

# Un traitement de superovulation des lapines nullipares améliore-t-il la production d'embryons ?

M. THEAU-CLEMENT<sup>1</sup>, A. TIRCAZES<sup>1</sup>, E. BALMISSE<sup>2</sup>, T. JOLY<sup>3</sup>

<sup>1</sup>INRA. UR 631 SAGA BP 52627 - 31326 Castanet Tolosan, France

<sup>2</sup>INRA, UE PECTOUL, F-31326 Castanet-Tolosan, France

<sup>3</sup>Université de Lyon, Vetagrosup, UPSP ICE, 1, avenue Bourgelat, 69280 Marcy L'Etoile, France

**Résumé.** L'objectif de cette étude était d'étudier la pertinence d'utiliser un traitement de superovulation pour augmenter le nombre d'embryons de bonne qualité chez des lapines nullipares pour des programmes de conservation de ressources génétiques. Cent quarante-deux lapines nullipares INRA 1777 ont été réparties en 2 lots. Toutes ont été inséminées, mais la moitié d'entre elles ont reçu préalablement un traitement de superovulation (lot superovulation vs lot témoin). Les embryons étaient collectés 64 à 73h après l'insémination. Seize lapines (11%) possédaient 2 générations de corps jaunes au moment de la collecte suggérant une pseudogestation. Il est confirmé que cet état s'accompagne d'une diminution importante de la fertilité (77,78 vs 6,25%,  $P < 0,001$ ) et conduit en conséquence, à une productivité globale excessivement faible (respectivement 14,69 vs 2,63 embryons de qualité/lapine inséminée). Sur des lapines nullipares non-pseudogestantes, un traitement de superovulation de 5 injections successives étalées sur 3 jours (dose totale de 31,5 µg de pFSH par femelle), permet de tripler le nombre d'embryons de qualité par lapine traitée (7,11 vs 22,22,  $P < 0,001$ ). Cependant, les résultats suggèrent que le nombre d'embryons de qualité augmente avec l'âge des nullipares (17,62 vs 26,81 respectivement pour des lapines âgées de 20 à 25 semaines). Des études complémentaires seraient nécessaires pour préciser l'âge des lapines nullipares permettant d'obtenir une réponse optimale au traitement de superovulation.

## **Abstract. Does a superovulation treatment improve embryo production of nulliparous rabbit does?**

The experiment aimed at studying the suitability of using a superovulation treatment, to increase the number of good quality embryos (Q1Q2 embryos) of nulliparous rabbits does for conservation programs of genetic resources. One hundred forty-two nulliparous INRA 1777 rabbits were divided into two groups. All were inseminated, but half of them previously received a superovulation treatment (superovulation group vs control group). The embryos were collected 64 to 73h after insemination. Sixteen rabbits (11%) had two generations of corpora lutea at the time of collection suggesting a pseudopregnancy. It is confirmed that this state is responsible of a significant decrease in fertility (77.78 vs. 6.25%,  $P < 0.001$ ) and consequently leads to an excessively low overall productivity (respectively 14.69 vs 2.63 Q1Q2 embryos / inseminated rabbit). On non-pseudopregnant nulliparous rabbit does, a superovulation treatment consisting in 5 successive injections spread over 3 days (total dose: 31.5 µg pFSH per female), can triple the number of Q1Q2 embryos per female treated (7.11 vs 22.22,  $P < 0.001$ ). However, the results suggest that the number of Q1Q2 embryos increases with the age of nulliparous (17.62 vs. 26.81 respectively for 20 and 25 weeks). Further studies would be needed to determine the age of nulliparous rabbits to obtain an optimal response to superovulation treatment.

## **Introduction**

Les traitements de superovulation utilisés pour la sauvegarde des ressources génétiques (Joly *et al.*, 2008) permettent en moyenne d'augmenter la production d'embryons des lapines donneuses mais, ils s'accompagnent généralement d'une grande variabilité de la réponse ovarienne (Besenfelder, 2000, Joly *et al.*, 2008). Le traitement est initié 68 à 72 heures avant l'insémination artificielle (IA), à des moments variables après le sevrage des lapereaux car les lapines sont souvent en fin de production. Cependant, il est parfois nécessaire de congeler des embryons issus de lapines nullipares, qui n'ont généralement pas encore atteint leur poids adulte. Il se pose alors la question de la pertinence d'utiliser un traitement de superovulation sur des lapines n'ayant pas achevé leur croissance.

L'objectif de cette expérience est donc de comparer la production qualitative et quantitative d'embryons de

lapines nullipares recevant ou non un traitement de superovulation avant l'insémination artificielle (IA).

## **1. Matériel et méthodes**

### *1.1 Animaux et conduite d'élevage.*

Cent quarante-deux lapines nullipares INRA 1777 ont été utilisées pour cette expérience. Elles étaient placées sous un éclairage artificiel continu de 8 heures de lumière par jour, mais une semaine avant l'insémination, elles recevaient une stimulation lumineuse (passage brutal de 8 à 16 heures d'éclairage), programme lumineux maintenu jusqu'au moment du sacrifice. Les femelles étaient abreuvées et nourries à volonté avec un aliment commercial contenant 157g/kg de protéines et 170g/kg de fibres.

### *1.2 Dispositif expérimental.*

La collecte et la congélation des embryons ont été réalisées à l'Élevage expérimental de l'INRA

(PECTOUL) sur 2 séries à 5 semaines d'intervalle (février-mars 2013). Toutes nées la même semaine, les lapines ont été réparties en 2 lots identiques en tenant compte de leur généalogie. A chaque série, la moitié des lapines reçoit un traitement de superovulation consistant en 5 injections sous-cutanées successives de pFSH à 12 heures d'intervalle (dose totale injectée/femelle : 31,5 µg de Stimufol<sup>®</sup>, Reprobiol, Belgique) selon le protocole décrit par Salvetti (2008). Sept heures après la dernière injection, les lapines sont inséminées à 16 heures, l'ovulation est induite simultanément par injection intra-musculaire de 1,6 µg d'acétate de buséréline (Réceptal<sup>®</sup>, Intervet, France). Elles sont sacrifiées 3 jours après, le matin à partir de 8 heures et les embryons sont collectés 64 à 73 heures après IA.

Les lapines sont pesées à l'IA. L'observation des ovaires a permis de dénombrer les corps jaunes et les follicules hémorragiques (diamètre > 1 mm). Les tractus génitaux sont isolés puis perfusés avec 20 ml d'Euroflush (IMV France), le perfusé est observé sous une loupe binoculaire pour dénombrer les œufs récoltés : les embryons de bonne qualité (Q1 et Q2, selon les critères morphologiques établis par l'International Embryo Transfer Society), les embryons dégénérés (Q3) et les ovocytes (non fécondés).

### 1.3 Analyses statistiques.

Le poids des lapines à l'IA, la fréquence d'ovulation, le nombre de corps jaunes, de follicules hémorragiques, le taux de collecte (nombre d'embryons collectés/nombre de corps jaunes), la fertilité (nombre de lapines ayant au moins 1 embryon Q1Q2/nombre de lapines traitées), et la productivité totale (nombre d'embryons Q1Q2/nombre lapines traitées) ont été étudiés au moyen d'une analyse de variance à effets fixés (procédure GLM de SAS). Nous avons considéré dans un premier temps l'effet fixé de la pseudogestation. Dans un deuxième temps, sur les lapines non-pseudogestantes, nous avons analysé l'effet fixé du traitement (2 niveaux : avec ou sans traitement de superovulation), de la série (2 niveaux : série 1 et série 2) et l'interaction traitement\*série. La fréquence d'ovulation et la fertilité sont considérées comme des variables de Bernoulli (variable 0-1) et sont analysées comme des variables continues classiques. Le nombre d'embryons Q1Q2, Q3, les ovocytes et le taux de fécondation (nombre d'embryons Q1Q2/ nombre d'œufs collectés) sont analysés sur les 98 lapines donneuses (ayant obtenu au moins un embryon Q1Q2) selon le même modèle que précédemment.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Effet de la pseudogestation (tableau 1).

Un total de 142 lapines étaient candidates à la collecte d'embryons, 16 d'entre elles possédaient, à la surface de l'ovaire, 2 générations de corps jaunes suggérant une pseudogestation telle que décrite par Theau-Clément *et al.*, (2000). Ces lapines n'avaient jamais

été inséminées ou saillies auparavant, la cause de ces ovulations est aujourd'hui inconnue (Boiti *et al.*, 2006). Le pourcentage de lapines nullipares pseudogestantes (11%) est du même ordre de grandeur que celui trouvé par Theau-Clément *et al.* (2005 ; nullipares : 16%, primipares : 32,5%, multipares : 4%). Les lapines pesaient en moyenne 4,079 kg, le poids n'est pas en relation avec l'état de pseudogestation. La fréquence d'ovulation est significativement plus faible chez les lapines pseudogestantes (81,25 vs 96,03%). Le nombre de corps jaunes est plus faible chez les pseudogestantes, cependant la différence n'est pas significative (18,40 et 24,46 corps jaunes). En revanche, les pseudogestantes ont plus de follicules hémorragiques signant une atresie folliculaire plus importante. Chez ces lapines, le taux de collecte des embryons est aussi significativement réduit (42,79 vs 73,33), ainsi que la fertilité qui chute de manière drastique (6,25 vs 77,78 %), se répercutant en conséquence sur la productivité totale (2,63 vs 14,69 embryons Q1Q2/lapine inséminée). Ces résultats sont en accord avec les observations de Theau-Clément *et al.* (2000).

### 2.2. Effet du traitement et de la série sur la réponse ovarienne, la fertilité et la productivité des lapines non-pseudogestantes (tableau 2).

L'allotement a été bien fait, puisque le poids des lapines ne varie pas significativement en fonction du traitement. On peut noter que les lapines sont plus lourdes en série 2 (+ 340g), elles ont en effet 5 semaines de plus. La fréquence d'ovulation est élevée (96,03%), elle ne varie pas significativement en fonction du traitement ou de la série. En revanche, le nombre de corps jaunes est plus élevé chez les lapines ayant reçu un traitement de superovulation (37,72 vs 11,33,  $P < 0,001$ ). Cependant, le traitement et la série interagissent ( $P = 0,067$ ). En effet, nous n'observons pas d'effet série sur le lot témoin, en revanche les lapines du lot expérimental répondent plus largement au traitement de superovulation en série 2 (42,28 vs 33,17 corps jaunes). Salvetti (2008) obtient sur des lapines de génotype et de parité variés, 11,9 et 26,7 corps jaunes, respectivement pour le lot témoin et le lot superovulé. Nos résultats démontrent donc l'efficacité du traitement FSH pour accroître la croissance folliculaire et l'intensité d'ovulation des lapines nullipares, d'autant plus qu'elles sont plus âgées. Conformément aux observations de Kennelly et Foote (1965), le nombre de follicules hémorragiques est augmenté après traitement de superovulation (2,09 vs 10,63,  $P < 0,001$ ). En effet, l'administration de doses supra-physiologiques de gonadotrophines exogènes conduit à une apoptose précoce des cellules de la granulosa conduisant à l'atresie des follicules préovulatoires. La fertilité ne varie pas en fonction du traitement. Cependant, l'interaction traitement\*série ( $P = 0,004$ ), est due à l'absence d'effet série sur le lot témoin, en revanche les lapines du lot expérimental sont plus fertiles en série 2 (respectivement 55,17 vs 90,91 %).

**Tableau 1. Influence de la pseudogestation sur la réponse ovarienne et la productivité. Résultats de l'analyse de variance et moyennes estimées.**

	N	Poids IA (kg)	Fréquence ovulation (%)	Corps jaunes	Follicules hémorragiques	Taux collecte <sup>(1)</sup> (%)	Fertilité <sup>(2)</sup> (%)	Productivité Totale <sup>(3)</sup>
Moyenne	142	4,079	94,37	23,82	6,72	70,36	69,72	13,33
R <sup>2</sup>		<0,001	0,041	0,011	0,028	0,077	0,242	0,060
<b>Effet pseudogestation</b>		NS	P=0,016	NS	P=0,048	P=0,001	P<0,001	P=0,003
Non pseudogestante	126	4,076	96,03	24,46	6,29	73,33	77,78	14,69
Pseudogestante	16	4,101	81,25	18,40	10,13	42,79	6,25	2,63

<sup>(1)</sup> Nombre d'embryons ou d'ovocytes collectés/nombre de corps jaunes. <sup>(2)</sup> Nombre de lapines ayant au moins un embryon Q1Q2/nombre de lapines traitées. <sup>(3)</sup> Nombre d'embryons Q1Q2/nombre de lapines traitées.

**Tableau 2. Influence du traitement et de la série sur la réponse ovarienne et la fertilité des lapines non pseudogestantes. Résultats de l'analyse de variance et moyennes estimées.**

	N	Poids IA (kg)	Fréquence Ovulation (%)	Corps jaunes	Follicules hémorragiques	Taux collecte <sup>(1)</sup> (%)	Fertilité <sup>(2)</sup> (%)	Productivité totale <sup>(3)</sup>
Moyenne	126	4,076	96,03	24,46	6,72	73,33	77,78	14,69
R <sup>2</sup>		0,233	0,036	0,560	0,411	0,045	0,101	0,288
<b>Effet traitement</b>		NS	NS	P<0,001	P<0,001	NS	NS	P<0,001
Témoin	64	4040	98,44	11,33	2,09	76,06	81,25	7,11
Superovulation	62	4102	93,31	37,72	10,63	69,65	73,04	22,22
<b>Effet série</b>		P<0,001	NS	P=0,024	NS	NS	P=0,041	P=0,069
Série1	61	3901	93,27	22,01	6,40	71,15	69,77	12,48
Série 2	65	4241	98,48	27,04	6,32	74,56	84,52	16,85
<b>Traitement*série</b>		NS	NS	P=0,067	NS	P=0,042	P=0,004	P=0,044

<sup>(1)</sup> Nombre d'embryons ou d'ovocytes collectés/nombre de corps jaunes. <sup>(2)</sup> Nombre de lapines ayant au moins un embryon Q1Q2/nombre de lapines traitées. <sup>(3)</sup> Nombre d'embryons Q1Q2/nombre de lapines traitées.

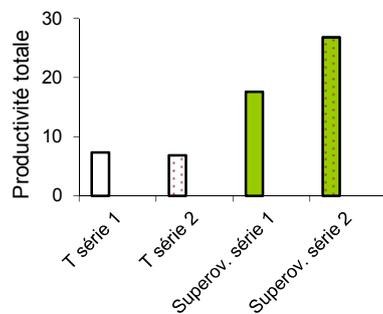
**Tableau 3. Influence du traitement et de la série sur la production d'embryons des donneuses non pseudogestantes. Résultats de l'analyse de variance et moyennes estimées.**

	N	Embryons Q1Q2	Embryons Q3	Ovocytes	Taux fécondation <sup>(1)</sup> (%)
Moyenne	98	18,89	1,14	2,64	86,39
R <sup>2</sup>		0,504	0,239	0,180	0,209
<b>Effet traitement</b>		P<0,001	P<0,001	P<0,001	P<0,001
Témoin	52	8,75	0,25	0,45	93,97
Superovulation	46	30,72	2,07	5,17	77,76
<b>Effet série</b>		NS	NS	NS	NS
Série1	43	20,32	1,05	2,79	86,10
Série 2	55	19,15	1,27	2,84	85,63
<b>Traitement*série</b>		NS	NS	NS	NS

<sup>(1)</sup> Nombre d'embryons Q1Q2/nombre d'œufs collectés

En conséquence, la productivité mesurée sur l'ensemble des lapines non-pseudogestantes est 3 fois plus importante après un traitement FSH ( $22,22 \pm 18,94$  vs  $7,11 \pm 4,16$  d'embryons Q1Q2/lapine traitée). Une interaction traitement\*série sur la productivité totale traduit le fait que l'effet série ne s'exerce que sur le lot traité ( $17,62$  vs  $26,81$  embryons Q1Q2 respectivement pour les séries 1 et 2, figure 1). Ce résultat est vraisemblablement le fait d'une maturité plus élevée des lapines de la série 2 (+ 5 semaines, + 340g), suggérant qu'elles sont plus réceptives à l'action de la FSH. Le traitement de superovulation est donc plus efficace sur des lapines matures, capables de produire un grand nombre de corps jaunes de qualité et d'être fécondées, il reste cependant lié à une grande variabilité.

**Figure 1. Nombre d'embryons Q1Q2 par lapine traitée en fonction de la série et du traitement.**



### 2.3. Effet du traitement et de la série sur la production quantitative et qualitative des lapines donneuses d'embryons (tableau 3).

Sur 98 lapines donneuses d'embryons, le nombre d'embryons de qualité Q1Q2 est augmenté par l'administration de la FSH ( $8,75$  vs  $30,72$ ,  $P < 0,001$ ) quelle que soit la série. Il en est de même pour les embryons de mauvaise qualité et les ovocytes (respectivement  $0,25$  vs  $2,07$ ,  $P < 0,001$  et  $0,45$  vs  $5,17$ ,  $P < 0,001$ ). Cependant, quelle que soit la série, le taux de fécondation est déprimé par le traitement de superovulation ( $93,97$  vs  $77,76$ ,  $P < 0,001$ ).

### Conclusion

L'objectif de cette étude était d'étudier la pertinence d'utiliser un traitement de superovulation pour augmenter le nombre moyen d'embryons de bonne qualité chez des lapines nullipares, pour des

programmes de conservation de ressources génétiques. Dans nos conditions expérimentales, sur des lapines nullipares non-pseudogestantes, un traitement de superovulation de 5 injections successives étalées sur 3 jours (dose totale de  $31,5 \mu\text{g}$  de pFSH par femelle), permet de tripler le nombre d'embryons de qualité par lapine traitée. Cependant, les résultats confirment la grande variabilité de la réponse à un traitement de superovulation. Par ailleurs, ils suggèrent que le nombre d'embryons de qualité, augmente avec l'âge des nullipares. Des études complémentaires seraient nécessaires pour préciser l'âge des lapines nullipares permettant d'obtenir une réponse optimale au traitement de superovulation.

### Remerciements

Les auteurs remercient les techniciens INRA de PECTOUL ainsi que J. Ruesche pour leur précieuse collaboration.

### Références

- BESINFELDER U., HASS C., BREM G. 2000. Reproduction technology and gene transfer in rabbits. *7<sup>th</sup> World Rabbit Congress*, July 4-7, 2000, Valencia, Spain, 37-59.
- BOITI C., BESINFELDER U., BRECCHIA G., THEAU-CLÉMENT M., ZERANI M., 2006. Reproductive physiopathology of the rabbit doe. In MAERTENS L., Coudert P., (Eds) *Recent Advances in Rabbit Sciences*, Cost Action 848 : "Multi-faceted research in rabbits : a model to develop a healthy and safe production in respect with animal welfare", 3-19.
- JOLY T., SALVETTI P., NETO V., DANIEL N., RENARD J.P. 2008. La cryoconservation des ressources génétiques chez le lapin. *Biofutur* 287, 24-27.
- KENNELLY J.J., FOOTE R.H. 1965. Superovulatory response of pre- and post-pubertal rabbits to commercially available gonadotrophins. *J. Reprod. Fertil* 9, 177-188.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 1999. SAS User's guide, version 8, SAS Institute Inc., Cary, NC.
- SALVETTI P. 2008. Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine : application à la gestion des ressources génétiques. Thèse de l'Université de Lyon, 179 pp.
- THEAU-CLEMENT M., BOITI C., MERCIER P., FALIERES J., 2000. Description of the ovarian status and fertilising ability of primiparous rabbit does at different lactation stage, *Proceedings of the 7th World Rabbit Congress Valencia Spain*, Vol A, 259-266.
- THEAU-CLEMENT M., BOITI C., BRECCHIA G., 2005. Characterisation of pseudopregnant rabbit does at the moment of artificial insemination. Preliminary results. Scientific Meeting Management and housing of rabbit does : reproductive efficiency and welfare interactions, Palerme, Italie, 23-25 juin 2005, Cost Action 848