

Lapins produits par injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) stockés à température ambiante.

N. DANIEL¹, P. CHESNÉ¹, M. BARATTE², J.P. RENARD¹

¹UMR INRA-CNRS-ENVA 1198, Biologie du Développement et de la Reproduction, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

²INRA, Unité Commune d'Expérimentation Animale, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France.

Résumé. Nous proposons, chez le lapin, une technique nouvelle d'obtention de lapins, par injection de spermatozoïdes dans des ovocytes matures. Cette technique, l'ICSI (en anglais intracytoplasmic sperm injection), est couramment pratiquée en médecine humaine. Associée à l'utilisation de sperme éjaculé conservé à température ambiante pendant 24h et à une préparation désynchronisée des receveuses (-14h), nous montrons que l'ICSI chez le lapin aboutit à la naissance de lapereaux viables. Ces résultats préliminaires indiquent que l'efficacité de l'ICSI chez le lapin, exprimée en taux de lapereaux viables par embryons transplantés est supérieure à 20%.

Abstract : Rabbit produced by intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with sperm preserved at room temperature. We propose a new technique of rabbit production, in the rabbit species, based on the direct injection of sperm into mature oocytes. This technique, ICSI (intracytoplasmic sperm injection), is already used in human medicine. We show that ICSI with ejaculated sperm preserved at room temperature during 24 hours and with a desynchronized preparation of recipients, results in the birth of viable pups. These preliminary results indicate that the efficiency of ICSI in the rabbit species expressed in term of number of viable offsprings per transferred embryos is higher than 20%.

Introduction

L'injection intra-cytoplasmique de sperme (ICSI) est une technique de reproduction utilisée couramment en médecine humaine dans le cadre des procréations médicalement assistées. Elle consiste à prélever, à l'aide d'une micropipette en verre et sous microscope, un seul spermatozoïde parmi ceux présents dans une petite goutte de semence mâle, puis à en introduire directement la tête dans le cytoplasme d'un ovule. L'embryon ainsi formé est alors transplanté chez la patiente en vue d'une grossesse. Cette technique a été initialement proposée pour les cas où la semence est très pauvre en spermatozoïdes (Palermo *et al.*, 1992 - Van Steirteghem *et al.*, 1993), une situation relativement fréquente dans l'espèce humaine (azoospermie). Elle est maintenant aussi mise en œuvre avec des spermatozoïdes recueillis dans l'épididyme quand l'éjaculation ne peut être obtenue.

Plus délicate et plus lourde à mettre en œuvre que l'insémination artificielle, l'ICSI est peu utilisée chez les animaux d'élevage. Pourtant, elle pourrait ponctuellement permettre d'assurer la descendance de mâles dont la fonction sexuelle est devenue déficiente et offrir, en cas de crise sanitaire, de meilleures garanties que l'insémination lors de l'introduction de nouvelles origines mâles dans un élevage.

Cet article fait état de résultats préliminaires que nous avons obtenus chez le lapin. L'objectif est de proposer, notamment quand des objectifs de sélection ou d'entretien de lignées l'exigent, le recours à l'ICSI.

La faisabilité technique de l'ICSI chez le lapin a été montrée pour la première fois en 1988 (Hosoi *et al.*, 1988). Plus récemment, des naissances, avec des

spermatozoïdes éjaculés et utilisés en conservant leur flagelle, ont été obtenues à l'Université du Connecticut par le groupe du Dr Xiangzhong (Jerry) Yang (Yang X *et al.*, 2001). Dans notre travail, nous avons amélioré de façon notable l'efficacité de la technique en prenant en compte le retard de développement observé aux premiers stades de l'embryogenèse avec les embryons issus d'ICSI. Nous avons aussi voulu nous placer d'emblée dans des conditions compatibles avec une utilisation en élevage en utilisant des spermatozoïdes conservés pendant 24h à température ambiante ce qui permet de les faire parvenir aisément jusqu'à un laboratoire.

1. Matériel et méthodes

1.1. Les ovocytes

Des lapines INRA1077, placées depuis une semaine sous 16h de lumière par jour, sont utilisées comme donneuses d'ovocytes. Les ovocytes au stade métaphase II sont collectés entre 14-15h après une injection d'hCG (30UI) et accouplement avec un mâle vasectomisé (Escriba *et al.*, 1998). Les ovocytes sont récupérés par « flush » des oviductes avec du D-PBS (InVitrogen – 1419). Les cellules périovocytaires sont alors enlevées (décoronation) mécaniquement par des aspirations douces et répétées à la pipette après une incubation de 15 min. dans le même milieu en présence de hyaluronidase (Sigma H3506), une enzyme qui dissout les liaisons conjonctives entre ces cellules et l'ovocyte, ajoutée à une concentration de 0,25% dans le même milieu. Les ovocytes ainsi décoronés seront lavés 3 fois dans du TCM-199-Hepes-10% SVF (Sigma H7528) puis incubés à 38,5°C & 5% CO₂ dans du TCM-199-bicarbonate-10% SVF (Sigma H4530) jusqu'à utilisation.

1.2. Récupération et conditionnement de la semence pour une ICSI avec du sperme conservé 24h.

Les éjaculats sont collectés en utilisant un vagin artificiel lubrifié de vaseline, amené à la température de 41 à 42°C. Les échantillons de sperme sont observés au microscope afin de vérifier leur motilité. Ils sont ensuite dilués (v:v ;1:3) avec un dilueur commercialisé pour les inséminations artificielles chez le lapin, le Galap (IMV Technologies - 005338).

Le sperme est ensuite conservé à température ambiante dans un tube de 15 ml et mis à l'abri de la lumière pendant une période de temps qui peut aller jusqu'à 24h ce qui permet son utilisation le jour suivant la collecte.

Pour réaliser l'ICSI les spermatozoïdes sont alors préparés de la façon suivante :

- Le culot est prélevé, rincé dans 5 à 6 ml de D-PBS et centrifugé à 800 tours/min pendant 5 minutes.
- 200µl de culot sont prélevés et dilués dans du D-PBS volume / volume (v:v).
- Après homogénéisation, 10µl de semence sont prélevés et rajoutés à 190µl de D-PBS + 10% PVP 40000 (Sigma P0930).
- A la pipette à bouche quelques picolitres de cette suspension sont ajoutés à la micro-goutte de D-PBS + 10% PVP 40000 dans la chambre de micromanipulation.

1.3. Procédure d'ICSI.

Dans la chambre de micromanipulation, 4 gouttes sont déposées :

- 1 goutte « ovocytes » de TCM-199-Hepes-10% SVF pour les micromanipulations d'ovocytes et l'ICSI.
- 1 goutte de D-PBS + 10% PVP 40000 pour le stockage des spermatozoïdes préparés.
- 2 gouttes de D-PBS + 10% PVP 40000 pour le rinçage des pipettes.

Les 2 micropipettes (maintien et injection) sont mises en place dans la micro-goutte « ovocytes », et la chambre est remplie d'huile de paraffine légère (Sigma M8410).

Les micropipettes sont réalisées auparavant avec des capillaires de verre (Phymep, Paris,GC100T) et stockées dans des boîtes à l'abri de toute poussière. Leur façonnage implique le recours à un filament chauffé électriquement, dont la température est précisément contrôlée (Microforge - Campden instruments Limited).

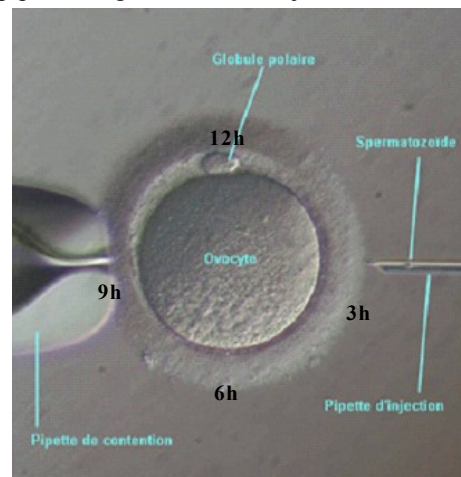
- La micropipette qui servira à maintenir en place l'ovocyte (pipette de maintien ou contention) est préparée de façon à avoir un diamètre extérieur ajusté à 100µm. Son extrémité est rodée et coudée.

- La micropipette d'injection est préparée de façon à avoir un diamètre extérieur compris entre 7µm et 10µm. Elle est ensuite biseautée, nettoyée des poussières de verres à l'acide fluorhydrique (solution diluée à 20%), très bien rincée à l'eau distillée, et coudée.

Les ovocytes sont traités par lot de 6 à 7.

Avec la pipette d'injection, un spermatozoïde est prélevé le flagelle en premier. La pipette est rincée puis amenée vers la micro-goutte avec les ovocytes. Avec la pipette de maintien, un ovocyte est maintenu de façon à placer le globule polaire à 12h (Figure-1). Le spermatozoïde est délicatement amené à l'entrée de la pipette d'injection et la zone pellucide est percée à 3h (Figure-1). La pipette d'injection est amenée doucement au contact de la membrane cytoplasmique qui est délicatement aspirée jusqu'à ce qu'elle cède (des va-et-vient délicats et successifs peuvent aider). La pipette d'injection est alors avancée au cœur du cytoplasme de l'ovocyte et le spermatozoïde est introduit tout en retirant lentement la pipette d'injection.

Figure 1 . Photo représentant le positionnement des micropipettes et gamètes avant injection.



Les ovocytes injectés sont mis en culture à 38,5°C et 5% CO2 dans du TCM-199-bicarbonate-10% SVF.

Environ 1h après, les ovocytes endommagés (lysés) sont éliminés et ceux qui sont restés intacts sont mis en culture dans des micro-gouttes de B2 + 2,5% SVF (Laboratoire CCD, Paris, France). Les embryons ainsi obtenus sont cultivés *in vitro* jusqu'au stade blastocyste ou jusqu'au transfert au stade (2)4 cellulés.

1.4. Procédure de transfert d'embryons par chirurgie.

Les receveuses sont préparées pour la pseudogestation par un traitement de 0,2ml de Réceptal (Intervet) administré en injection intra-musculaire. Elles sont préparées de façon à être synchronisées ou désynchronisées de 14h avec la préparation des donneuses (injection de hCG) : en même temps ou 14h plus tard.

Les lapines sont anesthésiées avec 4% d'isoflurane et 1,2 litre d'O2/min au masque. Préalablement à l'anesthésie gazeuse, les lapines reçoivent une injection d'anti-inflammatoire (Metacam-Boehringer-Ingelheim), de tranquillisant (Valium) et d'antibiotique (Chesné *et al.*, 2002). Après ouverture de l'abdomen par laparotomie, un transfert bilatéral par le pavillon de 5 à 7 embryons par corne est effectué.

Un suivi échographique de la receveuse peut-être réalisé afin de s'assurer du cours de la gestation (Chavatte-Palmer *et al.*, 2005).

2. Résultats et discussion

2.1. Développement *in vitro* des embryons produits après ICSI

Un total de 297 ovocytes a été injecté avec des spermatozoïdes provenant de 2 mâles différents. Une heure après injection, 168 ovocytes (56,5%) étaient intacts (tableau 1). Le lendemain 116 d'entre eux (69%) avaient atteint le stade 2-4 cellules. Après 4 jours de culture, 61 des embryons au stade 2-4 cellules avaient atteint le stade blastocyste (52,6%) soit une efficacité globale de 36,3% (61/168) par rapport aux embryons intacts utilisés après la réalisation de l'ICSI. En prenant en compte le temps mis pour effectuer l'ensemble des injections (en excluant le temps nécessaire à la préparation des milieux et des microinstruments), on peut estimer que le temps nécessaire à la production de 10 à 14 embryons au stade 2-4 cellules, soit le nombre d'embryons transplantés sur une lapine receveuse, est d'environ 90 minutes.

Tableau 1. Développement *in vitro* des embryons après ICSI.

	Nombre d'ovocytes		Nombre d'embryons	
	injectés (nb manip)	intacts après ICSI (%)	Clivés (%)	Blastocystes (%)
mâle 1	216 (n=7)	126 (58,3%)	83 (65,9%)	46 (36,5%)
mâle 2	81 (n=3)	42 (51,9%)	33 (78,6%)	15 (35,7%)
total	297 (n=10)	168/297 (56,5%)	116/168 (69%)	61/168 (36,3%)

Les résultats obtenus sont semblables à ceux obtenus par Yang *et al.* (2001, 39% de blastocystes à J4.). Dans notre cas toutefois le sperme utilisé avait été stocké pendant 24h à température ambiante. Aux vues de ces résultats, nous avons décidé d'éprouver l'aptitude des embryons ICSI clivés à se développer à terme

2.2. Développement *in vivo* après ICSI chez le lapin.

Dans un premier temps, nous avons utilisés des femelles receveuses préparées de façon synchrones transplantés avec des embryons ICSI au stade 1 cellule. Aucune gestation établie n'a pu détectée à 14 jours par palpation ou par échographie sur les trois femelles ayant reçu respectivement 12 et 14 embryons.

Dans un deuxième temps, nous avons eu recours à une désynchronisation des receveuses pour prendre en compte le retard de développement observé lors de la culture d'embryons de lapin ICSI, retard semblable à celui après transfert de noyau (Chesné *et al.* 2002).

Les trois lapines receveuses utilisées ont été

Tableau 2. Développement *in vivo* des embryons issus d'ICSI à partir de spermatozoïdes conservés jusqu'à 24h en Galap.

Type de transfert	Nombre d'embryons transplantés	Gestation à J14	Nb (%) de jeunes nés vivants
synchrone	12	non	-
	14	non	-
	14	non	-
asynchrone	10	-	0*
	11	oui	4 (36%)
	11	oui	3 (27%)
			1 mort-né.

diagnostiquées gestantes à 14 jours et deux ont donné naissance à respectivement 4 et 3 lapereaux viables (tableau 2).

Ainsi, sur les trois femelles receveuses désynchronisées transplantées avec 32 embryons ICSI, 7 lapereaux viables ont pu être obtenus soit un taux de développement à terme de plus de 20% (21,8%, 7/32). Ce taux est deux fois supérieur à celui obtenu par Yang *et al.* (2001) avec du sperme frais.

Le stockage de la semence dans le dilueur Galap pendant 24h rend possible la naissance de lapereaux issus d'embryons ICSI dans des conditions de terrain. Le sperme peut ainsi être transporté et non l'animal, ce qui limite les risques sanitaires et réduit les stress qui empêchent souvent chez cette espèce la réalisation de l'accouplement.

En outre, la semence peut être diluée à l'extrême puisque peu de spermatozoïdes par éjaculat sont nécessaires pour assurer une descendance. Une forte dilution de la semence par lavages successifs est compatible avec l'ICSI. Cette dilution offre la possibilité de réaliser des analyses très poussées sur la qualité sanitaire d'un éjaculat donné en vue de réduire considérablement les risques de transmission d'agents infectieux. Cet atout de l'ICSI pour le sauvetage de génotypes représentatifs de la biodiversité de l'espèce, en cas de crise sanitaire, est loin d'être négligeable.

Conclusion et perspectives

Notre étude montre que l'injection intra cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) peut être mise en œuvre avec succès chez le lapin avec de la semence conservée jusqu'à 24h à température ambiante. Ce délai est suffisant pour permettre l'acheminement de la semence d'un élevage à un laboratoire spécialisé dans la mise en œuvre des techniques de reproduction artificielle. Nos résultats, encore préliminaires compte tenu du petit nombre de femelles receveuses utilisées dans cette expérience pilote, indiquent un taux de succès de 20%. Deux lapereaux viables peuvent être obtenus après transfert de dix embryons dans une femelle receveuse. Ce taux est deux fois plus élevé que celui obtenu initialement par Yang (Yang *et al.*, 2001).

Nous avons entrepris d'étendre notre approche à

l'utilisation de semence congelée et obtenu tout récemment plusieurs naissances sans apparente perte d'efficacité en terme de nombre de lapereaux par ovocyte injecté (données non publiées). Si ces résultats se confirment, l'intérêt de l'ICSI chez le lapin en serait renforcé. En effet, même si chez cette espèce le recours à l'insémination artificielle avec de la semence congelée peut aboutir à des taux de fertilité et prolificité voisins de ceux obtenus avec de la semence fraîche (Andrieu et Courot, 1976 - Chen et Foote, 1994 - Mocé *et al.*, 2003) les résultats sont régulièrement décevants à cause de la grande variabilité de réponse de la semence à la congélation entre mâles d'une même population et entre éjaculats d'un même individu (Mocé *et al.*, 2005). Les procédures de congélation-décongélation réduisent souvent fortement la motilité de la semence et altèrent l'intégrité de l'acrosome avec des conséquences sur la capacitation (Castellini *et al.*, 2006). L'ICSI permet de contourner ces obstacles à la fécondation puisque le spermatozoïde est directement introduit dans le cytoplasme : un sperme de très faible motilité après décongélation peut alors être utilisé pour obtenir après ICSI des embryons qui se développent normalement *in vitro* et jusqu'au terme (nos données non publiées). Cette perspective renforce l'intérêt de l'ICSI chez le lapin quand la descendance d'un mâle donné doit être obtenue pour garantir le bon déroulement d'un programme de sélection.

La congélation des embryons est aujourd'hui utilisée pour conserver les ressources génétiques chez le lapin (Joly *et al.*, 2003). La fiabilité de cette approche après une longue période de stockage vient d'être confirmée (Salvetti *et al.*, 2007). Mais la congélation des embryons est une technique plus coûteuse à mettre en œuvre que la congélation de la semence. Si l'efficacité de l'ICSI est confirmée avec du sperme congelé, ce nouveau mode de reproduction devra être pris en compte dans les stratégies de conservation de la diversité génétique chez le lapin.

Remerciements

Nous remercions M. Christian Poirier pour son aide efficace dans la réalisation des transferts d'embryons.

Nous remercions Mme Véronique Duranthon pour son intérêt constant à l'utilisation de l'embryon de lapin comme modèle de recherche en biomédecine. Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien de l'INRA

et celui de l'Agence De Biomédecine via le contrat (programme Geninvitro- PEGh -2006).

Références

- ANDRIEU R, COUROT M, 1976. Congélation du sperme de lapin en vue de l'insémination artificielle. *1^{er} congrès international cunicole*, Dijon, communication 67.
- CASTELLINI C, PIZZI F, THEAU-CLÉMENT M, LATTAIOLI P 2006. Effect of different number of frozen spermatozoa inseminated on the reproductive performance of rabbit does. *Theriogenology*, 66:2182-7.
- CHAVATTE-PALMER P, LAIGRE P, SIMONOFF E, CHALLAH M, CHESNÉ P, RENARD JP, 2005. Caractérisation de la croissance in utero par échographie chez la lapine. *11^{ème} journées de la recherche cunicole, Paris, 29-30 nov. 2005*, p83-86, ITAVI ed..
- CHEN Y, FOOTE R.H, 1994. Survival of rabbit spermatozoa frozen and thawed at different rates with and with out seeding. *Anim. Reprod. Sci.*, 35,131-143.
- CHESNÉ P, ADENOT P, VIGLIETTA C, BARATTE M, BOULANGER L, RENARD JP, 2002. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotech.*,20,366-369.
- ESCRIBA M.J, GARCIA-XIMENEZ F. 1998. Preliminary results of ICSI applied on rabbit : a technical note. *World Rabbit Sci.* 6(2),227-230.
- HOSOI Y, MIYAKE M, UTSUNMI K, IRITANI A. 1988. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. *Proceedings of the 11th international congress of animal reproduction* 3, abstract 331.
- JOLY T, BOLET G, THEAU-CLEMENT M, FALIÈRES J, DE ROCHAMBEAU H, RENARD J.P., 2003. La Cryobanque Nationale : une mise en œuvre adaptée pour l'espèce lapin. *10^{ème} journées de la recherche cunicole, Paris, 19-20 nov. 2003*, pp. 39-42, ITAVI ed.
- MOCE E, VICENTE JS, LAVARA R, 2003. Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination. *Theriogenology*, 60(1),115-23.
- MOCE E, LAVARA R, VICENTE JS, 2005. Influence of the donor male on the fertility of frozen-thawed rabbit sperm after artificial insemination of females of different genotypes. *Reprod Domest Anim.*,40(6),516-21.
- PALERMO G. 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 17-18.
- SALVETTI P, JOLY T, RENARD JP, 2007. Viability of rabbit embryos after 15 years storage in liquid nitrogen. In *Proc. of the 44th annual meeting of the Society for Cryobiology*, 28 july-1st August, Lake Louise, Canada, P.102
- VAN STEIRTEGHEM AC, NAGY Z, JORIS H, LIU J, STAESSEN C, SMITZ J, WISANTO A, DEVROEY P. 1993. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.*, 8,1061-1066.
- YANG X, DENG M, 2001. Full term development of rabbit oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Mol. Reprod. Dev.*,59 (1) 38-43.