

## Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins

P Brebion <sup>1</sup>, G Baril <sup>1</sup>, Y Cognié <sup>1</sup>, JC Vallet <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INRA physiologie de la reproduction et URA CNRS 1291, 37380 Nouzilly

<sup>2</sup> Procreatech-SA, ZI de la Centrale, 81400 Carmaux, France

(Reçu le 12 septembre 1991; accepté le 15 novembre 1991)

**Résumé** — Les solutions techniques aux impératifs physiologiques qui régissent la réalisation du transfert d'embryons chez les petits ruminants sont en constante évolution. Nous en dressons une revue très sélective. Quelle qu'en soit la finalité, le transfert embryonnaire repose sur la capacité d'obtenir des donneuses une récolte suffisante d'embryons utilisables; la superovulation, première étape obligée, est induite à l'aide de préparations gonadotropes dont les plus appropriées sont les extraits hypophysaires, dits «FSH-P»; 3 j de stimulation à activités FSH décroissante et LH croissante assurent en moyenne 11,1 (brebis) ou 14,2 (chèvre) ovulations avec respectivement 20% et 10% de réponses inférieures à 5 corps jaunes (CJ). Chez la brebis, un prétraitement antigonadotrope préalable a permis d'accroître significativement la superovulation par élimination des non-réponses; chez la chèvre se pose le problème de la répétabilité de la stimulation par des hormones hétérologues, qui met en jeu la réponse immunitaire. Conséquence de la superovulation, l'altération de la survie et/ou de la remontée des spermatozoïdes dans le tractus femelle condamne l'IA exocervicale; chez la brebis si le dépôt *in utero* de  $100 \times 10^6$  spermatozoïdes frais est effectué de façon standard 49 h après l'arrêt du traitement de synchronisation des chaleurs 77% des embryons collectés sont utilisables contre 87 % si l'insémination est pratiquée «à la carte» 32 h après le début de l'oestrus; chez la chèvre inséminée *in utero* avec  $100 \times 10^6$  spz congelés 45 h après l'arrêt du traitement progestagène, le taux de division moyen est de 71%, mais il atteint 87% pour les femelles inséminées 15 h après leur pic de LH. Dans cette espèce la définition d'un moment d'IA standardisé mais adapté pour l'ensemble des donneuses suppose d'améliorer le groupement des ovulations. La collecte des morulas compactées/blastocystes a lieu 5–6 j (brebis) ou 6–7 j (chèvre) après la fécondation. L'infranchissabilité du cervix impose pour pratiquer le rétro-flushing des cornes une approche transpéritonéale. Après laparotomie, la réussite en première collecte est de 72-75% mais la répétabilité de l'intervention est faible; en revanche la méthode laparoscopique, un peu moins performante en première collecte (63%), a été répétée avec succès jusqu'à 6-7 fois. La cryopréservation des embryons aux âges précisés fait appel à une technologie calquée sur le modèle bovin au moins pour la courbe de refroidissement. Avec  $1,5 \text{ mol.l}^{-1}$  d'éthylène-glycol comme cryoprotecteur et 20% de sérum de veau fœtal additionné au PBS (Phosphate Buffer Saline) enrichi (F1), nous obtenons 85 à 90% de réanimation, confirmés par un taux de survie après transfert de l'ordre de 65%. Le transfert de 2 embryons par receveuse synchronisée est assuré par une technique laparoscopique légère, rapide et au moins aussi efficace que la méthode chirurgicale: avec 80% de fertilité et 80% de survie des embryons chez les receveuses fertiles, la survie globale des embryons transférés est de 65%. Dépendante principalement de la productivité des traitements actuels en terme d'embryons utilisables, l'efficacité de la technologie du transfert embryonnaire permet donc d'espérer 4-5 produits (transfert direct) ou 3 produits (passage par la congélation) par donneuse traitée.

brebis / chèvre / insémination artificielle / transfert d'embryon

**Summary — Embryo transfer in sheep and goats.** *In response to the physiological demands governing the feasibility of embryo transfer (ET) in small ruminants, the techniques involved are constantly improving, as we intend to show in the following selective review. Whatever the aim, ET is dependent on sufficient yields of viable embryos from donors. The first step in ET, superovulation, may be induced with various gonadotrophins, the most appropriate being the pituitary extracts known as FSH-P. Three days of stimulation with decreasing doses of follicle stimulating hormone (FSH) with increasing luteinizing hormone (LH) content ensures mean ovulation rates of 11.1 in the ewe or 14.2 in the dairy goat, including 20% and 10% non-responses (< 5 corpora lutea (CL)), respectively. In the ewe, prior antigonadotrophic pretreatment results in a significant gain in ovulation rate due to the elimination of non-responses. In the goat, however, the responsiveness to repeated exogenous stimulation is impaired by the immune reaction. As a consequence of superovulation, there is a decrease in spermatozoal survival and/or transport within the donor genital tract which seems to condemn cervical artificial insemination. In the ewe, deposition of  $100 \times 10^6$  fresh spermatozoa in utero 49 h after progestagen sponge removal results in the recovery of 77 % viable embryos versus 87 % when insemination occurs 32 h after the onset of oestrus. In the goat following deposition in utero of  $100 \times 10^6$  frozen/thawed spermatozoa 45 h after the end of progestagen treatment, the mean fertilization rate is 71% but it reaches 87% for females having their LH surge 15 h before the AI takes place. In this species, the definition of an efficient standardized timing for AI implies a better synchronisation of ovulations. Compacted morulae and/or blastocysts are recovered 5–6 d (sheep) or 6–7 d (goat) after fertilization. Because of the impenetrable cervix, retroflushing of the uterine horns with phosphate buffered saline (PBS) requires a transperitoneal approach. After laparotomy, first recovery rate reaches 72–75% but repeatability is limited, in contrast, laparoscopic recovery, although less efficient in first collection (63%), has been successful up to 7 times. Cryopreservation of pre-hatched embryos is confined to bovine-inspired technology. Using  $1.5 \text{ mol.l}^{-1}$  ethylene-glycol as a cryoprotectant and 20% FCS (foetal calf serum) added to PBS-F<sub>1</sub> (phosphate buffered saline-F<sub>1</sub>) medium we obtained 85–90% reanimated embryos, as confirmed by 65% total survival following transfer. At least as effective as surgery but easier and quicker, laparoscopic transfer of 2 embryos in each synchronised recipient leads to 65% total survival (80% fertility and 80% surviving embryos in fertile recipients). In conclusion, ET technology which is mainly limited by the productivity of current treatments in term of usable embryos, allows 4–5 products (direct transfer) or 3 products (through deep frozen storage) per donor treatment.*

#### **embryo transfer / sheep / goat / artificial insemination**

## **INTRODUCTION**

L'objet de cette courte revue est de présenter un tableau sélectif de quelques unes des réponses techniques les mieux adaptées à ce jour aux conditions dictées par la physiologie, en identifiant pour chaque espèce les problèmes résiduels majeurs ainsi que les progrès les plus attendus à court terme.

En France en 1991, tandis que plus de 25 000 transferts d'embryons sont annuellement pratiqués dans l'espèce bovine, cette activité reste marginale chez les petits ruminants, au moins quant à son application sur le terrain. Pourtant un intérêt potentiel

existe, au même titre que chez les bovins, sous-tendu par les mêmes argumentaires génétique, commercial et sanitaire. Il faut rechercher la raison de cette apparente stagnation dans le coût de production élevé d'un agneau/chevreau né de transfert embryonnaire par rapport à la valeur attribuée à l'animal. À niveaux de productivité (une moyenne de 4-5 embryons utilisables par donneuse traitée) et de fiabilité (une très large variabilité interindividuelle) équivalents aux résultats qui ont pu suffire à l'essor du transfert embryonnaire chez les bovins, cette technologie ne reste envisageable que dans de trop rares cas chez les ovins et caprins. Toute progression vers une meilleure productivité et surtout une moindre variabili-

té de la réussite individuelle rendrait donc avantageux le recours au transfert embryonnaire chez les petits ruminants.

### TRANSFERT D'EMBRYONS : ÉTAPES TECHNIQUES, RENDEMENTS PARTIELS, RENDEMENT FINAL

À la différence de la procréation assistée dans l'espèce humaine, le transfert embryonnaire chez les animaux d'élevage n'a pas vocation thérapeutique; les traitements proposés, non personnalisables, doivent pouvoir être appliqués de façon standardisée à des lots de femelles, pour une efficacité moyenne dépassant nettement celle de la reproduction naturelle. Ceci implique toujours à la base l'obtention d'un nombre aussi élevé que possible d'embryons de qualité.

La figure 1 décrit les étapes techniques. Leurs rendements partiels (R) sont successivement: la superovulation induite ( $R_0 = T_0$  = taux d'ovulation avec sa variabilité), la fécondation *in vivo* des ovocytes émis ( $R_1$  = taux de fécondation, ou, plus significatif, taux de viabilité des embryons), la collecte des embryons ( $R_2$  = taux de récupération par rapport au nombre d'ovulations), le transfert dans les receveuses ( $R_3$  = taux de survie des embryons transférés, combinant la fertilité après transfert et la prolificité des receveuses fertiles). Enfin, l'intérêt du transfert embryonnaire reposant largement sur la possibilité de dissocier dans l'espace et le temps les étapes de production et de transfert des embryons, la cryopréservation peut venir ajouter son rendement propre à la chaîne ( $R_4$  = taux de réanimation des embryons décongelés).

### SUPEROVULATION

La superovulation des donneuses est induite au terme d'un traitement classique de

synchronisation des chaleurs (par exemple par la méthode des éponges vaginales imprégnées de progestagène dans la formulation adaptée à l'espèce considérée). La fonction ovarienne peut être stimulée par une variété de préparations hormonales à activité gonadotrope (Chupin, 1988), comme eCG (*equine chorionic gonadotrophin*=*pregnant mare serum gonadotrophin*), HAP (*horse anterior pituitary*), FSH-P (*follicle stimulating hormone-pituitary*) pFSH (*porcine FSH*), oFSH (*ovine FSH*), hMG (*human menopausal gonadotrophin*). Par delà la diversité des sources hormonales citées, il existe un relatif consensus sur les principes d'une stimulation de qualité:

- la durée de stimulation doit avoisiner celle de la croissance folliculaire terminale (ici 3 j);
- l'activité FSH doit nettement prédominer sur celle de la LH contaminante en début de traitement (le seuil de tolérance semble varier selon le génotype; chez la brebis Lacaune un rapport FSH/LH < 2 affecte la qualité embryonnaire); ceci condamne notamment l'usage de eCG, molécule dont l'activité intrinsèque LH est environ 4 fois supérieure à l'activité FSH; un enrichissement en LH semble en revanche nécessaire en fin de traitement (FSH/LH < 0,4), conditionnant l'induction des ovulations (Cognié *et al*, 1986). Deux traitements types utilisant pFSH sont détaillés à titre d'exemple figure 2.

Même si des améliorations de ces conditions de stimulation sont encore possibles, notamment par l'utilisation des facteurs de croissance dans la maturation folliculaire terminale, le type de traitement décrit ci-dessus représente un optimum relatif, puisqu'il permet la pleine expression de l'état de l'ovaire au moment de la première dose stimulante.

Cependant les résultats des traitements, même les plus évolués, désignent

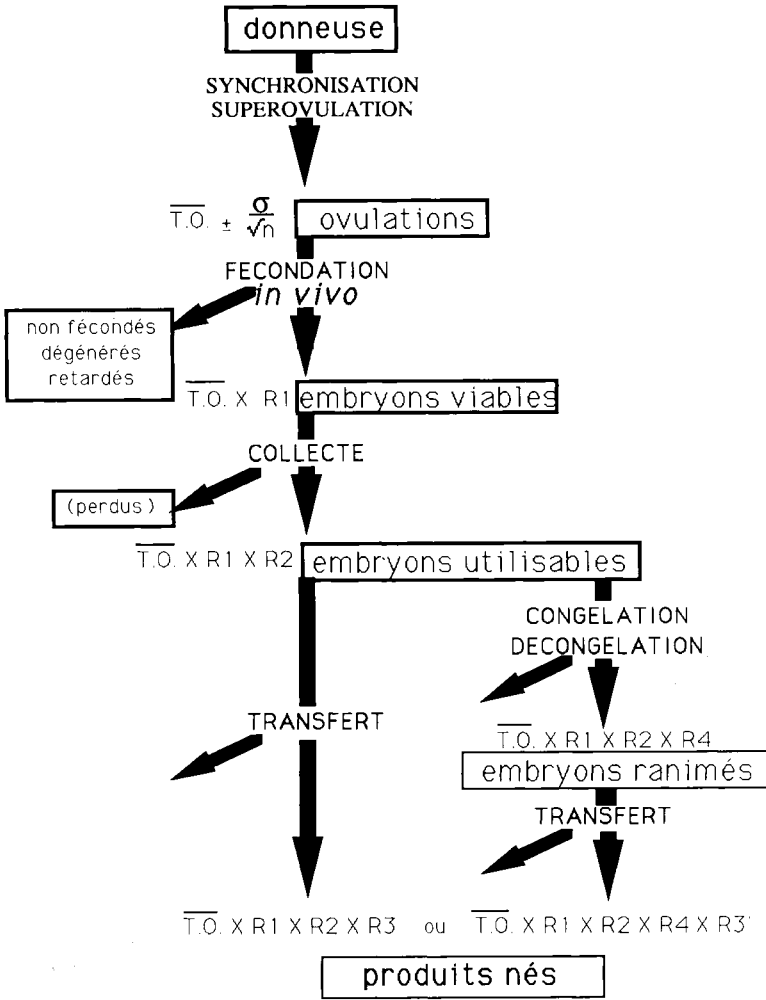


Fig. 1. Transfert d'embryons : enchaînement des étapes, combinaison des rendements.

encore la superovulation comme l'étape la plus limitante de la production d'embryons. En effet (fig 3), autour de réponses moyennes de 11 CJ (brebis laitière) ou 14 CJ (chèvre laitière) la variabilité interindividuelle est excessivement élevée, incluant 20% de non-réponses (< 5 ovulations).

Cette variabilité reflète très exactement la structure de la population folliculaire de l'ovaire stimulé. Chez la brebis superovulée avec pFSH le TO est positivement corrélié au nombre de follicules de 1-2 mm présents au début de la stimulation. Un prétraitement antigonadotrope par des

<i>éponge progestagène</i>				
Jo		J12	J13	J14
FSH ( mg ARMOUR )		5 5	3 3	2 2
<u>2.A</u>	FSH / LH	5		0,4 0,3

<i>prostaqlandine</i>				
<i>éponge progestagène</i>				
Jo		J9	J10	J11
FSH ( mg ARMOUR )		4 4	2 2	2 2
<u>2.B</u>	FSH / LH	8	1	0,4

Fig 2. Traitements de superovulation applicables à la brebis (2A) ou à la chèvre (2B).

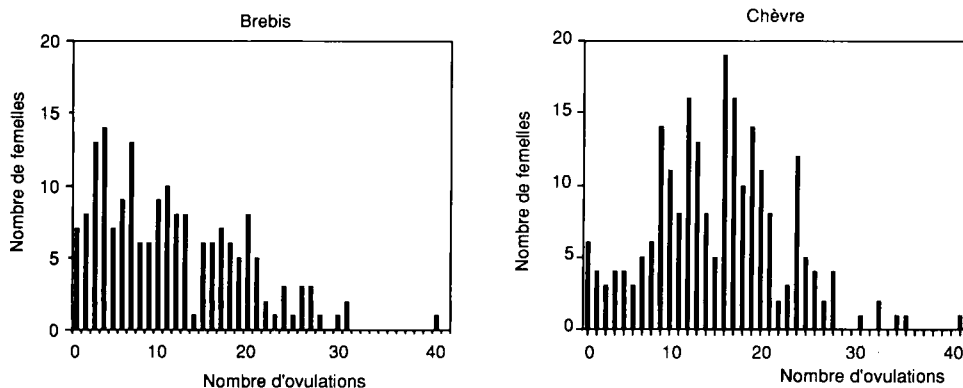


Fig 3. Répartition des femelles en fonction du nombre d'ovulations; brebis : après 20 mg de FSH (n = 198), chèvre : après 16 mg de FSH (n = 226).

agonistes ou un antagoniste (tableau I) du GnRH a permis d'enrichir cette classe de follicules cibles, doublant le nombre moyen d'ovulations par élimination des faibles réponses (Brebion et Cognié, 1989). Le

même principe est à l'étude chez la chèvre.

En ce qui concerne la répétabilité de la superovulation, la situation change avec l'espèce considérée. Chez la brebis de gé-

**Tableau I.** Effets de 11 j de traitement par un antagoniste du GnRH sur l'ovaire et la superovulation consécutive, chez la brebis Lacaune.

	<i>GnRH-Antag</i> (n = 14)	<i>Témoins</i> (n = 13)
Nb follicules de diamètre 1–2 mm avant FSH	24,7	12,5
Nb d'ovulations ** après FSH (m ± sem)	19,2 ± 3,4	9,9 ± 1,6
% de collecte des embryons	67,5	66,0
Nb d'embryons viables (%)	10,6 (81)	6,1 (92)

notype croisé hyperproliférique Booroola x Romanov traitée 6–7 fois à intervalles de 60 j par 20 mg pFSH, aucune diminution significative de la réponse n'est observée (Brebion *et al*, 1990). En revanche, chez des chèvres laitières soumises à 5 traitements successifs par 16 mg pFSH à intervalles de 50 j, l'efficacité diminue fortement avec le rang de traitement, les non-réponses ayant pu être reliées à une élé-

vation de la liaison plasmatique de pFSH, indicatrice de la présence d'anticorps anti FSH (Rémy *et al*, 1992).

## FÉCONDATION

La fécondation *in vivo* des ovocytes de femelles superovulées pose des difficultés particulières (Armstrong et Evans, 1983), liées non au traitement en lui-même (sauf utilisation de PMSG), mais dépendantes de la réponse ovarienne. Le taux de fécondation après IA classique est corrélé négativement au taux d'ovulation (chèvre: Baril *et al*, 1989). Une altération massive des conditions de survie et de transit des spermatozoïdes impose de déposer ceux-ci le plus près possible du site de fécondation. Chez la brebis (tableau II) et la chèvre superovulées avec pFSH, l'insémination intra-utérine (IAU) sous contrôle laparoscopique permet d'obtenir un pourcentage élevé d'embryons viables quel que soit le niveau de réponse. Chez la brebis inséminée *in utero* avec 100.10<sup>6</sup> spz conservés à + 15 °C, la qualité embryonnaire est maximale si l'IAU est réalisée 2–6 h après l'ovulation (87% de fécondation alors que la moyenne générale est de 70% par cette technique) 49 h après la fin du traitement

**Tableau II.** Efficacités comparées de l'IA intra-utérine et de l'IA cervicale pour la production d'embryons chez la brebis.

	<i>IA exocervicale</i>		<i>IA intra-utérine</i>
Heures d'IA post retrait	48 + 60	32 + 48 + 60	48
Nombre de spz (en 10 <sup>6</sup> )	2 x 400	3 x 400	1 x 80
Embryons			
Fécondés (%)	77	68	93
Viables			
% total	45	44	86
Nb par femelle collectée	3,5	3,8	6,7
Nb par femelle traitée	3,2	3,7	5,7

progestatif (77 % d'embryons viables). Chez la chèvre inséminée *in utero* avec  $100 \cdot 10^6$  spz congelés, la meilleure qualité est obtenue pour les femelles inséminées 16 h après leur pic de LH, soit environ 6 h avant le début des ovulations (87% de fécondation, alors que la moyenne générale est de 70% par cette technique). La faisabilité de l'IAU au moment optimal pour une majorité de femelles traitées conjointement dépend du degré de synchronisation des ovulations à la suite du traitement pratiqué. Quatre vingt cinq pour cent des brebis traitées ovulent pendant une période de 20 h, contre 40 h chez la chèvre. Pour cette raison, la qualité embryonnaire est le problème majeur dans cette dernière espèce. En attendant de savoir regrouper les ovulations sans compromettre la maturation finale de l'ovocyte, il est indispensable de pratiquer l'IAU par rapport au pic de LH (précis mais difficile à mettre en œuvre) ou, à défaut, 20–24 h après le début des chaleurs (pratique mais moins précis).

## COLLECTE DES EMBRYONS

Les embryons sont généralement recueillis aux stades «morula compactée» à «blastocyste» (80–300 cellules) correspondant à J6-J7 chez la brebis et J6,5-J7,5 chez la chèvre, J1 étant le jour de la fécondation.

Chez l'une et l'autre espèce, la difficulté de franchissement du cervix (Kraemer, 1989) impose raisonnablement une approche transpéritonéale. De nombreuses variantes techniques sont possibles pour parvenir à perfuser chaque corne utérine avec 40 ml de milieu PBS dans le sens antérograde ou rétrograde. Le véritable choix qui s'offre au praticien porte entre la laparotomie classique et une technique moins invasive sous contrôle laparoscopique:

– la laparotomie médioventrale permet de collecter aisément 72% d'embryons (taux

de collecte à J6) par rapport aux CJ. Toutefois la présence d'adhérences post-opératoires à partir de la deuxième collecte, peut compromettre tant la fertilité que la réussite des collectes ultérieures;

– la collecte laparoscopique (Vallet, 1987; Scudamore et Robinson, 1990), de maîtrise plus délicate, offre un rendement moyen de 62%; cette technique a été développée pour son innocuité. De fait, elle n'affecte pas la fertilité des sujets, et a pu être répétée jusqu'à 7 fois sans perte d'efficacité.

## CRYOPRÉSERVATION

On ne congèle actuellement avec succès que les morula compactées et les blastocystes selon une technologie dérivée du modèle bovin. Les variantes concernent le choix du cryoprotecteur. Chez la brebis et la chèvre l'éthylène glycol  $1,5 \text{ mol.l}^{-1}$  ajouté au milieu  $F_1$  peut être retenu. L'avantage de fractionner en 3 étapes l'addition du cryoprotecteur n'est pas net. La courbe de refroidissement comporte un palier à  $-7 \text{ }^\circ\text{C}$  puis une pente de  $-0,3 \text{ }^\circ\text{C/min}$  jusqu'à  $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ , où a lieu l'immersion dans l'azote liquide ( $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Si l'on part d'embryons exempts de toute anomalie morphologique (classe A) on peut prévoir un taux de réanimation moyen de 70 %, dont la variabilité (50–90 %) rappelle que le jugement visuel des embryons donne une estimation très imparfaite de leur viabilité réelle.

L'intérêt de pouvoir congeler des embryons plus jeunes serait grand, car on sait que le rendement d'une collecte plus précoce est supérieur, particulièrement dans l'oviducte à J3,5 (Folch *et al*, 1991).

## TRANSFERT

La laparotomie classique peut être aujourd'hui avantageusement remplacée par

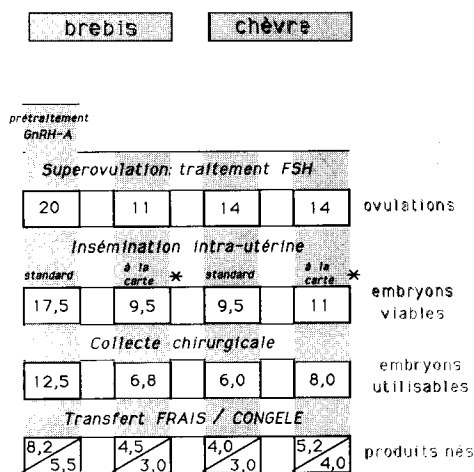
**Tableau III.** Fertilité, en % de femelles mettant bas (nombre de femelles receveuses), après transfert laparoscopique ou chirurgical chez la brebis et chez la chèvre.

	Brebis		Chèvre	
	Embryons frais	Embryons congelés	Embryons frais	Embryons congelés
Transfert laparoscopique	80 (46)	90 (20)	76 (25)	75 (12)
Transfert chirurgical	88 (25)	45 (11)	64 (25)	89 ( 9)

une technique laparoscopique au moins aussi efficace et bien mieux adaptée aux conditions de terrain (Vallet *et al*, 1990). À la suite au transfert de 2 embryons frais par receveuse synchronisée la fertilité est comprise entre 70 et 80% (tableau III); la survie des embryons chez les receveuses fertiles étant de 80%, la survie moyenne de l'embryon frais transféré est de 65%. Pour un embryon décongelé et jugé viable, la survie globale est de 50-55%.

### Conclusion : Rendement final du transfert embryonnaire

La figure 4 présente 4 versions aujourd'hui possibles du transfert embryonnaire chez la brebis ou chez la chèvre, qui intègrent plus ou moins les nouvelles connaissances relatives à la superovulation et aux conditions d'insémination. La démonstration de la possibilité d'une préparation de l'ovaire réduisant l'importante variabilité de la superovulation est intéressante dans ces 2 espèces, mais pourrait l'être également chez les bovins où ce problème n'est pas résolu actuellement. Chez les petits ruminants, l'émergence de cette nouvelle génération de traitements caractérisés par un contrôle total des phénomènes, depuis la préparation ovarienne jusqu'au déclenchement des ovulations est une étape im-



**Fig 4.** Nouvelles possibilités pour le transfert embryonnaire chez la brebis et la chèvre. \*IA «à la carte» = 27 heures après le pic de LH (brebis, sperme frais) ou 15 heures après le pic de LH (chèvre, sperme congelé).

portante pour le développement du transfert embryonnaire. Au delà d'un accroissement de la productivité moyenne (plus de 10 embryons utilisables par brebis prétraitée), l'apport majeur sera la réduction du pourcentage d'échecs individuels encore aujourd'hui excessif dans toutes les espèces.



**RÉFÉRENCES**

- Armstrong DT, Evans G (1983) Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology* 19, 31-42
- Baril G, Casamitjana P, Perrin J, Vallet JC (1989) Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthygiene (Berl)* 24, 101-115
- Brebion P, Cognié Y (1989) Increased superovulation in the ewe following 14 days of GnRH-agonist pretreatment. *AETE, 5<sup>e</sup> Coll Sci*, p 106
- Brebion P, Beckers JF, Guérin Y, Boomarov (1990) High performance of Booroola x Romanov ewes as permanent embryo donors. In: *Colloq INRA, major genes for reproduction in sheep*, 171-174
- Chupin D (1988) Superovulation par PMSG ou FSH pour le transfert embryonnaire. *Coll Soc Fr Études Fertil* 26, 213-232
- Cognié Y, Chupin D, Saumande J (1986) The effect of modifying the FSH/LH ratio during the superovulatory treatment in ewes. *Theriogenology* 25, 148
- Folch J, Cocero MJ, Ramon JP, Fernandez-Arias A, Alabart JL (1991) Embryo recovery in the oviduct improves efficiency of superovulation in the ewe. *AETE 7<sup>e</sup> Coll Sci*, 144 p
- Kraemer DC (1989) Embryo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology* 31, 141-148
- Rémy B, Baril G, Vallet JC, Dufour R, Chouvet C, Saumande J, Chupin D, Bechers JF (1992) Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone? *Theriogenology* 36, 389-399
- Scudamore CL, Robinson JJ (1990) Laparoscopic embryo recovery and transfer in sheep. *Proc Soc study anim breeding*; 1988-1989, 27-35
- Vallet JC (1987) Feasibility and repeatability of embryo recoveries from dairy goats under laparoscopy. *AETE, 3<sup>e</sup> Coll Sci*, 159 p
- Vallet JC, Baril G, Loysel C (1990) Surgical or laparoscopic embryo transfer in goats. *AETE, 5<sup>e</sup> Colloq Sci*, 186 p