

CHAPITRE 4.8.

COLLECTE ET MANIPULATION DES OVOCYTES/EMBRYONS DU BÉTAIL ET D'ÉQUIDÉS PRODUITS *IN VITRO*

Article 4.8.1.

Objectifs du contrôle

La production d'embryons *in vitro* nécessite la collecte des ovocytes à partir des ovaires des femelles donneuses, la maturation *in vitro* et la fécondation des ovocytes, puis la mise en culture *in vitro* jusqu'au stade du développement de la morula/du blastocyste où les embryons seront prêts pour leur transfert vers les femelles receveuses. L'objectif du contrôle sanitaire officiel des embryons produits *in vitro* destinés aux échanges internationaux est de garantir l'absence de germes pathogènes spécifiques que pourraient véhiculer ces embryons, et d'éviter toute contamination des femelles receveuses et de leur descendance. Les conditions précisées dans le présent chapitre s'appliquent également au transport d'ovocytes amenés à maturation *in vitro*.

Article 4.8.2.

Conditions applicables à l'équipe de production d'embryons

L'équipe de production d'embryons est un groupe de techniciens qualifiés comprenant au moins un *vétérinaire* pour procéder aux opérations de prélèvement et de manipulation des ovaires/ovocytes ainsi qu'aux opérations de production et de stockage des embryons produits *in vitro*. Les conditions précisées ci-après doivent être remplies :

1. L'équipe doit être titulaire d'un agrément délivré par l'*Autorité compétente*.
2. L'équipe doit comprendre un *vétérinaire* qui en assure la supervision.
3. Le *vétérinaire* de l'équipe est responsable de toutes les activités de l'équipe, notamment celles concernant le respect des conditions sanitaires lors des opérations de prélèvement d'ovaires et d'ovocytes ainsi que de toute autre procédure concourant à la production d'embryons destinés aux échanges internationaux.
4. Le personnel de l'équipe doit être parfaitement formé aux techniques et aux principes du contrôle des *maladies* et appliquer des règles d'hygiène rigoureuses afin d'éviter toute contamination.
5. L'équipe de collecte doit disposer d'installations et d'équipements pour assurer :
 - a) la collecte des ovaires et/ou des ovocytes ;
 - b) la manipulation des ovocytes et la production des embryons dans un laboratoire fixe ou mobile ;
 - c) le stockage des embryons et/ou des ovocytes.Il n'est pas nécessaire que ces installations se trouvent sur le même site.
6. L'équipe de production des embryons doit tenir un registre de ses activités qui sera présenté à l'*Autorité vétérinaire* lors de tout contrôle au moins pendant les deux années suivant l'exportation des embryons.

7. L'équipe de production des embryons doit être soumise à des contrôles réguliers au moins une fois par an effectués par un *vétérinaire officiel* pour s'assurer du respect des procédures d'hygiène lors de la collecte et de la manipulation des ovocytes, ainsi que lors de la production et du stockage des embryons.

Article 4.8.3.

Conditions applicables aux laboratoires de manipulation

Tout laboratoire de manipulation utilisé par l'équipe de production d'embryons qui peut être fixe ou mobile. Il peut être situé à proximité du lieu de prélèvement des ovocytes ou à distance de celui-ci. C'est un lieu dans lequel les ovocytes extraits des ovaires sont amenés à maturation et fécondés et où les embryons ainsi obtenus sont ensuite mis en culture *in vitro*.

Dans ce laboratoire, les embryons peuvent également être soumis à tout traitement requis, tel que le lavage, et stockés et maintenus en quarantaine.

En outre :

1. Le laboratoire doit être placé sous la supervision directe du *vétérinaire* de l'équipe et contrôlé régulièrement par un *vétérinaire officiel*.
2. Lorsque des embryons destinés à l'exportation sont produits avant d'être conservés en ampoules, flacons ou paillettes, aucun ovocyte/embryon de qualité sanitaire inférieure ne doit être prélevé ou manipulé dans le même laboratoire.
3. Le laboratoire doit être protégé contre les rongeurs et les insectes.
4. Le laboratoire de manipulation doit être construit avec des matériaux permettant un nettoyage et une *désinfection* efficaces. Ces opérations doivent être réalisées fréquemment et toujours avant et après chaque manipulation d'embryons destinés à l'exportation.

Article 4.8.4.

Conditions sanitaires applicables aux femelles donneuses

Les ovocytes destinés à la production *in vitro* d'embryons sont prélevés sur les femelles donneuses essentiellement selon deux méthodes : la collecte individuelle et la collecte par lots. Les conditions recommandées pour chaque méthode diffèrent.

La collecte individuelle consiste habituellement en une ponction d'ovocytes sur les ovaires d'*animaux* vivants différents, opération réalisée dans la ferme dans laquelle les femelles sont entretenues ou au laboratoire. Occasionnellement, les ovocytes peuvent également être extraits des ovaires des donneuses vivantes par ponction, après ablation de ces organes. Lorsque les ovocytes sont prélevés sur des *animaux* vivants, les procédures suivies relatives à chaque femelle donneuse doivent être conformes aux dispositions de l'article 4.7.4.

Dans ces cas, il est particulièrement important de nettoyer et de stériliser le matériel (par exemple, sonde échoguidée) après chaque usage sur une donneuse conformément aux recommandations décrites dans le Manuel de la Société internationale de transfert d'embryons (IETS)¹.

S'agissant de la collecte par lots, les ovaires sont recueillis à partir de lots de femelles donneuses abattues à l'*abattoir* ; ces ovaires sont ensuite transportés au laboratoire de manipulation où la collecte des ovocytes s'effectue par aspiration au niveau des follicules ovariens. La collecte par lots présente un inconvénient : il est, en général, impossible d'établir le lien entre les ovaires transportés au laboratoire et les donneuses abattues. Néanmoins, il est crucial de veiller à ne prélever que des tissus sains et de faire en sorte que ces prélèvements sur les donneuses et le transport des prélèvements au laboratoire s'effectuent dans les conditions d'hygiène nécessaires.

En outre :

1. L'*Autorité vétérinaire* doit disposer d'informations sur le ou les *troupeaux* ou *cheptels* dont proviennent les femelles donneuses.
2. Les animaux donneurs ne doivent pas provenir de *troupeaux* ou *cheptels* faisant l'objet de restrictions vétérinaires liées à la fièvre aphteuse, à la peste bovine ou à la peste des petits ruminants, et aucun prélèvement de tissus ou aspiration d'ovocytes ne doit être pratiqué dans une *zone infectée* ni dans une zone faisant l'objet de restrictions vétérinaires du fait de la présence de ces *maladies*.
3. En cas de prélèvement d'ovocytes sur des donneuses vivantes, il convient d'exercer une surveillance de ces femelles et des *troupeaux* ou *cheptels* donneurs après collecte d'après les *périodes d'incubation* connues des *maladies* dont on cherche à se protéger, en vue de déterminer rétrospectivement le statut sanitaire des donneuses.
4. En cas de prélèvement d'ovocytes par collecte d'ovaires par lots issus d'un *abattoir*, l'*abattoir* doit être officiellement agréé et placé sous la supervision d'un *vétérinaire* qui veillera à ce que l'examen des éventuelles femelles donneuses avant et après abattage soit effectué, et certifiera que ces *animaux* sont indemnes de tout signe clinique ou anatomo-pathologique d'une des *maladies* visées à l'alinéa 2 ci-dessus.
5. Aucune femelle donneuse abattue dans le cadre d'un *abattoir* ne doit être retenue parmi les *animaux* abattus pour cause de *maladie à déclaration obligatoire* ; les femelles donneuses, dont les ovaires et autres tissus seront prélevés, ne doivent pas être abattues en même temps que d'autres *animaux*.
6. Les lots d'ovaires et autres tissus ayant fait l'objet d'une collecte au sein d'un *abattoir* ne doivent pas être transportés au laboratoire de manipulation avant d'avoir obtenu confirmation que l'examen des femelles donneuses avant et après abattage a abouti à un résultat favorable.
7. Le matériel utilisé pour le prélèvement et le transport des ovaires ou d'autres tissus doit être nettoyé et stérilisé avant usage et utilisé exclusivement à cette fin.
8. Il convient de tenir des registres dans lesquels sont consignées l'identité et les origines de toutes les femelles donneuses qui seront présentés à l'*Autorité vétérinaire* lors de tout contrôle au moins pendant les deux années suivant l'exportation des embryons. Ces informations peuvent se révéler difficiles à obtenir dans le cas des collectes par lots. Cependant, l'identité des *troupeaux* ou *cheptels* dont sont issues les femelles donneuses doit être consignée dans un dossier

Article 4.8.5.

Examens et traitement facultatifs

La réalisation d'examens sur divers matériels afin de confirmer l'absence des germes pathogènes visés à l'alinéa 2 de l'article 4.8.4. offre une méthode complémentaire permettant de s'assurer que les embryons produits *in vitro* ne risquent pas de transmettre des *maladies* importantes.

Des examens peuvent également être effectués pour s'assurer que les procédures de contrôle de la qualité en usage dans le laboratoire de manipulation respectent des normes satisfaisantes.

Des examens peuvent être réalisés sur les matériels suivants :

- a) les ovocytes/embryons non viables appartenant aux lots destinés à l'exportation et qui se révèlent non viables à n'importe quel stade de la chaîne de production *in vitro* ;
- b) des échantillons prélevés sur le milieu de maturation *in vitro* avant la mise en contact de la semence et des ovocytes ;
- c) des échantillons prélevés sur le milieu de culture des embryons prélevés immédiatement avant le stockage de ces derniers.

Ces échantillons doivent être conservés à 4 °C et examinés dans les 24 heures. Si ce n'est pas possible, les échantillons doivent être conservés à une température égale ou inférieure à -70 °C.

En outre :

1. La semence utilisée pour féconder les ovocytes *in vitro* doit répondre aux conditions et normes sanitaires précisées au chapitre 4.6. selon l'espèce animale considérée.

Lorsque le géniteur ayant fourni la semence utilisée pour féconder les ovocytes est décédé ou que l'état sanitaire de ce géniteur vis-à-vis d'une ou plusieurs *maladies* infectieuses particulières, ou dont il convient de se protéger, n'était pas connu au moment du prélèvement de la semence, des examens complémentaires portant sur les embryons inutilisés peuvent être exigés, pour vérifier que ces *maladies* ne leur ont pas été transmises. Une autre méthode peut consister à examiner une partie aliquote de semence prélevée à la même date.

2. Tout produit biologique d'origine animale, y compris les cellules de co-culture et composants des milieux utilisés pour la collecte d'ovocytes, la maturation, la fécondation, la mise en culture, le lavage et la conservation, doit être exempt d'agents pathogènes vivants. Les milieux doivent être stérilisés avant utilisation selon des méthodes agréées comme indiqué dans le Manuel de l'IEETS¹, et manipulés de façon à rester stériles. Des antibiotiques doivent être ajoutés à tous les liquides et à tous les milieux, conformément aux recommandations du Manuel de l'IEETS¹.
3. Tout le matériel utilisé pour la collecte, la manipulation, la mise en culture, le lavage, la congélation et la conservation des ovocytes/embryons doit être neuf ou nettoyé et stérilisé avant usage, conformément aux recommandations du Manuel de l'IEETS¹.

Article 4.8.6.

Gestion du risque

Au regard de la transmission de *maladies*, le transfert d'embryons produits *in vitro* constitue une méthode à très faible risque pour transférer du matériel génétique animal, bien que le risque ne soit pas exactement aussi faible que dans le cas des embryons prélevés *in vivo*. Il convient de noter que les catégories de *maladies* ou d'agents pathogènes établies par l'IEETS qui s'appliquent aux embryons prélevés *in vivo*, comme décrit à l'article 4.7.14., ne s'appliquent pas aux embryons produits *in vitro*. Quelle que soit l'espèce animale considérée, il existe trois phases dans la production d'embryons et le processus de transfert qui déterminent le niveau final de risque. Ces phases sont les suivantes :

1. La première phase tient compte du potentiel de risque relatif à une contamination de l'ovaire/ovocyte/embryon, laquelle dépend :
 - a) de la situation zoosanitaire du *pays exportateur* et/ou de la zone d'exportation ;
 - b) de l'état sanitaire du *troupeau* ou *cheptel* et des femelles donneuses sur lesquelles les ovaires/ovocytes/embryons sont prélevés ;
 - c) du pouvoir pathogène des agents pathogènes spécifiques mentionnés à l'alinéa 2 de l'article 4.8.4.
2. La deuxième phase a trait à l'atténuation du risque grâce à l'utilisation de procédures, agréées au niveau international, de traitement des embryons qui sont définies dans le Manuel de l'IEETS¹. Ces procédures sont les suivantes :
 - a) à l'issue de la période de culture *in vitro*, les embryons doivent être lavés au moins 10 fois à une dilution d'au moins 1/100 entre chaque lavage, et une nouvelle pipette doit être utilisée pour le transfert des embryons entre chaque lavage ;
 - b) seuls les embryons provenant d'une même femelle donneuse (en cas de collecte individuelle) ou du même lot (en cas de collecte par lots) doivent être lavés ensemble, et il convient de ne pas laver plus de 10 embryons à la fois ;

- c) lorsque des opérations d'inactivation ou d'élimination de certains virus (herpèsvirus-1 des bovins et virus de la maladie d'Aujeszky par exemple) sont rendues nécessaires, la procédure de lavage normalisée doit être modifiée pour inclure de nouveaux lavages avec addition de trypsine, comme indiqué dans le Manuel de l'IETS¹ ;
 - d) après le lavage, la zone pellucide de chaque embryon doit être examinée sur toute sa surface sous un grossissement d'au moins 50X et être certifiée intacte et exempte de toute matière adhérente.
3. La troisième phase, qui s'applique aux *maladies* mentionnées à l'alinéa 2 de l'4.8.4., concerne les moyens de réduction des risques résultant des opérations suivantes :
- a) *surveillance*, après collecte, des animaux donneurs et des *troupeaux* ou *cheptels* d'origine de ces *animaux* en se fondant sur les durées normales d'incubation des *maladies* dont il convient de se protéger afin de déterminer rétrospectivement l'état sanitaire des animaux donneurs au moment où les embryons sont stockés (pour les espèces pour lesquelles un stockage par cryoconservation efficace est possible) dans le *pays exportateur*. La *surveillance* des animaux donneurs après collecte est bien sûr impossible dans le cas de collectes par lots auprès d'un *abattoir* bien que la *surveillance* des *troupeaux* ou *cheptels* d'origine reste possible ;
 - b) examen des ovocytes/embryons, des fluides de collecte des embryons ou d'autres milieux ou prélèvements (tel que le sang) (ainsi que le précise l'article 4.8.5.) au laboratoire pour détecter la présence d'agents pathogènes spécifiques.

Article 4.8.7.

Conditions applicables au stockage et au transport des embryons

1. On ne doit placer dans la même ampoule, le même flacon ou la même paillette que des embryons provenant d'une même femelle donneuse ou d'un même lot de collecte.
2. Les embryons doivent si possible, cette faculté dépendant des espèces concernées, être congelés dans des conteneurs ou cuves nettoyés et stérilisés contenant de l'azote liquide frais ou tout autre cryoconservateur puis conservés dans un liquide cryoconservateur en respectant des conditions d'hygiène rigoureuses sur un site de stockage.
3. Les ampoules, flacons ou paillettes doivent être scellés au moment de la congélation et étiquetés comme indiqué dans le Manuel de l'IETS¹.
4. Les conteneurs d'azote liquide doivent être scellés avant leur expédition du *pays exportateur*.
5. Les embryons ne doivent pas être exportés avant l'établissement définitif des certificats vétérinaires requis.

Article 4.8.8.

Opérations de micromanipulation

Lorsque les embryons sont soumis à des opérations de micromanipulation, celles-ci doivent être entreprises après achèvement du traitement décrit au point 2 de l'article 4.8.6. et réalisées en conformité avec le chapitre 4.9.

1 Manuel de la Société internationale de transfert d'embryons.