

Essais d'amélioration de la production d'embryons chez la lapine

P SALVETTI¹, P GUÉRIN¹, M THEAU-CLÉMENT², J HURTAUD³, JF BECKERS⁴, T JOLY¹

¹ Université de Lyon, ENVL/ISARA-LYON, unité CRYOBIO, 1 avenue Bourgelat, 69280 Marcy L'Étoile, France.

² INRA, Station d'Amélioration Génétique des Animaux, B.P. 27, 31326 Castanet Tolosan Cedex, France.

³ GRIMAUD FRERES SELECTION SAS, La Corbière, 49450 Roussay, France.

⁴ Department of Physiology of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine,
Bd de Colonster, N°20, B41, B-4000 Sart Tilman, Belgique.

Résumé. Les traitements de superovulation sont fréquemment utilisés lors des opérations de congélation d'embryons mais leur efficacité est très variable selon les individus traités ce qui entraîne une production d'embryons irrégulière. L'objectif de ce travail est d'optimiser la production qualitative et quantitative d'embryons chez la lapine en étudiant l'effet de la LH (Luteinizing Hormone) dans les traitements de superovulation (expérience 1) ou en essayant de synchroniser les vagues folliculaires (expérience 2). L'effet de la LH a été évalué par comparaison de deux traitements de superovulation à base de FSH (Follicle Stimulating Hormone) porcine contenant ou non 20% de LH porcine. Le traitement de synchronisation utilisait, préalablement au même traitement de superovulation (+20% LH), la prostaglandine F_{2α} sur lapines rendues pseudogestantes. Ces études n'ont pas conduit à une amélioration significative des résultats de production d'embryons par rapport aux traitements classiques bien que la variabilité des réponses semble pouvoir être réduite. Ces travaux mettent une fois de plus en évidence le manque de connaissances scientifiques sur la cinétique de la croissance folliculaire chez la lapine.

Abstract. Optimization attempts of the embryos production in the rabbit doe. Given the variable efficiency of the superovulation treatments applied to embryos freezing, this frequently used technique involves an irregular embryos production. That work aims to optimize the qualitative and quantitative production of embryos in rabbit species through the study of LH effect in treatments of superovulation (experiment 1) or trying to synchronize follicular waves (experiment 2). LH effect was evaluated by the comparison of two superovulation treatments using porcine FSH and containing or not 20% of porcine LH. Synchronization treatment used, before the same superovulation treatment (+20% LH), prostaglandins F_{2α} on induced pseudopregnant does. Despite an increased regularity of responses, these studies failed to improve significantly the embryos production results compared to the classical treatment. Once more, this study highlights the lack of scientific knowledge on the kinetic of follicular waves establishment in rabbit species.

Introduction

De nos jours, la congélation de l'embryon de lapin au stade morula est une technique maîtrisée et fiable avec des taux de survie après transfert pouvant aller jusqu'à plus de 50% (Salvetti *et al.*, 2007). Cette technique représente actuellement la voie privilégiée pour la conservation *ex situ* des ressources génétiques cunicoles avec près de 15000 embryons congelés (environ de 50 populations différentes) stockés au sein de la Cryobanque Nationale (Joly *et al.*, 2005).

Cette méthode standardisée est basée sur l'utilisation d'un traitement de superovulation permettant de doubler, voire de tripler la production moyenne d'embryons par femelle traitée. En effet, l'administration de gonadotropines (equine Chorionic Gonadotropin ou FSH) 68 à 72h avant induction de l'ovulation, augmente significativement le nombre de follicules recrutés lors de la phase de croissance terminale et le nombre d'ovocytes ovulés (Besenfelder *et al.*, 2000). Cependant, plusieurs auteurs ont montré que l'utilisation de ces traitements entraînait une plus grande proportion d'embryons de mauvaise qualité non congelables (Donaldson *et al.*, 1986 ; Levi-Setti *et al.*, 2006). De plus, les réponses des lapines à ces traitements sont très variables et le nombre d'embryons produits par femelle est incertain. Cette variabilité peut avoir diverses origines avec

notamment la nature du traitement administré mais aussi l'âge, le génotype, la parité, le statut physiologique ou les conditions d'élevage (Lerner *et al.*, 1986).

Chez la lapine, les traitements de superovulation à base d'eCG ont souvent été décrits comme moins efficaces que les traitements à base de FSH notamment au niveau de la qualité des embryons collectés (Fujimoto *et al.*, 1974). Ces mauvais résultats peuvent être attribués à la longue demi-vie de l'eCG qui présente une double activité FSH/LH. Les préparations hormonales commerciales de FSH présentent quand à elles une importante variabilité de composition, notamment en ce qui concerne leur contenu en LH (Murphy *et al.*, 1984). L'effet de la LH dans les traitements à base de FSH a donc été étudié mais les conclusions sont parfois contradictoires et le rôle de la LH n'a pas clairement été établi. Cependant, il semble qu'une concentration excessive en LH entraîne une activation trop précoce des ovocytes qui présenteraient alors des défauts de maturation conduisant à des problèmes de fécondation ou de qualité des embryons. Chez le lapin, Hashimoto *et al.* (2004) ont mis en évidence que l'utilisation d'une préparation de FSH avec un contenu en LH réduit (0,0013 UI de LH par mg de protéine) permettait d'augmenter significativement la

production d'embryons par femelle ($27,1 \pm 2,5$ vs. $20,1 \pm 1,8$). La diminution du contenu en LH des préparations semble donc être intéressante.

Une autre approche consiste à étudier les traitements de synchronisation qui ont beaucoup été étudiés chez les animaux domestiques à ovulation spontanée afin de simplifier la conduite des troupeaux et d'augmenter les taux de réussite des inséminations artificielles. Les techniques utilisées sont basées sur la combinaison d'analogues de GnRH, de prostaglandines ou d'œstrogènes pour synchroniser les vagues de croissances folliculaires (Grimard *et al.*, 2003). Chez la lapine dont l'ovulation est induite par l'accouplement, l'enchaînement des vagues de croissance folliculaire a très peu été étudié (Diaz, 1987 ; Mariana *et al.*, 1986, 1989). Les travaux existant ont montré que la croissance folliculaire terminale (dès l'apparition de la cavité antrale dans le follicule et d'une croissance FSH-dépendante) dure 21 jours (Mariana *et al.*, 1989). En l'absence de coït, les follicules préovulatoires régressent en l'espace de 7 à 10 jours (Hill, 1933) ou de 3 à 6 jours (Smelser *et al.*, 1934). L'idée selon laquelle la lapine est en œstrus permanent (Hammond et Marshall, 1925 ; Kranzfelder *et al.*, 1984) a été contredite par Moret (1980) qui a observé des périodes de réceptivité sexuelle entrecoupées de période de non-réceptivité. L'étude des croissances folliculaires post-partum a montré que les vagues de croissances folliculaires sont probablement superposées avec l'apparition de nouveaux follicules préovulatoires en 4 à 6 jours (Diaz *et al.*, 1987). Après ovulation et en absence de fécondation, les corps jaunes persistent 21 jours mais deviennent sensibles aux prostaglandines $F_{2\alpha}$ dès le 9^{ème} jour de pseudogestation (Boiti *et al.*, 1998). Ainsi, la synchronisation des vagues de croissance folliculaire chez la lapine pourrait être théoriquement obtenue en utilisant des techniques identiques à celles utilisées chez les bovins.

L'objectif de ce travail est de diminuer la variabilité des réponses aux traitements de superovulation chez la lapine en évaluant l'effet de la LH dans un traitement de superovulation (expérience 1) et l'effet de la synchronisation des vagues folliculaires (expérience 2).

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux et traitements hormonaux

L'expérience 1 a été réalisée de février à juin 2006 au centre INRA du Magneraud et chez Grimaud Frères Sélection SAS. Pour les besoins de l'expérience, 217 lapines au repos sexuel appartenant à 5 génotypes différents (4 souches commerciales GRIMAUD et 1 souche INRA) ont été utilisées. Les femelles ont été réparties de façon homogène selon leur parité (99 nullipares, 48 primipares, 70 multipares) dans chacun des 3 lots expérimentaux : femelles témoins non superovulées (Lot « Sans FSH »), femelles superovulées par administration de $31,5\mu\text{g}$ FSH_{porcine} + 20% de LH_{porcine} (Stimufol[®], Reprobiol, Belgique ; lot

« FSH avec LH ») ou femelles superovulées avec $31,5\mu\text{g}$ de FSH_{porcine} sans LH (Lot « FSH sans LH »).

Les traitements de superovulation consistaient en 5 injections successives (s.c.) à 12h d'intervalle. Douze heures après la dernière injection, les lapines ont été inséminées avec de la semence fraîche et l'ovulation a été induite par injection (i.m.) de $1,6\mu\text{g}$ d'acétate de buséréline (Receptal[®], Intervet, France).

L'expérience 2 a été entièrement réalisée chez Grimaud Frères Sélection SAS de septembre 2006 à juin 2007. Quatre vingt onze lapines multipares au repos sexuel appartenant à 4 génotypes différents (souches GRIMAUD) ont été réparties de façon aléatoire dans deux lots expérimentaux : femelles témoins (Lot « FSH avec LH ») et femelles synchronisées (lot « Synchronisé »). Toutes ont subi un traitement de superovulation selon un protocole identique à celui décrit ci-dessus pour le lot « FSH avec LH ».

Afin de synchroniser les vagues folliculaires, 15 jours avant le début du traitement de superovulation l'ovulation des lapines du lot synchronisé a été induite par injection (i.m.) de $1,6\mu\text{g}$ d'acétate de buséréline (Receptal[®], Intervet, France). Douze jours après la première induction d'ovulation, une injection (i.m.) de $200\mu\text{g}$ d'alfaprostol (Alfabédyl[®], Ceva Santé Animale, France), a été administrée aux lapines pseudogestantes afin d'entraîner la lutéolyse.

1.2. Collecte des embryons

Dans les deux expériences, les embryons ont été collectés 65 à 72h après insémination artificielle (IA) par abattage des lapines, isolement du tractus génital et perfusion de celui-ci avec 20ml d'Euroflush (IMV, France). Après dénombrement des corps jaunes, le perfusat de collecte a été observé sous une loupe binoculaire pour dénombrer les œufs collectés. La qualité des embryons a été évaluée selon l'intégrité du manteau muqueux et de la zone pellucide ainsi que l'homogénéité des blastomères permettant de distinguer les embryons congelables (Q_1 , Q_2) de ceux qui ne le sont pas (Q_3 ou non fécondés).

1.3. Analyse statistique

Pour chaque expérience, l'analyse du pourcentage de femelles donneuses d'embryons (femelles ayant donné au moins un embryon congelable/femelles traitées) a été réalisée grâce à un test du Khi deux avec la correction de Yates. L'influence du traitement administré (3 niveaux pour l'expérience 1 et 2 niveaux pour l'expérience 2) sur les variables de production d'embryons a été estimée à l'aide d'une analyse de variance à un effet fixé.

Les variables de production analysées sont les nombres de corps jaunes, d'œufs collectés, d'embryons de bonne qualité (congelables), d'embryons de mauvaise qualité (non congelables) et d'œufs non fécondés par femelle donneuse d'embryons. Les moyennes présentées sont considérées comme significativement différentes lorsque $p < 0,05$.

Tableau 1. Effet du traitement de superovulation et de la LH (expérience 1) et effet de la synchronisation des vagues folliculaires (expérience 2) sur la réponse ovarienne et la production d'embryons (Moyenne \pm écart-type).

	Femelles traitées	Femelles donneuses %	Paramètres de production d'embryons par femelle donneuse				
			Corps jaunes	Oeufs collectés	Embryons Q ₁ -Q ₂ *	Embryons Q ₃ **	Non fécondés
Expérience 1							
<i>Sans FSH</i>	89	95,7 ^a	11,9 ^a \pm 3,1	9,4 ^a \pm 3,7	8,6 ^a \pm 4,2	0,9 ^a \pm 1,5	0,5 ^a \pm 1,6
<i>FSH sans LH</i>	65	77,8 ^b	25,4 ^b \pm 8,7	19,9 ^b \pm 9,3	16,6 ^b \pm 10,8	3,4 ^b \pm 4,4	1,1 ^{ab} \pm 2,5
<i>FSH avec LH</i>	63	81,3 ^b	25,9 ^b \pm 10,5	19,8 ^b \pm 8,7	17,4 ^b \pm 8,9	2,3 ^b \pm 3,8	1,4 ^a \pm 3,0
Expérience 2							
<i>FSH avec LH</i>	61	77,0	38,5 \pm 16,0	32,9 \pm 17,9	29,3 \pm 17,7	1,7 \pm 2,3	1,3 \pm 4,8
<i>Synchronisé</i>	66	83,6	33,6 \pm 12,8	29,6 \pm 11,8	26,2 \pm 11,8	1,9 \pm 2,9	1,4 \pm 3,1

* Embryons Q₁-Q₂ : Embryons de bonne qualité morphologique, congelables

** Embryons Q₃ : Embryons de qualité morphologique insuffisante pour être congelés.

Les valeurs d'une même colonne présentant des exposants différents (a, b) sont significativement différentes (p<0.05).

2. Résultats

2.1. Expérience 1

Les résultats de production d'embryons obtenus pour les 3 lots expérimentaux sont présentés dans le tableau 1. Le pourcentage de lapines donneuses d'embryons dans le lot témoin (« sans FSH ») est significativement plus élevé que pour les lapines superovulées des lots « FSH avec LH » et « FSH sans LH » dont les résultats sont proches (respectivement 95,7 vs 81,3 et 77,8%). Pour l'ensemble des variables de réponse ovarienne ou de production d'embryons, les résultats obtenus sont significativement plus élevés dans les lots superovulés que dans le lot témoin. Cependant, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les lots « FSH avec LH » et « FSH sans LH ». Par exemple, le nombre d'embryons Q₁-Q₂ par femelle donneuse est de 16,6 \pm 10,8 et 17,4 \pm 8,9 respectivement pour les lots « FSH sans LH » et « FSH avec LH ».

2.2. Expérience 2

Le pourcentage de lapines donneuses d'embryons semble amélioré par une synchronisation des vagues folliculaires (83,6 vs 77,0%), cependant la différence n'est pas significative. De même, aucune écart significatif n'est mise en évidence sur le nombre de corps jaunes ni sur les autres variables de production d'embryons. Par exemple, le nombre d'embryon Q₁-Q₂ par femelle donneuse est de 29,3 \pm 17,7 et 26,2 \pm 11,8 respectivement pour les lots « FSH avec LH » et « Synchronisé ».

3. Discussion

L'objectif de ce travail était d'améliorer la production quantitative et qualitative d'embryons chez les lapines superovulées lors des opérations menées dans le cadre de la sauvegarde des ressources génétiques cynociviles.

La suppression de LH dans les traitements de superovulation à base de FSH (expérience 1) n'a pas permis d'améliorer la production d'embryons contrairement aux observations de Hashimoto *et al.* (2004). Cependant, la comparaison des résultats entre les deux études est difficile à cause du manque de

précisions sur les niveaux de LH exogène dans les préparations hormonales du lot témoin de Hashimoto *et al.* Si des différences significatives entre les deux traitements peuvent ressortir d'études menées sur un génotype particulier avec de petits effectifs, ces effets ne sont plus significatifs sur des effectifs plus importants présentant une diversité génotypique. Notre étude offre l'avantage d'avoir été réalisée sur un grand nombre d'individus appartenant à des génotypes différents, ce qui correspond aux cheptels classiquement rencontrés lors des opérations de cryoconservation. Ainsi, il semble que, chez la lapine, l'ajout de 20% de LH exogène lors des traitements de superovulation n'améliore pas la production d'embryons. Cependant, cette quantité de LH n'est pas préjudiciable à la qualité des embryons produits contrairement à ce qui avait été mis en évidence chez la vache (Chupin *et al.*, 1984 ; Herrler *et al.*, 1991) et chez la femme (Howles, 2000). Ces études avaient alors montré l'existence d'une concentration optimale LH pour assurer une maturation ovocytaire normale. Ainsi, notre étude montre que chez la lapine le niveau de LH endogène est suffisant pour assurer la maturation de la cohorte de follicules recrutés par l'administration de gonadotropines.

L'expérience 2 montre que même si le nombre d'embryons congelables n'est pas amélioré par l'utilisation du traitement de synchronisation, le pourcentage de lapines donneuses pourrait être augmenté. La diminution de la variabilité des réponses des lapines aux traitements de superovulation est particulièrement importante quand les populations à cryoconserver sont de type I (populations menacées d'extinction) ou II (reproducteurs exceptionnels mais peu diffusés). Ces résultats de synchronisation sont difficilement comparables à ceux obtenus chez les autres espèces domestiques cyclées. Chez les bovins, les traitements de synchronisation sont variés et permettent de rationaliser le travail au moment de la mise à la reproduction et de s'affranchir, dans certains cas, de la détection des chaleurs. Chez les petits ruminants, la

production d'embryons a pu être augmentée par inhibition de la croissance folliculaire terminale lors du cycle précédant le traitement de superovulation. Réalisée grâce à l'administration d'analogues anti-GnRH, cette technique permet d'augmenter la population de follicules recrutables lors du traitement de superovulation (Baril *et al.*, 2004). Il serait intéressant de mener des études similaires sur des lapines synchronisées.

Les lapines des lots « FSH avec LH » des expériences 1 et 2 ont subi le même traitement mais présentent un nombre d'embryons Q₁-Q₂ par femelle donneuse très différent (17,4 ± 8,9 et 29,3 ± 17,7 respectivement pour les lots des expériences 1 et 2). Cette différence, qui peut aussi être observée sur les autres variables de production d'embryons, résulterait principalement de l'effet du génotype des animaux utilisés pour ces expériences.

Conclusion et perspectives

Notre étude montre qu'il est difficile de maîtriser la variabilité de la réponse ovarienne des lapines aux traitements de superovulation. En effet, l'ajout de LH exogène dans les traitements de superovulation ou encore la synchronisation des vagues folliculaires ne permettent pas d'améliorer la production d'embryons chez les femelles superovulées. Ces résultats s'expliquent notamment par le manque de connaissances physiologiques sur les croissances folliculaires chez la lapine qui est une espèce pour laquelle il est difficile d'appliquer les méthodes d'investigations utilisées chez les autres animaux domestiques. Or, l'étude des mécanismes de la folliculogénèse est nécessaire au développement des biotechnologies de la reproduction et à la gestion dynamique des ressources génétiques chez cette espèce. Ces aspects intéressent particulièrement l'industrie pharmaceutique et la recherche biomédicale qui utilisent de plus en plus le lapin comme animal modèle.

Remerciements

Les auteurs remercient vivement Benoit Rémy de la société REPROBIOL pour la fourniture des préparations hormonales.

Références

BARIL G, COGNIE Y, BELLOC JP, BRIOIS M, POULIN N, BOUTTIER A, POUGNARD JL, VALLET JC, LEBOEUF B, REMY B, BECKERS JF, MERMILLOD P, 2004. Effet de prétraitements agoniste et antagoniste de GnRH sur la production d'embryons chez la brebis et la chèvre. *11^{èmes} Rencontre Recherche Ruminants*, 8 et 9 décembre, Paris, 373-376.

BESENFELDER U, HAAS C, BREM G, 2000. Reproduction technology and gene transfer in rabbits. *7th Congress of the World Rabbit Science Association*, Valencia (Spain), 3-7 July, Vol. A, 37-59.

BOÏTI C, CANALI C, ZERANI M, GOBETTI A, 1998. Changes in refractoriness of rabbit corpora lutea to a prostaglandin F_{2α} analogue, alfaprostol, during pseudopregnancy. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 56: 255-264

CHUPIN D, COMBARNOUS Y, PROCUREUR R, 1984. Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle. *Theriogenology*, 21:229 [résumé].

DONALDSON LE, WARD DN, 1986. Effects of luteinizing hormone on embryo production in superovulated cows. *Vet Rec*, 119:625-6.

DIAZ P, RODRIGUEZ JM, GOSALVEZ LF, ROMAN MR, 1987. Cyclic ovarian activity in postpartum rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.*, 10: 122-5.

FUJIMOTO S, PAHLAVAN N, DUKELOW WR, 1974. Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation. *J Reprod Fertil*, 40:177-81.

GRIMARD J, HUMBLOT P, PONTER AA, CHASTANT S, CONSTANT F, MIALOT JP, 2003. Efficacité des traitements de synchronisation des chaleurs chez les bovins. *INRA Productions Animales*, 16: 211-27.

HAMMOND J, MARSHALL FMA, 1925. Reproduction in the rabbit. Ed: Oliver and Boyd, Edinburgh.

HASHIMOTO S, KURAMOCHI T, AOYAGI K, TAKAHASHI R, UEDA M, HIRAO M, 2004. Refined porcine follicle stimulating hormone promotes the responsiveness of rabbits to multiple-ovulation treatment. *Exp Anim*, 53:395-7.

HERRLER A, ELSAESSER F, PARVIZI N, NIEMANN H, 1991. Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH. *Theriogenology*, 35: 633-43.

HILL M et WHITE WE, 1933. The growth and regression of follicles in the oestrous rabbit. *J Physiol*, 80: 174-8.

HOWLES CM, 2000. Role of LH and FSH in ovarian function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 161: 25-30.

JOLY T, RENARD JP, DANCHIN-BURGE C, 2005. Role of LH and FSH in ovarian function. *9th Annual Conference of European Society for Domestic Animal (ESDAR)*, Murcia (Spain), 1-3 September 2005.

KRANZFELDER D, KORR H, MESTWERDT W, MAURER-SCHULTZE B, 1984. Follicle growth in the ovary of the rabbit after ovulation-inducing application of human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res*, 238: 611-20.

LERNER SP, THAYNE WV, BAKER RD, HENSCHEN T, MERIDITH S, INSKEEP EK, DAILEY RA, LEWIS PE, BUTCHER RL, 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows *Journal of Animal Science*, 63: 176-83.

LEVI-SETTI P, CAVAGNA M, BULLETTI C; 2006. Recombinant gonadotrophins with GnRH antagonist (cetorelix) in ovarian stimulation for ICSI: comparison of r-FSH alone and in combination with r-LH. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 126:212-6.

MARIANA JC, HULOT F, POUJARDIEU B, 1986. Croissance comparée des follicules ovariens dans deux souches de lapin. *4^{ème} Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, communication n°20, 12p.

MARIANA JC, HULOT F, DERVIN C, TOMASSONE R, POUJARDIEU B, 1989. Estimation de la durée moyenne de croissance d'un follicule d'ovaire de lapine âgée de 20 semaines, dans deux souches. *Archives Biologiques (Bruxelles)*, 100: 47-63.

MORET B, 1980. Comportement d'oestrus chez la lapine. *Cuniculture*, 7: 159-161.

SMELSER GK, WALTON A, WHETHAM EO, 1934. The effect of light on ovarian activity in the rabbit. *J. Exp. Biol.*, 11: 352-63.

MURPHY BD, MAPLETOFT RJ, MANNIS J, HUMPHREY WD, 1984. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. *Theriogenology*, 21:117-25.

SALVETTI P, THEAU-CLÉMENT M, BECKERS JF, HURTAUD J, GUÉRIN P, NETO V, FALIÈRES J, JOLY T, 2007. Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology*, 67: 1185-1193.