

Production d'embryons chez la brebis laitière. Bilan des recherches conduites pour augmenter l'efficacité du transfert embryonnaire

Y. COGNIE(1), Y. GUERIN(1), J.P. BELLOC(2), P. BOULENC(2), M. BRIOIS(3), P. GIROU(2), G. LAGRIFFOUL(4),
P. SOLIER(3), F. BARILLET(5), P. BREBION (1)

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

(2) Ovitest, Les Balquières, 12850 Onet le Château

(3) Confédération Générale de Roquefort, B.P. 348, 12103 Millau Cedex

(4) CNBL et (5) INRA-SAGA, B.P. 27, 31326 Castanet Tolosan Cedex

RÉSUMÉ – Les travaux réalisés par le groupe physiologie de la reproduction du CNBL pour préciser les conditions d'utilisation du transfert embryonnaire en brebis laitières ont permis, d'une part, la mise en place d'équipes opérationnelles dans le rayon de Roquefort et d'autre part apporté une amélioration significative de la production d'embryons transférables. Cette amélioration repose essentiellement sur la diminution des cas de non-réponse au traitement de superovulation, par une modification de la population folliculaire avant la stimulation gonadotrope, et secondairement sur l'augmentation du taux d'oeufs fécondés après insémination intra-utérine. La programmation de toutes les étapes de la technique pour le cheptel de brebis élites, de la préparation ovarienne au transfert embryonnaire, est réalisable, avec cependant un coût économique élevé qui freine son développement, comparativement à la situation actuelle du schéma de sélection fondé sur un large usage de l'insémination artificielle.

Embryo production in dairy sheep. Overview of research to increase the efficiency of embryo transfer

Y. COGNIE(1), Y. GUERIN, J.P. BELLOC, P. BOULENC, M. BRIOIS, P. GIROU, G. LAGRIFFOUL,
P. SOLIER, F. BARILLET, P. BREBION

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

ABSTRACT – The studies carried out in the frame work of the "Reproduction group" of CNBL, in order to determine the conditions of using embryo transfer in dairy sheep, has allowed the establishment of operational teams in the Roquefort area and a significant improvement in the production of transferable embryos. This improvement consists primarily of a decrease in the frequency of low response to superovulation which was obtained by modification of the follicular population before gonadotropin stimulation and secondly of an increase in the proportion of eggs fertilized following intra-uterine insemination. All steps of the technique of ovarian preparation to embryo transfer could be implemented for elite ewes but its high economic cost limits its widespread use, compared to the present situation where the breeding program is based on the large use of artificial insemination.

INTRODUCTION

L'amélioration génétique des ovins laitiers présente en France une efficacité remarquable, grâce à la mise en place de l'insémination artificielle (couplée à la synchronisation des oestrus) dans les années 60-70, et son développement important ensuite : en effet actuellement, près de 40 % des brebis laitières sont inséminées, dont 85 % pour le seul noyau de sélection Lacaune-lait. Autrement dit, l'efficacité actuelle des schémas de sélection ovins laitiers est fondée sur un très large usage de l'insémination artificielle. Dans ces conditions, le transfert d'embryons n'augmenterait pratiquement pas l'efficacité du schéma de sélection ; en revanche, il pourrait permettre de sélectionner simultanément d'autres caractères d'intérêt économique sans réduction du gain génétique laitier (Barillet et al., 1987). Le problème se pose alors en termes de coût-bénéfice, puisqu'il faudrait pouvoir utiliser cette technique à l'échelle du cheptel de mères à béliers.

Pour que la mise en place de cette nouvelle technique se fasse avec le maximum d'efficacité, un programme d'expérimentation a été poursuivi depuis 1985 par le groupe Physiologie de la Reproduction, dans le cadre du CNBL. Cette organisation s'est avérée fructueuse puisque au cours de ces dix ans, des équipes de transfert embryonnaire opérationnelles se sont constituées tandis que les différentes étapes de la technique (superovulation, insémination, collecte et transfert) ont été maîtrisées et perfectionnées. Dans cette synthèse, les améliorations obtenues au cours de ces 10 années sont présentées, en insistant particulièrement sur les nouvelles approches qui ont été développées chez la brebis laitière afin de réduire la variabilité de réponse des donneuses au traitement de superovulation, principal facteur limitant l'utilisation du transfert embryonnaire.

1 - AMÉLIORATION DES TRAITEMENTS DE SUPEROVULATION

Les traitements hormonaux proposés pour produire des embryons (Fig. 1) ont fait l'objet d'expérimentations dont l'objectif global était d'augmenter le nombre moyen de bons embryons par donneuse traitée en limitant la fré-

quence des femelles ayant moins de 5 ovulations pour lesquelles la collecte d'embryons n'est pas justifiée.

La superovulation des donneuses est induite au terme d'un traitement classique de synchronisation des chaleurs (éponge vaginale imprégnée de 40 mg de FGA mise en place pendant 14 jours) par l'application d'extraits hypophysaires de porc (pFSH-Beckers, Liège) ayant une activité gonadotrope. La durée de la stimulation gonadotrope (3 jours avec 200 µg de pFSH administrée en 6 doses décroissantes) permet la croissance folliculaire terminale. L'activité FSH doit prédominer sur celle de la LH contaminante les 2 premiers jours du traitement. Pendant cette période un rapport FSH/LH <2 dans la préparation utilisée affecte négativement la qualité embryonnaire. En revanche, un enrichissement en LH de la préparation hormonale (FSH/LH <0.4) est nécessaire en fin de traitement pour induire des ovulations chez toutes les donneuses traitées (Cognié et al., 1986). Chez la brebis Lacaune, ce traitement induit en moyenne 11.3 ± 7.4 ovulations (n=198) avec une grande variabilité : un quart ayant moins de 5, un quart plus de 16 et la moitié de 5 à 16 ovulations (Brebion et al., 1992). Cette variabilité reflète la structure de la population folliculaire de l'ovaire. En effet, le taux d'ovulation induit est positivement corrélé au nombre de follicules de 1-2 mm ($r=0.72$; $p=0.0001$) et négativement corrélé avec le volume des gros follicules (>3 mm) observés par coelioscopie au début de la stimulation ($r=-0.52$; $p=0.02$). Etant donné les fluctuations au cours du temps de cette configuration ovarienne, le niveau de réponse induit n'est pas une caractéristique permanente d'une femelle donnée. Chez 103 brebis Lacaune traitées à 2 mois d'intervalle, les réponses ne sont pas corrélées (Brebion, non publié).

Comme la fin de la croissance des follicules est strictement dépendante de l'activité hypophysaire, il a été fait l'hypothèse qu'en inhibant les sécrétions endogènes de LH et FSH l'on devrait enrichir la classe de taille (1-2 mm) qui précède la dépendance vis à vis des gonadotrophines. Cette hypothèse a été vérifiée en utilisant un prétraitement antigonadotrope par un agoniste (Busérelina Hoechst : 50 µg/j) ou un antagoniste (Nal-GluLHRH, Bouchard, Hôpital Bicêtre : 1mg/j) au GnRH pendant 14 jours (Busérelina) ou 11 jours (Nal-Glu) précédant le début de la stimulation par pFSH (Tableau 1). Après induc-

Figure 1

Schéma de la production d'embryons chez la brebis. Les résultats obtenus avec le traitement de superovulation classique (a) en comparaison avec les traitements incluant la préparation ovarienne avant la stimulation pFSH, à l'aide d'agoniste (b) ou d'antagoniste (c) du GnRH sont présentés dans le tableau 1. Pour les traitements b et c, l'injection de HCG ou pLH* est nécessaire 28 heures après le retrait de l'éponge pour induire les ovulations.

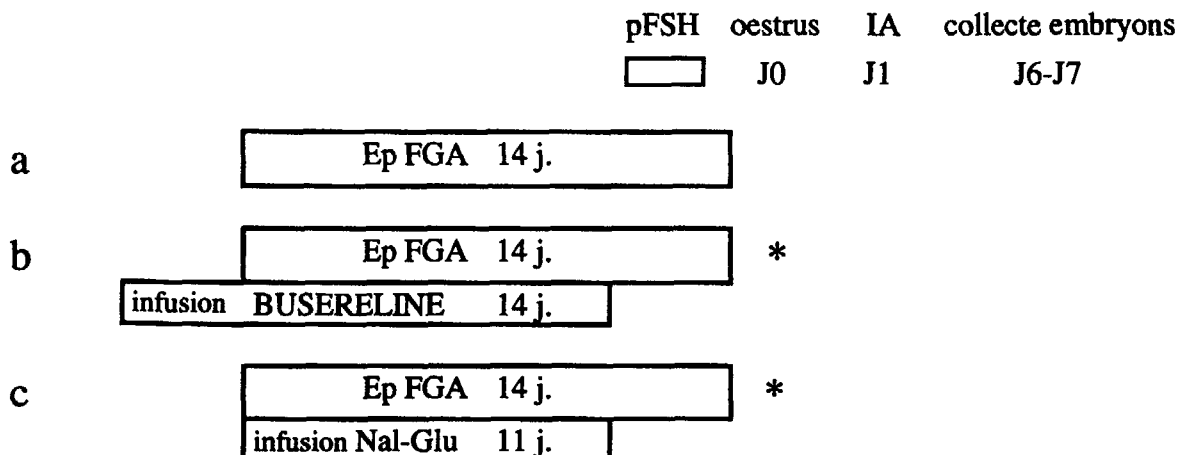


Tableau 1
Effet d'un prétraitement par un agoniste (Buséreline : 50 µg/j) ou un antagoniste (Nal-Glu LHRH : 1 mg/j) au GnRH avant pFSH (360 µg) sur la production d'embryons chez la brebis.

Traitement	n	Taux ovulation	Collecte (%)	Nb bons embryons/ brebis traitée
Témoin	13	9.0	50	3.3
Busereleine	14	21.6**	38*	7.2
Nal-Glu	13	22.5**	59	9.4

Significativement différent du lot Témoin aux seuils de : * P<0.05 ; ** P<0.001.

tion de la superovulation, le nombre moyen d'ovulations et le nombre moyen d'embryons transférables sont alors environ doublé, en comparaison avec le traitement classique, par élimination des faibles réponses. Ces résultats consécutifs au prétraitement par un agoniste ou un antagoniste de GnRH, acquis chez des femelles expérimentales de réforme laitière, ont été confirmés ultérieurement chez les brebis Lacaune élite (Brebion *et al.*, 1990a ; Briois *et al.*, 1992 et 1993).

2 - AMÉLIORATION DU TAUX DE FÉCONDATION DES DONNEUSES APRÈS SUPEROVULATION

Après une double insémination cervicale, 48 et 60 heures après le retrait des éponges vaginales chez 211 brebis Lacaune superovulées, le taux de fécondation (nb. d'oeufs fécondés/nb. de corps jaunes) chute de 75 % à 50 % chez les donneuses ayant respectivement moins et plus de 12 ovulations. Ces résultats, confirmés par d'autres travaux, montrent que

le taux d'oeufs fécondés après I.A. classique est corrélé négativement au taux d'ovulation. Chez la femelle, superovulant fortement, l'altération des conditions de survie et de transit des spermatozoïdes, impose le dépôt de ceux-ci le plus près possible du site de fécondation. Chez la brebis Lacaune, une seule insémination intra-utérine (80 à 100 x 10⁶ spermatozoïdes frais/dose) sous contrôle laparoscopique, permet d'obtenir un pourcentage élevé d'embryons viables quelque soit le niveau de réponse (Tableau 2). En routine, l'insémination intra-utérine avec de la semence fraîche peut être pratiquée 49 ± 1 heure après la fin du traitement progestatif chez les femelles en oestrus 24 h auparavant. On a montré précisément que les femelles inséminées 4 ± 2 heures après l'ovulation ont un taux d'oeufs fécondés plus élevé (P<0.05) mais un taux de collecte plus faible que les femelles inséminées 4 ± 2 heures avant l'ovulation (Tableau 3). Chez la brebis inséminée in utero avec de la semence congelée, le

Tableau 2
Efficacités comparées de l'I.A. cervicale (2 x 400 x 10⁶ spermatozoïdes frais à 48 et 60 heures après retrait éponge) et intra-utérine (80 x 10⁶ spermatozoïdes frais à 48 heures) pour la production d'embryons chez la brebis (d'après Brebion *et al.*, 1992)

	I.A. cervicale		I.A. intra-utérine
nb. brebis	17		17
Taux d'ovulation	11.0		12.2
nb. embryons récupérés (%)	132 (71)		132 (64)
% oeufs fécondés	77		93
% retardés/dégénérés	32	P<.001	6
% transférables	45	P<.001	86
nb. transf./brebis traitée	3.2		5.7

pourcentage d'embryons viables est le plus élevé lorsque l'insémination a lieu 4 à 6 h avant l'ovulation c'est à dire 24 h après le début des chaleurs (Brébion et al., 1992).

3 - COLLECTE, CRYOPRÉSERVATION OU TRANSFERT DES EMBRYONS

Les embryons sont collectés aux stades "morula compactée" à "blastocyste" (80-300 cellules) 6 à 7 jours après l'apparition des chaleurs qui ont lieu en moyenne 24 heures après le retrait des éponges vaginales. La difficulté de franchissement du cervix impose une collecte par laparotomie abdominale sous anesthésie générale, chaque corne utérine étant perfusée avec 40 ml de milieu PBS-BSA dans le sens rétrograde. Cette méthode permet de collecter 65 à 70 % d'embryons (voir tableaux) par rapport aux corps jaunes comptés.

La collecte laparoscopique (Vallet et al., 1987) qui minimise l'apparition d'adhérences post-opératoires n'est pas utilisée chez les brebis laitières car la répétabilité des collectes chez une même donneuse n'est pas recherchée, étant donné le renouvellement rapide du cheptel élite. Par contre, le transfert des embryons se fait aujourd'hui à l'aide de la technique laparoscopique (Brebion et al., 1989) qui remplace avantageusement la laparotomie particulièrement dans les conditions de terrain.

A la suite du transfert de 2 embryons par receveuse synchronisée à l'aide du traitement éponge vaginale imprégnée de FGA et PMSG, la survie moyenne jusqu'à terme de l'embryon transféré frais est de 60-65 % et est de 50-55 % pour l'embryon décongelé et jugé viable avant le transfert, la fertilité des receveuses étant respectivement de 83 et 74 % (Brebion et al., 1990b). La technique de congélation

est identique à celle présentée par G. Baril pour l'espèce caprine, au cours de ces journées.

CONCLUSION

Les progrès réalisés dans la production d'embryons chez la brebis laitière (7 à 9 embryons transférables par donneuse pré-traitée) s'appuient sur la mise en évidence que le nombre d'ovulations induit par le traitement de superovulation dépend essentiellement de l'état de la population folliculaire avant la stimulation gonadotrope, et qu'un taux de fécondation satisfaisant n'est obtenu que par insémination intra-utérine chez la femelle superovulée. Bien que notre savoir-faire nous permette à présent une programmation adéquate de toutes les étapes depuis la préparation ovarienne jusqu'à la collecte des embryons, sa mise en place reste complexe et coûteuse. En conséquence, l'utilisation du transfert d'embryons pour la gestion du schéma de sélection dans le Rayon de Roquefort demeure encore limitée. Mais son usage ciblé justifie les essais poursuivis pour mieux maîtriser tous les paramètres physiologiques et techniques de cette méthode de reproduction qui présente un intérêt majeur dans le cadre de l'exportation ou la mise à l'écart temporaire (problèmes pathologiques) de génotypes sous forme embryonnaire.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient les membres du groupe technique Reproduction du Comité National Brebis Laitières ayant participé à la mise en place des protocoles expérimentaux, J.F. Beckers (Université de Liège) pour la fourniture de pFSH, le Prof. Ph. Bouchard (Hôpital Bicêtre) et le Dr. Bauer, Hoechst Germany, pour la fourniture de Nal-Glu LHRH et de Busérelène.

Tableau 3

Influence du moment d'insémination par voie intra-utérine (100×10^6 spermatozoïdes frais) sur le nombre et la qualité des embryons récupérés chez la brebis. Le moment d'IAU a été fixé à 4 ± 2 heures avant ou après l'ovulation après mise en évidence rapide du pic préovulatoire de LH par dosage ELISA (M.C. Maurel, INRA Nouzilly).

Moment IAV/ovulation	-4 h		+4 h
nb. brebis	22		21
Taux d'ovulation	11.3		10.8
nb. embryons récupérés (%)	184 (74)		147 (65)
% non fécondés	22	P<0.05	12
% retardés/dégénérés	10		13
% transférables	67		74
nb. transf./brebis traitée	5.6		5.2

RÉFÉRENCES

BARILLET F., ELSÉN J.M., ROUSSELY M., BELLOC J.P., BRIOIS M., CASU S., CARTA R., POIVEY J.P., 1988. 3^r World Congress on Sheep and Beef Cattle Breeding, June 12, 469-490, INRA, Paris.

BREBION P., VALLET J.C., COGNIE Y., LAJOUS D., BARIL G., 1989. 5th Sci. Meeting Emb. Transf. Assoc., Lyon, France, 1, 134 (Abstract).

BREBION P., BELLOC J.P., BRIOIS M., 1990a. 6th Sci. Meeting Emb. Transf. Assoc., Lyon, France, 1, 126 (Abstract).

BREBION P., BRIOIS M., BELLOC J.P., 1990b. 6th Sci. Meeting Emb. Transf. Assoc., Lyon, France, 1, 128 (Abstract).

BREBION P., BARIL G., COGNIE Y., VALLET J.C., 1992. *Ann. Zootech.*, 41, 331-339.

BRIOIS M., BELLOC J.P., BREBION P., GUERIN Y., COGNIE Y., 1992. 8th Sci. Meeting Emb. Transf. Assoc., Lyon, France, 1, 132 (Abstract).

BRIOIS M., BELLOC J.P., EVANS G., GUERIN Y., COGNIE Y., 1993. 9th Sci. Meeting Emb. Transf. Assoc., Lyon, France, 1, 162 (Abstract).

COGNIE Y., CHUPIN D., SAUMANDE J., 1986. *Theriogenology*, 25, 148.

VALLET J.C., BARIL G., ROUGIER F., CHUPIN D., PROCUREUR R., CORTEEL J.M., 1987. 3rd Sci. Meeting Emb. Transf. Assoc., Lyon, France, 1, 60 (Abstract).

