

Collecte d'ovocytes et production in vitro d'embryons chez les cervidés

Oocyte recovery and in vitro production of embryos in cervids

Y. LOCATELLI (1,2), P. MERMILLOD (1)

(1) MNHN. Laboratoire de l'espace animalier de la Haute Touche, 36290 Obterre

(2) INRA. Physiologie de la Reproduction et des Comportements, 37380 Nouzilly

INTRODUCTION

La famille des cervidés compte près de 200 sous espèces réparties dans 17 genres. Aujourd'hui, près de quarante sous espèces sont menacées d'extinction dans leur milieu naturel (sources IUCN) et certaines d'entre elles font l'objet de programmes conservatoires, mis en place *in* et *ex situ*. Chez les cervidés, la mise au point des techniques de collecte d'ovocytes associée à la production *in vitro* d'embryons pourrait offrir de nouvelles possibilités pour réaliser les programmes conservatoires *ex situ*. Nos travaux de recherches ont été menés sur les conditions de production *in vitro* d'embryons chez le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) et sika du Japon (*Cervus nippon nippon*). Chez l'élaphe et le sika, les ovocytes ont été collectés respectivement sur ovaires d'abattoirs ou par ponction laparoscopique sous contrôle endoscopique après stimulation hormonale de la croissance folliculaire.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. COLLECTE D'OVOCYTES CHEZ LES BICHES ELAPHE ET SIKA

Chez l'élaphe, les ovocytes ont été collectés sur des ovaires d'abattoirs par ponction à la seringue des follicules de plus de 2 mm et durant la saison sexuelle.

Six biches sika du Japon ont été utilisées comme donneuses d'ovocytes (Locatelli *et al.*, 2004). Un protocole hebdomadaire de stimulation de la croissance folliculaire via des injections de FSH ovine (Ovagen, 0,5 ui / femelle) et de ponctions laparoscopiques des follicules par *ovum pick-up* a été conduit en dehors (5 séances) puis pendant la saison de reproduction (3 séances).

1.2. PRODUCTION IN VITRO D'EMBRYONS

Après lavages, les complexes cumulus-ovocytes (COC) ont été placés en maturation *in vitro* pendant 24 h (TCM-199, Fluide folliculaire caprin 10 %, oFSH 50 ng / ml, cystéamine 100 µM). A l'issue de la maturation les ovocytes ont été co-incubés pendant 18 h dans un milieu SOF+acides aminés (SOFaa) supplémenté de 20 % de sérum de brebis en chaleur avec de la semence dégelée sélectionnée sur percoll. Ils ont ensuite été cultivés pendant 8 jours dans le milieu SOFaa-BSA supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal en présence ou absence d'un tapis de cellules épithéliales d'oviducte ovin ou ovine oviductal epithelial cells (oOEC) sous atmosphère humide de 5 % CO₂ dans l'air ou 5 % O₂, 5 % CO₂ dans 90 % N₂ respectivement.

2. RESULTATS

2.1 COLLECTE D'OVOCYTES

Chez l'élaphe, lors de la saison sexuelle, il a été possible de collecter 157 ovocytes de bonne qualité sur 40 ovaires prélevés en abattoirs.

Chez la biche sika durant l'anoestrus saisonnier, il a été possible de ponctionner 5,33 ± 0,7 follicules et de collecter 2,9 ± 0,37 ovocytes par biche et par session (m ± sem). Le nombre de follicules aspirés a significativement diminué de la première à la dernière séance (p < 0,005). Il n'y a pas eu d'effet significatif de la saison sexuelle sur les nombres

moyens de follicules ponctionnés et d'ovocytes collectés (5,72 ± 0,59 et 3,61 ± 0,36 respectivement, durant l'oestrus).

2.2. PRODUCTION IN VITRO

Chez l'élaphe, la présence de cellules épithéliales tubaires (OEC) n'a pas affecté le taux de clivage (p > 0,05, test χ²). La co-culture a permis d'augmenter significativement le taux de développement au stade blastocyste (J8) des embryons (tableau 1). Près de 40 % des embryons produits par co-culture ont atteint le stade blastocyste contre seulement 5 % dans la culture SOF seule (p < 0,05, test χ²).

Aucun développement au stade blastocyste de l'embryon de cerf sika n'a pu être observé dans le milieu SOFaa-BSA seul. Par contre, la co-culture a permis un fort niveau de développement de ces embryons (tableau 2). La saison de reproduction n'a pas affecté significativement la compétence au développement de ces ovocytes.

Tableau 1 : effet de la présence de cellules épithéliales d'oviducte ovin (oOEC) dans le milieu SOFaa-BSA sur le taux de clivage et de développement d'ovocytes collectés chez la biche élaphe, maturés et fécondés *in vitro*.

Co culture oOEC (répliques)	Ovocytes (n)	Clivage 48 hpi (%)	Blastocystes /Total	J8 pi (%) /Clivés
-				
(3)	64	66	3 ^a	5 ^a
+				
(3)	93	63	25 ^b	39 ^b

Dans une même colonne les indices a vs b diffèrent significativement (p < 0,05, test χ²).

Tableau 2 : effets de la saison de reproduction et de la présence de cellules épithéliales d'oviducte ovin (oOEC) sur le taux de clivage et de développement d'ovocytes collectés par LOPU chez la biche sika du Japon, maturés et fécondés *in vitro*

Saison (répliques)	Co culture oOEC	Ovocytes (n)	Clivage (%)	Blastocystes (%) /Total	/Clivés
<i>Anoestrus</i>					
(4)	-	31	77,4	0	0
	+	36	80,6	22,2	27,5
<i>Oestrus</i>					
(3)	-	31	90,3	0	0
	+	32	84,4	34,3	40,7

CONCLUSION

Chez l'élaphe, la présence de cellules épithéliales tubaires durant la culture a permis le développement d'une forte proportion d'embryons. Chez le sika, il a été possible de répéter les stimulations / ponctions de follicules et de collecter des ovocytes de bonne qualité. Les embryons produits *in vitro* à partir de ces ovocytes, se sont développés au stade blastocyste en présence de cellules d'oviducte indépendamment de la saison de reproduction.

Y. Locatelli, J-C Vallet, F. Huyghe, X. Legendre, Y. Cognie and P. Mermillod., 2004. Proceedings of 15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brazil