

Etat actuel des méthodes utilisées pour la transplantation embryonnaire chez la chèvre

G. BARIL

(1) INRA, *Physiologie de la Reproduction des Mammifères Domestiques*, 37380 Nouzilly

RÉSUMÉ – Les travaux réalisés sur la transplantation embryonnaire caprine permettent de définir les conditions favorables pour la production, la conservation et le transfert des embryons. Chez les donneuses et receveuses, le contrôle de l'oestrus est effectué en toute saison par un traitement progestatif. Durant les 3 ou 4 derniers jours de ce traitement, l'administration de 160 à 200 µg de pFSH permet d'induire la superovulation chez les donneuses. Une réponse ovarienne faible, et la régression prématurée des corps jaunes sont les principaux facteurs limitant l'efficacité de l'induction de la superovulation. Les donneuses sont fécondées par IA in utéro sous contrôle endoscopique. Six à huit jours après le début de l'oestrus, les embryons sont récoltés par laparotomie ou sous contrôle endoscopique. Ces techniques sont aussi utilisées pour le transfert des embryons, et présentent une efficacité similaire en terme de taux de survie des embryons (50 %). Dans le cas de la congélation des embryons, l'emploi d'éthylène glycol comme cryoprotecteur est conseillé. Après décongélation, les meilleurs taux de survie des embryons transférés sont obtenus après retrait du cryoprotecteur en présence de sucrose.

State of the art in goats embryo transfer

G. BARIL

(1) INRA, *Physiologie de la Reproduction des Mammifères Domestiques*, 37380 Nouzilly

SUMMARY – A series of experiments involving embryo transfer has allowed us to improve conditions for the production, preservation and transfer of goat embryos. For donor goats as for recipients, oestrus occurrence can be controlled all year round with a progestagen treatment. During the last 3 to 4 days of this treatment administration of 160-200 µg of pFSH induces superovulation in the donors. A low ovarian response (7.5 % with 0-3 ovulations) and premature C.L. regression (for 10 to 35% of goats) were the main problems encountered. For fertilization of donor goats, the intra-uterine insemination is recommended. Six to 8 days after the beginning of oestrus, embryos are collected by laparotomy or laparoscopy. Both techniques can also be used for embryo transfer with a development rate of 50% whatever the method and regardless of the embryos were frozen or not. For embryo freezing, ethylene glycol is recommended as a cryoprotectant with its removal with sucrose before transfer.

1 - INTRODUCTION

La transplantation embryonnaire (TE) a connu chez les bovins un essor important. En revanche, chez les caprins, la TE est aussi possible, mais elle est très peu développée. Les travaux réalisés chez la chèvre nous permettent néanmoins de décrire les conditions optimales de production, de conservation et de transfert d'embryons, afin d'améliorer l'efficacité de cette méthode de reproduction et d'en préciser les possibilités.

2 - PRÉPARATION HORMONALE DES DONNEUSES

Afin de produire des embryons à un stade de développement prédéterminé à partir de plusieurs chèvres, un traitement de synchronisation de l'oestrus doit être associé à celui de l'induction de la superovulation.

La synchronisation de l'oestrus est généralement obtenue par l'administration de progestérogène ou de ses analogues, sous forme d'implants sous-cutanés (Senn and Richardson, 1992), ou de supports vaginaux (Armstrong *et al.*, 1983a; Baril *et al.*, 1989; Holm *et al.*, 1990).

2.1 - INDUCTION DE LA SUPEROVULATION

2.1.1 - Choix de la gonadotrophine, dose, durée du traitement et rapport FSH/LH

La production d'embryons après traitement PMSG est inférieure à celle obtenue après administration de FSH (McKelvey and Bhattacharyya, 1992). Par conséquent, les préparations de FSH ovine et porcine sont les plus employées pour induire la superovulation chez la chèvre. Chez les donneuses permanentes, la répétition des traitements avec FSH porcine provoque l'apparition d'anticorps anti-pFSH associée à une diminution de la réponse ovulatoire (Rémy *et al.*, 1991). En revanche, l'administration de FSH ovine peut être répétée sans entraîner d'abaissement du nombre d'ovulations (Baril *et al.*, 1992).

La dose totale préconisée est comprise entre 160 et 200 µg de pFSH, mais elle doit être déterminée pour la race considérée. Une dose peut s'avérer être insuffisante ou au contraire excessive pour certains génotypes (Ritar *et al.*, 1988). La dose totale est répartie en six à huit injections biquotidiennes durant les 3 ou 4 derniers jours du traitement progestatif (Tervit *et al.*, 1984; Baril *et al.*, 1989).

Dans le cas de l'emploi de FSH porcine, la répartition de la quantité totale en doses décroissantes, associée à une addition de LH en fin de traitement permet d'accroître la réponse ovulatoire et le nombre d'embryons transférables (Baril *et al.*, 1989).

1.2 - FACTEURS DE VARIATIONS DE LA SUPEROVULATION

La réponse ovulatoire moyenne est comprise entre 12 et 16 ovulations, mais il existe une grande variabilité de la réponse individuelle (Brebion *et al.*, 1992). Des différences de réponse au traitement de superovulation ont aussi été décrites en fonction de la race (Ritar *et al.*, 1988). Pour les chèvres Alpine et Saânen, la saison n'a pas d'effet sur le nombre d'ovulations, mais une plus faible qualité des ovocytes durant l'anoestrus saisonnier, pourrait être la cause du plus fort taux d'embryons dégénérés à cette période qu'au cours de la saison de reproduction : 20 vs 11.5 % (Baril et Vallet, 1990). La production d'embryons est compromise par la régression prématurée des corps jaunes. Ce phéno-

mène est observé chez 10 à 35 % des chèvres traitées (Baril *et al.*, 1989; Gilbert *et al.*, 1990) et entraîne une faible production d'embryons (Armstrong *et al.*, 1983).

2.3 - SYNCHRONISATION DE L'OVULATION CHEZ LES DONNEUSES

Pour un lot de chèvres traitées au même moment, les ovulations ont lieu sur une période de plus de 24 h (Baril et Vallet, 1990b). L'insémination artificielle effectuée à un moment prédéterminé, ne peut donc être efficace, sans un meilleur contrôle du moment de l'ovulation. L'injection de GnRH ou d'HCG accroît la synchronisation des ovulations (Cameron *et al.*, 1988), mais le moment optimum d'injection est difficile à préciser. En effet, une étude réalisée chez la brebis, montre que l'administration trop précoce de GnRH provoque une diminution du taux d'oeufs divisés (Walker *et al.*, 1989). Une méthode basée sur l'administration d'un antagoniste de GnRH 12 h. après le retrait de l'éponge et suivie 24 h. plus tard par l'injection de pLH a été récemment testée. Elle permet d'inséminer les donneuses à un moment prédéterminé sans diminution de la production d'embryons transférables (Baril *et al.*, 1994).

3 - FÉCONDATION DES DONNEUSES

Les chèvres donneuses sont le plus souvent inséminées in utéro sous contrôle endoscopique. Le taux d'oeufs divisés est alors supérieur à celui obtenu après I.A. cervicale (Moore and Eppleston, 1979). Cependant, en raison de la variabilité du moment de l'ovulation, l'I.A. intra utérine ne peut être efficace si elle a lieu à un moment constant par rapport à la fin du traitement. En l'absence de traitement de synchronisation de l'ovulation, l'I.A. intra utérine avec 100 x 10⁶ spermatozoïdes doit avoir lieu 20 à 24 h. après le début de l'oestrus, le taux d'oeufs divisés (78 %) est alors similaire à celui observé après saillie (Vallet et Baril, 1990).

4 - COLLECTE DES EMBRYONS

Les embryons sont récoltés entre le 6ème et le 8ème jour après le début de l'oestrus (Jour 0) par laparotomie abdominale (collecte chirurgicale) ou sous contrôle endoscopique (collecte par endoscopie). Une solution de P.B.S. additionnée de 2 à 4 % de B.S.A. ou de 10 % de sérum de veau foetal ou de chèvre, est utilisée (40 à 50 ml/corne utérine) pour le « lavage » des cornes utérines (Baril *et al.*, 1993). La collecte chirurgicale est la plus efficace en terme de taux d'oeufs collectés (70 à 90 %), mais il diminue lorsque cette technique est répétée plusieurs fois chez les mêmes chèvres (Senlis, 1990). Le taux d'oeufs récoltés par endoscopie est inférieur de 10 à 15 % à celui obtenu par chirurgie mais la répétition de la collecte par endoscopie ne provoque pas de diminution du taux d'oeufs collectés (Vallet *et al.*, 1987).

5 - PRÉPARATION HORMONALE DES RECEVEUSES

Le traitement progestatif utilisé pour programmer l'oestrus des receveuses n'est pas différent de celui appliqué chez les donneuses. La stimulation de l'ovaire est obtenue par une injection de PMSG effectuée 48 heures avant ou au moment du retrait de l'éponge. La quantité de PMSG doit être adaptée à la saison à laquelle est réalisé le traitement, à la race, ainsi

qu'à l'état physiologique et à la production laitière des chèvres (Leboeuf, 1989).

6 - TRANSPLANTATION EMBRYONNAIRE

Hormis le transfert par voie cervicale dont l'efficacité est faible (Flores-Foxworth *et al.*, 1992), les taux de réussite ne diffèrent pas lorsque les embryons sont transférés par laparotomie ou sous contrôle endoscopique (Vallet *et al.*, 1991). Le transfert par endoscopie est toutefois plus rapide et moins traumatisant pour la femelle que par laparotomie. Le taux de survie des embryons après transfert est voisin de 50 % mais plusieurs paramètres peuvent le faire varier. La survie des embryons est plus élevée chez les chèvres qui reçoivent 2 embryons que chez celles où un seul est transplanté (Armstrong *et al.*, 1983). Le transfert d'un embryon dans chaque corne n'accroît pas le taux de réussite par rapport à la mise en place de 2 embryons dans la corne ipsilatérale à l'ovaire présentant au moins un corps jaune fonctionnel (Armstrong *et al.*, 1983b). Chez la chèvre Angora, la survie des embryons est plus élevée chez les receveuses présentant 2 corps jaunes que chez celles où un seul est observé (Armstrong *et al.*, 1983b). Enfin, un asynchronisme de 24 heures entre les stades physiologiques des donneuses et des receveuses tend à avoir un effet néfaste sur la survie des embryons après transplantation (Armstrong *et al.*, 1983b).

7 - CRYOCONSERVATION DES EMBRYONS

Moins de 3 h. après la collecte, les embryons maintenus entre +20°C et +30°C sont passés successivement dans 2 à 3 bains de PBS à concentration croissante en cryoprotecteur (DMSO, éthylène-glycol, glycérol). Les meilleurs taux de survie des embryons sont cependant obtenus avec l'emploi d'éthylène glycol (Le Gal *et al.*, 1993). Les embryons sont refroidis à raison d'1 à 3°C/min jusqu'à -7°C, température à laquelle a lieu l'induction de la cristallisation. Après un palier de

10 min. à -7°C, le refroidissement se poursuit à raison de 0.3°C/min. jusqu'à -30°C à -35°C, puis après 15 min. à cette température les paillettes contenant les embryons sont plongées directement dans l'azote liquide à -196°C.

Après décongélation à +37°C, le retrait du cryoprotecteur est effectué par passage des embryons dans 2 à 3 bains à concentration décroissante en cryoprotecteur ou par passage direct dans une solution de PBS avec sucrose 0.25M. Avec cette dernière méthode, le taux de survie des embryons tend à être plus élevé qu'avec la dilution par étapes (Le Gal *et al.*, 1993).

Le taux de survie des embryons après transfert augmente avec le stade de développement des embryons lors de la congélation (Chemineau *et al.*, 1986 ; Li *et al.*, 1990). Lorsque les embryons caprins doivent être congelés, la collecte doit avoir lieu le 7ème voire le 8ème jour après le début de l'oestrus, afin de récolter un maximum d'embryons au stade blastocyste.

8 - CONCLUSION

Le rendement final de la transplantation embryonnaire (2 à 5 chevreaux par donneuse traitée) n'est pas inférieur à celui obtenu chez les bovins. Cependant, cette production est insuffisante chez les caprins d'un point de vue économique, pour accroître la descendance des chèvres estimées les meilleures. Actuellement, le principal intérêt de la TE est sans doute son application aux échanges internationaux de matériel génétique. Dans ce cas, la commercialisation d'embryons est économiquement compétitive et ne présente pas les risques sanitaires (CHEMINEAU *et al.*, 1986) qui existent lors de l'achat d'animaux vivants.

Remerciements

Je remercie très sincèrement J. SAUMANDE et M. TERQUI pour l'aide qu'ils m'ont apporté lors de la préparation de cette communication.

RÉFÉRENCES

- ARMSTRONG D.T., PFITZNER A.P., WARNES G.H., RALPH M.M. and SEAMARK R.F., 1983a. *J. Reprod. Fert.*, 67, 395-401.
- ARMSTRONG D.T., PFITZNER A.P., WARNES G.M., SEAMARK R.F., 1983b. *J. Reprod. Fert.*, 67, 403-410.
- BARIL G., CASAMITJANA P., PERRIN J., VALLET J.C., 1989. *Zuchthyg.*, 24, 101-115.
- BARIL G., VALLET J.C., 1990a. 6th Sc. Meeting of Europ. Emb. Trans. Assoc., Lyon, France, 1, 118 (Abstract).
- BARIL G., VALLET J.C., 1990b. *Theriogenology*, 34, 303-311.
- BARIL G., REMY B., LEBOEUF B., VALLET J.C., BECKERS J.F., SAUMANDE J., 1992. 8th Sci. Meet. of Europ. Emb. Transf. Assoc., Lyon, France, 1, 126 (Abstract).
- BARIL G., BREBION P., CHESNE P., 1993. Animal production and health, paper n° 115, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, pp. 183.
- BARIL G., LEBOEUF B., FIGUEIREDO FREITAS V.J., POUGNARD J.L. and SAUMANDE J., 1994. 10th Sci. Meet. of Europ. Emb. Trans. Assoc., Lyon, France, 1, 148 (Abstract).
- BREBION P., BARIL G., COGNIE Y., VALLET J.C., 1992. *Ann. Zootech.*, 41, 331-339.
- CAMERON A.W.N., BATTYE K.M., TROUSON A.O., 1988. *J. Reprod. Fert.*, 83, 747-752.
- CHEMINEAU P., PROCUREUR R., COGNIE Y., LEFEVRE P.C., LOCATELLI A., CHUPIN D., 1986. *Theriogenology*, 26, 279-290.
- FLORES-FOXWORTH G., McBRIDE B.M., KRAEMER D.C., NUTI L.C., 1992. *Theriogenology*, 37, 213 (Abstract).
- GILBERT D.E., COONROD S.A., WHITTING C.J., PASHEN R.L., 1990. *Theriogenology*, 33, 230 (Abstract).
- HOLM P., PETERSEN B.A., KROGH K., DAGNAES-HANSEN F., LAURSEN I.A., 1990. *Theriogenology*, 33, 250 (Abstract).
- LE GAL F., BARIL G., VALLET J.C., LEBOEUF B., 1993. *Theriogenology*, 40, 771-777.
- LEBOEUF B., 1989. C.R. Symp. Intern. sur la reproduction chez les petits ruminants. Varse, Villa Ponti, Eds. G. ENNE e G.F. GREPPI, 87-113.
- LI R., CAMERON N.W., BATT P.A., TROUSON A.O., 1990. *Reprod. Fert. Dev.*, 2, 345-350.
- McKELVEY W.A.C., BHATTACHARYYA N.K., 1992. V Intern. Conf. on Goats., New Delhi, India.
- McNATTY K.P., HUDSON N.L., BALL K., MASON A., SIMMONS M.H., 1989. *N.Z. Vet. J.*, 37, 27-29.
- MOORE N.W., EPPLESTON J., 1979. *Aust. J. Agric. Res.*, 30, 973-981.
- REMY B., BARIL G., VALLET J.C., DUFOUR R., CHOUVET C., SAUMANDE J., CHUPIN D., BECKERS J.F., 1991. *Theriogenology*, 36, 389-399.
- RITAR A.J., BALL P.D., O'MAY P.J., BLACK T.M., JACKSON R.B., MURRAY N., 1988. *Aust. Soc. Reprod. Biol.* 20th. Conf. Newcastle Univ., 29-31, 3 (Abstract).
- SENLIS Y., 1990. Mémoire de fin d'Etudes, ENSAIA Nancy, France, 35 p.
- SENN B.J., RICHARDSON M.E., 1992. *Theriogenology*, 37, 579-585.
- TERVIT H.R., GOOLD P.G., McKENZIE R.D., CLARKSON D.J., DRUMMONDS J., 1984. *New Zealand Veterinary J.*, 33, 78-80.
- VALLET J.C., BARIL G., ROUGIER F., CHUPIN D., PROCUREUR R., CORTEEL J.P., 1987. 3rd Sci. Meeting of Europ. Emb. Trans. Assoc., Lyon, France, 1, 60 (Abstract).
- VALLET J.C., BARIL G., 1990. 6th Sci. Meeting of Europ. Emb. Trans. Assoc., Lyon, France, 1, 188 (Abstract).
- VALLET J.C., CASAMITJANA P., BREBION P., PERRIN J., 1991. *Recueil de Médecine Vétérinaire, Spécial Reproduction des Ruminants*, 1, 293-301.
- WALKER S.K., SMITH D.H., FRENHAM A., SEAMARK R.F., 1989. *Theriogenology*, 31, 741-752.