

Amélioration des méthodes de cryopréservation et de transfert d'embryons chez les petits ruminants

G. BARIL (1), Y. COGNIE (1), J.L. POUGNARD (2), B. LEBOEUF (2), A.S. TRALDI (1), F. GUIGNOT (1), J.F. BECKERS (3), P. MERMILLOD (1)

(1) INRA, Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly

(2) INRA, Unité Expérimentale d'Insémination Caprine et Porcine, 86480 Rouillé

(3) Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Physiologie de la Reproduction B-4000 Sart-Tilman, Belgique

RESUME - Chez les petits ruminants, le coût de la transplantation embryonnaire est un facteur limitant essentiel de l'utilisation de cette méthode. Des techniques rapides à mettre en oeuvre, telles que la vitrification des embryons et leur transfert direct sans observation après dégel, peuvent contribuer à réduire les coûts de la transplantation embryonnaire et accroître ainsi le développement de cette méthode chez la brebis et la chèvre. Afin d'évaluer l'efficacité de ces techniques, 2 expériences ont été réalisées. Dans une première expérience, la viabilité des embryons vitrifiés/décongelés a été comparée aux résultats obtenus après transfert d'embryons frais chez la brebis ou après transfert d'embryons congelés (par congélation lente) chez la chèvre. Les taux de mise-bas et de survie embryonnaire ne diffèrent pas significativement en fonction du traitement des embryons (chez la brebis: embryons frais 72 % et 60 % vs embryons vitrifiés 72 % et 50 % ; chez la chèvre : embryons congelés 69 % et 55 % vs embryons vitrifiés 48 % et 39 %).

Dans la seconde expérience, la possibilité de transférer directement après dégel les embryons vitrifiés ou congelés (sans retrait des cryoprotecteurs et sans évaluation morphologique de la qualité des embryons après dégel) a été testée par comparaison avec la technique traditionnelle de transfert d'embryons vitrifiés ou congelés (retrait des cryoprotecteurs et évaluation de la qualité des embryons). Il n'a pas été observé d'effet significatif de la méthode de transfert sur les taux de mise-bas et de survie embryonnaire (chez la brebis/embryons vitrifiés : transfert traditionnel 67 % et 49 % vs transfert direct 75 % et 53 % ; chez la chèvre/embryons vitrifiés : transfert traditionnel 23 % et 15 % vs transfert direct 38 % et 26 % ; chez la chèvre/embryons congelés : transfert traditionnel 74 % et 45 % vs transfert direct 71 % et 57 %).

Improvement of embryo cryopreservation and embryo transfer methods in small ruminants

G. BARIL (1), Y. COGNIE (1), J.L. POUGNARD (2), B. LEBOEUF (2), A.S. TRALDI (1), F. GUIGNOT (1), J.F. BECKERS (3), P. MERMILLOD (1)

(1) INRA, Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly

(2) INRA, Unité Expérimentale d'Insémination Caprine et Porcine, 86480 Rouillé

(3) Université de Liège, Faculté de Médecine Vétérinaire, Physiologie de la Reproduction B-4000 Sart-Tilman, Belgique

SUMMARY - In small ruminants, the costs of embryo transfer is a main limiting factor to the use of this method. The use of ultra rapid techniques such as embryo vitrification and direct transfer may contribute to reduce a part of the costs and increase the use of embryo transfer in sheep and goats. In order to evaluate the efficiency of these techniques, two experiments were performed. In a first experiment the viability of vitrified/thawed embryos was compared to results obtained after transfer of fresh embryos in ewes or frozen embryos (with slow freezing method) in goats. The pregnancy rate at term as well as embryo survival rate did not differ significantly according to embryo treatment (in ewes : 72% and 60% for fresh embryos vs 72% and 50% for vitrified embryos; in goats : 69% and 55% for frozen embryos vs 48% and 39 % for vitrified embryos).

In a second experiment, the possibility to transfer the vitrified embryos or frozen embryos directly after thawing (without cryoprotectant removal and evaluation of the morphological status of the embryos) was tested by comparison with the standard technique of transfer of vitrified or frozen/thawed embryos (removal of cryoprotectant and morphological evaluation). No significant effect of the transfer method was observed on the pregnancy rate at term and embryo survival rate (in ewes/vitrified embryos : 67% and 49% for traditional transfer vs 75% and 53% for direct transfer ; in goats/ vitrified embryos : 23% and 15% for traditional transfer vs 38% and 26% for direct transfer ; in goats/frozen embryos : 74% and 45% for traditional transfer vs 71% and 57% for direct transfer).

INTRODUCTION

La transplantation embryonnaire est peu pratiquée chez les petits ruminants (Thibier, 2000) en raison du coût élevé de cette méthode de reproduction par rapport à la valeur de l'animal. Cependant, dans un avenir proche, la transplantation embryonnaire peut faciliter et réduire le coût de l'introgession de gènes d'intérêt assistée par marqueurs (Bishop et al., 1995). Il s'avère donc nécessaire de poursuivre les travaux qui visent à favoriser la mise en œuvre de cette méthode de reproduction. Comparés aux procédures de congélation lente et de transfert des embryons après dilution des cryoprotecteurs et réexamen des embryons suite au dégel, la vitrification et le transfert direct des embryons après dégel nécessitent peu de matériel et permettent de réduire les temps d'intervention. De plus, le transfert direct peut être réalisé par un opérateur n'ayant pas de compétence en matière d'embryologie.

Ces méthodes constituant une possibilité d'abaisser le coût de la transplantation embryonnaire, leur utilisation chez les ovins et les caprins, a été évaluée dans les conditions de terrain au cours de plusieurs essais.

La survie après transfert d'embryons conservés par vitrification a été comparée, à celle d'embryons frais chez la brebis et à celle d'embryons conservés par congélation lente chez la chèvre. En raison de contraintes expérimentales (transfert d'embryons dans les élevages privés pour les caprins, sans possibilité de produire des embryons frais), la vitrification n'a pas pu être comparée à la même méthode de référence pour les 2 espèces. La comparaison des méthodes de transfert traditionnel et de transfert direct a été réalisée à partir d'embryons vitrifiés pour les espèces ovine et caprine, et à partir d'embryons conservés par congélation lente dans le cas des caprins.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. ANIMAUX - SYNCHRONISATION DE L'ŒSTRUS - SUPEROVULATION

Les expériences ont été réalisées sur des brebis de races Lacaune et Ile de France et sur des chèvres de races Alpine et Saanen.

La synchronisation de l'œstrus chez les donneuses et receveuses a été obtenue par un traitement progestagène/eCG. Chez la brebis : insertion d'une éponge vaginale contenant 40 mg de FGA durant 14 j et injection d'eCG 500UI (Intervet-Angers-France) au retrait de l'éponge ; chez la chèvre : insertion d'une éponge vaginale contenant 45 mg de FGA durant 11 j, injection d'eCG 400 à 500UI et de 50 µg de Cloprosténol (Shering-Plough, Levallois-Perret, France) 48 h avant retrait de l'éponge.

La superovulation a été induite chez les donneuses, par l'injection de pFSH/LH (Stimufol-Université de Liège et Merial-Belgique) en fin de traitement progestagène, selon les méthodes précédemment décrites par Baril et Vallet (1990) pour la chèvre et par Cognié (1999) pour la brebis.

1.2. RÉCOLTE DES EMBRYONS

Les embryons ont été récoltés chirurgicalement par laparotomie, au stade de développement (morula compactée à blastocyste) permettant la cryoconservation, soit 6 à 7 j ou 7 à 8 j après le début de l'œstrus chez la brebis et la chèvre respectivement. Chaque corne utérine a été rincée avec 40 ml de PBS additionné de 2 % d'albumine sérique bovine (BSA) (IMV-l'Aigle-France). Seuls les embryons morphologiquement normaux ont été sélectionnés pour être transférés ou conservés par vitrification ou congélation lente.

1.3. PROCÉDURES DE CRYOPRÉSERVATION ET DE DÉCONGÉLATION DES EMBRYONS

1.3.1. Dans le cas de la vitrification

Les méthodes préalablement décrites par Mermillod et al. (1997) et Donnay et al. (1998) ont été utilisées. Avant vitrification, les embryons ont été placés à température ambiante, durant 5 min dans un bain de PBS contenant 20 % sérum de veau nouveau né (NBCS) et 10 % de glycérol, puis durant

5 min dans un PBS-NBCS contenant 10 % de glycérol et 20 % d'éthylène glycol, et ils ont ensuite été déposés durant 30 secondes dans la solution de vitrification (PBS-NBCS avec 25 % de glycérol et 25 % d'éthylène glycol). Durant le dernier bain, les embryons ont été rapidement aspirés avec 20 à 30 µl de solution de vitrification, dans la partie centrale d'une paillette de 0.25 ml (les autres parties étant remplies avec une solution de PBS-NBCS contenant 0.8 M de galactose) qui est immédiatement immergée dans l'azote liquide.

Avant transfert, les paillettes ont été décongelées dans l'air durant 5 secondes puis immergées dans un bain-marie à +20°C durant 15 secondes. Les embryons ont été transférés directement, ou après retrait des cryoprotecteurs, par incubation durant 5 min dans le contenu de la paillette, et ils ont été lavés dans 2 bains successifs de PBS-NBCS.

1.3.2. Dans le cas de la congélation lente

Les embryons ont été placés successivement dans 3 bains de PBS/BSA 4%, à concentration croissante en éthylène glycol (0.5 M., 1.0 M., 1.5 M. ; 5-7 min/bain) (Legal et al., 1993). Durant le dernier bain, les embryons ont été aspirés avec 20 à 30 µl de PBS-éthylène glycol 1.5 M, dans la partie centrale d'une paillette de 0.25 ml, les autres parties étant remplies à l'aide de la solution PBS/BSA 4 % dans le cas du transfert direct et à l'aide de la solution PBS/BSA 4 % et éthylène glycol 1.5 M dans le cas du transfert traditionnel. Les paillettes ont été placées dans un congélateur programmable (Agrogen - EF1 - Freiburg - Switzerland) puis ont été refroidies de +20-25°C à -7°C à raison de 4°C/min. La cristallisation a été induite 5 min plus tard et après 10 min à cette température, le refroidissement a été poursuivi jusqu'à -30°C à raison de 0.3°C/min avant d'immerger les paillettes dans l'azote liquide. Pour la décongélation, les paillettes ont été immergées dans un bain-marie à +37°C durant 20 sec. Les embryons ont ensuite été transférés dans les receveuses, soit directement, soit après retrait du cryoprotecteur, par incubation durant 10-15 min dans une solution de PBS/BSA 4 % + 0.25 M. sucrose, avant d'être lavés dans 2 bains successifs de PBS/BSA 4 % (5 min/bain). Quelle que soit la méthode de cryopréservation, les embryons ont été conditionnés par groupes de 5 à 6 par paillette pour le transfert traditionnel et par groupes de 2 pour le transfert direct.

1.4. MÉTHODES DE TRANSFERT

1.4.1. Expérience 1 : Evaluation de la survie après transfert d'embryons vitrifiés

1.4.1.1. Chez la brebis

Une expérience a été réalisée chez 50 multipares de race Lacaune afin de comparer les taux de réussite après transfert traditionnel d'embryons vitrifiés (après retrait des cryoprotecteurs et évaluation de la qualité des embryons; 25 receveuses) à ceux obtenus après transfert d'embryons frais (25 receveuses). Les embryons frais ou décongelés ont été transférés dans des femelles dont les œstrus ont été préalablement synchronisés avec ceux des donneuses. Pour chaque receveuse, 1 à 3 embryons ont été aspirés avec 20 µl de PBS dans un capillaire de verre connecté à une seringue d'1 ml et ont été introduits chirurgicalement dans le tiers supérieur de la corne utérine ipsilatérale à l'ovaire présentant au moins un corps jaune fonctionnel (*embryons frais* : 1 embryon : n = 4, 2 embryons : n = 19, 3 embryons : n = 2 ; *embryons vitrifiés* : 1 embryon : n = 3, 2 embryons : n = 19, 3 embryons : n = 3).

1.4.1.2. Chez la chèvre

La comparaison des taux de réussite après transfert traditionnel d'embryons vitrifiés, et à partir d'embryons conservés par congélation lente, a été mise en œuvre chez 55 chèvres primipares et multipares de race Alpine. Le transfert de 2 à 3 embryons par receveuse a été réalisé selon la procédure précédemment décrite pour la brebis (*embryons vitrifiés* : 2 embryons : n = 26, 3 embryons : n = 3 ; *embryons congelés* : 2 embryons : n = 25, 3 embryons : n = 1).

1.4.2. Expérience 2 : Comparaison des méthodes de transfert direct et de transfert traditionnel

1.4.2.1. Chez la brebis

Cet essai a été réalisé à partir d'embryons vitrifiés dans 2 élevages, chez 39 multipares de race Lacaune (élevage 1) et chez 40 nullipares de race Ile de France (élevage 2).

Les embryons ont été transférés soit après retrait des cryoprotecteurs et évaluation de la qualité des embryons après décongélation, chez 43 receveuses (transfert traditionnel), soit directement, sans retrait des cryoprotecteurs ni réexamen de la qualité des embryons après dégel, chez 36 receveuses (transfert direct). Dans ce dernier cas, les embryons ont été transférés avec tout le contenu de la paillette (250 µl) à l'aide d'une sonde prototype (IMV - L'Aigle - France).

Quelle que soit la méthode de transfert, chaque femelle a reçu 2 embryons de sa propre race selon la procédure décrite pour l'expérience 1.

1.4.2.2. Chez la chèvre

Les méthodes de transfert traditionnel et de transfert direct ont été comparées d'une part à partir d'embryons vitrifiés et d'autre part à partir d'embryons congelés, chez respectivement 68 receveuses de race Alpine et 33 receveuses de race Saanen. Chaque chèvre a reçu 2 embryons selon les procédures déjà décrites pour ces 2 méthodes de transfert.

2. RESULTATS

2.1. EXPÉRIENCE 1 : EVALUATION DE LA SURVIE APRÈS TRANSFERT D'EMBRYONS CONSERVÉS PAR VITRIFICATION

2.1.2. Chez la brebis

Le traitement des embryons (frais ou vitrifiés) n'a pas eu d'effet sur le taux de receveuses ayant mis-bas (tableau 1). Cependant, le pourcentage d'agneaux nés par rapport aux embryons transférés (taux de survie des embryons) tend à être plus élevé pour les embryons frais que pour les embryons vitrifiés.

Il n'a pas été observé d'effet du nombre d'embryons transférés sur le taux de mises-bas et de survie des embryons (non représenté).

Tableau 1
Taux de mises-bas et de survie des embryons après transfert d'embryons frais ou vitrifiés chez la brebis

Embryons	Receveuses	Embryons transférés	Mises-bas (%)	Survie des embryons (%)
Frais	25	48	72	60 ^a
Vitrifiés	25	50	72	50 ^b

a vs. b : différence non significative ; Chi 2 = 1.07

2.1.3. Chez la chèvre

Les taux de réussite après transfert ne diffèrent pas significativement en fonction de la méthode de cryopréservation des embryons. Pour les embryons congelés, les résultats de mises-bas et de survie des embryons tendent cependant à être plus élevés que pour les embryons vitrifiés (tableau 2).

Tableau 2
Taux de mises-bas et de survie des embryons après transfert d'embryons congelés ou vitrifiés

Embryons	Receveuses	Embryons transférés	Mises-bas (%)	Survie des embryons (%)
Congelés	26	53	69 ^a	55 ^c
Vitrifiés	29	61	48 ^b	39 ^d

a vs. b : différence non significative ; Chi 2 = 2.47
c vs. d : différence non significative ; Chi 2 = 2.69

2.2. EXPÉRIENCE 2 : COMPARAISON DES MÉTHODES DE TRANSFERT DIRECT ET DE TRANSFERT TRADITIONNEL

2.2.1. Embryons ovins vitrifiés

Dans le cas du transfert traditionnel, 84 % (86/102) des embryons décongelés ont été évalués comme transférables selon les critères morphologiques, sans différence selon la race [Lacaune 87 % (46/53) ; Ile de France 82 % (40/49)].

La méthode de transfert n'a pas eu d'effet significatif sur les pourcentages de mises-bas et de survie des embryons (tableau 3). Le taux de survie des embryons a été significativement plus élevé chez les brebis Lacaunes multipares que chez les brebis Ile de France nullipares (59 vs 42% respectivement ; P < 0,05) (tableau 2).

Tableau 3
Taux de réussite après transfert d'embryons ovins vitrifiés en fonction de la méthode de transfert

Méthode de transfert	Race-Parité	Recev. ¹	Mises-bas (%)	Survie des embryons (%)
Traditionnel	Lacaune-Multipares	23	74	59 ^c
	Ile de Fr.-Nullipares	20	60	37 ^f
	Total	43	67 ^a	49 ^e
Direct	Lacaune-Multipares	16	81	59 ^c
	Ile de Fr.-Nullipares	20	70	47 ^h
	Total	36	75 ^b	53 ^d

1 : 2 embryons /receveuse

a vs. b et c vs. d : pas de différence significative

e + g vs. f + h : P < 0,05

2.2.2. Embryons caprins vitrifiés

Pour le transfert traditionnel, 92 % (68/74) des embryons décongelés ont été jugés transférables après examen morphologique.

Il n'a pas été observé d'effet de la méthode de transfert sur le taux de mise-bas. En revanche, le taux de survie des embryons après transfert direct tend à être plus élevé qu'après transfert traditionnel (P < 0,10) (tableau 4).

Tableau 4
Taux de réussite après transfert d'embryons caprins vitrifiés en fonction de la méthode de transfert

Méthode de transfert	Recev.	Embryons transférés	Mises-bas (%)	Survie des embryons (%)
Traditionnel	34	68	23	15 ^a
Direct	34	68	38 ¹	26 ^b

1 : - 2 chèvres gestantes mortes durant la gestation

a vs b : P < 0.10

2.2.2. Embryons caprins congelés

Suite à l'examen morphologique réalisé après dégel dans le cas du transfert traditionnel, 80 % (44/55) des embryons décongelés ont été jugés transférables.

Les taux de mise-bas et de survie in vivo des embryons congelés ne diffèrent pas en fonction de la méthode de transfert utilisée (tableau 5).

Tableau 5
Taux de réussite après transfert d'embryons caprins congelés
en fonction de la méthode de transfert

Méthode de transfert	Recev.	Embryons transférés	Mises-bas (%)	Survie des embryons (%)
Traditionnel	19	38	74	45 ^a
Direct	14	28	71	57 ^b

a vs. b : différence non significative, Chi 2 = 0.99

3. DISCUSSION

Les résultats de l'expérience 1, montrent que le transfert traditionnel d'embryons vitrifiés peut être très efficace chez les ovins. Dans cette étude, les taux de réussite obtenus chez la brebis, après transfert d'embryons vitrifiés, sont similaires à ceux observés avec des embryons frais, ainsi qu'à ceux précédemment rapportés chez la brebis pour des embryons congelés (Brebion et al., 1992 ; Tervit and Goold, 1984) ou vitrifiés avec d'autres méthodes (Ali and Shelton, 1993 ; Martinez et al., 1997 ; Naitana et al., 1997). Dans le cas des caprins, bien que les taux de réussite après transfert d'embryons vitrifiés ne soient pas statistiquement différents de ceux obtenus avec les embryons cryopréservés par congélation lente, ils tendent cependant à être plus faibles.

Dans l'expérience 2, les taux de réussite après transfert d'embryons ovins vitrifiés confirment ceux obtenus dans l'expérience 1. En revanche, chez les caprins ces taux sont très faibles et sont inférieurs à ceux de l'expérience 1. Le transfert d'embryons vitrifiés avec la méthode utilisée dans cette étude est apparu moins efficace chez la chèvre que chez la brebis. Récemment, des résultats très encourageants ont été obtenus chez la chèvre (El Gayar et al., 2001) après transfert d'embryons vitrifiés selon la méthode OPS décrite par Vajta et al. (1998). Si ces résultats sont confirmés, cette méthode constituera un outil efficace pour la cryopréservation des embryons de chèvre.

La comparaison des méthodes de transfert qui a été réalisée à partir d'embryons vitrifiés chez la brebis et chez la chèvre, et à partir d'embryons congelés chez la chèvre, montre que le transfert direct est au moins aussi efficace que le transfert traditionnel, comme cela a déjà été rapporté par Nibart et Humblot (1997) chez les bovins.

Comparés aux résultats du transfert direct, les opérations de retrait des cryoprotecteurs et de sélection morphologiques des embryons après dégel n'améliorent pas les taux de réussite.

Quelle que soit l'espèce (ovine ou caprine) ou la méthode de cryopréservation (congélation lente ou vitrification), la survie

des embryons après transfert direct tend même à être plus élevée qu'après transfert traditionnel. Comparé au transfert traditionnel pour lequel 10 à 20% des embryons sont éliminés à l'examen morphologique après dégel, le transfert direct représente un gain potentiel de 5 à 10 % en terme d'agneaux ou de chevreaux nés par rapport aux embryons décongelés, ce qui contribue à réduire le coût par naissance.

CONCLUSION

Avant que ces méthodes puissent être pratiquées chez les petits ruminants sur le terrain, il est nécessaire que ces résultats soient confirmés sur des effectifs plus importants. Alors, la vitrification associée au transfert direct chez la brebis, et le transfert direct d'embryons congelés chez la chèvre, pourront aider à réduire le coût de la transplantation embryonnaire et à favoriser ainsi le développement de cette méthode chez les petits ruminants.

Les auteurs remercient très sincèrement les Centres de Reproduction Ovins de la race Lacaune (la Confédération des Eleveurs de Roquefort et Oviest) , J.M. Lamorinière (Eleveur caprin-Neuillé Pont Pierre) ainsi que F. Dupont et J.L. Touzé (INRA - NOUZILLY), J. Hervieu (INRA - Brouessy) et leurs collaborateurs, pour leur aide efficace dans la réalisation des ces travaux. Ces remerciements s'adressent également à IMV (l'Aigle-France) pour la préparation et la mise à disposition d'un instrument de transfert direct.

- Ali, J., Shelton, J.N., 1993. *J. Reprod. and Fert.*, 99, 65-70.
 Baril, G., Vallet, J.C., 1990. *Theriogenology*, 34, 303-311.
 Bishop, M.D., Hawkins, G.A., Keefer, C.L., 1995. *Theriogenology*, 43, 61-70.
 Brebion, P., Baril, G., Cognié, Y., Vallet, J.C., 1992. *Ann. Zootech.*, 41, 331-339.
 Cognié, Y., 1997. 13th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon, France, 182 abstr.
 Cognié, Y., 1999. *Theriogenology*, 51, 105-116.
 Donnay, I., Auquier, P., Kaidi, S., Carolan, C., Lonergan, P. M. P., Massip, A., 1998. *Anim. Reprod. Sci.*, 52, 93-104.
 El-Gayar, M., Holm, P., Holtz, W., 2001. *Theriogenology* 55, 305 abstr.
 Mermillod, P., Traldi, A.S., Guerin, Y., Poulin, N., Massip, A., Legal, F., Baril, G., Vallet, J.C., Leboeuf, B., 1993. *Theriogenology*, 40, 771-777.
 Martinez, A.G., Furnus, C.C., Matkovic, M., De Matos D.G., 1997. *Theriogenology*, 47, 1351 abstr.
 Naitana, S., Ledda, S., Loi, P., Leoni, G., Bogliolo, L., Dattena, M., Cappai, P., 1997. *Anim. Reprod. Sci.*, 48, 247-256.
 Nibart, M., Humblot, P., 1997. *Theriogenology*, 47, 371, abstr.
 Thibier, M., 2000. *Embryo Transfer Newsletter*, 18, 24-28.
 Tervit, H.R., Goold, P.G., 1984. *Theriogenology* 21, 268 abstr.
 Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H., 1998. *Mol. Reprod. Dev.*, 51, 53-58.