

Une désynchronisation des lapines receveuses améliore-t-elle les résultats de transfert d'embryons ?

M. THEAU-CLEMENT¹, A. TIRCAZES¹, E. BALMISSE², T. JOLY³

¹INRA. UR 631 Station d'Amélioration Génétique des Animaux BP 52627 - 31326 Castanet Tolosan, France

²INRA, UE PECTOUL, F-31326 Castanet-Tolosan, France

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

Résumé. L'objectif de cette expérience est de mesurer l'influence de l'état physiologique des lapines donneuses au moment de l'insémination et du stade physiologique des receveuses sur le rendement de transferts d'embryons (n=49) au stade morula (67±2 heures dans notre expérience). Les donneuses ont reçu un traitement de superovulation, elles sont inséminées alors qu'elles sont allaitantes (3 jours avant sevrage, ou le jour du sevrage) ou non allaitantes. Les lapines receveuses reçoivent des embryons au stade 67±2 heures post induction de l'ovulation (*p.o.*), au moment du transfert, elles sont au stade : 59-61, 62-64, 65-68 et 69-71 *p.o.* Sur l'ensemble des transferts, l'état physiologique des donneuses au moment de l'insémination n'influence significativement ni la fertilité, ni la taille de portée (nés vivants, nés morts) ni le rendement global (nombre de nés vivants/nombre d'embryons transférés). En revanche, la fertilité est optimale pour des receveuses aux stades 62-64 et 65-68 heures après l'induction de l'ovulation (respectivement 77,78 et 79,78 % vs 68,36 et 28,90 % pour les stades 59-61 et 69-71 heures post induction de l'ovulation, P=0,024). Le nombre de lapereaux nés vivants est significativement supérieur quand les receveuses sont à un stade correspondant à l'âge des embryons (respectivement 5,77 vs 4,28, 2,83 et 3,52 pour 59-61, 62-64, 69-71 heures après l'ovulation, P=0,036). En conséquence, la réussite du transfert, ou le rendement mesuré sur les lapines fertiles est plus élevé quand le stade physiologique des lapines correspond à l'âge des embryons (respectivement 53,92 % vs 37,74, 28,87, et 33,01 %, P=0,053). La durée de la gestation est plus longue après un transfert d'embryons (moyenne : 32,6 jours). Le nombre de lapereaux nés vivants est corrélé au nombre total d'embryons transférés (r=+0,32, P=0,024). La durée de gestation est négativement corrélée au nombre de nés totaux (r=-0,60, P<0,001). En conclusion, pour des transferts d'embryons au stade morula (67 ±2 heures après l'ovulation) dans les cornes utérines, la fertilité ainsi que le nombre d'embryons vivants sont améliorés pour des transferts synchrones, c'est-à-dire quand l'âge des embryons correspond précisément au stade physiologique des receveuses après l'induction de l'ovulation.

Abstract. Does a desynchronization of rabbit recipient improve the results of embryo transfer? The objective of this experiment was to measure the influence of the physiological status of the donor rabbits at the time of insemination and the physiological stage of the recipient, on the performance of embryo transfer (n = 49) at the morula stage (67 ± 2 hours in our experience). The donors were treated for superovulation and were inseminated as they were lactating (3 days before weaning, or the day of weaning) or not lactating. The recipient rabbits receiving embryos at 67 ± 2 hours post induction of ovulation, at the time of the transfer, they were at the stage: 59-61, 62-64, 65-68 and 69-71 hours post ovulation. On the all transfers, the physiological state of the donor at the time of insemination did not significantly influence fertility or litter size (born alive, born dead) or global yield (number of born alive / number of transferred embryos). However, fertility was optimal for the recipient stages 62-64 and 65-68 hours after ovulation induction (respectively 77.78 and 79.78% vs. 68.36 and 28.90 for stages 59-61 and 69-71 hours post ovulation induction, P = 0.024). The number of born alive was significantly higher when recipients were at a stage corresponding to the age of embryos (5.77 vs. 4.28, respectively, 2.83 and 3.52 for 59-61, 62-64, 69-71 hours after ovulation, P = 0.036). Accordingly, the successful transfer, measured on the fertile rabbits yield was higher when the physiological stage rabbits corresponds to the age of embryos (respectively 53.92% vs. 37.74, 28.87, and 33.01%, P = 0.053). The pregnancy duration is longer after embryo transfer (mean: 32.6 days). The number of born alive is correlated to the total number of transferred embryos (r = 0.32, P = 0.024). The gestation duration is negatively correlated with the total number of born (r = -0.60, P < 0.001). In conclusion, for embryo transfer at the morula stage (67 ± 2 hours after ovulation) in the uterine horns, fertility and the number of live embryos are improved for synchronous transfers, is say when the age of the embryos corresponds to the physiological state of the recipient after induction of ovulation.

Introduction

Chez le lapin, la conservation de ressources génétiques implique l'utilisation de techniques pour augmenter la production d'embryons des lapines donneuses et éventuellement les congeler, permettant ainsi de dissocier dans le temps et dans l'espace leur production et leur utilisation. Ces embryons sont ensuite transférés chez des lapines receveuses qui, après une induction de l'ovulation, sont à un stade physiologique correspondant à l'âge des embryons.

Les traitements de superovulation sont souvent utilisés afin d'augmenter la production d'embryons des lapines donneuses (Joly et Neto, 2013 ; Besenfelder, 2000). Le traitement est initié 56 heures avant l'insémination artificielle (IA), à des moments

variables après le sevrage des lapereaux car les lapines sont souvent en fin de production. Dans une étude préliminaire, Theau-Clément *et al.* (2007) ont montré que le stade physiologique des lapines autour du sevrage (IA 2 jours vs 7 jours après sevrage), influence la réponse à un traitement de superovulation ainsi que la production d'embryons de qualité.

Les embryons au stade morula (65 à 72h *p.c.*) peuvent être transférés dans les cornes utérines (Garcia-Ximenez *et al.*, 1991) ou dans les oviductes (Besenfelder et Brem, 1993). Dans le cas où les embryons ont été préalablement congelés, il est généralement admis qu'ils accusent un retard de développement et il est parfois recommandé de les transférer dans des receveuses à un stade

physiologique légèrement moins avancé (Landa, 1981 ; et Tsunoda *et al.*, 1982).

L'objectif de cette analyse est de mesurer l'influence de l'état physiologique des lapines donneuses au moment de l'IA et du stade physiologique des receveuses sur le rendement des transferts. Les donneuses ont reçu un traitement de superovulation, elles sont inséminées alors qu'elles sont allaitantes (3 jours avant sevrage, ou le jour du sevrage) ou non allaitantes. Les lapines receveuses reçoivent des embryons au stade 67 ± 2 heures post induction de l'ovulation (*p.o.*), au moment du transfert, elles sont au stade : 59-61, 62-64, 65-68 et 69-71 heures *p.o.*

1. Matériel et méthodes

1.1 Dispositif expérimental.

Un total de 507 embryons de la lignée INRA 1001 a été obtenu (janvier-février 2013) ; ils sont issus de lapines donneuses ayant reçu un traitement de superovulation consistant en 5 injections sous-cutanées successives de pFSH (dose totale injectée/femelle : 31,5 µg de Stimufol[®], Reprobio, Belgique, Salvetti, 2008) à 12 heures d'intervalle. Douze heures après la dernière injection, les lapines sont inséminées avec de la semence fraîche, l'ovulation est induite par injection intra-musculaire de 1,6 µg d'acétate de buséréline (Réceptal[®], Intervet, France). Au moment de l'insémination, les donneuses sont à différents états physiologiques, elles sont allaitantes (3 jours avant sevrage, ou le jour du sevrage) ou non allaitantes.

Quarante-neuf lapines INRA 1777 multipares (ayant réalisé de 3 à 6 portées) sont préparées au transfert d'embryons préalablement congelés (méthode Salvetti, 2008) et reçoivent une injection intra-musculaire de 0,8 µg d'acétate de buséréline 59-61, 62-64, 65-68 ou 69-71 heures avant le transfert. Celui-ci est effectué par voie chirurgicale au niveau des cornes utérines par laparotomie midventrale. Deux opérateurs sont intervenus. Le nombre d'embryons transférés a varié de 5 à 15, parfois les embryons contenus dans une paillette ont permis de faire deux transferts. Les embryons sont transférés immédiatement après collecte.

Toutes les lapines sont placées sous un éclairage artificiel continu de 8 heures de lumière par jour, mais une semaine avant l'insémination (ou l'injection de GnRH pour les receveuses), elles reçoivent une stimulation lumineuse (passage brutal de 8 à 16 heures d'éclairage, programme maintenu jusqu'au moment de l'abattage des donneuses). Les femelles sont abreuvées et nourries à volonté avec un aliment commercial contenant 157g/kg de protéines et 170g/kg de fibres.

La fertilité définie par le nombre de mises bas par transfert réalisé, la taille de portée à la naissance (nombre de lapereaux nés vivants, nés totaux) et la durée de gestation ont été enregistrés. Le rendement du transfert par lapine fertile (nombre de lapereaux

nés vivants/embryons transférés) et le rendement global (sur toutes les lapines transférées : nés vivants/embryons transférés) ont été calculés.

1.3 Analyses statistiques.

La fertilité et le rendement global ont été analysés sur l'ensemble des transferts. Le nombre de lapereaux nés vivants, nés morts, la durée de gestation et le rendement du transfert ont été analysés pour les lapines ayant produit au moins un lapereau. Ces variables ont été étudiées au moyen d'une analyse de variance à effets fixés (procédure GLM de SAS) en considérant l'effet fixé de l'état physiologique des donneuses au moment de l'insémination (3 niveaux : allaitantes 3 jours avant sevrage, le jour du sevrage ou non allaitantes) et l'effet fixé du stade physiologique des receveuses au moment du transfert (4 niveaux : 59-61, 62-64, 65-68, 69-71 heures après l'injection de GnRH). L'interaction n'étant significative sur aucune des variables, nous l'avons supprimée du modèle. Il en est de même pour l'effet de l'opérateur et de la parité des lapines receveuses. La fertilité est considérée comme une variable de Bernoulli (variable 0-1), elle est analysée comme les variables continues classiques.

2. Résultats et discussion

Un total de 49 transferts a été réalisé à partir de 30 paillettes (tableau 1). Les embryons avaient en moyenne 67 ± 2 heures (80% ont été congelés 67 ± 1 heure après l'insémination). Il faut rappeler que toutes les donneuses avaient reçu un traitement de superovulation, elles étaient allaitantes (insémination 3 jours avant sevrage, ou le jour du sevrage) ou non allaitantes. Sur l'ensemble des transferts, l'état physiologique des donneuses au moment de l'insémination n'influence significativement ni la fertilité, ni le rendement global (nombre de nés vivants/embryons transférés). Sur les lapines fertiles, l'état physiologique des donneuses au moment de l'insémination n'influence aucune composante du rendement, ni la durée de la gestation. Sur ces mêmes donneuses, Salvetti (2008) n'avait pas observé d'effet de l'état physiologique des donneuses sur la réponse au traitement de superovulation et sur la production d'embryons de qualité. Ce complément d'étude montre que le rendement du transfert d'embryons de bonne qualité (Q1 et Q2, selon les critères morphologiques établis par l'International Embryo Transfer Society) préalablement congelés, n'est pas influencé par l'état physiologique des lapines aux stades étudiés.

En revanche, le stade physiologique des receveuses influence la fertilité. Elle est maximale pour des receveuses au stade 65-68 heures après l'induction de l'ovulation (79,78 %), elle ne varie pas significativement pour des stades plus précoces, mais elle est significativement déprimée quand les embryons sont placés dans des cornes utérines à un stade physiologique plus avancé (28,90 %, $P=0,024$). Le retard de développement des embryons ayant subi

Tableau 1. Influence de l'état physiologique des donneuses au moment de l'insémination et du stade physiologique des receveuses sur la réussite et le rendement du transfert. Résultats de l'analyse de variance et moyennes estimées.

Lapines receveuses fertiles							
	N	Fertilité (%)	Nés vivants	Nés morts	Rendement ⁽¹⁾ (%)	Durée gestation (j)	Rendement global ⁽²⁾ (%)
Moyenne	49	61,22	4,40	0,83	40,80	32,57	24,98
R ²		0,269	0,395	0,127	0,327	0,513	0,321
Etat physio. donneuses/IA		NS	NS	NS	NS	NS	NS
Allaitantes	13	63,66	3,27	1,36	33,20	32,56	22,72
Jour sevrage	17	52,52	4,00	0,68	36,91	32,59	20,23
Non allaitantes	19	74,92	5,03	0,46	45,03	32,75	33,85
Stade physio. receveuses (heures post induction ovulation)		*	*	NS	*	***	***
59-61	13	68,36 ^a	4,28 ^{ab}	1,53	37,74 ^{ab}	31,74 ^a	26,66 ^{ab}
62-64	10	77,78 ^a	2,83 ^a	0,52	28,87 ^a	33,50 ^c	22,66 ^{ac}
65-68	11	79,78 ^a	5,77 ^b	0,69	53,92 ^b	32,32 ^{ab}	43,35 ^b
69-71	15	28,90 ^b	3,52 ^{ab}	0,59	33,01 ^{ab}	32,97 ^{bc}	9,74 ^c

⁽¹⁾ Sur lapines fertiles : nombre nés vivants/nombre d'embryons transférés. ⁽²⁾ Sur toutes les lapines transférées : nombre nés vivants/nombre d'embryons transférés

*: significatif au seuil 5/100, ***: significatif au seuil 1/1000.

une congélation pourrait générer une désynchronisation trop importante affectant l'implantation et la survie des embryons (Landa, 1981 ; et Tsunoda *et al.*, 1982).

Le stade physiologique des receveuses influence aussi significativement la taille de portée à la naissance (P=0.036). En effet, le nombre de nés vivants est significativement supérieur quand les receveuses sont à un stade correspondant à l'âge des embryons, notamment par rapport au stade 62-64 h (respectivement 5,77 vs 2,83). En conséquence, la réussite du transfert, ou le rendement mesuré sur les lapines fertiles est plus élevé quand le stade physiologique des lapines correspond à l'âge des embryons (respectivement 53,92 % vs 37,74, 28,87, et 33,01 %, pour 59-61, 62-64, et 69-71 heures p.o., P=0,053). Ce résultat est conforme aux conclusions de Techakumphu et Heyman (1987), qui ont montré que le rendement des transferts à partir d'embryons de 65 heures, préalablement congelés et transférés dans l'oviducte, est supérieur pour des transferts synchrones vs fortement asynchrones (par rapport aux donneuses : -17 et -24 heures). Ce résultat est cependant opposé aux conclusions de Landa (1981) et notamment Tsunoda *et al.* (1982) qui recommandent une désynchronisation des receveuses (+23% lapereaux sevrés quand les receveuses ovulent 18h après les donneuses). Cependant, ces auteurs font les transferts au niveau de l'oviducte.

La durée de la gestation est plus longue après un transfert d'embryons (moyenne : 32,6 jours). Cependant, on peut remarquer qu'elle varie en fonction du stade physiologique des receveuses. En effet, elle est significativement plus courte quand les

embryons sont placés dans une corne utérine trop précocement (59-61 heures après l'induction de l'ovulation).

Dans ces conditions de transfert, le nombre de nés vivants est corrélé au nombre total d'embryons transférés ($r=+0,32$, $P=0,024$). Comme l'a démontré Hammond (1934), la durée de gestation est négativement corrélée au nombre de nés totaux ($r=-0,60$, $P<0,001$).

Conclusion

L'objectif de cette analyse était de mesurer l'influence de l'état physiologique des lapines donneuses au moment de l'IA et du stade physiologique des receveuses, sur le rendement des transferts d'embryons. Dans nos conditions d'expérimentation, l'état physiologique des donneuses n'a pas influencé la réussite du transfert, ni son rendement. En revanche, pour des transferts d'embryons au stade morula (67 ±2 heures après l'ovulation) dans les cornes utérines, la fertilité ainsi que le nombre d'embryons vivants est amélioré pour des transferts synchrones, c'est-à-dire quand l'âge des embryons correspond au stade physiologique des receveuses après l'induction de l'ovulation.

Dans nos conditions expérimentales, une désynchronisation des lapines receveuses réduit le rendement du transfert d'embryons. Sur un plan appliqué, ce résultat indique que l'induction de l'ovulation des receveuses doit être pratiquée, de manière à correspondre précisément à l'âge des embryons au moment du transfert dans les cornes utérines.

Remerciements

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

Références

- BESENFELDER U., HASS C., BREM G. 2000. Reproduction technology and gene transfer in rabbits. *7th World Rabbit Congress*, July 4-7, 2000, Valencia, Spain, 37-59.
- BESENFELDER U., BREM G. 1993. Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *J. Reprod. Fertil.* 99: 53-56.
- GARCIA-XIMENEZ F., VICENTE J.S., SANTACREU A.M. 1991. Embryo transfer in lactating rabbit does by laparoscopy. *Anim. Reprod. Sci.* 24: 343-346.
- LANDA V. 1981. Factors influencing the results of transfers of rabbit embryos stored at -196°C. *Folia Biol. Praha*, 27: 265-273.
- HAMMOND J. 1934. The fertilisation of rabbit ova in relation to time. A method of controlling the litter size, the duration of pregnancy and the weight of the young at birth? *J. Exp. Biol.* 11 : 140-161.
- JOLY T., NETO V. 2013. La cryoconservation des ressources génétiques chez le lapin. *STAL*, 3^{ème} trimestre 2013, vol 39 : 59-65.
- 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.
- TECHAKUMPHU M., AND HEYMAN Y. 1987. Survival of frozen-thawed rabbit morulae after synchronous or asynchronous transfer. *Anim. Reprod. Sci.* 12 : 305-312.
- THEAU-CLEMENT M., SALVETTI P., BOLET G., BODIN L., GARREAU H., FALIERES J., JOLY T. 2007. Influence de l'intervalle entre le sevrage et le début d'un traitement de superovulation sur la production d'embryons et leur qualité chez la lapine. *12^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole*, Le Mans, France, 27-28 novembre 2007, 37-39.
- TSUNODA Y., SOMA T., AND SURGIE T. 1982. Effect of post-ovulatory age of recipient on survival of frozen-thawed rabbit morulae. *J. Reprod. Fertil.*, 65 : 483-487.