

Amélioration de la survie embryonnaire après transfert d'embryons caprins produits *in vitro* et vitrifiés grâce à un développement sur tapis de cellules d'oviductes bovines

Improved *in vivo* survival rate of *in vitro* produced goat embryos after coculture with bovine oviductal cells and vitrification

F. GUIGNOT (1), N. POULIN (1), G. BARIL (1), J. COGNIE (1), A. BOUTTIER (1), J.F. BECKERS (2), A. TOUZE (1), P. MERMILLOD (1)

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

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

INTRODUCTION

Quelle que soit l'espèce, les embryons produits *in vitro* donnent généralement beaucoup moins de gestation après gel/dégel et transfert dans une femelle receveuse que des embryons *in vivo*. L'objectif de cette étude était d'améliorer la résistance au froid des embryons caprins *in vitro* en testant différents milieux de développement. Une telle biotechnologie est importante pour l'espèce caprine, en particulier pour les embryons issus de clonage et qui doivent être cryoconservés avant d'être transférés dans une femelle receveuse. Les milieux de développement *in vitro* testés sont un tapis de cellules d'oviductes bovines préalablement congelées et un milieu synthétique défini, le SOF (*synthetic oviduct fluid*).

1. MATERIEL ET METHODES

Les embryons *in vitro* ont été produits à partir d'ovocytes d'abattoir, maturés et fécondés *in vitro* suivant la technique décrite par Cognié *et al.* (2003). Les zygotes ont ensuite été cultivés en goutte, soit dans du milieu SOF enrichi de 5 % de sérum de veau foetal, soit sur un tapis de cellules d'oviductes bovines à confluence. Ces cellules ont été prélevées à partir d'un *pool* d'oviductes collectés à l'abattoir, mises en culture puis congelées avant d'être utilisées pour chaque production d'embryons. L'ensemencement a été fait à raison de 10⁵ cellules/ml. A J7, après 6 jours de culture *in vitro*, les embryons au stade blastocyste et blastocyste expansé ont été vitrifiés selon la technique décrite par Guignot *et al.* (2006). Parallèlement, des embryons ont été produits *in vivo* à partir de femelles superovulées avec 160 µg de pFSH (Merial, Belgique) et inséminées. Les embryons *in vivo* collectés à J7 ont été également vitrifiés. Pour chaque lot, 15 femelles ont été transférées et chacune d'elles a reçu 2 embryons. Les taux de gestation ont été estimés par dosage de la progestérone (P4) à 21 jours et par échographie et dosage de la PAG (protéine associée à la gestation) à 42 et 74 jours.

2. RESULTATS

Les taux de réussite après transfert sont présentés dans le tableau 1. Les taux de gestation estimés à 42 et à 74 jours, ainsi que le taux de mise bas sont de 27 %, 40 % et 53 % pour respectivement les lots "SOF", "coculture" et "*in vivo*". Les taux de survie embryonnaire obtenus sont 13 %, 23 % et 40 % respectivement pour les mêmes lots. A la naissance, les petits ne présentaient aucune anomalie et ils étaient d'un

poids tout à fait normal. Même si les différences ne sont pas significatives à cause d'effectifs trop faibles, une tendance à avoir des taux de mise bas et de survie embryonnaire plus importants est observée lorsque le développement des embryons *in vitro* est réalisé sur tapis de cellules d'oviductes par rapport au milieu SOF.

3. DISCUSSION

Les résultats obtenus indiquent que des cellules d'oviductes bovines préalablement congelées sont tout à fait capables de donner des embryons caprins plutôt plus résistants à la cryoconservation que le milieu SOF. Ces données confirment les résultats obtenus antérieurement avec des embryons caprins cultivés sur des cellules d'oviductes caprines fraîches (Rodriguez *et al.*, 2006). Les cellules d'oviductes doivent avoir un rôle : 1/ trophique pour l'embryon, 2/ détoxifiant du milieu et, également, 3/ réducteur de la teneur en O₂, limitant ainsi les réactions d'oxydation néfastes pour les embryons. Il faut cependant noter que même en présence de cellules d'oviductes, les embryons produits *in vitro* n'atteignent pas le degré de résistance au froid des embryons produits *in vivo*.

CONCLUSION

Les cellules d'oviductes bovines congelées peuvent soutenir un développement embryonnaire hétérologue en donnant des embryons, caprins en l'occurrence, après gel/dégel et transfert dans des receveuses, qui sont plus résistants à la cryoconservation que ceux obtenus avec le milieu défini SOF. D'autres améliorations sont encore à apporter pour élever la résistance des embryons *in vivo*.

Les auteurs tiennent à remercier le personnel animalier de l'Unité expérimentale, ainsi que le personnel de la plate forme Hopital-Abattoir de l'INRA de Nouzilly sans qui cette expérience n'aurait pas pu se dérouler dans d'aussi bonnes conditions.

Cognie Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P., 2003. *Theriogenology*, 59, 171-188

Guignot F., Bouttier A., Baril G., Salvetti P., Pignon P., Beckers J.F., Touze J.L., Cognie J., Traldi A.S., Cognie Y., Mermillod P., 2006. *Theriogenology*, sous presse

Rodriguez N., Gonzalez F, Cognie Y., Poulin N., Guignot F., Touze J.L., Baril G., Cabrera F., Alamo D., Batista M., Mermillod P., Gracia A., 2006. *ESDAR*, 201-B

Tableau 1 : taux de gestation et de survie embryonnaire après transfert d'embryons caprins vitrifiés produits *in vivo* et *in vitro*

Lot d'embryons	Receveuses n (embryons)	Gestation 21 j (P4)	Gestation 42 j et 74 j (échographie + PAG)	Mise bas	Survie embryonnaire
<i>in vitro</i> dans SOF	15 (30)	9 (60 %)	4 (27 %)	4 (27 %)	4 (13 %)
<i>in vitro</i> sur coculture	15 (30)	7 (47 %)	6 (40 %)	6 (40 %)	7 (23 %)
<i>in vivo</i>	15 (30)	10 (67 %)	8 (53 %)	8 (53 %)	12 (40 %)