elle signe une mort fœtale imminente.

Une tachycardie, souvent physiologique, est plus difficile à interpréter. C'est l'observation répétée d'une tachycardie qui évoque un stress fœtal et un risque d'avortement ou de mise-bas.

2. L'examen des annexes fœtales.

2. 1. Chez la jument.

2.1.1 L'évaluation placentaire.

Une étude rétrospective sur plus de 3000 cas d'avortements et de mortinatalités dans l'espèce équine a montré que dans près d'un tiers des cas une infection fœto-placentaire était en cause (Giles *et al.* 1993). L'herpès virus de type I (EHV-1) est l'agent viral le plus fréquent dans les avortements: après un passage respiratoire et une virémie intra leucocytaire le virus peut rester

en latence puis se réactiver et envahir le placenta. L'accumulation rapide de liquide entre l'endomètre et le placenta induit la mort fœtale par asphyxie, sans signe clinique chez la mère. La contamination bactérienne ou fongique de l'utérus se fait soit lors de la fécondation, soit par voie hématogène, soit par voie ascendante, cette dernière étant la plus fréquemment rencontrée. La jument présente alors des écoulements vulvaires et un développement mammaire avec ou sans lactation, dans 75% des cas, à un stade déjà avancé de l'infection (Collobert 1994).

Ces quelques données montrent la difficulté d'une détection précoce de ces infections, donc de la mise en place rapide d'un traitement efficace. L'échographie est le seul examen complémentaire disponible avant l'avortement: virologie, bactériologie, mycologie, sérologies sont des méthodes longues, qui se réalisent pour établir un diagnostic étiologique.

Les images échographiques normales du placenta.

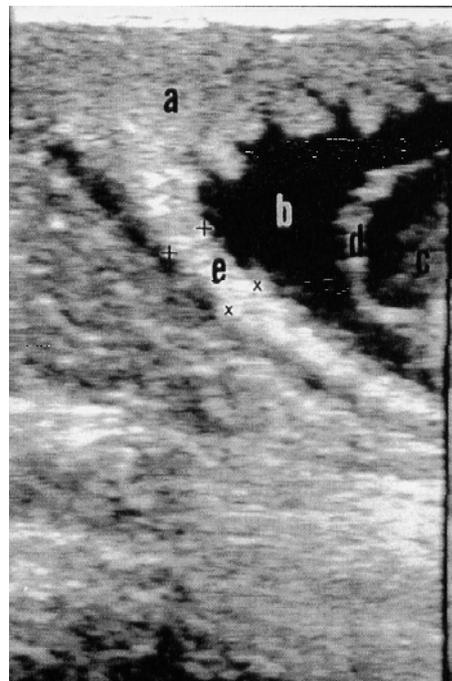
Dans les conditions normales, l'allantochorion et l'endomètre sont accolés et toujours confondus sur l'image échographique: on parle d'Épaisseur Combinée de l'Utérus et du Placenta (ECUP). La réalisation de cette mesure est présentée par la figure 8.

Figure 8 :

Image échographique transrectale.

L'Épaisseur Combinée de l'Utérus et du Placenta est la distance séparée par deux croix (e). Elle est mesurée sur la partie ventrale du corps utérin, proche du col.

(a : placenta proche du col de l'utérus, b : liquide allantoïdien, c : liquide amniotique, d : annios) (Renaudin *et al.* 1997).



Renaudin *et al.* (1997) ont examiné neuf juments entre 4 et 12 mois de gestation pour déterminer les variations normales de l'épaisseur utéroplacentaire au cours de la gestation. Ils ont comparé les mesures prises par voie transrectale, à la jonction placentocervicale et celles prises par voie transabdominale au niveau du corps ou des cornes utérines. L'ECUP mesurée par voie transrectale ne varie pas entre 4 et 8 mois de gestation puis augmente significativement de mois en mois sur la fin de la gestation. Aucune corrélation entre les mesures transrectale et transabdominale n'a été trouvée mais un effet « individu » a été montré pour l'ECUP transabdominale. En conclusion l'échographie transrectale semble être la plus appropriée pour l'évaluation de l'ECUP en milieu et fin de gestation.

Les images échographiques de placentite.

La placentite étant le plus fréquemment d'origine ascendante, les premiers signes sont attendus au niveau de la jonction cervico-utérine. C'est à ce niveau que l'on réalise la mesure utéro-placentaire à l'échographie transrectale. Quel que soit le stade de gestation, cette mesure ne dépasse pas 1 cm dans les conditions physiologiques (Renaudin 1997). En cas de placentite la réaction inflammatoire entraîne l'épaississement des tissus placentaires, donc l'augmentation de l'ECUP. Reef (1996) considère qu'une épaisseur dépassant les 2 cm est anormale. Lors d'infection, l'ECUP est augmentée avant l'apparition de tout signe clinique, ce qui en fait un élément de diagnostic précoce.

Les images échographiques de décollement placentaire.

Le décollement placentaire ne se fait normalement qu'après la mise bas, lors de la délivrance. Le décollement prématuré peut être aigu, lors de la parturition : c'est la surface veloutée du placenta que l'on visualise en premier car il s'est détaché avant la libération du poulain. Il faut alors le déchirer au plus vite pour éviter l'asphyxie de ce dernier.

Mais, le décollement peut aussi être chronique, au cours de la gestation. Il y a alors diminution progressive de la surface d'échange fœto-maternelle, entraînant ainsi l'hypoxie du fœtus. Le virus EHV-1 peut provoquer ce phénomène par accumulation de liquide entre les deux parois, mais le plus souvent l'étiologie reste inconnue (Collobert 1994). Les symptômes sont frustrés avec parfois un développement mammaire prématuré. Le seul traitement est le déclenchement de la mise-bas avec risque de prématurité ou l'attente avec risque de mort fœtale.

Comme nous l'avons vu, sur une image normale on ne peut différencier placenta et utérus. Le diagnostic échographique d'un décollement placentaire se fait lorsque cette distinction est possible.

2.1.2 L'évaluation des liquides fœtaux.

L'évaluation quantitative.

La quantité de liquides fœtaux présents dans l'utérus correspond à un équilibre entre leur production (sécrétions pulmonaires, urine) et leur absorption par le fœtus. D'après Reef *et al.* (1996), les valeurs normales pour la hauteur maximale mesurée des liquides allantoïdien et amniotique sont de 47 à 221 mm et de 8 à 149 respectivement, avec un intervalle de confiance de deux écarts-types de la moyenne.

Une hypoxie chronique est suivie d'une diminution de la production urinaire, donc des liquides fœtaux. Lors du suivi de 30 juments présentant une gestation à risque, Reef *et al.* (1996) ont détecté chez quatre juments un déficit en liquide allantoïdien : une d'elles a avorté, deux ont donné naissance à un poulain présentant un syndrome d'asphyxie péri-partum (anomalies comportementale, neurologique, rénale, gastro-intestinale, cardio-pulmonaire ou endocrine liées à l'hypoxie), le dernier poulain étant normal. La quantité de liquides fœtaux est donc un bon indicateur d'hypoxie, qui s'accompagne également d'un retard de croissance et de mortalité périnatale importante.

L'excès de liquide est plus rare dans l'espèce équine et son origine reste inconnue. Dans les quelques cas publiés d'hydropisie amniotique (Adams-Brendemuehl 1990, Sertich *et al.* 1994) le fœtus était bradycarde par rapport à son stade de gestation et l'avortement suivait de peu le diagnostic.

L'évaluation qualitative.

Dans les premiers stades de gestation, les liquides fœtaux paraissent uniformément noirs à l'échographie, anéchogènes. Cependant au cours de la gestation apparaissent des particules échogènes qui flottent dans ces liquides. Le liquide amniotique est formé à partir de l'épithélium amniotique et s'y ajoutent l'urine fœtale, la salive, les sécrétions du naso-pharynx du fœtus et le vernix, substance relarguée par la peau. Les particules de l'allantoïde proviennent de l'urine fœtale, riche en calcium. De manière générale, l'amnios est plus chargé en particules que l'allantoïde.

Adams-Brendemuehl et Pipers (1987), par des échographies transabdominales, ont observé l'apparition de particules au cours des deux derniers mois de gestation. Renaudin *et al.* (1997), par des échographies transrectales, ont mis en évidence, de manière normale, des particules dès le 4^{ème} mois de gestation, tant dans l'amnios que dans l'allantoïde. Il semble donc que l'échographie transrectale soit plus précise dans l'évaluation des liquides fœtaux.

Certains auteurs (Sertich 1993, Vaala 1994) ont décrit une soudaine augmentation de l'échogénicité des liquides fœtaux associée à la libération in utero de méconium, à une hémorragie ou à des débris inflammatoires reflétant respectivement une hypoxie fœtale, un décollement placentaire et une placentite.

L'amniocentèse par voie transabdominale, souvent guidée par échographie, permet d'analyser les liquides fœtaux, notamment leur statut bactériologique. Elle a aussi été utilisée pour déterminer le niveau de maturité pulmonaire du fœtus, comme aide à la décision du déclenchement de la mise-bas (Williams *et al.* 1988). Cela se pratique couramment chez la femme, par le ratio lecitine/sphingomyeline et la quantité de phosphatidylglycerol dans le liquide amniotique. Cependant, cette utilisation en équine est limitée au seul domaine de la recherche par le risque élevé d'avortements, lié à la procédure pouvant entraîner des contaminations ou des lésions placentaires (Schmidt *et al.* 1991).

2. 2. Chez la vache.

Les données sur les annexes fœtales en fin de gestation chez la vache sont rares. Placentites, décollements placentaires et oligohydramnios sont des entités cliniques principalement équine. Par contre, on retrouve dans l'espèce bovine des liquides fœtaux anormalement échogènes, avec une étiologie identique, et des hydropisies des annexes.

3. La mise en place d'un profil biophysique.

L'examen échographique apporte de nombreuses informations sur le fœtus et l'environnement utérin. Pour évaluer de manière la plus objective et la plus significative la viabilité et la santé du fœtus, il est intéressant de chiffrer les critères observés. C'est ce que Manning (1990 et 1991), en médecine humaine, a nommé le profil biophysique (PBP). C'est ce modèle humain que nous allons décrire, pour voir ensuite les adaptations aux animaux qui ont été réalisées.

3.1. Le profil biophysique en médecine humaine.

En 1990, les causes de mortalité périnatale, en l'absence d'intervention, sont l'asphyxie chronique dans 60%, des anomalies fœtales dans 30% et une asphyxie aiguë dans 10% des cas. Le profil biophysique est la mesure de la probabilité de survenue d'une hypoxémie ou d'une asphyxie fœtale aiguë ou chronique.

Le profil biophysique se base sur l'évaluation de critères reflétant soit le statut du fœtus au moment de l'examen (la respiration fœtale, les mouvements corporels, le tonus musculaire, la réactivité de la fréquence cardiaque), soit ce statut sur la période précédant l'examen (le volume de liquide amniotique).

Durant les phases de sommeil du fœtus, les premiers critères peuvent apparaître anormaux : pour ne pas confondre le sommeil avec un signe d'asphyxie, l'examen se prolonge jusqu'à ce que les paramètres redeviennent normaux et que tous aient pu être observés, dans la limite de 30 à 45 minutes. En moyenne, un examen normal se déroule en une dizaine de minutes.

Chaque paramètre obtient la note de 2 si le seuil de normalité défini est atteint, 0 s'il ne l'est pas. Le profil biophysique est donc un score, noté entre 0 et 10.

Les valeurs seuils retenues sont :

Mouvements respiratoires normaux = un épisode de respiration fœtale pendant plus de 30 secondes sur une période de 30 minutes.

Mouvements corporels normaux = au moins trois épisodes de mouvements pendant une période de 30 minutes.

Tonus fœtal normal = les membres ou la colonne vertébrale passent de la flexion à l'extension et reviennent à la flexion. (tonus anormal = extrémités en extension ou en flexion partielle, mouvements non suivis d'un retour à la position fléchie).

Réactivité cardiaque normale = suite à des mouvements fœtaux la fréquence cardiaque s'accélère de 15 battements par minute pendant au moins 15 secondes.

Volume du liquide amniotique normal = la hauteur maximale de liquide mesure plus de 1 cm dans deux plans perpendiculaires.

Il faut noter que quelques modifications ont été apportées, en prenant en compte des études rétrospectives sur le sujet : le test de réactivité fœtale n'est pas fait lorsque les quatre autres paramètres sont normaux, car alors la valeur prédictive reste la même, mais il reste effectué si une des valeurs précédentes est anormale. Ces études ont également montré l'importance du paramètre « volume du liquide amniotique » et son seuil de normalité a été relevé à 2 cm.

Le score obtenu est étroitement corrélé à la mortinatalité ou à la morbidité infantile : Manning a démontré qu'un score inférieur à 8 entraîne un taux de mortinatalité significativement plus élevé qu'un score de 10. Un score faible (<8) indique une détresse fœtale et la nécessité d'une intervention immédiate, tandis qu'un score élevé (>ou = 8) est compatible avec le bien être fœtal.

Les bases de l'interprétation de ce score sont présentées dans le tableau VII. Cependant cette interprétation est faite en relation avec la clinique de la patiente et du fœtus : en post-terme, l'accouchement peut être déclenché quel que soit le score, en fonction de l'état du col de l'utérus ; de même, chez des patientes souffrant d'hypertension ; l'oligohydramnios, même accompagné de valeurs normales (score de 8/10), reste une indication majeure d'intervention.

Le stade de gestation est évidemment pris en compte, pour comparer les chances de survie du prématuré et les risques courus en prolongeant la grossesse.

Tableau VII :

Conduite à tenir selon le résultat du profil biophysique. (Manning 1990 et 1991)

Score	Interprétation	Conduite à tenir
10 / 10 8 / 10 avec liquide normal 8 / 8 test de réactivité non fait	Pas de signe d'asphyxie aiguë ou chronique	Pas d'indication fœtale d'intervention
8 / 10 avec liquide anormal	Probable asphyxie chronique	Si âge > 36 semaines: intervention Si âge < 36 semaines: autres tests
6 / 10 avec liquide normal	Test équivoque, possible asphyxie fœtale	Si âge > 34 semaines: intervention Si âge < 34 semaines: refaire l'examen 24 heures après
6 / 10 avec liquide anormal	Probable asphyxie chronique Possible asphyxie aiguë	Si âge > 26 semaines: intervention
4 / 10	Probable asphyxie aiguë	Si âge > 32 semaines: intervention Si âge < 32 semaines: refaire l'examen dans la journée.
2 / 10	Asphyxie fœtale presque certaine	Prolonger l'examen jusqu'à 1h, si score toujours < 6, intervention.

L'application de ce PBP aux 17 juments à risque de l'étude a donné les résultats présentés dans le tableau VIII, qui montrent une bonne corrélation entre le profil et le devenir du fœtus, avec tout de même deux faux positifs et un faux négatif.

Tableau VIII :

Profil Biophysique du fœtus et devenir, pour 17 juments référées pour gestation à risque.
(Adams-Brendemuehl et Pipers, 1987)

Jument	Cause du référé	Stade de gestation	Profil biophysique	Devenir du fœtus	Problème maternel post partum
1	Sous développement	291	Normal	Négatif (petit, faible, mort à 5 jours)	Placentite
2	Lactation prématurée	310	Anormal (FC 48)	Négatif (pneumonie)	Placentite focale
3	Jumeaux sous développés	322	Anormal (FC 58)	Négatif (dystocie, un mort né)	Placentite diffuse
4	Lactation prématurée	280	Anormal (placenta 0,5cm)	Négatif (faible, pneumonie)	Placentite
5	Distension abdominale rapide	236	Anormal (présentation postérieure)	Négatif (avortement)	Placentite

En cherchant un résultat plus précis, Reef, en 1996, a proposé un PBP dont le calcul se rapproche plus de celui réalisé en médecine humaine. Il se base sur 6 paramètres : la fréquence cardiaque, le diamètre aortique, l'activité fœtale, l'épaisseur utéro-placentaire, le contact utéro-placentaire et l'épaisseur maximale de liquide fœtal.

L'évaluation de chaque paramètre se fait suivant le protocole suivant :

Le diamètre aortique : il doit être égal au diamètre calculé, plus ou moins 4 erreurs standard (5,038mm), donné par l'équation

$Ao \text{ calc. (mm)} = 0.00912 Pm(\text{kg}) \pm 5.664$ avec Pm le poids de la mère.

La fréquence cardiaque : elle doit être comprise entre 57 et 104 battements par minute si le fœtus est âgé de moins de 330 jours et entre 50 et 104 s'il est plus âgé. La valeur maximale ne doit pas être dépassée, même après une période d'activité fœtale.

L'activité fœtale : elle est évaluée sur l'ensemble de l'examen, soit 30 minutes et est notée de 0 (aucune activité) à 3 (activité pendant au moins 20 minutes sur les 30).

Les liquides fœtaux : c'est la hauteur maximale de liquide, allantodien ou amniotique, qui est prise en compte. Elle doit être comprise entre 47 et 221 mm pour le liquide allantodien et 8 et 149 mm pour le liquide amniotique.

L'épaisseur utéro-placentaire : elle est normalement comprise entre 7 et 20 mm.

Le contact utéro-placentaire : un décollement placentaire est évidemment considéré comme anormal.

Chaque paramètre étant noté sur 2, le score se fait sur 12. Un PBP < 8 indique une très forte probabilité de problème au cours de la mise bas.

Les études rétrospectives sur la valeur prédictive de chacun des profils ont donné les résultats présentés dans le tableau IX.

Tableau IX :

Pourcentage de poulains anormaux à la naissance en fonction du profil biophysique calculé.

Profil biophysique	Reef (n=30)	Adams (n=17)
Normal	44%	22%
Anormal	100%	88%

Il faut souligner qu'aucun profil biophysique ne peut garantir une mise-bas sans complication. En effet, certains événements ne sont pas prévisibles : le décollement placentaire aigu, certaines dystocies, l'inertie utérine, le développement d'une maladie néonatale ne peuvent être détectés.

L'échographie de fin de gestation est donc bien développée en médecine humaine, et elle permet, grâce au profil biophysique de diagnostiquer précocement les retards de croissance fœtale et les risques d'asphyxie fœtale, et ainsi d'intervenir le plus efficacement possible pour améliorer les chances de survie du fœtus.

Chez les grands animaux, les mêmes principes peuvent être adaptés avec succès même si l'intérêt du diagnostic précoce est limité par les possibilités de survie d'un prématuré, beaucoup plus réduites chez les animaux. Sur le terrain, l'échographie est également indispensable pour le diagnostic de placentite et de décollement placentaire chez la jument.

Les autres mesures rendues possibles par l'échographie intéressent surtout le domaine de la recherche, car elles peuvent donner des indications quant aux schémas de développement des différentes structures fœtales et placentaires au cours d'une gestation normale ou pathologique.

LE CLONAGE

Un clone animal est un ensemble d'individus génétiquement identiques, obtenus par reproduction asexuée. L'exemple le plus simple de clone est illustré par la naissance de jumeaux monozygotes, résultant de la scission accidentelle d'un tout jeune embryon avant son implantation dans l'utérus maternel. Le clonage regroupe plusieurs méthodes de manipulation des embryons aboutissant à la formation d'un clone.

I. LES TECHNIQUES DE CLONAGE.

1. La bissection embryonnaire.

C'est la méthode la plus simple, qui copie la formation des jumeaux monozygotes: l'embryon au stade morula ou blastocyste, avant la formation du disque embryonnaire et du trophoblaste, est coupé par micromanipulation en deux masses de cellules, chacune étant replacée dans une zone pellucide vide. Chaque demi-embryon ainsi produit est ensuite transplanté dans une vache porteuse synchronisée. Par cette méthode, en transférant les deux demi-embryons dans une même vache, Ozil *et al.* (1982) ont obtenu un taux de gestation de 64% et un taux de gémellité de 66%.

Cette technique reste limitée car elle ne peut produire, au mieux, qu'un clone de deux animaux.

2. Le transfert nucléaire.

Le principe de cette technique est d'extraire le matériel chromosomique de l'ovocyte ovulé (stade métaphase II) et de le remplacer par le noyau d'une cellule donneuse. (Heyman *et al.* 1990). L'intérêt du transfert nucléaire est de disposer d'une source de cellules donneuses génétiquement identiques la plus large possible afin de produire des clones de grande taille.

La première source utilisée a été les embryons à des stades préimplantatoires: une morula peut ainsi fournir, après dissociation, entre 32 et 64 blastomères. Des équipes ont tenté un reclonage des morulas obtenues, de façon à augmenter la taille finale du clone: à partir d'un embryon on obtient en moyenne 6 blastocystes tandis qu'après reclonage des blastocystes obtenus plus de 14 blastocystes génétiquement identiques peuvent être formés. Cependant la viabilité de ces blastocystes après leur transfert chez une vache receveuse est plus faible que celui des embryons issus d'un clonage unique (Heyman *et al.* 1996, Ectors *et al.* 1995). Le premier veau issu de transfert nucléaire de cellule embryonnaire est né en 1986 (Prather *et al.* 1987).

Une source plus large encore est représentée par les cellules somatiques, différenciées, d'un fœtus ou d'un animal adulte. Depuis la naissance de la brebis Dolly en 1997 (Wilmut *et al.* 1997), le clonage à partir de cellules somatiques adultes est le plus médiatisé et soulève de nombreuses questions et inquiétudes. La naissance d'animaux, ovins, bovins, caprins, porcins, lapins, félins et murins issus de lignées cellulaires variées, montre que la différenciation cellulaire n'est pas irréversible: le noyau d'une cellule différenciée placée dans un ovocyte peut retrouver sa totipotence, capacité à induire le développement d'un individu adulte normal, fertile, pouvant assurer sa descendance.

Kato *et al.* (2000) ont montré la diversité des cellules somatiques utilisables en transfert nucléaire en réalisant chez des bovins le clonage de six types cellulaires issus d'adultes, de nouveau-nés et de fœtus bovins, mâles et femelles: cellules de cumulus, d'oviducte, d'utérus, de peau et d'oreille de femelle adulte, cellules de peau, d'oreille et de foie de femelle nouveau-née, cellules de peau et d'oreille de mâle adulte, cellules de peau, d'oreille, de foie et de testicules de mâle nouveau-né, cellules de peau et de foie de fœtus.

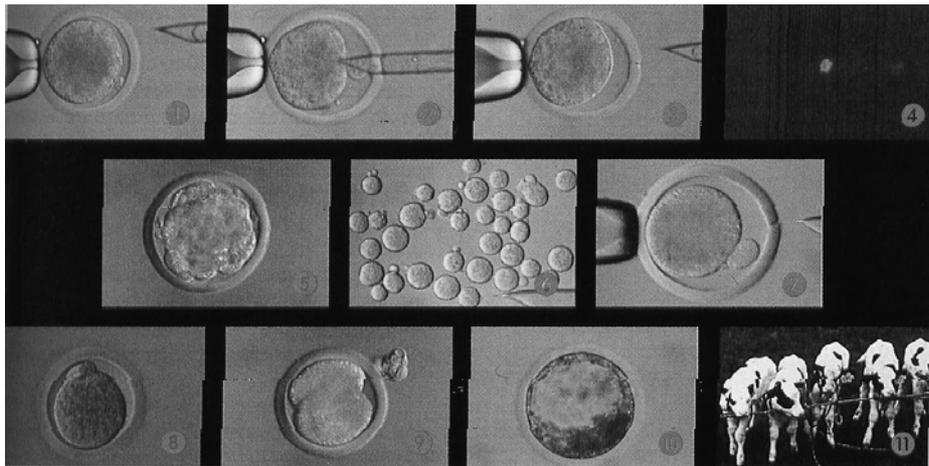
Dans cette même étude (Kato *et al.* 2000), pour les étapes aboutissant à la formation de blastocystes, il n'y a pas eu de différence significative entre les ovocytes contenant un noyau adulte (42%), de nouveau-né (37%) ou fœtal (40%), ni entre les noyaux d'origine mâle (40%) ou femelle (39%).

Sur le principe du transfert nucléaire qui est commun à toutes les équipes de recherches, se sont développés plusieurs protocoles qui diffèrent plus ou moins les uns des autres au sujet du milieu de culture utilisé (avec ou sans sérum de veau fœtal, avec ou sans système de coculture) et du développement embryonnaire qui peut se faire *in vitro* ou *in vivo*. Sans rentrer dans les détails de ces différentes méthodes, je présente ici le protocole de l'INRA pour les bovins (Chastant et Renard 1998, Heyman *et al.* 1996). La figure 9 illustre les principaux temps du protocole, avec l'exemple du transfert nucléaire de cellules embryonnaires.

- **Enucléation:** l'ovocyte au stade métaphase II est immobilisé par une pipette de maintien en verre. Grâce à un colorant vital fluorescent (Hoechst 33342) et un éclairage de faible intensité, on visualise sur un écran vidéo la position de la plaque métaphasique. Une seconde pipette en verre, biseautée, de 30 microns de diamètre, traverse la zone pellucide et permet l'extraction de la métaphase ainsi que du premier globule polaire.
- **Préparation des cellules donneuses:** lorsque la source de cellules est un embryon, la zone pellucide est digérée par un traitement enzymatique (pronase) et les blastomères sont dissociés après un passage dans un milieu sans calcium. Si la source est une culture de cellules, celle-ci est soumise à un traitement à la trypsine pour individualiser les cellules.
- **Reconstruction de l'embryon:** une cellule donneuse est aspirée dans la pipette d'enucléation puis injectée dans l'espace périvitellin. On parle donc à tort de transfert nucléaire puisqu'en fait il s'agit plutôt du transfert d'une cellule entière.
- **Fusion - activation:** la fusion entre les deux membranes cellulaires, celle du cytoplasme ovocytaire et celle de la cellule donneuse placées l'une contre l'autre, est obtenue en soumettant l'embryon reconstitué à un champ électrique entre deux électrodes. La fusion est effective dans l'heure qui suit la stimulation électrique, qui provoque également l'activation et la reprise du développement embryonnaire, en imitant l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte.
- **Développement embryonnaire et fœtal:** les embryons reconstitués sont ensuite placés en culture *in vitro*, dans un milieu contenant 2,5% de sérum de veau fœtal et en coculture avec des cellules Vero, et ceux qui atteignent le stade de blastocyste peuvent être transplantés dans l'utérus d'une femelle receveuse synchronisée.

Figure 9 :

Les étapes du clonage par transfert nucléaire (cellules embryonnaires) (INRA).



1. ovocyte de vache obtenu par maturation in vitro.
2. énucléation de l'ovocyte par micromanipulation.
3. ovocyte énucléé ou cytoplaste receveur.
4. contrôle de l'énucéation (chromosomes fluorescents).
5. embryon donneur au stade morula.
6. blastomères de l'embryon.
7. reconstitution d'un embryon par micromanipulation à partir d'un blastomère et du cytoplaste.
8. fusion des membranes.
9. embryon cloné après 24 h de culture (stade deux cellules).
10. embryon cloné après sept jours de culture (stade blastocyste).
11. clone de cinq veaux mâles issu du même embryon donneur.

II. L'INTERET DU CLONAGE DES ANIMAUX DE RENTE.

1. Les études fondamentales sur la différenciation cellulaire.

La majorité des cellules diploïdes de l'organisme possède la même séquence d'ADN, la même information génétique, qui contient tous les gènes, exprimés ou non. La différenciation d'une cellule, conduisant à sa spécialisation, ne correspond pas à la perte d'information génétique mais seulement à une expression sélective de certains gènes. Les résultats obtenus avant la naissance de Dolly, notamment chez les amphibiens, conduisaient à penser que l'architecture de l'ADN et la fixation de protéines sur les gènes empêchaient définitivement l'expression de certains d'entre eux, faisant perdre à la cellule sa totipotence. Seule l'obtention d'un individu complet à partir d'une cellule adulte différenciée a pu démontrer que tous les gènes sont réactivables et peuvent à nouveau s'exprimer de façon ordonnée après reprogrammation par un cytoplasme receveur adéquat. L'approfondissement de ces connaissances, notamment des mécanismes impliqués dans la différenciation cellulaire est à la base de la recherche pour le développement du clonage thérapeutique.

2. La diminution du nombre d'animaux nécessaires en expérimentation animale.

L'absence de variabilité génétique au sein d'un clone permet d'augmenter la puissance des tests statistiques d'analyse des résultats et donc de diminuer le nombre d'animaux nécessaires. Ceci intéresse particulièrement les immunologistes, les éthologistes et les nutritionnistes (Heyman *et al.* 1996). Les clones permettent aussi de mieux étudier les influences respectives de la génétique et de l'environnement sur une performance ou un phénomène biologique. Ainsi, les clones bovins obtenus à l'INRA sont maintenant utilisés comme modèles d'étude du déterminisme génétique de caractères complexes tels que le comportement alimentaire, la résistance à des agents pathogènes et la qualité des ovocytes pour le développement embryonnaire *in vitro* (Chastant et Renard 1998).

Une étude récente (Archer *et al.* 2003) nuance cet intérêt : elle montre que la variabilité au sein d'un clone, pour un caractère donné, n'est pas obligatoirement diminuée, contrairement à ce qui était attendu. Par exemple, le poids à âge type chez des truies présente une variabilité identique pour les clones et pour les témoins, placés dans un environnement strictement identique. Car, si les influences génétique et environnementale sont masquées par l'identité génétique et les conditions d'élevage, reste l'influence épigénétique sur l'expression des gènes, que l'on sait augmentée par la procédure de clonage. L'intérêt des clones en expérimentation n'est donc réel que pour certaines études, sur des caractères peu influencés par les phénomènes épigénétiques.

3. L'utilisation en sélection.

Le clonage peut permettre de diminuer le coût de la sélection : un clone de cinq filles obtenu à partir d'un embryon d'un taureau testé permet d'obtenir la même précision que 25 filles naturelles (Colleau 1993). Ceci permettrait d'appliquer la sélection à des races à faibles effectifs.

Le clonage embryonnaire associé au sexage permet d'augmenter de manière importante et rapide la descendance d'un animal au patrimoine génétique intéressant. Le clonage de cellules adultes permet de reproduire directement cet individu.

C'est dans ce but qu'au Canada des tissus du taureau Hanoverhill Starbuck ont été prélevés et congelés, peu de temps avant sa mort. Le succès commercial mondial de ce taureau Holstein a incité ses propriétaires à demander son clonage. C'est une collaboration entre l'équipe de l'Université Vétérinaire de Montréal, celle du Centre d'Insémination du Québec et l'Alliance Boviteq, qui est à l'origine de Starbuck II, né en septembre 2000, après la reconstitution de 68 ovocytes. Starbuck II est aujourd'hui collecté par Semex Alliance, mais aucune de ses doses n'a pu être vendue faute d'autorisation du gouvernement fédéral (Anonyme, 2000).

En effet, sur le plan juridique peu de juridictions se sont clairement prononcées sur la commercialisation des produits issus d'animaux clonés. En France, c'est un moratoire provenant de l'Institut National de Recherche Agronomique, daté du 6 juillet 1999, qui précise qu'« il est formellement interdit de procéder à la mise sur le marché de tout produit issu de clones somatiques (et embryonnaires) ainsi que de ces animaux eux-mêmes et de leur descendance ». Aujourd'hui, seul le Japon autorise la consommation de la viande d'animaux issus de transfert nucléaire de cellule embryonnaire.

4. La sauvegarde d'animaux en voie de disparition.

Le clonage de cellules adultes pourrait, en augmentant le nombre d'individus, donc leur chance de survie, permettre de sauvegarder des espèces ou des races en voie de disparition (Chastant et Renard, 1998).

5. L'obtention d'animaux transgéniques.

La transgénèse classique s'appuie sur la micro-injection des embryons au stade une cellule. Le rendement de cette manipulation est faible : 1,6 veaux nés sur 100 embryons injectés, dont 10% seulement de transgéniques (Menck *et al.* 1998). Ceci représente également un coût très important. Le clonage, à partir de souches cellulaires génétiquement modifiées dans lesquelles ont aura pu vérifier le niveau d'expression du transgène, devient une technique très puissante pour la production d'animaux transgéniques.

Ces animaux ont de nombreuses applications : la production de protéines d'intérêt pharmaceutique en les synthétisant dans leur lait, la modification de la composition du lait pour augmenter les productions fromagères ou améliorer sa digestibilité, l'acquisition de résistance aux maladies, la création de modèles animaux pour les maladies humaines ou la modification des antigènes pour pouvoir utiliser des organes en xénotransplantation.

Si les intérêts du clonage sont nombreux, la technique soulève des questions d'éthique importantes. Un comité d'éthique interne à l'INRA s'est penché sur la question et a approuvé les travaux effectués pour la recherche fondamentale, pour des aspects médicaux (lapins clones transgéniques comme modèles de la mucoviscidose, chèvres dans la recherche contre l'infertilité...), mais pas pour des applications zootechniques à visée commerciales. De plus, conscients de l'importance de ces inquiétudes, une thèse en bioéthique est en cours sur le sujet.

III. LES CARACTERISTIQUES DES GESTATIONS DES PORTEUSES DE CLONES.

1. L'efficacité générale du clonage.

Les différentes études réalisées sur le clonage sont parfois difficiles à comparer car les méthodes utilisées diffèrent, notamment pour le diagnostic de gestation, et le petit nombre de clones produits rend souvent les résultats statistiques peu fiables. Je choisis donc de présenter ici les résultats des deux plus grandes études publiées actuellement sur le sujet, celle de l'INRA présentant l'ensemble de ses résultats jusqu'en 1999 (Chavatte-Palmer *et al.* 2000, tableau XII) et celle de Marvin M. Pace *et al.* du Wisconsin (tableaux X et XI, figure 10) concernant leurs clones produits entre janvier 1998 et février 2000 (Pace *et al.* 2002). Ces deux études concernent des clones produits par transfert nucléaire de cellules somatiques adultes et fœtales. Pour celle de Pace *et al.* la répartition des embryons entre ces deux catégories ne sont pas précisées.

Tableau X :
Résultats de gestation des clones dans l'étude de Pace *et al.* 2002.

	Nombre	%
Transferts et début de gestation		
Transferts d'embryons	2170	
Gestations initiées	535	24,7
Devenir des gestations initiées		
Avortement	402	75,1
Hydropisie	30	5,6
Naissance	103	19,3
Devenir des clones nés		
Veaux nés	117	
Veaux nés en vie	106	90,6
Veaux toujours en vie	82	77,4

Tableau XI :
Répartition des avortements au cours des gestations de clones. (Pace *et al.* 2002)

Stade (jours)	Nombre d'avortement	% cumulé
<30	131	24,5
30-39	136	50,0
40-49	68	62,7
50-59	22	66,5
60-89	14	69,5
90-180	20	73,2
>180	10	75,1

Figure 10 :
Répartition des avortements au cours des gestations de clones. (Pace *et al.* 2002)

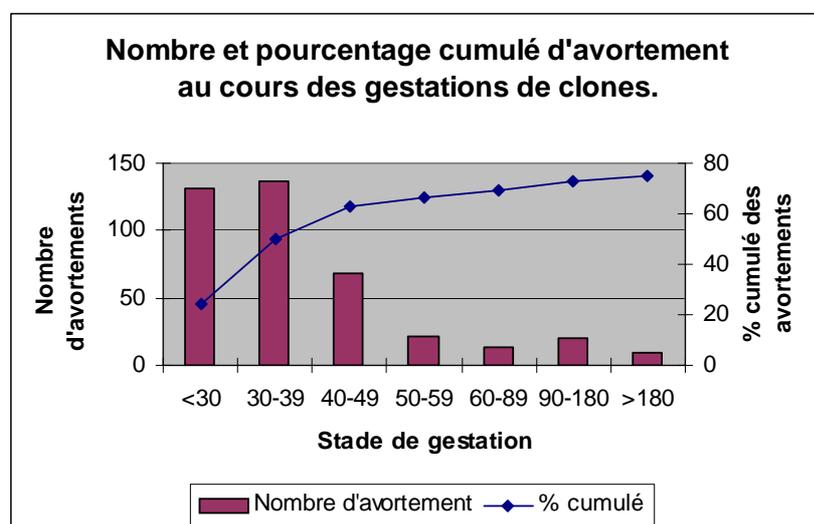


Tableau XII :

Développement in vivo après transfert d'embryons issus de transfert nucléaire de cellules somatiques au sein de l'INRA. Chavatte-Palmer *et al.* 2000.

	Embryons issus de transfert nucléaire de cellules somatiques			Groupe contrôle
	foétale	adulte	total	FIV
Nombre de receveuses	31	85	116	39
Dosage de progestérone à J21	17 (54,8%)	42 (49,4%)	59 (50,8%)	24 (61,5%)
Diagnostic de gestation à J35	7 (22,6%)	28 (32,9%)	35 (30,2%)	20 (51,3%)
Diagnostic de gestation à J50	6 (19,3%)	24 (16,5%)	30 (25,8%)	18 (46,1%)
Diagnostic de gestation à J70	6 (19,3%)	14 (16,5%)	20 (17,2%)	17 (43,6%)
Diagnostic de gestation à J90	6 (19,3%)	12 (14,1%)	18 (15,5%)	17 (43,6%)
Avortement tardif	2	3	5	
Abattage après détection d'une anomalie de développement		3	3	
Naissance	4 (12,9%)	6 (7,1%)	10 (8,6%)	17 43,6%

Les résultats des deux études concordent assez bien, avec des taux de réussite un peu moins bons chez Pace *et al.*, qui suggèrent que cela soit du à l'utilisation de cellules transfectées comme donneuses de noyau dans 75% des manipulations.

Le clonage par transfert nucléaire se caractérise donc, en comparaison avec d'autres techniques de reproduction, par des pertes embryonnaires, foétales et périnatales particulièrement élevées: les pertes foétales après 35 jours de gestation sont respectivement de 78,5% et 43% pour les clones d'origine adulte et foétale alors qu'elles ne sont que de 36,4% pour le clonage embryonnaire et 15% pour les FIV.

2. Les pertes rencontrées au premier trimestre.

Les pertes précoces des gestations issues de transfert nucléaire ont été récemment associées à une vascularisation placentaire anormale. Hill *et al.* (2000) ont ainsi comparé, après abattage entre 45 et 55 jours de gestation, le placenta de deux vaches porteuses de clones vivants à celui de deux gestations naturelles. Chez les clones, ils notent la quasi absence de développement cotylédonaire, avec seulement quelques ébauches de 5 mm de diamètre, associée à une vascularisation placentaire diminuée et des caroncules plus petites que pour les témoins. De même, De Sousa *et al.* (2000) trouvent de nombreuses anomalies placentaires, notamment une hypoplasie chorionique sur des clones ovins observés à 35 jours de gestation. Dans ces études, les fœtus présentant des anomalies placentaires étaient de petite taille mais sans anomalie anatomique: tout ceci suggère que les pertes foétales précoces de clones bovins et ovins pourraient être dues à une vascularisation placentaire anormale, entraînant l'affaiblissement du fœtus et sa mort.

3. Les pertes rencontrées aux deuxième et troisième trimestres.

Les pertes tardives sont très rares au cours des gestations naturelles, contrairement aux gestations de clones, surtout pour les clones issus de transfert nucléaire de cellules somatiques adultes. Il est reconnu que ces pertes tardives sont associées à un excès de poids foetal et un développement placentaire anormal: hydrallantoïde, hydramnios et placentomes œdémateux (Young *et al.* 1998).

La taille et le nombre de ces placentomes ont été observés chez 10 porteuses de clone présentant un hydrallantoïde, en comparaison avec quatre témoins (Allen *et al.* 2003): les placentomes des porteuses de clones étaient en nombre significativement réduit (68 ± 22 contre 96 ± 34) et de poids supérieur ($138,2 \pm 52,1g$ contre $64,6 \pm 36,5g$). De plus, le poids total des placentomes, malgré leur nombre réduit, était significativement plus élevé que chez les témoins ($9,3 \pm 3,8$ kg contre $5,5 \pm 2,1$ kg).

Ce phénomène rappelle celui de la croissance compensatrice des placentomes restant après l'ablation de certaines caroncules chez la brebis (Robinson *et al.* 1979). L'absence de reconnaissance des caroncules par l'allantochorion pourrait donc être à l'origine de cette anomalie. L'aspect et la taille des placentomes peuvent être observés par échographie transabdominale (Figures 11 et 12). L'autopsie de ces fœtus a révélé systématiquement un rapport entre le poids des organes et le poids corporel plus élevé que la normale pour les reins et le cœur et plus petit pour les poumons et la rate (Chavatte-Palmer *et al.* 2000).

Figure 11 :
Echographie de cotylédons normaux.



Figure 12 :
Echographie de cotylédons œdémateux.



La photo 2 (annexe 1) montre l'aspect macroscopique d'un cotylédon œdémateux prélevé lors d'une césarienne. Les images échographiques correspondantes étaient similaires à celle de la figure 12.

4. Les pertes néonatales.

Le poids de naissance de certains clones est très élevé. Ce surpoids est très variable: deux fois la normale de l'espèce n'est pas rare et on a trouvé un agneau dont le poids était cinq fois supérieur à la moyenne (Walker *et al.* 1996). Cet excès de croissance à l'origine de fréquentes

dystocies et les gestations associées souvent prolongées avec une mauvaise préparation de la mère porteuse à la mise bas impliquent, la plupart du temps, la pratique d'une césarienne. A la naissance le tableau clinique des clones est très variable. Si certains ne semblent présenter aucun trouble, des difficultés respiratoires, l'absence de réflexe de succion, des insuffisances cardiaques gauches, des morts subites ont souvent été décrites (Hill *et al.* 1999, Chavatte-Palmer *et al.* 2000), et des cas plus rares d'aplasie thymique (Renard *et al.* 1999), de malformations ont été également rencontrées. Chez certains veaux l'augmentation de la taille des vaisseaux ombilicaux impose une opération chirurgicale pour les ligaturer et les internaliser afin d'éviter les infections (Chavatte-Palmer *et al.* 2000) (voir annexe x). Des nouveau-nés hypothermiques, hypoglycémiques ou en sévère acidose métabolique et en hypoxie suggèrent une altération du métabolisme énergétique pouvant expliquer la faiblesse et la forte mortalité périnatale. Garry *et al.* (1996) pensent qu'une altération des échanges énergétiques fœto-placentaires *in utero* pourraient être à l'origine d'une croissance fœtale excessive et d'une mauvaise adaptabilité à la vie extra utérine.

5. Le syndrome du gros veau.

Le poids de naissance élevé étant un élément très frappant, les problèmes rencontrés dans les gestations de clones ont été regroupés sous le terme de syndrome du gros veau (Large Offspring Syndrom, LOS). Si ce syndrome regroupait au début principalement les problèmes de fin de gestation et de néonatalité, de plus en plus on s'interroge sur le lien pouvant exister avec les problèmes précoces de la gestation: pertes fœtales précoces et tardives ne font-elles pas partie du syndrome mais avec des phénotypes plus graves interdisant la poursuite de tout développement? Car si les problèmes rencontrés sont bien connus, leur origine reste particulièrement floue. Il faut aussi préciser que ce syndrome est également rencontré, dans des proportions moindres, chez les produits issus de fécondation *in vitro* (Behboodi *et al.* 1995, Walker *et al.* 1996, Young *et al.* 1998).

IV. LES CAUSES POTENTIELLES DES ANOMALIES RENCONTREES CHEZ LES CLONES.

Nous ne pouvons encore parler que de causes potentielles car, si les manipulations subies *in vitro* sont mises en causes avec certitude, ni l'influence exacte des différents paramètres, ni les mécanismes mis en jeu ne sont connus actuellement. En effet, l'incidence du syndrome du gros veau après manipulation d'embryons varie de 0 à presque 100% ; il apparaît de manière inconstante même entre deux études utilisant le même protocole ou, pour une même équipe, entre deux périodes différentes. Il est ainsi imprévisible, ponctuel et pleiotropique.

1. La culture *in vitro*.

On sait que l'exposition aux conditions de culture *in vitro* peut à elle seule perturber l'embryon car des embryons ovins produits *in vivo* après superovulation, récupérés et cultivés six jours *in vitro* présentent un poids moyen à 125 jours de gestation supérieur de 18 à 36 % à la moyenne, selon le système de culture utilisé (Sinclair *et al.* 1998).

Le point commun entre les évènements pouvant conduire au syndrome est l'exposition de l'ovocyte ou de l'embryon à un environnement inhabituel. La perturbation pourrait être engendrée soit par l'exposition de l'embryon à un facteur non présent normalement au stade de développement considéré, soit à un facteur présent mais à une autre concentration.

Les milieux de culture actuels utilisent des sérums, dont l'origine et la concentration varient, et/ou des systèmes de co-culture. Les nombreux composants de ces systèmes sont autant de facteurs susceptibles de perturber le développement embryonnaire. On pense ainsi aux facteurs de croissance présents dans les sérums et produits par les cellules de co-culture et pour lesquels les embryons possèdent des récepteurs. De nombreuses études ont montré leur rôle dans la prolifération cellulaire et le métabolisme des blastocystes en développement (Kaye 1997).

Une autre hypothèse est celle d'altérations du pH intracellulaire qui est un régulateur naturel de la croissance embryonnaire : des modifications subtiles du milieu de culture pourraient être suffisantes pour altérer la croissance embryonnaire puis fœtale par le biais de ce pH.

L'utilisation de SOF (synthetic oviductal fluid) en remplacement des sérums, en réduisant la fréquence du syndrome du gros veau de manière significative (Sinclair *et al.* 1997), a donné beaucoup d'espoir aux chercheurs. Mais, des anomalies ont malgré tout été rencontrées avec le SOF, accompagnées de rendements en blastocystes, de taux de gestation et de survie embryonnaire après congélation beaucoup plus faibles.

2. L'environnement utérin.

Dans la procédure de clonage, l'embryon est transféré dans l'utérus d'une receveuse synchronisée avec l'âge de l'embryon. Cependant, on sait que les embryons produits *in vitro* peuvent se développer à une vitesse différente de celle des embryons produits *in vivo* (van Wagendonk-de Leeuw *et al.* 2000). Ceci pourrait donc entraîner un transfert asynchrone de l'embryon cloné.

Or, il a été montré que le transfert asynchrone d'embryons ovins dans des receveuses à un stade plus avancé entraîne une croissance embryonnaire anormale (Wilmot et Sales 1981). De même, l'administration de progestérone pendant les premiers jours de gestation (J1 à J3) chez la brebis, en provoquant un développement plus rapide de l'utérus que de l'embryon, est suffisant pour diminuer nettement la survie embryonnaire et augmenter la masse fœtale à mi-gestation chez les fœtus survivants (Kleeman *et al.* 1994).

Le même phénomène se produit quand les brebis sont nourries avec un régime riche en urée : la perturbation de l'environnement utérin affecte probablement des voies de signalisation, les facteurs de croissance échangés entre l'embryon et l'endomètre maternel et pourrait résulter en un environnement enrichi en nutriments, favorisant ainsi la croissance embryonnaire (Barnes 2000). Un seuil subtil doit exister entre une stimulation produisant de gros embryons et des concentrations toxiques menant aux pertes embryonnaires et fœtales.

3. Les mutations génétiques: les mitochondries et les cellules somatiques adultes.

Le génome mitochondrial est dix fois plus susceptible de subir des mutations que l'ADN nucléaire et ces mutations pourraient mener à des désordres métaboliques puisque l'ADN mitochondrial code entre autres pour des enzymes impliquées dans la voie de synthèse des stéroïdes. Dans un processus normal de fécondation la cellule mâle apporte une centaine de mitochondries mais elles sont détruites rapidement et il ne reste que les 100 000 mitochondries ovocytaires d'origine maternelle. Pendant le clonage, les mitochondries de la cellule donneuse sont en petite quantité par rapport à celles de l'ovocyte mais elles persistent. Des mutations dans leur génome suivies d'une distribution hétérogène de ces mitochondries au cours des divisions cellulaires peuvent aboutir à des anomalies de la croissance embryonnaire (Smith *et al.* 2000, Chavatte-Palmer *et al.* 2000).

Les avortements tardifs, à plus de 200 jours de gestation, sont surtout rencontrés chez les clones dérivés de cellules adultes (6/37 dans l'étude de Kato *et al.* 2000). Ces avortements suggèrent un défaut d'expression des gènes nécessaires au développement fœtal tardif. La cause de ce taux d'avortement élevé pour les clones somatiques adultes n'est pas déterminée mais une piste proposée par Kato est la présence de mutations génétiques induites par les rayonnements UV, les cellules de peau et d'oreille étant particulièrement exposées : des modifications dans les gènes contrôlant la morphogenèse pourraient induire un risque élevé d'avortement ou d'anomalies.

Le degré de ploïdie des embryons produits par transfert nucléaire a été comparé à celui des embryons FIV par Booth *et al.* (2003). Ils n'ont ainsi trouvé que 26% d'embryons entièrement diploïdes mais une majorité de mixoploïdes (68%). Cette étude montre aussi que les erreurs de ploïdie sont étroitement liées à la qualité morphologique de l'embryon : par exemple les embryons à faible vitesse de croissance possèdent plus d'erreurs chromosomiques et, morphologiquement, ils ont moins de cellules que les autres, ce qui les classe comme de moindre qualité. Les embryons issus de transfert nucléaire classés comme de bonne qualité sont ainsi ceux qui possèdent le moins d'anomalies de ploïdie et, de plus, ils n'en possèdent pas plus que les embryons de bonne et d'excellente qualité produits par FIV.

Les embryons transplantés étant préalablement sélectionnés en fonction de leur qualité morphologique, seuls ceux qui ont le moins d'anomalies vont être choisis : les pertes embryonnaires et fœtales, plus importantes après transfert nucléaire qu'après FIV ne sont donc pas expliquées par une plus forte proportion de mixoploïdie.

4. L'empreinte parentale.

L'empreinte parentale correspond à la modification de l'expression de chaque allèle d'un gène en fonction de son origine paternelle ou maternelle : un gène soumis à l'empreinte maternelle ne verra s'exprimer que l'allèle d'origine maternelle. Il y a entre 100 et 1000 gènes soumis à l'empreinte dans le génome des mammifères et environ 40 ont été identifiés chez la souris et l'homme, la plupart jouant un rôle dans la croissance et le développement embryonnaire, fœtal ou placentaire, comme le montrent les exemples présentés dans le tableau XIII.

Tableau XIII :

Gènes soumis à l'empreinte qui peuvent jouer un rôle dans le développement fœtal.
(d'après Young et Fairburn 2000)

Gène	Fonction
U2af1	Facteur d'épissage de l'ARN
Peg 3	Protéine à doigts de zinc
P57 / Kip2	Régulateur du cycle cellulaire
Xist	Régulation du chromosome X
Peg 1 / Mest	Comportement maternel
Mash 2	Croissance du trophoblaste
Ins 2	Régulation du développement du sac vitellin
IGF2, H19, IGF2R	Croissance fœtale et développement

L'empreinte des gènes dépend de modifications épigénétiques de l'ADN sans modification de la séquence nucléotidique : la méthylation de résidus cytosines. Les méthylations se produisent au cours de la gamétogenèse ou l'embryogenèse et peuvent varier entre les tissus, les stades de développement et les espèces. C'est chez l'homme et la souris que ces phénomènes ont été le plus étudiés. Chez l'homme la surexpression d'IGF2 par la perte de l'empreinte entraîne un syndrome d'excès de développement, le syndrome de Beckwith-Wiedemann, caractérisé par une grande taille à la naissance, une surcroissance des organes, une macroglossie causant un polyhydramnios et une augmentation de la fréquence des tumeurs pendant l'enfance (Young et Fairburn 2000).

Chez 9 fœtus ovins sur 12 présentant le syndrome du gros veau, produits par FIV, Young *et al.* (2001) ont observé une déméthylation complète du gène IGF2r. D'autre part, Cézard *et al.* (2003) ont analysé le degré global de méthylation du génome de fœtus clones avortés, de fœtus clones dont le développement paraissait normal, de clones adultes, de fœtus issus de FIV et d'IA. Dans l'ensemble, le niveau de méthylation est plus faible chez les clones que chez les produits d'IA. Chez les deux tiers des fœtus clones avortés aucune méthylation n'était détectable. Les fœtus clones apparemment normaux présentaient tous un niveau de méthylation détectable, plus élevé que pour les avortés, mais moins important que pour les fœtus produits *in vivo*. L'absence de différence significative entre les groupes FIV et IA suggère que les altérations de l'épigénèse chez les clones soient liées au processus de clonage plus qu'au passage *in vitro*.

Si le rôle de l'épigénèse dans les fortes pertes et les anomalies de développement rencontrées dans le clonage est largement accepté, on ne connaît pas les mécanismes mis en jeu pour la reprogrammation de la cellule donneuse, différenciée, et donc pas de piste pour l'amélioration de ces étapes.

5. Le statut immunitaire.

Au cours d'une gestation normale, le premier trimestre voit le contact entre l'endomètre et l'allantochorion s'initier avec l'implantation vers la quatrième semaine de gestation, puis s'accroître de façon très importante avec le développement des microvillosités, des cotylédons et l'augmentation de la vascularisation.

Durant cette période et jusqu'au cinquième mois, le trophoblaste n'exprime pas de molécules du CMH-1 (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe 1) dont le rôle est de présenter à la surface des cellules des peptides provenant de la dégradation des molécules internes. De cette présentation découle la reconnaissance par les lymphocytes des cellules du soi ou du non-soi.

Hill *et al.* (2002) ont cherché à mettre en évidence si une incompatibilité immunologique pouvait être mise en cause dans les pertes précoces des gestations de clone, car elles surviennent principalement dans la période d'implantation. Pour cela, ils ont prélevé plusieurs échantillons de placenta (endomètre et allantochorion) des cotylédons et des zones intercotyledonnaires de la corne utérine gravide, chez huit porteuses de clone entre 34 et 63 jours de gestation et huit témoins dans les mêmes stades de gestation. Au moment de la récupération des placentas trois clones de 35 jours étaient morts depuis moins de trois jours (après la dernière vérification échographique) et un fœtus témoin également. L'évaluation du stade de gestation par la taille du fœtus a révélé des retards de croissance chez 4 des 6 clones de 35 jours.

Des analyses immunohistochimiques ont mis en évidence l'expression du CMH-1 par le trophoblaste de tous les clones de l'étude mais chez aucun des fœtus témoins. Le niveau de cette expression était maximum pour le clone présentant le plus grand retard de croissance, retrouvé mort, mais la relation entre le niveau d'expression et l'apparente viabilité du clone n'est pas retrouvée dans tous les cas. Les analyses de l'endomètre ont permis de quantifier la présence des lymphocytes CD3+, sous forme d'agrégats ou de cellules éparses. L'endomètre des porteuses de clones présentait un nombre d'agrégats de lymphocytes significativement plus important (dans près de 37% des champs observés) que pour les témoins (moins de 2% des champs) et ces agrégats étaient de plus grande taille (entre 200 et plusieurs milliers de lymphocytes pour ceux des porteuses de clone contre moins de 200 pour les témoins).

Le nombre accru de lymphocytes dans les gestations des clones et leur distribution dans l'endomètre suggèrent un recrutement actif en réponse à un stimulus antigénique fort. De plus, le nombre de lymphocytes était maximal au niveau de l'endomètre des gestations de clones qui s'étaient récemment interrompues, ce qui ne peut pas être relié à la mort fœtale en elle-même car on ne retrouve pas ce phénomène chez le fœtus témoin mort.

La conclusion de cette étude est qu'un défaut d'expression des gènes liés au CMH-1, probablement induit par le clonage, est probablement à l'origine d'une réaction immunitaire de l'endomètre, qui pourrait entraîner un défaut de fonctionnement trophique du placenta, avec pour conséquence un défaut de croissance fœtale voir une mort fœtale.

Une réserve émise par ces auteurs est l'utilisation, dans leur étude, d'embryons issus d'une unique lignée cellulaire : il faudrait ainsi vérifier que les résultats obtenus sont retrouvés avec d'autres génotypes.

En résumé, si aujourd'hui on sait donner naissance à des clones de fœtus et d'adultes de nombreuses espèces, tous les paramètres sont loin d'être connus et maîtrisés : le rôle du milieu de culture utilisé, les conséquences sur les phénomènes épigénétiques, sont des éléments reconnus du processus de clonage mais on ne sait pas prévoir, encore moins éviter, les trop nombreuses interruptions de gestation et le syndrome du gros veau.

Le faible taux de réussite et les anomalies fœtales rencontrées sont donc un obstacle important à l'application de ces techniques au monde agricole. Ce dernier n'est d'ailleurs pas prêt à accepter le clonage à visée reproductive et commerciale, toujours interdit par la législation actuelle.

III. PARTIE EXPERIMENTALE

L'Institut National de Recherche Agronomique possède une équipe de recherche travaillant sur le clonage depuis 1990. Elle est située au centre de Jouy-en-Josas, dans l'Unité Mixte de Recherche 1198 « Biologie du Développement et Reproduction ».

Les gestations sont suivies au sein de la ferme expérimentale de Bressonvilliers, qui comprend un troupeau laitier traditionnel de vaches Prim Holstein, utilisé pour des protocoles d'étude de la fécondité et du cycle ovarien, ainsi qu'un troupeau de génisses de races diverses utilisées comme porteuses d'embryons, produits par Fécondation In Vitro ou par clonage.

Un protocole de mesures sur les fœtus clones a été mis en place en deux temps : les contrôles échographiques en fin de gestation, par voie transabdominale ont été instaurés fin 1998, tandis que les mesures en début de gestation ont été décidées fin 2001. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les anomalies de gestation des clones.

L'analyse de l'ensemble de ces données, relevées de fin 1998 à début 2003, leur interprétation et l'évaluation des protocoles de l'INRA forment le sujet de cette thèse.

MATERIELS ET METHODES.

I. PRODUCTION DES EMBRYONS.

Tous les embryons ont été produits dans les laboratoires de l'INRA, à Jouy en Josas. Les protocoles étant détaillés dans certaines publications dont les références sont précisées, je n'en citerai ici que les points principaux pour m'attarder principalement sur ce qui fait l'objet de cette thèse, l'échographie.

1. Production des embryons clones.

Les clones étudiés ici sont issus de transfert nucléaire, de cellules somatiques adultes pour la plupart, de cellules somatiques fœtales pour certains (Heyman *et al.* 2002).

Cellules donneuses de noyau. Les cellules somatiques sont des fibroblastes. Elles sont prélevées par biopsies de peau de vaches Holstein du troupeau de l'INRA, ou prélevées sur un fœtus récupéré après abattage. Ces cellules, mises en culture (3 à 12 passages) peuvent être congelées et utilisées en temps voulu. Dans cette étude huit génotypes de cellules adultes sont représentés, dont trois étudiés en début de gestation, et toutes les cellules fœtales proviennent d'un même fœtus.

Préparation des ovocytes. Des ovaires de vaches provenant de deux abattoirs ont servi à la collecte d'ovocytes : après plusieurs lavages en solution saline, les complexes cumulus-ovocytes ont été aspirés des follicules de 2-6 mm, sélectionnés sur des critères morphologiques puis mis en maturation dans le milieu TCM 199 (Tissue Culture Medium 199, Sigma, St Louis, MO) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal, de 10µg de FSH (Stimufol, Merial, Lyon, France) et de 1µg de LH par millilitre, pendant 22 heures à 39°C.

Transfert nucléaire (Chesné *et al.* 1993). Après séparation des cellules du cumulus et passage en milieu de fixation de la chromatine, les ovocytes ont été énucléés par micromanipulation sous microscope inversé. L'énucléation était confirmée par l'observation immédiate de la plaque métaphasique et du globule polaire dans la pipette d'énucléation.

La cellule a alors été introduite sous la zone pellucide de l'ovocyte et la fusion a été déclenchée par électrostimulation (Vignon *et al.* 1998).

2. Production des témoins.

Les témoins choisis pour les mesures de début de gestation sont issus d'insémination artificielle. Les vaches sont des Prim'Holstein du troupeau laitier de l'exploitation de Bressonvilliers. La semence utilisée pour les inséminations artificielles provient de divers taureaux Holstein de haute valeur génétique.

Les témoins choisis pour les mesures de fin de gestation sont issus de Fécondation In Vitro, obtenus à partir des mêmes ovocytes maturés in vitro que les clones, mis en incubation avec des spermatozoïdes ayant subi la capacitation, pendant 18 heures (Revel *et al.* 1995).

II. TRANSFERT DES EMBRYONS.

Développement in vitro. Les embryons issus du transfert nucléaire et ceux issus de FIV ont été cultivés dans des conditions strictement identiques, dans le milieu B2 (CCD, Paris, France) supplémenté de 2,5% de sérum de veau fœtal, en coculture avec des cellules Vero. A J7 les embryons sont examinés et sélectionnés : ceux ayant atteint le stade blastocyste expansé sont transférés.

Receveuses. Les receveuses utilisées sont des génisses de race charolaise, normande, limousine, Maine-Anjou ou issues de différents croisements, transportées sur la ferme de Bressonvilliers à l'âge de 12-14 mois, après une mise en quarantaine prolongée et des analyses sérologiques répétées les certifiant indemnes des principales pathologies infectieuses bovines (brucellose, leucose, rhino-trachéite infectieuse, fièvre Q, chlamydie, néosporose, diarrhée virale bovine) ainsi que des vaccinations contre les virus RS et BVD, contre les chlamydias et un déparasitage interne et externe. L'observation des chaleurs, et si nécessaire des échographies ovariennes, permettaient de s'assurer de leur cyclicité, avant leur entrée dans les protocoles receveuses, vers 15-18 mois.

Synchronisation. Les cycles oestriques ont été synchronisés à l'intérieur d'un groupe de receveuses par la mise en place d'implants de progestagène durant 9 jours (Crestar® Intervet), associée à une injection de prostaglandine (2mL Estrumate® Schering-Plough Vétérinaire) 2 jours avant le retrait de l'implant. Après observation des chaleurs, les génisses synchronisées avec les embryons (\pm 24h) et portant un corps jaune palpable étaient sélectionnées pour le transfert.

Transfert. Le transfert des embryons s'est fait au stade blastocyste, à J7, J0 étant le jour de la fertilisation de l'ovocyte ou du transfert nucléaire. Le transfert des embryons se fait de manière non chirurgicale, dans la corne utérine ipsilatérale au corps jaune, sous anesthésie péridurale.

III. SUIVI DES GESTATIONS.

1. Progesteronémie.

Une prise de sang dans la veine caudale, sur tube hépariné, était effectuée à J21 (2 semaines après le transfert) sur chaque receveuse. Après centrifugation immédiate, le plasma était récupéré, congelé puis envoyé au laboratoire de l'INRA à Nouzilly afin de doser le taux de progestérone sanguin, par une méthode radioimmunologique. Les génisses étaient considérées comme vides si leur progestéronémie à 21 jours était inférieure à 1 ng /mL, et présumées gestantes s'il était supérieur à 2 ng /mL.

2. Echographies transrectales.

Les échographies transrectales ont été réalisées avec un échographe portatif (Ultrascan 9000, Alliance Medical Inc, 907 North Second Street Albemarle N.C. 28001) équipé d'une sonde linéaire de 5MHz. Les examens se font lorsque les animaux sont pris aux cornadis.

Le diagnostic de gestation était fait à J35, par échographie transrectale, par la visualisation de la vésicule embryonnaire et celle de l'embryon. Des contrôles échographiques étaient réalisés à J50, J70 et J90. A partir de fin 2001, pour les animaux rentrant dans cette étude, des images échographiques ont été enregistrées vers 50 et 64 jours de gestation. Le choix de ces stades a été motivé par la volonté de visualiser le plus tôt possible les placentomes, et d'obtenir des images aux mêmes stades que les abattages, réalisés pour récupérer des fœtus entre 60 et 64 jours de gestation. L'objectif étant d'évaluer la longueur du fœtus, les images recherchées étaient des coupes longitudinales.

3. Echographies transabdominales.

Pour observer le fœtus après 150 jours et apprécier le déroulement de la gestation, c'est par voie transabdominale qu'ont été prises les images échographiques. L'appareil utilisé est un échographe portatif (Starvet 3, Hospimedi, 42 Bis rue de l'Europe 60149 Saint Crépin Ibouvillers) muni d'une sonde linéaire de 3.5 MHz. Les examens se sont fait dans une salle équipée de stalles à bas-flanc mobile pour faciliter les manipulations et assurer la sécurité de l'opérateur (voir photo 5 en annexe 1).

L'animal était tondu en région abdominale, du processus xiphoïde à la mamelle et d'un travers de main à gauche de la ligne blanche à mi-hauteur du flanc droit. Les examens étant réalisés tous les 15 jours en moyenne, la tonte se faisait une fois sur deux. Le contact avec la sonde était réalisé avec de l'alcool.

Au cours de ce suivi, la taille des placentomes était évaluée grâce à leur surface, mesurée sur image arrêtée. Quatre des plus gros placentomes observés étaient ainsi mesurés, généralement près de la mamelle. Au début de l'étude, les manipulateurs différenciaient les placentomes vus près de la mamelle de ceux situés au niveau du flanc, mais une étude statistique n'a pas montré de différence significative entre les deux groupes.

Outre les placentomes, les données recueillies étaient la fréquence cardiaque fœtale, mesurée sur 15 secondes minimum et le diamètre aortique mesuré au plus près du cœur pour avoir son diamètre le plus large. Ces mesures ne sont possibles que lorsque la position du fœtus permet de visualiser le cœur. En fonction des images obtenues, d'autres paramètres ont pu être observés tels que le diamètre des vaisseaux ombilicaux, l'épaisseur placentaire, mais ils n'ont pas été relevés assez souvent que pour pouvoir les exploiter de manière statistique.

Des observations non chiffrées étaient également notées, telles que la présence d'images d'œdème au niveau des placentomes, l'aspect et le volume des liquides fœtaux. Ces dernières données sont très subjectives : l'aspect des liquides évolue physiologiquement au cours de la gestation, le volume apparent de liquide (épaisseur entre le fœtus et la paroi utérine) varie en fonction de l'endroit observé...

IV. VELAGES.

En raison de la mauvaise préparation au vêlage des porteuses de clone, de la durée de gestation souvent allongée et des risques importants de dystocies liés à l'excès de poids des clones, une césarienne a été systématiquement prévue vers 282 jours de gestation. En fonction de l'évolution des images échographiques, certaines césariennes ont été avancées de quelques jours voire d'une semaine. Les interventions étaient pratiquées par le Dr Lefol ou le Dr Couderc, vétérinaires praticiens à Egly (78). Seuls quatre clones sont nés naturellement avant 282 jours de gestation.

Dès leur sortie de l'utérus, les veaux ont été suspendus par les postérieurs quelques minutes (photo 3 en annexe 1), réanimés si nécessaires puis séchés avec des serviettes éponge. Certains ont subi rapidement une opération pour ligaturer des vaisseaux ombilicaux trop gros (photo 4 en annexe 1). Pesés puis mis sous lampe à infra-rouge si leur température corporelle descendait en dessous de 38°C, on leur a donné 2 litres de colostrum au biberon dans l'heure qui suivait leur naissance. Le colostrum utilisé était issu du troupeau laitier, congelé en prévision de ces naissances.

Un protocole de suivi des veaux était ensuite appliqué, comprenant des relevés de température corporelle biquotidiens, la quantification précise des buvées, des pesées et des analyses sanguines et urinaires pour d'autres protocoles de recherche.

V. TRAITEMENT DES DONNEES.

1. Images de début de gestation.

Pour chaque gestation rentrant dans l'étude, des images échographiques à J50 et J64 ont été enregistrées. Ces images ont été traitées à l'aide du logiciel Perfect Image (Clara-Vision - 72, Rue de Paris - 91400 Orsay). Ce logiciel permet de réaliser des mesures de droites, dessinées entre deux points de l'image échographique. Ces mesures sont ensuite enregistrées sous forme de tableau Excel. L'image sur laquelle sont dessinées les droites correspondant aux mesures, avec leur indication chiffrée, sont enregistrées avec une fiche d'information permettant de les retrouver grâce à certains paramètres : numéro de la vache, stade de gestation, type de mesure....

Sont ainsi mesurés :

- La longueur tête-queue : de l'extrémité de la tête à la base de la queue.
- La longueur cou-queue : de la base de la queue à la base de la tête.
- La longueur de la tête : du sommet de la tête à sa base.
- Le diamètre orbitaire.
- La longueur et la largeur d'un placentome.
- La largeur de la vésicule embryonnaire.

Un exemple de ces mesures est proposé par la photo 6 annexe 1.

Pour vérifier la validité des mesures effectuées, un test complémentaire a été fait : dix films échographiques de gestations comprises entre 55 et 75 jours ont été réalisés, et pour chaque film des images ont été sélectionnées pour permettre la réalisation de dix mesures de quatre paramètres : la longueur de la tête, la longueur cou-queue, mais aussi le diamètre bipariétal et le diamètre abdominal. Le but était de vérifier la répétabilité des mesures effectuées entre deux opérateurs (Patrice Laigre et moi-même), qui ont réalisé ces mesures en aveugle. La répétabilité des mesures de diamètre bipariétal et de diamètre abdominal, qui ne font pas partie du protocole initial, a aussi été testée en vue de leur utilisation dans des protocoles ultérieurs.

2. Données de fin de gestation.

Les données de chaque échographie transabdominale étaient relevées sur une fiche type (cf annexe 2). Les observations n'étant pas réalisées à des stades de gestation fixes, pour permettre leur comparaison, elles ont été réparties en classes de quinze jours de la manière suivante :

120-134 jours = 4 mois
135-149 jours = 4.5 mois
150-164 jours = 5 mois
165-179 jours = 5.5 mois
180-194 jours = 6 mois
195-209 jours = 6.5 mois
210-224 jours = 7 mois
225-239 jours = 7.5 mois
240-254 jours = 8 mois
255-269 jours = 8.5 mois
270-284 jours = 9 mois

Les données qualitatives sur l'aspect des placentomes et des liquides fœtaux ont été traduites en valeur semi-quantitative, par une note de 1 à 3 selon les critères suivants :

Placentomes :

note 1 = léger œdème sur certains placentomes.

note 2 = œdème léger sur l'ensemble des placentomes, placentomes un peu plus échogènes que la normale.

note 3 = œdème important sur l'ensemble des placentomes, placentomes nettement plus échogènes que la normale.

Liquides fœtaux :

note 1 = quelques particules échogènes dans les liquides fœtaux.

note 2 = nombreuses particules échogènes dans les liquides fœtaux, liquides en quantité un peu plus importante que la normale, gênant la visualisation du fœtus par endroits.

note 3 = aspect de l'ensemble des liquides fœtaux très échogène, liquides en très grande quantité, empêchant la visualisation du fœtus.

3. Formation des lots.

Les vaches ont été classées selon :

- l'origine de leur fœtus : insémination artificielle, fécondation in vitro, transfert embryonnaire en frais, transfert nucléaire de cellule somatique fœtale, transfert nucléaire de cellule somatique adulte.
- le devenir de leur gestation : avortement, abattage après diagnostic d'hydropisie des annexes fœtales, naissance d'un veau mort avant une semaine d'âge, naissance d'un veau mort après une semaine d'âge, naissance d'un veau en bonne santé et encore en vie (ou abattu pour les recherches après plusieurs mois d'âge, sans aucun signe de problème).

Les tableaux XIV et XV résument les types d'embryons contenus dans les différents groupes du protocole.

Tableau XIV : Composition des groupes « Clones » et « Témoins » pour les mesures de début de gestation.

Groupe	Type d'embryon	Nombre de génotypes (clones)	Nombre d'embryons
Clones	Clone Somatique Adulte	3	35
Clones	Clone Somatique Fœtal		0
Témoins	Fécondation In Vitro		4
Témoins	Transfert Embryonnaire		0
Témoins	Insémination Artificielle		32

Tableau XV : Composition des groupes « Clones » et « Témoins » pour les mesures de fin de gestation.

Groupe	Type d'embryon	Nombre de génotypes(clones)	Nombre d'embryons
Clones	Clone Somatique Adulte	8	63
Clones	Clone Somatique Fœtal	2	9
Témoins	Fécondation In Vitro		12
Témoins	Transfert Embryonnaire		4
Témoins	Insémination Artificielle		0

L'annexe 3 présente l'ensemble des animaux inclus dans le protocole, excepté les gestations issues d'IA, et les données les concernant : type d'embryon, date de transfert, lot de devenir, type de mesures effectuées...

4. Etudes statistiques.

Toutes ces données ont été saisies dans un tableau Excel. Pour permettre l'analyse statistique, ce tableau a été transféré dans le logiciel de statistique SAS (SAS Institute GmbH-P.O.Box 105340-Neuenheimer Landstr. 28-30-D-69043 Heidelberg-Germany). Les comparaisons des données pour deux classes d'animaux ont été réalisées par les tests de Fischer (test F) et de Student (test T), celles prenant en compte plus de deux catégories d'animaux par l'analyse non orthogonale de variance ou test ANOVA. Dans chaque cas les moyennes, écarts-type et degré de signification du test sont précisés.

L'analyse des mesures de validation a été réalisée par un test GLM (General Linear Models), avec une analyse de variance de mesures répétées.

RESULTATS

I. FORMATION DES LOTS DEFINITIFS.

1. Comparaison des lots de témoins.

Pour les mesures de fin de gestation 12 fœtus issus de Fécondation In Vitro (FIV) et 4 fœtus issus de Transfert Embryonnaire direct (TE) forment les témoins. Pour les mesures de début de gestation, des fœtus issus d'Insémination Artificielle (IA) et quelques fœtus issus de FIV sont pris comme témoins.

La comparaison de ses différents lots de témoins, par une analyse de variance, n'a montré aucune différence significative. Le détail de cette analyse est présenté dans le tableau XVI. L'ensemble des témoins a donc été rassemblé dans un même groupe, nommé « Témoins ».

2. Comparaison des lots de clones.

Une gestation de clone somatique adulte a été retirée de l'étude à cause de son caractère gémeilaire rendant les mesures effectuées imprécises ne sachant pas quel fœtus est observé. De plus, la gémeilité influence la croissance des fœtus de manière indéterminée.

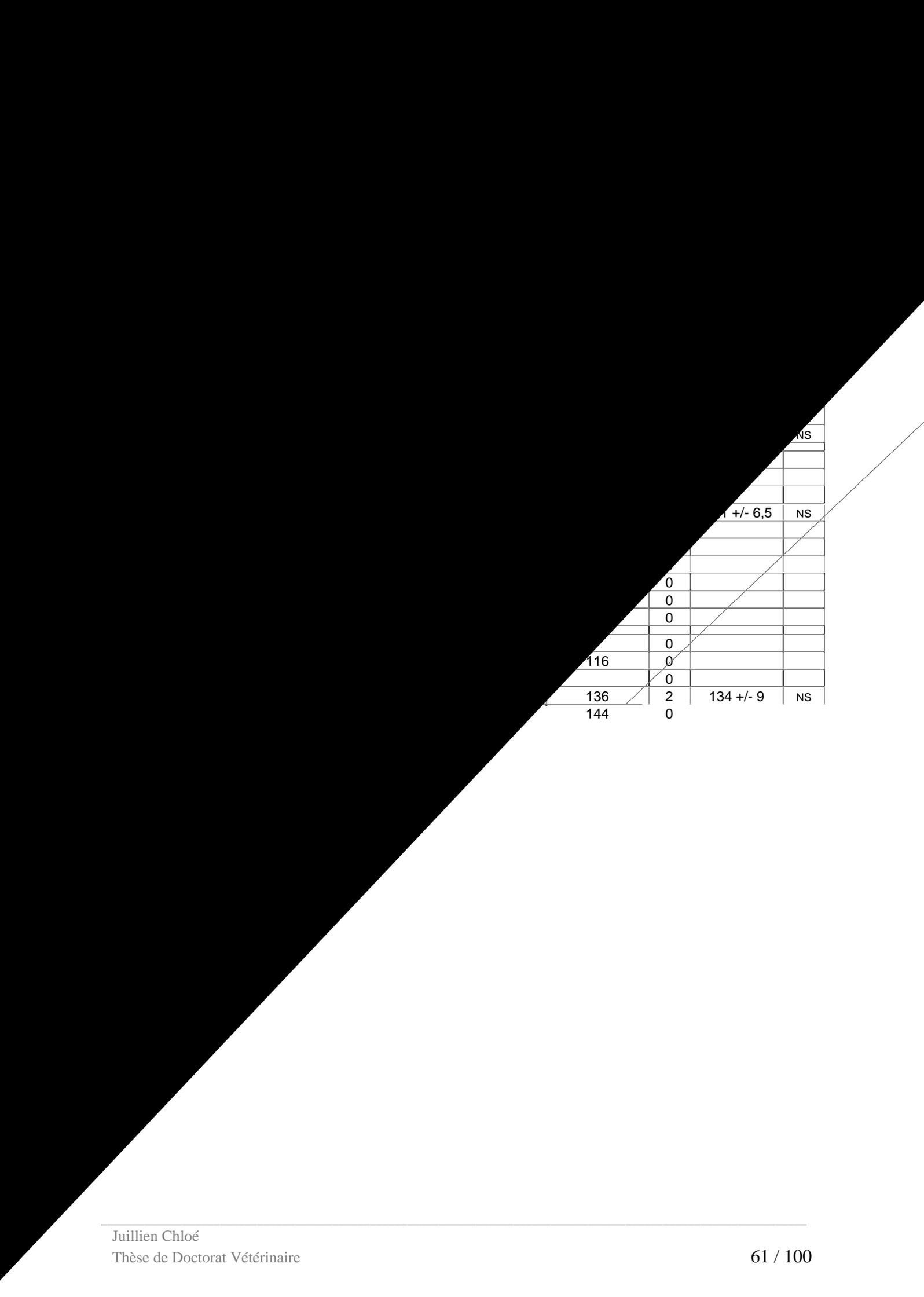
Parmi les 72 gestations de clones somatiques restantes, 9 sont issues de cellules somatiques fœtales, les autres proviennent de cellules adultes. La comparaison entre ces deux origines de clones, réalisée par un test T dont les résultats sont présentés dans le tableau XVII, ne montre pas de différence significative. Un seul lot de clones a donc été comparé au groupe témoin dans le reste de l'étude.

3. Cas des avortements à plus de 150 jours de gestation.

L'absence de précision, dans les registres des évènements de gestation, sur 12 avortements survenus après 150 jours de gestation pose le problème de leur intégration dans un groupe à part ou dans le groupe des hydropsies, cause principale des avortements très tardifs chez les clones. La comparaison avec ce dernier groupe, présentée dans le tableau XVIII, n'a montré aucune différence significative et ils ont donc été inclus dans le lot des hydropsies.

4. Cas des mesures effectuées à 54 jours de gestation.

Les mesures de début de gestation des clones n'ont pas toujours été réalisées à date fixe : pour le stade 50 jours, des mesures ont été prises entre 50 et 54 jours de gestation, pour le stade 64 jours, elles ont été prises à 63 et 64 jours. Les différences observées pour le stade 50 jours paraissant très importantes, deux groupes ont été formés, l'un pour les 50 à 52 jours, l'autre pour les 53 et 54 jours. La comparaison de ces deux groupes, par un test T, présentée dans le tableau XIX, a révélé des différences très significatives en ce qui concerne les longueurs tête-queue et cou-queue. Pour les 8 gestations concernées les mesures pour le stade 50 jours faites à 53 ou 54 jours ne sont donc pas prises en comptes pour les analyses suivantes.



				NS
			1 +/- 6,5	NS
			0	
			0	
			0	
			0	
			0	
	116		0	
			0	
	136	2	134 +/- 9	NS
	144	0		

Tableau XVII : Comparaison des mesures entre clones d'origine fœtale (TNF) et adulte (TNA).

Variable	N	TNF	N	TNA	P
Poids de naissance	7	45,3 +/- 10,0	34	50,0 +/- 10,7	NS
Longueur tête-queue 50j	0		19	31,8 +/- 5,6	
Longueur cou-queue 50j	0		22	21,7 +/- 4,7	
Longueur tête 50j	0		19	13,6 +/- 2,7	
Longueur tête + corps 50j	0		19	35,2 +/- 6,4	

Tableau XVIII : Comparaison des mesures entre avortements > 150 jours et hydropisie.

Variable	N	Avortement > 150 j	N	Hydropisie	P	P
Poids de naissance						

Tableau XIX : Comparaison des mesures effectuées à 50 et 54 jours.

Variable	N	50 jours	N	54 jours	P	P
Longueur tête-queue	19	31,8 +/- 5,6	8	42,1 +/- 7,0	**	0,0005

Tableau xx : Comparaison de mesures entre clones et témoins.

Variable	N	Clones	N	Témoins	P	P	
Poids de naissance	41	49,2 +/- 10,6	16	44,8 +/- 6,0	NS	0,12	
Longueur tête-queue 50j	19	31,8 +/- 5,6	32	36,0 +/- 4,6	**	0,005	C<T
Longueur cou-queue 50j	22	21,7 +/- 4,7	32	23,0 +/- 4,3	NS	0,31	
Longueur tête 50j	19	13,6 +/- 2,7	32	15,5 +/- 2,2	**	0,009	C<T
Longueur tête + corps 50j	19	35,2 +/- 6,4	32	38,5 +/- 5,9	NS	0,07	
Diamètre orbitaire 50j	6	2,0 +/- 0,7	11	3,0 +/- 1,3	NS	0,13	
Diamètre placentome 50j	12	8,3 +/- 2,9	7	8,3 +/- 1,4	NS	0,95	
Hauteur placentome 50j	12	4,8 +/- 1,5	7	7,2 +/- 1,7	**	0,005	C<T
Diamètre vésicule 50j	22	32,2 +/- 7,1	32	33,7 +/- 9,3	NS	0,52	

Tableau XXI : Evaluation de l'âge des fœtus selon les équations de la littérature.

Stade réel de gestation	Données	Clones	Témoins
50 jours	longueur fœtale moyenne	35.2 mm	38.5 mm
	âge évalué par l'équation 1	53.7 jours	55.4 jours
	âge évalué par l'équation 2	48.1 jours	49.7 jours
64 jours	longueur fœtale moyenne	53.4 mm	71.8 mm
	âge évalué par l'équation 1	62.0 jours	67.9 jours
	âge évalué par l'équation 2	56.8 jours	64.4 jours

Equation 1 : Hugues *et al.* 1989 ; Equation 2 : Kahn 1989.

Tableau XXII : Comparaison des croissances de 50 à 64 jours entre clones et témoins.

Variable	N	Clones	N	Témoins	P
Longueur fœtale	12	20,81 + 11,20	24	35,05 + 9,42	*
Largeur vésicule	12	8,18 + 8,12	25	9,58 + 12,81	NS

Fréquence cardiaque 4,5 mois	0		2	138 +/- 13	0		0		0			
Fréquence cardiaque 5 mois	0		0		0		0		0			
Fréquence cardiaque 5,5 mois	0		1	125	0		0		0			
Fréquence cardiaque 6 mois	0		1	135	0		0		1	123		
Fréquence cardiaque 6,5 mois	0		2	125 +/- 1	0		0		3	107 +/- 33	ns	0,51
Fréquence cardiaque 7 mois	0		2	122 +/- 5	3	125 +/- 6	1	138	5	113 +/- 13	ns	0,19
Fréquence cardiaque 7,5 mois	0		2	125 +/- 10	3	124 +/- 4	2	117 +/- 4	10	126 +/- 12	ns	0,78
Fréquence cardiaque 8 mois	0		0		1	116	4	124 +/- 7	9	119 +/- 7	ns	0,37
Fréquence cardiaque 8,5 mois	0		0		2	108 +/- 19	0		5	115 +/- 4	ns	0,42
Fréquence cardiaque 9 mois	0		0		1	112	0		3	115 +/- 9	ns	0,79
Diamètre aortique 4,5 mois	0		1	0,7	0		0		0			
Diamètre aortique 5 mois	0		0		0		0		0			
Diamètre aortique 5,5 mois	0		1	1,1	0		0		0			
Diamètre aortique 6 mois	0		1	1,6	0		0		1	1		
Diamètre aortique 6,5 mois	0		2	1,3 +/- 0,2	0		0		3	1,5 +/- 0,1	ns	0,29
Diamètre aortique 7 mois	0		1	1,7	3	1,6 +/- 0,2	1	1,8	4	1,9 +/- 0,2	ns	0,57
Diamètre aortique 7,5 mois	0		2	1,7 +/- 0,1	2	1,7 +/- 0,1	2	1,6 +/- 0,1	9	1,8 +/- 0,3	ns	0,90
Diamètre aortique 8 mois	0		0		0		3	1,8 +/- 0,2^a	8	2,0 +/- 0,1^b	*	0,03
Diamètre aortique 8,5 mois	0		0		2	1,9 +/- 0,0	2	1,9 +/- 0,1	5	2,0 +/- 0,2	ns	0,58
Diamètre aortique 9 mois	0		0		2	1,9 +/- 0,6	0		2	2,1 +/- 0,1	ns	0,60
Epaisseur placentaire 4,5 mois	0		0		0		0		0			
Epaisseur placentaire 5 mois	0		0		0		0		0			
Epaisseur placentaire 5,5 mois	0		0		0		0		0			
Epaisseur placentaire 6 mois	0		0		0		0		0			
Epaisseur placentaire 6,5 mois	0		0		0		0		0			
Epaisseur placentaire 7 mois	0		1	1,5	1	0,9	0		1	2		
Epaisseur placentaire 7,5 mois	0		2	0,9 +/- 0,2	1	1,2	0		2	1,0 +/- 0,0	ns	0,51
Epaisseur placentaire 8 mois	0		0		0		0		2	1,1 +/- 0,0		
Epaisseur placentaire 8,5 mois	0		0		0		1	0,9	3	1,3 +/- 0,3	ns	0,37
Epaisseur placentaire 9 mois	0		0		0		0		0			

^a et ^b indiquent que les deux groupes sont significativement différents.

V. VALIDATION DES MESURES.

L'analyse statistique des mesures réalisées pour valider la technique (tableau XXIV) montre que la variabilité due à l'opérateur ne représente qu'une faible part de la variabilité totale de ces mesures. La mesure la plus répétable est le diamètre abdominal (0,35%) tandis que la moins répétable est la longueur de la tête (3,96%).

Tableau XXIV :
Part de variabilité des mesures due à l'opérateur.

Type de mesure	Variabilité due à l'opérateur (en % de la variabilité totale)
Longueur de la tête	3,96
Longueur du corps	0,73
Diamètre abdominal	0,35
Diamètre bipariétal	0,99

L'analyse de variance de mesures répétées permet de calculer la variabilité inter-opérateurs. Les résultats sont présentés dans le tableau XXV.

Tableau XXV : Résultats de l'analyse de variance de mesures répétées.

Variable	P	P
Longueur du corps	0.2066	NS
Longueur de la tête	0.1565	NS
Diamètre abdominal	0.6152	NS
Diamètre bipariétal	0.4363	NS

DISCUSSION

I. FORMATION DES LOTS DEFINITIFS.

Le syndrome du gros veau est associé, dans la littérature, à la fécondation in vitro et au clonage. Au sein de l'INRA, aucun produit issu de fécondation in vitro n'a présenté ce syndrome, rencontré ici uniquement chez les clones. L'hypothèse pour expliquer ceci est l'utilisation d'un faible taux de sérum (2.5%) et de cellules Vero (et non de cellules d'oviductes) pour les systèmes de culture des cellules et embryons.

L'intérêt d'utiliser des produits de FIV comme témoins est de réduire la différence entre témoins et clones uniquement au processus de clonage, puisque les conditions de maturation des ovocytes et de mise en culture des embryons sont les mêmes.

Données de début de gestation :

Les données recueillies en début de gestation sont suffisantes pour obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Cependant quelques difficultés dans la mise en place du protocole ont été rencontrées :

- La dispersion des prises de mesures sur quatre jours au lieu d'un stade fixe, a fait perdre des informations. En effet la croissance est telle en début de gestation, que même un faible écart influence beaucoup les mesures effectuées.
- Des problèmes techniques ont également limité le nombre de mesures : l'acquisition d'une image exploitable sans manipulation prolongée est parfois délicate. De plus l'enregistrement d'une unique image pour réaliser l'ensemble des mesures était parfois insuffisant et certaines données n'ont pu être mesurées. On espère qu'avec l'expérience ce problème deviendra de moins en moins fréquent.

Données de fin de gestation :

Le problème rencontré ici est le nombre réduit de fécondations in vitro réalisées et donc utilisables, car cela ne correspond pas à l'objectif de recherche du laboratoire. Ainsi, le faible nombre de témoins en fin de gestation, aggravé par l'étalement des mesures réalisées, rend difficile l'analyse statistique des résultats.

Pour optimiser la présence de ces témoins, il aurait fallu réaliser une série de mesures pour chaque intervalle, donc tous les quinze jours. Une autre option, choisie pour le début de gestation, est d'utiliser des produits d'insémination artificielle. Avec le troupeau laitier de l'exploitation, le nombre de gestations disponibles est important. L'écart entre les origines est plus grand et on ne peut pas séparer les effets du clonage de ceux des procédés de culture, mais un nombre d'animaux plus important augmente la puissance statistique des tests.

Le choix d'intégrer les avortements qui ont eu lieu après 150 jours de gestation dans le lot des hydropisies se base sur la conviction qu'après 150 jours l'avortement est lié au syndrome du gros veau.

En effet, ces avortements ont en général eu lieu à un moment éloigné de l'échographie précédente et ils n'ont pas été observés, ce qui pose un problème de diagnostic. La cause la plus fréquente d'avortement très tardif chez les clones étant l'hydropisie des annexes fœtales, nous avons testé l'hypothèse de non-différence entre ces animaux et ceux présentant une pathologie identifiée d'hydropisie. Les incertitudes générées par ces animaux soulignent bien l'apport indispensable des relevés systématiques d'informations et de diagnostic pour tous les événements au cours d'un protocole de recherche.

L'étalement des gestations sur plus de quatre années, avec un flux d'animaux faible, et les objectifs qui ont évolués au fur à mesure, ont rendus les prises de mesures régulières difficiles.

Les données manquantes au cours des gestations sont nombreuses. De même, le manque de régularité dans la réalisation des échographies transabdominales, notamment lorsque tout paraît bien se dérouler, associé au nombre insuffisant de témoins handicapent réellement les analyses statistiques.

II. COMPARAISON CLONES ET TEMOINS.

Il existe très peu de données de mesures sur des clones. Les possibilités de comparaison des résultats obtenus dans cette étude sont donc limitées, et les travaux sur la fécondation in vitro seront la principale référence.

Dans notre étude, les clones sont plus petits que les témoins, à 50 et 64 jours de gestation.

Ceci est en accord avec les résultats de De Sousa *et al.* (2000) qui, en étudiant l'aspect d'embryons ovins à 35 jours, ont trouvé près de deux tiers des clones avec un retard de développement.

Si l'on compare nos résultats avec ceux d'études ayant utilisé le même type de milieu de culture (ajout de sérum de veau fœtal), on trouve une grande concordance : Bertolini *et al.* (2002) ont démontré que les embryons produits in vitro étaient plus petits que ceux produits in vivo, pour les stades 37 à 58 jours de gestation, mais que la différence s'effaçait de 65 à 93 jours.

Par contre, dans des études sur des gestations de clones (Pace *et al.* 2002) ou de fœtus produits in vitro (Breukelman *et al.* 2003), et utilisant un milieu de culture sans sérum, aucune différence pour des stades précoces n'a été relevée.

Ces données sont en accord avec les études prouvant que l'utilisation de sérum de veau fœtal dans le milieu de culture des embryons peut perturber le schéma de développement de l'embryon puis du fœtus. Pour améliorer les résultats du clonage à l'INRA, il est prévu, lorsque les thèses en cours utilisant les systèmes de culture actuels, seront achevées, de passer à un système de maturation séquentielle de Menezo (ISM), sans sérum.

La comparaison des croissances sur les quinze jours séparant les deux mesures montre que la croissance des clones est moins importante que celle des témoins. Cela est confirmé par les différents abaques sur l'évaluation de l'âge des fœtus, car la différence entre clones et témoins s'accroît en quinze jours d'intervalle : 2 jours d'écart à J50 contre 6 à 8 jours à J64.

Si les deux équations utilisées (Hugues *et al.* 1989, Kahn 1989) donnent des écarts comparables, l'évaluation de l'âge diffère un peu et montre la difficulté d'avoir une référence adéquate. Ici, l'équation provenant de mesures sur des vaches de race Simmentale correspond très largement aux mesures obtenues sur les animaux témoins de race Holstein, utilisés dans cette étude.

Même si le poids de naissance des clones n'est pas, dans notre étude, significativement supérieur à celui des témoins, il est reconnu que les clones sont dans l'ensemble plus gros que les non-clones à la naissance. L'association d'un défaut de croissance en début de gestation puis d'un excès en fin de gestation montre que l'ensemble des processus de régulation de la croissance fœtale peut être modifié par les manipulations *in vitro* et le clonage.

Différents articles évoquent un défaut de vascularisation et de développement du placenta des clones (De Sousa *et al.* 2000, Hill *et al.* 2000). Ici, nous trouvons un schéma de développement des cotylédons différent : le diamètre des placentomes visibles n'est pas différent de celui des témoins mais leur épaisseur semble réduite. On peut penser que le contact fœto-maternel est ainsi restreint et que les échanges sont perturbés. La faible épaisseur des placentomes des clones est en accord avec les résultats de Bertolini *et al.* (2002) qui ont comparé les dimensions des placentomes d'embryons produits *in vitro* à ceux d'embryons produits *in vivo* : après 51 jours le groupe *in vitro* présentait des placentomes de diamètre supérieur et après 72 jours une épaisseur inférieure à ceux du groupe *in vivo*.

De même, l'épaisseur utero-placentaire plus faible chez les clones en fin de gestation peut être un autre élément de ce développement placentaire anormal, mais ceci reste à confirmer du fait du faible nombre de mesures et de l'absence de localisation déterminée pour leur réalisation.

La recherche des placentomes n'a pas été réalisée pour chaque échographie de début de gestation, pour ne pas augmenter le temps de manipulation. Avec les données que nous avons, nous ne pouvons donc savoir si le nombre de placentomes visibles autour du fœtus est moindre pour les clones en début de gestation, comme cela est montré en fin de gestation dans les cas d'hydropisie (Allen *et al.* 2003). Au cours de gestations normales d'embryons produits *in vitro* le nombre de placentomes semble également réduit, 21% de moins en moyenne que pour des embryons produits *in vivo* (Bertolini 2002).

III. INTERET DIAGNOSTIQUE.

Sur les neuf abattages ayant suivi un diagnostic échographique d'hydropisie, huit se sont trouvés justifiés par la confirmation du diagnostic à posteriori. Le cas restant n'est pas expliqué, les images échographiques ne paraissaient pas équivoques et le diagnostic a été établi après plusieurs examens à la même conclusion. Un autre cas vient s'ajouter à cette interrogation, celui d'une gestation présentant des images inquiétantes d'œdème et d'hyperéchogénicité des placentomes en fin de gestation, ce qui a entraîné la décision d'avancer la césarienne d'une semaine. Mais, lors de l'intervention le placenta est apparu normal, aucun œdème n'a été décelé, la génopie était en parfaite santé, pesait 46 kg.

La fiabilité du diagnostic échographique n'a, à notre connaissance, encore jamais été remise en cause dans ce domaine. La présence de plusieurs observateurs, dont les manipulateurs habituels, lors des échographies de ces deux vaches laissent peu de place à l'erreur d'inattention ou à la confusion entre deux vaches. Aucune explication n'a été trouvée jusqu'ici. L'intérêt diagnostique de l'échographie transabdominale pour l'hydropisie reste cependant indiscutable, malgré ces deux erreurs.

IV. INTERET PRONOSTIQUE.

Aucune des mesures objectives réalisées, tant en début qu'en fin de gestation, ne permet d'établir un pronostic sur la poursuite de la gestation et le devenir du produit.

La différence significative sur la largeur de la vésicule à 50 jours entre le groupe des avortements et celui des veaux en vie est intéressante car elle pourrait être un signe précoce de l'avortement à venir, cependant cette différence n'est pas retrouvée à 64 jours, alors qu'elle aurait dû s'accroître. Il est intéressant de noter que c'est également au stade de 50 jours qu'il a été montré un taux de PSP60 maternelle élevée chez les clones pathologiques (Heyman *et al.* 2002). D'autres recherches, échographiques et biologiques, plus approfondies à cette période pourraient peut-être apporter des éléments de pronostic.

Les seuls paramètres intervenant dans le diagnostic d'hydropisie étant subjectifs (aspect des placentomes et des liquides fœtaux), il paraît intéressant de voir s'ils ont également un caractère pronostique : si des valeurs extrêmes correspondent à un diagnostic d'hydropisie, quelle est l'évolution de valeurs intermédiaires ?

La transformation des observations concernant l'aspect des placentomes et des liquides fœtaux en note, de 0 à 3, avait pour but d'évaluer le lien pouvant exister entre ces observations et le devenir de la gestation, pour essayer de leur donner une valeur prédictive. Cela n'a pu être réalisé pour diverses raisons : de nombreuses fiches échographiques ne présentent aucune observation, ne permettant pas de savoir si tout était normal ou si ce qui a été vu n'a pas été indiqué ; certaines vaches ayant été abattues, donc ayant eu un diagnostic échographique d'hydropisie n'ont aucun commentaire sur leur fiche ; plusieurs personnes ont réalisé ces échographies, ne transcrivant pas leurs observations de la même manière ; le classement des avortements à plus de 150 jours dans les hydropisies, en l'absence de diagnostic.

Pour rendre cette évaluation possible, il faudrait introduire dans le compte-rendu une classification précise des images d'œdème et d'échogénicité des placentomes et des liquides fœtaux, et s'en servir à chaque examen.

V. VALIDATION DES MESURES.

La réalisation d'un test personnel de validation des mesures réalisées a permis de montrer que la répétabilité intra-opérateur des mesures est très bonne (variabilité due à l'opérateur inférieure à 4% de la variabilité totale). Ceci signifie que le fait de ne réaliser qu'une seule mesure est valable et que prendre en compte une moyenne de plusieurs mesures, comme dans certains protocoles, n'apporte pas une précision supplémentaire importante, justifiant le surplus de travail.

De plus, la répétabilité inter-opérateurs est également bonne, puisque les différences entre opérateurs sont non significatives. Il est évident que la réalisation des mesures par un même opérateur apporte une précision appréciable. Le problème est l'inscription dans la durée de certains protocoles, principalement ceux concernant des gestations de grands animaux : cette étude montre que le changement d'opérateur en cours d'un protocole comme celui-ci, si des règles de mesures précises sont suivies, est possible sans entacher d'erreur les résultats obtenus. Notons tout de même que cette validation n'a pu se faire qu'entre deux opérateurs et que les résultats obtenus nécessiteraient confirmation sur un test plus important.

VI. PROPOSITIONS.

De l'analyse des résultats statistiques obtenus ressortent certains points pratiques à améliorer pour la valorisation des mesures.

- Travailler le plus possible à dates fixes. Ceci est indispensable en début de gestation, lorsque la croissance des éléments mesurés est très importante et qu'un écart de 4 jours est suffisant pour fausser les résultats. En fin de gestation c'est surtout la répétition des mesures à intervalle régulier pour pouvoir observer une évolution pour chaque gestation qui manque ici.
- Augmenter le nombre de témoins. Le nombre de clones est ici assez important et il est surtout lié à la réussite des transferts d'embryons clonés et à l'évolution des gestations. Les témoins sont plus faciles à produire et leur nombre devrait être au minimum égal à celui des clones : s'il n'y a pas assez de FIV réalisées, il vaudrait mieux prendre des témoins IA, même si l'on ne pourra pas attribuer les différences observées uniquement au clonage.

D'autres mesures, dans la même optique de travail, pourraient apporter de nouvelles informations intéressantes.

- Etendre la période des mesures en début de gestation. En effet, nous avons observé des différences significatives entre clones et témoins pour ces stades précoces, plus ou moins en accord avec d'autres auteurs. Mais, Bertolini (2002) trouve une inversion de ces résultats juste après les stades que nous avons étudiés : il serait intéressant d'avoir une mesure avant, vers 35 jours, et une ou deux mesures après, vers 80-90 jours. Pour les obtenir il faudrait cibler des parties du corps limitées, comme la tête. Ces mesures sont déjà en cours de réalisation.

- Rechercher systématiquement les placentomes en début de gestation. Cela permettrait de voir s'ils apparaissent plus tard chez les clones et de mieux observer leur croissance.
- Proposer une classification de l'œdème et de l'apparence des liquides sur le compte-rendu. Pour traduire les observations en note de 1 à 3, nous avons proposé une classification, à laquelle il faut ajouter la note 0 pour une apparence normale, ce que nous n'avons pu faire car l'absence de commentaire ne signifiait pas toujours RAS. Cette étape rendrait plus objective l'observation des images et les décisions qui peuvent en découler, et cela apportera des informations à posteriori pour connaître le caractère pronostique de ces critères d'apparence.
- Tester d'autres mesures. Nous avons vu qu'aucune des mesures effectuées n'avait d'intérêt pronostic. Ceci peut être nuancé par le faible nombre de mesures pour chaque stade de fin de gestation, mais en ce qui concerne le début de gestation il n'y a pas de doute. Deux options sont alors possibles : se concentrer sur les échographies transabdominales et effectuer plus de mesures, plus systématiquement ; réaliser d'autres mesures en début de gestation en espérant qu'il en existe avec un intérêt pronostic si tôt dans la gestation. Les deux options apporteraient également des renseignements complémentaires quant à la croissance des clones.

Certaines mesures, utilisées dans des études bovines ou équinnes, semblent pouvoir apporter des informations utiles pour l'étude de la croissance des clones ou pour obtenir un pronostic :

- La fréquence cardiaque en début de gestation. Elle présente de nombreuses variations en fonction du stade de gestation, comme le montrent trois études : 172 battements par minutes à 40 jours, 180 à 60 jours, 158 à 100 jours (Breukelman *et al.* 2003), Kähn (1989) présentant un même schéma de variations même si les valeurs absolues diffèrent un peu. Ces variations entre études imposent d'établir une référence pour la race étudiée et pour le preneur de mesure. Son intérêt serait d'être une indication sur la viabilité du fœtus, comme elle l'est chez la femme : une valeur anormale par rapport au stade de gestation est lié à une forte probabilité d'avortement (Schats 1990).
- Le diamètre bipariétal, le diamètre abdominal. Ces deux mesures possèdent une très bonne corrélation avec l'âge du fœtus, sont facilement mesurables en début de gestation et peuvent donc permettre de comparer la croissance des fœtus (Breukelman *et al.* 2003). Leur intérêt est leur répétabilité : elles sont en effet peu influencées par la position spatiale du fœtus. Ce n'est pas le cas de la longueur tête-croupe généralement utilisée, comme dans cette étude. Pour palier l'incurvation de nombreux fœtus nous avons choisi d'étudier la somme des longueurs de la tête et du corps, mais l'idéal serait d'avoir des images échographiques de fœtus bien rectilignes, ce qui demande parfois beaucoup de temps, ou de réaliser une mesure courbe, le long de la colonne vertébrale, ce que le logiciel utilisé ne pouvait faire. De plus, les résultats de notre test de validation concordent avec ceux de Breukelman et al présentant, comme les plus répétables, les diamètres bipariétal et abdominal, pour un même opérateur mais aussi entre opérateurs différents.

- La distance intercostale. Lors des échographies transabdominales, peu de structures fœtales sont bien identifiables mais on reconnaît toujours les côtes et le cœur, lorsque la pénétration des ultrasons est suffisante pour l'atteindre. Renaudin *et al.* (2000) ont démontré que la distance intercostale était corrélée avec le stade de gestation chez la jument, entre 100 et 350 jours ($r^2 = 0.81$) et Kähn (1989) l'a montré de même chez la vache, entre 60 et 210 jours ($r^2 = 0.96$). Cette mesure, simple à obtenir en comparaison du diamètre aortique, permettrait donc de suivre la croissance fœtale sur une très longue période. Il faudrait par exemple effectuer les mesures au niveau du cœur, pour avoir une position assez fixe.
- Le Doppler. Les anomalies du développement du placenta des clones présentées dans la littérature et rencontrées dans notre étude semblent être fondamentales dans la compréhension des anomalies de la croissance fœtale associée. Pour approfondir l'étude du placenta et de sa vascularisation, il serait intéressant d'utiliser la technique du Doppler, déjà employée en médecine humaine dans ce but.

Le Doppler permet en effet de mesurer différents paramètres pour un vaisseau sanguin donné : le diamètre du vaisseau, son indice de résistance, qui est globalement le reflet de la distension du réseau sanguin en aval, la vitesse du sang et le volume du flux sanguin. Au cours de la gestation, les besoins nutritifs du fœtus augmentent et l'apport sanguin au placenta doit alors s'accroître. Ainsi on observe une augmentation du diamètre, de la vitesse et du volume de sang au niveau des artères utérines, associées à une diminution de leur indice de résistance.

Chez la femme, la persistance d'une résistance élevée dans les artères utérines dans le dernier trimestre de la grossesse est un signe de déficit d'apport nutritionnel au fœtus et de risque de retard de croissance voir de mort fœtale.

L'application de cette technique à la gestation de la vache, en utilisant le Doppler par voie transrectale, montre les mêmes variations (Bollwein *et al.* 2002). Cette technique non-invasive pourrait donc permettre de comparer la vascularisation du placenta des clones à celui d'embryons issus de FIV et d'IA, et peut être d'obtenir des informations précoces sur le déroulement de la gestation et un pronostic quant à son devenir.

- L'échographie en trois dimensions. (Anonyme, 2003) Cette technique d'imagerie est au point depuis une dizaine d'année et est utilisée en obstétrique humaine, occupant une place diagnostique importante aux côtés de l'échographie bidimensionnelle classique. L'acquisition des images se fait à l'aide d'une sonde volumique qui réalise automatiquement un balayage du plan de coupes par un déplacement mécanique de la tête de la sonde. Le temps de balayage varie de 3 à 10 secondes suivant l'importance du volume et la qualité recherchée. Les données sont enregistrées (5 à 10 mégaoctets), puis exploré selon différents modes :
 - Exploration multiplan : pour se déplacer à l'intérieur du volume et réaliser tous les plans de coupe, même ceux irréalisables en échographie classique, comme par exemple un plan perpendiculaire à l'axe du faisceau ultrasonore. L'exploration simultanée dans les trois plans de coupes orthogonaux permet un repérage précis des structures et le calcul des volumes.
 - La reconstruction des surfaces : mode particulièrement intéressant pour l'exploration de la face et des membres du fœtus.

- Mode rayon X : toutes les informations contenues dans le bloc sont réunies en un même plan comme sur un cliché radiographique.
- A l'intérieur du volume, on peut extraire uniquement les échos les plus denses, permettant une reconstruction des structures osseuses.
- La reconstruction des arbres vasculaires est possible, les données du Doppler couleur sont incluses dans le volume.

Les avantages sont, en obstétrique, un bilan plus précis des malformations fœtales, en gynécologie exploration de la cavité utérine. Le temps d'examen est diminué, les images stockées. Cependant la technique nécessite l'absence de mouvement de la part de l'opérateur, de la patiente et du fœtus pendant le temps de l'acquisition. De plus, un volume d'acquisition ne peut inclure la totalité d'un fœtus à plus de deux mois de gestation.

Ainsi, les données fournies par l'échographie 3D permettraient d'améliorer les connaissances sur le développement *in utero* des clones, en combinant une meilleure visualisation du fœtus et du placenta, les informations Doppler et un stockage complet des informations permettant de revenir à posteriori à la recherche de nouvelles données. Les limites rencontrées pour l'utilisation en médecine humaine sont multipliées pour l'utilisation en bovine : l'immobilité requise pour la vache, la taille bien supérieure du fœtus bovin impliquant de multiples volumes pour les stades avancés...

Il faut aussi se poser la question de savoir si l'échographie est le bon outil pour obtenir un pronostic. Par exemple certains marqueurs biologiques de la gestation et des métabolismes associés, comme la PSP60, une glycoprotéine placentaire produite par les cellules binuclées, semblent prometteurs (Heyman et al, 2002). Cependant, le dosage de cette glycoprotéine n'est pas fait en routine et les prélèvements doivent être congelés et les analyses différées. Les résultats sont donc obtenus a posteriori. Ils montrent une bonne corrélation entre un taux de PSP60 supérieur à la normale et la survenue d'hydropisie, qui permettrait d'établir un pronostic précoce si un kit de diagnostic rapide était disponible.

IV. CONCLUSION

Cette étude avait pour objectif de faire un bilan sur le protocole de mesures effectué au cours des gestations de clones à l'INRA, pour savoir quelles informations il peut apporter quant au déroulement de ces gestations, notamment en matière de diagnostic des anomalies liées au clonage et de pronostic sur le devenir du fœtus.

L'analyse de ces données a soulevé certains manques dans la mise en œuvre de ce protocole : un nombre trop faible de gestations témoins en fin de gestation, une perte d'information due au non-respect des dates d'examens.

Les mesures réalisées en début de gestation (longueur de la tête, du corps, diamètre de la vésicule, taille des placentomes) ont permis de démontrer une longueur fœtale et une épaisseur des placentomes significativement inférieures pour les clones, à 50 et 64 jours, en comparaison des fœtus issus de FIV, ainsi qu'une croissance ralentie entre ces deux stades. Ces mesures n'ont par contre pas de valeur pronostique.

Ces résultats sont d'un grand intérêt car ils mettent en évidence les profondes modifications, liées au clonage en lui-même, sur le développement embryonnaire et fœtal : en début de gestation le déficit de croissance est rencontré chez l'ensemble des clones, mais pour ceux qui survivent aux premiers stades de la gestation, il y a un phénomène de compensation si important que les clones nouveaux-nés sont plus gros que les témoins. Le lien avec la vascularisation placentaire et les échanges fœtaux-maternels sont encore à explorer.

Les mesures réalisées en fin de gestation ne montrent pas de différence entre clones et témoins, ni de différence en fonction du devenir de la gestation. Cependant, cette analyse nécessite confirmation car sa valeur statistique est limitée par le manque de gestations témoins.

L'intérêt diagnostique des échographies est important pour les hydropisies des annexes fœtales, malgré deux erreurs dont l'origine reste inconnue. L'absence de relevé systématique des observations concernant les éléments diagnostiques d'hydropisie (œdème placentaire, échogénicité des placentomes et des liquides fœtaux) a rendu impossible l'analyse de ces données pour en tirer des valeurs prédictives.

Le test de validation de nos mesures a montré leur répétabilité intra-opérateur, ce qui justifie la réalisation d'une unique mesure par paramètre à chaque stade, et leur répétabilité inter-opérateurs qui semble autoriser la réalisation des mesures par plusieurs opérateurs bien formés. Cette dernière condition est très importante pour assurer la continuité d'un protocole de recherche sur une longue période.

Pour continuer et approfondir ce travail, il est envisagé, suite à cette étude, d'augmenter le nombre de témoins, de réaliser des mesures de 35 à 90 jours à dates fixes, de choisir de nouvelles mesures (diamètre bipariétal, diamètre abdominal, distance intercostale). Afin d'objectiver les observations sur l'œdème placentaire et les liquides fœtaux, une classification de 0 à 3 est proposée. La vascularisation placentaire pourrait être étudiée par le biais d'un appareil Doppler.

Cette étude est intéressante car elle montre le défaut de croissance fœtale chez les clones en début de gestation. A l'heure actuelle, aucune mesure ne permet de prédire l'évolution de ces gestations et seuls les dosages de PSP60 maternelle semblent avoir une valeur prédictive (Heyman *et al.* 2002).

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS-BRENDEMUEHL C.S. Fetal assessment. Equine clinical neonatology, 1990, Lea & Febiger, Philadelphia, London, 16-33.

ADAMS-BRENDEMUEHL C.S. et PIPERS F.S. Antepartum evaluations of the equine fetus. J. Reprod. Fert., 1987, 35, 565-573.

ALLEN W.R., CARTER A.M. CHAVATTE-PALMER P., CANTZER V., ENDERS A.C., FREYER C., LEISER R. et MIGLINO M.A. Comparative placentation – a workshop report. Pacenta 2003, 24, 100-103.

ANONYME. Communiqué de presse – Starbuck II. 20 septembre 2000. www.iforum.umontreal.ca/communiques/archivescommuniques/2000/200920.htm.

ANONYME. Acquisition du volume, avantages et limites de l'échographie 3D. 2003. www.echographie3d-4d.com.

ARCHER G.S., DINDOT S., FRIEND T.H., WALKER S., ZAUNBRECHER G., LAWHORN B. et PIEDRAHITA J.A. Hierarchical phenotypic and epigenetic variation in cloned swine. Biol. Reprod., 2003, 69, 430-436.

AYALON N. A review of embryonic mortality in cattle. J. Reprod. Fert., 1978, 54, 483-493.

BARNES F.L. The effects of early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. Theriogenology, 2000, 53, 649-658.

BARONE R. Splanchnologie II. Anatomie comparée des mammifères domestiques. 2nd ed., Vigot éd., Paris, 1990, tome 4, 1-951.

BAXTER S.J. et WARD W.R. Incidence of fetal loss in dairy cattle after pregnancy diagnosis using an ultrasound scanner. Vet. Rec., 1997, 140, 287-288.

BEHBOODI E., ANDERSON G.B., BONDURANT R.H., CARGILL S.L., KREUSCHER B.R., MEDRANO J.F. et MURRAY J.D. Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. Theriogenology, 1995, 44, 227-232.

BELLOW M.S., FEELEUS W.N., OHLRICH C.L., JOHNSON D.L. et LOONEY C.R. Application of transvaginal ultrasound for amniocentesis in cattle. Theriogenology, 1996, 45, 225 (abstr).

BERTOLINI M., MASON J.B., BEAM S.W., CARNEIRO G.F., SWEEN M.L., KOMINEK D.J., MOYER A.L., FAMULA T.R., SAINZ R.D. et ANDERSON G.B. Morphology and morphometry of in vivo and in vitro produced bovine concepti from early pregnancy to term and

Dis. Soc. Anim. Biol. High Birth Weigh 32 >> BDC BT/TT0 1 Tf0 Tc 0 Tw 23YER91 0 0 12.00191 65.21811 2

BOOTH P.J., VIUFF D., TAN S., HOLM P., GREVE T. et CALLESEN H. Numerical chromosome errors in Day 7 somatic nuclear transfer bovine blastocysts. *Biol. Reprod.*, 2003, 68, 922-928.

BOYD J.S., OMRAN S.N. et AYLIFFE T.R. Use of a high frequency transducer with real time B-mode ultrasound scanning to identify early pregnancy in cows. *Vet. Rec.*, 1988, 123, 8-11.

BREUKELMAN S.P., REINDERS J.M.C., JONKER F.H., DE RUIGH L., KAAL L.M.T.E., VAN WAGTENDONK-DE LEEUW A.M., VOS P.L.A.M., DIELEMAN S.J., BECKERS J.F., PERENYI Z. et TAVERNE M.A.M. Fetometry and fetal heart rates between day 35 and 108 in early bovine pregnancies resulting from transfer of either IVP-co-culture, IVP-SOF, or MOET embryos. *Theriogenology*, 2003, (in press).

BRUYAS J.-F., BARRIER-BATTUT I., FIENI F. et TAINTURIER D. L'échographie transrectale en gynécologie équine : suivi ovarien et diagnostic de gestation chez la jument. Journées nationales des GTV, Tours 27, 28 et 29 mai 1998, 425-437.

CEZAR G.G., BARTOLOMEI M.S., FORSBERG E.J., FIRST N.L., BISHOP M.D. et EILERTSEN K.J. Genome-wide epigenetic alterations in cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.*, 2003, 68, 1009-1014.

CHASTANT S., RENARD J.-P. Les nouveaux embryons : clones et animaux transgéniques. Journées nationales des GTV, Tours 27, 28 et 29 mai 1998, 551-556.

CHAVATTE-PALMER P., HEYMAN Y. et RENARD J.-P. Clonage et physiopathologies de la gestation associées. *Gynécol. Obstét. Fertil.*, 2000, 28, 633-642.

CHESNE P., HEYMAN Y., PEYNOT N. et RENARD J.P. Nuclear transfer in cattle : birth of cloned cattle and estimation of blastomere totipotency in morulae used as source of nuclei. *C. R. Acad. Sci.*, 1993, 316, 487-491.

COLLEAU J.J. Les biotechnologies de l'embryon bovin : application à la sélection, réalité et enjeux économiques. *Cahiers Agriculture*, 1993, 2, 93-102.

COLLOBERT C. Avortements infectieux. *CES Elevage et reproduction des équidés*, 1994, 18pp.

CURRAN S., PIERSON R.A. et GINTHER O.J. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from day 10 through 20. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1986a, 189, 1289-1294.

CURRAN S., PIERSON R.A. et GINTHER O.J. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from day 20 through 60. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1986b, 189, 1295-1302.

CURRAN S. et GINTHER O.J. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. *Theriogenology*, 1991, 36, 809-814.

CURRAN S. Fetal sex determination in cattle and horses by ultrasonography. *Theriogenology*, 1992, 37, 17-21.

DECANTE F. Le diagnostic de gestation par échographie en clientèle rurale bovine. *Bull. GTV*, 1990, 45-51.

DE SOUSA P.A., WALKER S., KING T.J., HARKNESS L., RITCHIE W.A., TRAVERS A., FERRIER P. et WILMUT I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep. *Theriogenology*, 2000, 53, 214 (abstr).

DUNNE L.D., DISKIN M.G. et SREENAN J.M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim. Reprod. Sci.*, 2000, 58, 39-44.

ECTORS F.J., DELVAL A. et SMITH L. Viability of cloned bovine embryos after one or two cycles of nuclear transfer in vitro culture. *Theriogenology*, 1995, 44, 925-933.

FARIN P.W., STEWART R.E., RODRIGUEZ K.F., CROSIER A.E., BLONDIN P., ALEXANDER J.E. et FARIN C.E. Morphometry of bovine placentas at 63 days following transfer of embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology*, 2001, 55, 320 (abstr).

GARCIA A. et SALAHEDDINE M. Bovine ultrasound-guided transvaginal amniocentesis. *Theriogenology*, 1997, 47, 1003-1008.

GARRY F.B., ADAMS R., McCANN J.P. et ODDE K.G. Postnatal characteristics of calves produced by nuclear transfer cloning. *Theriogenology*, 1996, 45, 141-152.

GILES R.C., DONAHUE J.M., HONG C.B., TUTTLE P.A., PETRITES-MURPHY M.B., POONACHA K.B., ROBERTS A.W., TRAMONTIN R.R., SMITH B. et SWERCZEK T.W. Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3572 cases (1986-1991). *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1993, 203, 1170-1175.

GINTHER O.J. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. Eds Equiservices Cross Plains, 1986, 378pp.

HAGEN-PICARD D., GAYRARD V. et BERTHELOT X. Développement embryonnaire et foetal, immunologie de la gestation et applications à la mortalité embryonnaire. SFB éd., Paris 2002, 80-94.

HANSEN C. et DELSAUX B. Use of transrectal B-mode ultrasound imaging in bovine pregnancy diagnosis. *Vet. Rec.*, 1987, 121, 200-202.

HANZEN C., LAURENT Y. et JAKOVLJEVIC S. Applications de l'échographie en reproduction bovine. 2. L'utérus gestant et non-gestant. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, 137, 93-101.

HEYMAN Y., CHAVATTE-PALMER P., LEBOURHIS D., CAMOUS S., VIGNON X et RENARD J.P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Bio. Reprod.*, 2002, 66, 6-13.

HEYMAN Y., CHESNE P. et RENARD J.-P. Reprogrammation complète de noyaux embryonnaires congelés après transfert nucléaire chez le lapin. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 1990, t .311, série III, 321-326.

HEYMAN Y., CHESNE P. et LEBOURHIS D. Clonage et sexage embryonnaires : recherches et perspectives d'applications chez les bovins. *Point Vét.*, 1996, 28, 873-880.

HILL J.R., ROUSSEL A.J., CIBELLI J.B., EDWARDS J.F., HOOPER N.L., MILLER M.W., THOMPSON J.A., LOONEY C.R., WESTHUSIN M.E., ROBL J.M. et STICE S.L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 cases studies). *Theriogenology*, 1999, 51, 1451-1465.

HILL J.R., BURGHARDT R.C., JONES K., LONG C.R., LOONEY C., SHIN T., SPENCER T., THOMPSON J., WINGER Q. et WESTHUSIN M.E. Evidence for placental abnormality as a major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol. Reprod.*, 2000, 63, 1787-1794.

HILL J.R., SCHLAFER D.H., FISHER P.J. et DAVIES C.J. Abnormal expression of trophoblast major histocompatibility complex class 1 antigens in cloned bovine pregnancies is associated with a pronounced endometrial lymphocytic response. *Biol. Reprod.*, 2002, 67, 55-63.

HUGUES E.A. et DAVIES D.A.R. Practical uses of ultrasound in early pregnancy in cattle. *Vet. Rec.*, 1989, 136, 406-410.

HUMBLLOT P., DALLA PORTA M.A., SCHWARTZ J.L. Etude de la mortalité embryonnaire. *Elevage Insém.*, 1983, 194, 3-12.

KAHN W. Sonographic fetometry in the bovine. *Theriogenology*, 1989, 31, 1105-1121.

KASTELIC J.P. et GINTHER O.J. Fate of conceptus and corpus luteum after induced embryonic loss in heifers. *Vet. Med. Ass.*, 1989, 194, 922-928.

KASTELIC J.P., CURRAN S. et GINTHER O.J. Accuracy of ultrasonography for pregnancy diagnosis on days 10 to 22 in heifers. *Theriogenology*, 1989, 31, 813-820.

KASTELIC J.P., BERGFELT D.R. et GINTHER O.J. Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 heifers. *Theriogenology*, 1991, 35, 569-581.

KASTELIC J.P., CURRAN S., PIERSON R.A. et GINTHER O.J. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. *Theriogenology*, 1988, 29, 39-54.

KATO Y., TANI T. et TSUNODA Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J. Reprod. Fertil.*, 2000, 120, 231-237.

KAYE P.L. Preimplantation growth factor physiology. *Rev Reprod.*, 1997, 2, 121-127.

KLEEMAN D.O., WALKER S.K. et SEAMARK R.F. Enhanced fetal growth in sheep administered progesterone during the first three days of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 1994, 102, 411-417.

LEBASTARD D. Echographie en gynécologie bovine : utilisations possibles dans le cadre d'un exercice en clientèle rurale. *Point Vét.*, 1997, 28, 1089-1096.

LEBASTARD D. Diagnostic de gestation, par échographie, chez la vache : diagnostic du sexe du fœtus entre 70 et 120 jours de gestation. *Journées nationales des GTV*, Tours 1998, 405-408.

- MAI W. L'échographie en médecine vétérinaire canine et féline. Polycopié d'imagerie médicale, ENVA, 1994.
- MAI W. L'image échographique: formation et qualité. Point Vét. 1999, 30, 499-504.
- MANNING F.A. The fetal biophysical profile score: current status. Obstet. Gynecol. Clin. North Am., 1990, 17, 147-162.
- MANNING F.A., HARMAN C.R., MENTICOGLU S. et MORRISON I. Assessment of fetal well-being with ultrasound. Obstet. Gynecol. Clin. North Am., 1991, 18, 891-905.
- MENCK M.C., MERCIER Y., LOBO R.B. et coll. Luminescent screening of transgenic bovine embryos. Theriogenology 1998, 49, 275 (abstr).
- MIALOT J.-P., LEVY I. et GRIMARD B. L'échographie dans la gestion de la reproduction chez les bovins. Rec. Méd. Vét. 1991, 167, 21-31.
- OZIL J.P., HEYMAN Y. et RENARD J.P. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. Vet. Rec. 1982, 110, 126-127.
- PACE M.M. *et al.* Ontogeny of cloned cattle to lactation. Biol. Reprod., 2002, 67, 334-339.
- PALMER E. et DRIANCOURT M.A. Diagnostic de la gestation à partir du 14^{ème} jour après l'ovulation par échographie d'ultrasons. CEREOPA 6^{ème} journée d'étude, 1980 a, Paris.
- PALMER E. et DRIANCOURT M.A. Use of ultrasonic echography in equine gynecology. Theriogenology, 1980 b, 13, 203-216.
- PIERSON R.A. et GINTHER O.J. Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. Theriogenology, 1984, 22, 225-233.
- PINTO *et al.* Sources of variation of fertility and embryonic mortality rates in the dairy cow. 7^{èmes} Rencontres autour des Recherches sur les Ruminants, Paris, 2000, 213-216.
- PIPERS F.S. et ADAMS-BRENDEMUEHL C.S. Techniques and applications of transabdominal ultrasonography in the pregnant mare. J. Am. Vet. Med. Ass., 1984, 185, 766-771.
- PRATHER R.S., BARNES F., SIMMS M.M. et coll. Nuclear transplantation in the bovine embryo. Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. Reprod. 1987, 37, 859-866.
- REEF V.B., VAALA W.E., WORTH L.T., SERTICH P.L. et SPENCER P.A. Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation: development of an equine biophysical profile. Equine Vet. J., 1996, 28, 200-208.
- RENARD J.P., CHASTANT S., CHESNE P., RICHARD C., MARCHAL J., CORDONNIER N., CHAVATTE P. et VIGNON X. Lymphoid hypoplasia and somatic cloning. Lancet, 1999, 353, 1489-1491.
- RENAUDIN C.D., TROEDSSON M.H.T., GILLIS C.L., KING V.L. et BODENA A. Ultrasonographic evaluation of the equine placenta by transrectal and transabdominal approach in the normal pregnant mare. Theriogenology, 1997, 47, 559-573.

REVEL F., MERMILLOD P, PEYNOT N., RENARD J.P. et HEYMAN Y. Low development capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 1995, 103, 115-120.

ROBINSON J.S., KINGSTON E.J., JONES C.T. et THORBURN G.D. Studies on experimental growth retardation in sheep: the effect of removal of endometrial caruncles on fetal size and metabolism. *J. Dev. Physiol.*, 1979, 1, 379-398.

SANTSCHI E.M. et LEBLANC M.M Fetal and placental conditions that causes high-risk pregnancy in mares. *The compendium*, 1995, 17, 710-720.

SANTSCHI E.M. et SLONE D.E. Maternal conditions that causes high-risk pregnancy in mares. *The compendium*, 1994, 16, 1481-1488.

SCHATS R., JANSEN C.A.M. et WLADIMIROFF J.W. Embryonic heart activity: appearance and development in early human pregnancy. *Brit. J. Obst. Gynaecol.*, 1990, 97, 989-994.

SCHMIDT A.R., WILLIAMS M.A., CARLETON C.L., DARIEN B.J. et DERKSEN F.J. Evaluation of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis in the late gestational mare. *Equine Vet. J.*, 1991, 23, 261-265.

SERTICH P.L Clinical anatomy and evaluation of equine fetal membranes. *Proceedings of Soc. of Theriogenology*, 1993, 178-184.

SERTICH P.L., REEF V.B., ORISTAGLIO-TURNER R.M., HABECKER P.L. et MAXSON A.D. Hydrops amnii in a mare. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 1994, 204, 1481-1482.

SINCLAIR K.D., MAXFIELD E.K., ROBINSON J.J., MALTIN C.A., McEVOY T.G., DUNNE L.D., YOUNG L.E. et BROADBENT P.J. Culture of sheep zygotes can alter fetal growth and development. *Theriogenology*, 1997, 47, 380 (abstr).

SINCLAIR K.D., DUNNE L.D., MAXFIELD E.K., MALTIN C.A., YOUNG L.E., WIMUT I., ROBINSON J.J. et BROADBENT P.J. Fetal growth and development following temporary exposure of Day 3 ovine embryos to an advanced uterine environment. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1998, 10, 263-269.

SMITH L.C., BORDIGNON V., GARCIA J.M. et MEIRELLES F.V. Mitochondrial genotype segregation and effects during mammalian development: applications to biotechnology. *Theriogenology*, 2000, 53, 35-46.

STROUD B.K. Using ultrasonography to determine bovine fetal sex. *Vet. Med.*, 1996, 91, 663-672.

TAINTURIER B. Diagnostic du sexe du fœtus par échotomographie chez la vache. Thèse de doctorat vétérinaire, Nantes 2001, 163p.

TAINTURIER D. et BENCHARIF D. Mortalité embryonnaire : mise en évidence et difficultés du diagnostic. *Journées nationales des GTV*, Tours 2002, 685-686.

VAALA W.E. Peripartum asphyxia. *Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract.*, 1994, 10, 187-210.

- VIGNON X., CHESNE P., LEBOURHIS D., FLECHON J.E., HEYMAN Y. et RENARD J.P. Developmental potential of bovine embryos reconstructed with enucleated matured oocytes fused with cultured somatic cells. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1998, 321, 735-745.
- VOS P., PIETERSE M.C., VAN DER WEYDEN G.C. et TAVERNE M. Bovine fetal fluid collection: transvaginal, ultrasound-guided puncture technique. *Vet. Rec.*, 1990, 127, 502-504.
- WAGTENDONK-DE LEEUW van A.M., MULLAART E., de ROOS A.P.W., MERTON J.S., den DAAS J.H.G., KEMP B. et de RUIGH L. Effects of different reproductive techniques: AI, MOET or IVP on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, 2000, 53, 575-597.
- WALKER S.K., HARTWICH K.M. et SEAMARK R.F. The production of unusually large offspring following embryo manipulation: concepts and challenges. *Theriogenology*, 1996, 45, 111-120.
- WIDEMAN D., DORN C.G. et KRAEMER D.C. Sex detection of the bovine fetus using linear array real-time ultrasonography. *Theriogenology*, 1989, 31, 272 (abstr).
- WILLIAMS M.A., GOYERT N.A., GOYERT G.L. et SOKOL R.J. Preliminary report of transabdominal amniocentesis for the determination of pulmonary maturity in an equine population. *Equine Vet. J.*, 1988, 20, 457-458.
- WILMUT I. et SALES D.I. Effect of an asynchronous environment on embryonic development in sheep. *J. Reprod. Fert.*, 1981, 61, 179-184.
- WILMUT I., SCHNIEKE A.E., McWHIR J. et coll. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385, 810-813.
- WHITE I.R., RUSSEL A.J.F., WRIGHT I.A. et WHYTE T.K. Realtime ultrasonic scanning in the diagnosis of pregnancy and the estimation of gestational age in cattle. *Vet. Rec.*, 1985, 117, 5-8.
- YOUNG L.E. et FAIRBURN H.R. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. *Theriogenology*, 2000, 53, 627-648.
- YOUNG L.E., SINCLAIR K.D. et WILMUT I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Reviews Reprod.*, 1998, 9, 155-163.
- YOUNG L.E., FERNANDES K., McEVOY T.G., BUTTEWITH S.C., GUTIERREZ G.C., CAROLAN C., BROADBENT P.J., ROBINSON J.J., WILMUT I. et SINCLAIR D.S. Epigenetic changes in IGFR2 is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat. Genet.*, 2001, 27, 153-154.

ANNEXE 1

Photo 1 :
Image échographique d'une gestation gémellaire.

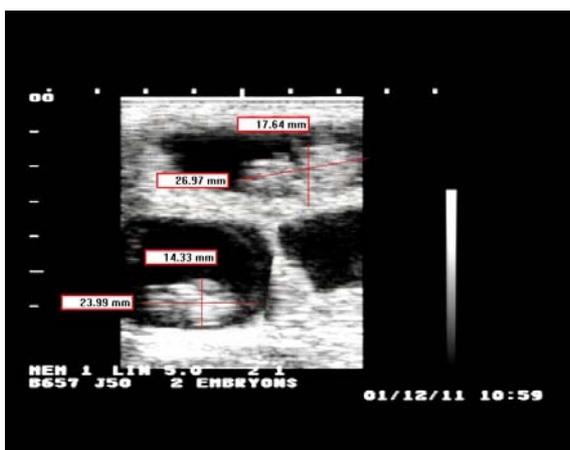


Photo 2:
Aspect macroscopique d'un cotylédon oedémateux.



Photo 3 :
Clone suspendu quelques minutes à la naissance.



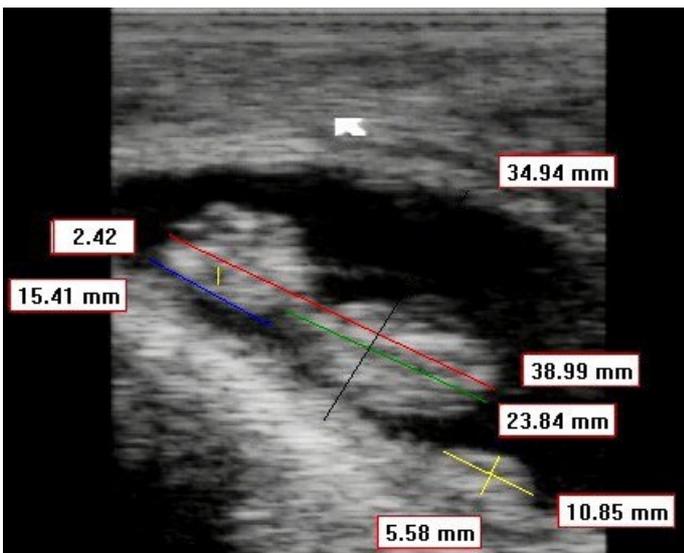
Photo 4 :
Opération du nombril à la naissance.



Photo 5 :
Réalisation d'une échographie transabdominale.



Photo 6 :
Fœtus à 50 jours de gestation et mesures du protocole.



rouge : longueur tête-queue.
vert : longueur cou-queue.
bleu : longueur tête (décalée pour voir l'orbite).
jaune : orbite, diamètre et épaisseur d'un placentome.
noir : diamètre de la vésicule.

Photo 7 :
Photo de famille du clone de la vache 7711.



ANNEXE 2

ANIMAL **B723**

Temps de gestation :

Date : **19/03/03**

Terme 12/04/03

J 258

Examen rectal :

cotylédons

longueur	largeur	surface	remarques

épaisseur du placenta :

observation du fœtus :

autres :

Examen transabdominal :

cotylédons près de la mammelle

longueur	largeur	surface	remarques
		23,8	
		57,3	
		53,2	
		39,3	
		26,5	

cotylédons vus par le flanc

longueur	largeur	surface	remarques

Rythme cardiaque : **75 - 38s**

Diamètre aortique : **2,2**

Mouvements :

épaisseur placentaire :

Profondeur de liquide (distance extrémité de la cage thoracique à placenta) :

Autres : *Bonne apparence du liquide, bien net et sans points blancs.*

œdème bien bien prononcé sur les coty et le placenta -

A surveiller, l'animal en lui même va bien

ANNEXE 3

Porteuse	Type d'embryon	Génotype pour clones	Date du transfert	Devenir embryon	Echo. J50	Echo. J64	Echo. Fin gestation	Poids naissance
B433	CSA	A1	13/10/98	vie				61
B434	CSF	F1	01/12/98	vie			7,5	56
B410	CSF	F1	10/12/98	vie			7,5	37
B405	TE		27/01/99	vie			6	36

B551	CSA	A5	06/03/01	vie			7,5/9	48
B561	CSA	A5	06/03/01	hydropisie			7,5/8	
B588	CSA	A6	26/04/01	vie			6,5/7/8/9	66
B602	CSA	A6	03/05/01	hydropisie			6,5/7	
B638	CSA	A6	10/05/01	mort < 1sem			7,5/8,5/9	53
B591	FIV		05/06/01	vie			6,5/7,5/8,5	46
B636	FIV		05/06/01	vie			7,5/8/8,5	39

B694	CSA	A5	05/03/02	mort > 1sem	o	o	7,5/8/8,5/9	59
B698	CSA	A5	05/03/02	vie	o	o	8/8,5	46
B705	CSA	A5	05/03/02	vie	o		7,8/8/9	50
B650	CSA	A5	19/03/02	mort < 1sem	o	o	7/7,5/8,5	31
B671	CSA	A5	19/03/02	avortement	o	o		
B688	CSA	A5	19/03/02	vie	o		7/7,5/8	49
B690	CSA	A5	19/03/02	hydropisie	o	o	7	
B619	CSA	A1	04/07/02	avortement				
B664	CSA	A8	04/07/02	avortement		o		
B666	CSA	A8	04/07/02	avortement		o		
B668	CSA	A8	04/07/02	hydropisie				
B670	CSA	A8	04/07/02	hydropisie		o	7/7,5	
B686	CSA	A8	04/07/02	hydropisie		o		
B692	CSA	A8	04/07/02	avortement		o		
B699	CSA	A8	04/07/02	hydropisie				
B719	CSA	A8	04/07/02	avortement		o		
B724	CSA	A8	04/07/02	vie		o	7/7,5/8,8	45
B651	CSA	A8	11/07/02	avortement	o			
B660	CSA	A8	11/07/02	hydropisie	o	o		
B695	CSA	A8	11/07/02	avortement	o			
B700	CSA	A8	11/07/02	avortement	o			
B723	CSA	A8	11/07/02	vie	o	o	7/8,5	64
B727	CSA	A8	11/07/02	avortement	o			
B728	CSA	A8	11/07/02	hydropisie	o	o	7	

CSA : clone somatique adulte.

CSF : clone somatique foetal.

TE : transfert embryonnaire