

Premières gestations après transfert d'embryons équins biopsiés et sexés

Par :

- F. Guignot¹, C. Perreau², F. Reigner², B. Bed'Hom³, P. Mermillod¹ et G. Duchamp³
- ¹INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France
- ²INRA, UEPAO, F-37380 Nouzilly, France
- ³INRA, UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, F-78352 Jouy-en-Josas, France

Résumé

Le transfert d'embryons couplé au génotypage de l'embryon à partir de biopsies embryonnaires est un puissant outil de diffusion du progrès génétique. Dans ce travail, nous avons testé l'impact de deux techniques de biopsie embryonnaire sur la survie *in vitro* et *in vivo* d'embryons équins : par coupe (étude 1), par aspiration (étude 2), et génotypé les embryons (sexe). Plus de 70 embryons ont été collectés sur des ponettes Welsh 6,75 ou 7 jours post ovulation. Etude 1 : après biopsie et 24h de culture *in vitro*, la note morphologique des embryons était négativement affectée par la biopsie, comparée à celle des embryons témoins (P=0,001). Après transfert, moins de 20% de DG14 ont été obtenus contre presque 70% avec les témoins. Etude 2 : après biopsie et 24h de culture *in vitro*, la note morphologique des embryons biopsiés était identique à celle des témoins (P= 0,89). A DG30, la moitié des receveuses d'embryons biopsiés était gestante, contre un tiers pour les receveuses d'embryons témoins. La biopsie par aspiration est donc à privilégier pour cette espèce. Le sexe des embryons a pu être prédit sur toutes les biopsies (étude 1) et sur plus de 80% (étude 2). Toutes les prédictions se sont révélées exactes.

Mots clés : Equin, embryon, biopsie, sexage, transfert

Summary

Embryo transfer coupled with embryonic genotyping from biopsied cells is a powerful tool for genetic selection. We have tested two technics of embryonic biopsy on *in vitro* and *in vivo* viability of equine embryo: by section (study 1) and by aspiration (study 2). We have also sexed the embryos. More than 70 embryos were collected 6.75 or 7 days post ovulation. Study 1: after biopsy and 24h of *in vitro* culture, morphological notation of biopsied embryos was significantly worse than control (P=0.001). After transfer, less than 20% of gestation at Day 14 was obtained with biopsied embryos *versus* almost 70% for control. Study 2: after biopsy and 24h of *in vitro* culture, morphological notations of biopsied embryos and controls were not significantly different (P=0.89). After transfer, half of the recipients with biopsied embryos were pregnant at Day 30 and a third with control. Biopsy by aspiration must be chosen for genotyping in equine species. Sex diagnosis was efficient for all biopsies (study 1) and for more than 80% in study 2. For both studies, all sex diagnoses were correct.

Key-words: Equine, embryo, biopsy, sexage, transfer

Introduction

La transplantation embryonnaire est un puissant outil de diffusion génétique. Elle est réservée pour le moment aux embryons de haute valeur génétique. Plus l'embryon a une valeur élevée, plus il est important qu'il ait les qualités attendues par l'acheteur. Vu l'explosion actuelle et à venir des connaissances sur le génome, il sera possible à partir de peu de cellules de déterminer certaines caractéristiques de l'embryon : c'est le diagnostic préimplantatoire par biopsie cellulaire. Ces caractéristiques peuvent être en rapport avec des maladies génétiques, des intérêts agronomiques, la couleur de la robe, ou encore le sexe de l'animal à naître. Cette technique ne peut être cependant utilisable que si la biopsie permet la survie ultérieure de l'embryon.

Jusqu'à dernièrement, dans l'espèce équine, seule une publication par micro section des embryons en association avec un sexage des embryons faisait état de gestation (Huhtinen *et al.*, 1997 : 3 gestations sur 14 embryons biopsiés). Le sexage avait été fait en analysant les RFLP (restriction fragment length polymorphism) sur les gènes ZFX/ZFY se trouvant sur le chromosome X et Y (Peippo *et al.*, 1995). Cette même technique de micro section d'une dizaine de cellules avait été réalisée sur des embryons bovins en conditions de terrain dès 1990, toujours en vue de sexer les embryons avant transfert (Thibier et Nibard, 1995). Chez les petits ruminants, elle a notamment été testée et validée dans notre Unité de recherche : espèce ovine, 38% de survie embryonnaire (nombre de petits nés) après transfert d'embryons vitrifiés et biopsiés (n=71) *versus* 50% pour des embryons témoins vitrifiés mais non biopsiés (n=8) (Guignot *et al.*, 2008) ; espèce caprine, 25% (n=36) et 35% (n=20) respectivement (Guignot *et al.*, 2011). Le taux de prédiction du sexe s'est révélé exact à 97% pour les ovins et 100% pour les caprins dans ces deux publications.

Tout récemment, une autre technique de biopsie a été rapportée sur des embryons équins : la micro aspiration. Elle permet d'obtenir de bons taux de survie des embryons biopsiés, 8 jours après transfert, meilleurs que ceux obtenus après micro section (Seidel *et al.*, 2010). Après vitrification, dégel et transfert d'embryons biopsiés avec cette technique au stade morula et au stade jeune blastocyste, 3 mises bas ont été obtenues par Troedsson *et al.* (2010 ; n=8). Trois autres mises bas ont été également obtenues, mais à partir d'embryons plus âgés (blastocystes expansés avec capsule, de diamètre compris entre 300µM et 600µM) (Choi *et al.*, 2010; n=12). Ces embryons avaient été également biopsiés par micro aspiration, mais transférés à l'état frais (sans avoir été cryoconservés).

Le but de notre travail est de tester l'effet d'une biopsie par section (étude 1) et par aspiration (étude 2) sur la survie *in vitro* et *in vivo* d'embryons équins et de mettre en place une technique fiable de sexage des embryons à partir des quelques cellules embryonnaires biopsiées.

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux

Donneuses : les embryons sont produits à partir de ponettes Welsh cycliques de l'UEPAO (Unité Expérimentale Physiologie Animale de l'Orfrasière) à l'INRA de Nouzilly suivant la méthode décrite par Moussa *et al.* (2005). Brièvement, la croissance folliculaire des ponettes donneuses est suivie par échographie, et dès qu'un follicule préovulatoire atteint un diamètre supérieur ou égal à 33 mm, l'ovulation est induite. Le lendemain de l'induction de l'ovulation, la donneuse est inséminée avec du sperme frais d'étalon fertile. Les embryons sont collectés 6,75 (étude 1) ou 7 jours (étude 2) après ovulation au stade blastocyste.

Receveuses : les transferts d'embryons sont réalisés par voie cervicale sur des ponettes Welsh cycliques du troupeau de l'UEPAO de moins de 8 ans. Suivi folliculaire et induction d'ovulation sont effectués de la même façon que pour les receveuses.

1.2. Collecte des embryons

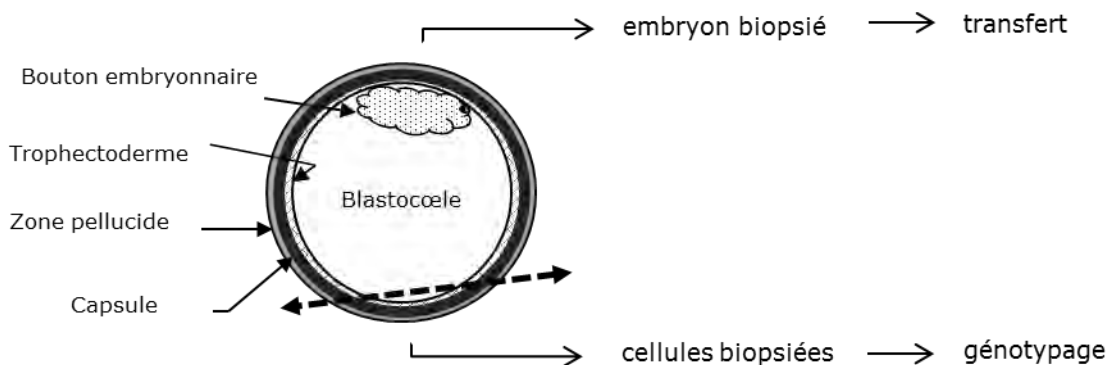
Les embryons sont collectés par lavage de l'utérus avec du ringer lactate (3 x 500 mL) maintenu à 37°C. Après filtration du milieu de collecte, les embryons sont recherchés sous loupe binoculaire, lavés dans 10 bains d'Emcare holding solution, leur diamètre est mesuré et leur qualité morphologique est évaluée selon la grille de notation élaborée par Squires (1995).

1.3. Biopsie des embryons

1.3.1. Biopsie par coupe

Les embryons à biopsier sont déposés un par un dans des gouttes de 30 μ L de milieu tampon (phosphate buffer saline, PBS) sans protéine afin qu'ils adhèrent au fond de la boîte de Pétri. La biopsie est réalisée grâce à un couteau (éclat de lame de rasoir) fixé à un mandrin, lui-même actionné par l'intermédiaire d'un micromanipulateur. Quelques cellules du trophoctoderme sont coupées en prenant garde de ne pas toucher aux cellules du bouton embryonnaire, placé à l'opposé du couteau par précaution (voir figure 1 ci-dessous). Après biopsie, les cellules coupées sont déposées à sec dans des tubes de 0,5 mL et congelées à -80°C pour l'analyse ultérieure du sexe de l'embryon par PCR. Entre chaque embryon, la lame du couteau est lavée (eau, alcool, eau et pour finir PBS sans protéine).

Figure 1 : Biopsie par coupe d'un blastocyste équin
Figure 1: Equine blastocyst biopsy by section



1.3.2. Biopsie par aspiration

Les embryons sont déposés un par un dans des gouttes de 70 μ L de Emcare. Les embryons sont maintenus à 9h par une pipette de maintien, bouton embryonnaire orienté à midi ou 6h. Une pipette d'aspiration reliée à un système Piezo (PrimetechPMM-150FU) est alors introduite dans l'embryon à 3h. Le passage de la pipette à travers la capsule est rendu possible grâce aux vibrations électriques générées par le système Piezo. Les embryons sont vidés de 70% de leur fluide blastocœlique puis des cellules du trophoctoderme sont aspirées. Elles sont ensuite déposées dans un tube de 0,5 mL avec 0,2 μ L de Emcare et conservées à -80°C en attendant la réalisation du sexage.

1.4. Survie *in vitro*

Les embryons sont placés individuellement dans 500 μ L de milieu de culture (milieu Emcare) à 38°C pendant 24h (étude 1) ou dans 500 μ M de mSOF (modified synthetic oviduct fluid) avec 20% de sérum de veau fœtal et 19 mM de glucose (Herrera et al, 2008) à $38,5^{\circ}\text{C}$ pendant 24h dans une étuve 3 gaz (5% CO_2 , 5% O_2 et 90% N_2) (étude 2). A 24h, la qualité morphologique des embryons est de nouveau évaluée.

1.5. Survie *in vivo*

Embryons biopsiés comme embryons témoins sont mis 3 à 4 h en culture *in vitro* avant d'être transférés dans des receveuses ponettes, à J5 ou J6 post ovulation. Les receveuses sont placées dans une barre de contention et la région périnéale est nettoyée et désinfectée avec de la povidone iodée (Vétédine). Juste avant le transfert, elles sont tranquilisées par une injection intraveineuse de sédivet (0,25 mL/100kg de poids vif) et un anti-inflammatoire leur est administré (Méflosyl, 3 mL/100 kg de poids vif). Les transferts se font par voie cervicale à raison d'un embryon par receveuse. Les gestations sont ensuite examinées par échographie à 14 jours (étude 1 ; DG14) et jusqu'à 30 jours (étude 2 ; DG30), afin de visualiser le développement des vésicules embryonnaires (normal, retard, absence de visualisation de l'embryon à l'échographie).

1.6. Sexage

La même technique de sexage a été appliquée pour les 2 études. L'ADN des biopsies cellulaires déposées dans les tubes de 0,5 mL est extrait par la protéinase K, puis pré amplifié sur kit. Une PCR duplex est réalisée sur tous les échantillons pour amplifier deux fragments génomiques, l'un spécifique du chromosome Y et l'autre se trouvant à la fois sur le chromosome X et le chromosome Y. Les résultats de sexage obtenus sur les biopsies sont confrontés à ceux obtenus sur les embryons correspondants, lorsque ceux-ci ne sont pas transférés dans une femelle receveuse.

1.7. Statistiques

Des analyses statistiques ont été réalisées pour comparer les notes morphologiques entre les lots et aux deux temps d'observation, test de Kruskal Wallis, et pour comparer les taux de gestation entre les deux lots, test de Chi2. Les valeurs ont été considérées significatives pour $P < 0,05$.

2. Résultats

Plus de 70 embryons ont été collectés sur 2 ans pour réaliser l'ensemble de ces travaux. Les deux types de biopsies ont été testés séparément dans le temps, la première année, la biopsie par coupe (étude 1), et la seconde année, la biopsie par aspiration (étude 2).

2.1. Biopsie par coupe

Pour cette étude, 43 embryons ont été collectés 6,75 jours post ovulation. Le diamètre moyen était de $193,23 \pm 37 \mu\text{M}$. Vingt ont servi à l'évaluation de la survie *in vitro*, les 23 autres à l'évaluation de la survie *in vivo*.

2.1.1. Survie *in vitro*

Trois lots expérimentaux ont été testés, le lot « biopsie », le lot « témoin », et le lot « témoin milieu ». Dans ce dernier lot, les embryons étaient placés dans le milieu de biopsie mais ils n'ont pas été biopsiés. Après 24h de culture *in vitro*, le nombre d'embryons des lots « témoin » et « témoin milieu » voyant leur diamètre augmenté est significativement plus élevé comparé à celui du lot « biopsie » ($P = 0,07$). La note morphologique des embryons après 24h de culture est négativement affectée par la biopsie cellulaire par coupe, contrairement à celle des embryons des lots « témoin » et « témoin milieu » ($P = 0,001$).

2.1.2. Survie *in vivo*

Pour cette expérience, seuls deux lots ont été testés, le lot « biopsie » et le lot « témoin ». Sur les 23 embryons collectés, 2 étaient au stade morula et n'ont donc pas pu être biopsiés par coupe. En effet, à ce stade de développement, pour un problème de taille et pour moins léser les embryons, il est préférable d'aspirer quelques blastomères. Afin de ne pas perdre ces deux morulae, elles ont donc été mises dans le lot « témoin ». Par contre, tous les blastocystes collectés ont été également repartis entre le lot « biopsie » et le lot « témoin ». Les résultats des diagnostics de gestation à DG14 sont les suivants : presque 70 % de gestation pour le lot « témoin » contre moins de 20% pour le lot « biopsie ».

2.2. Biopsie par aspiration

Vingt-cinq embryons, tous au stade blastocyste, ont été collectés 7 jours post ovulation. Le diamètre moyen était de $379,2 \pm 199,3 \mu\text{M}$. Onze ont servi à l'évaluation de la survie *in vitro*, les 14 autres à l'évaluation de la survie *in vivo*. Deux lots expérimentaux ont été testés, le lot « biopsie » et le lot « témoin ».

2.2.1. Survie *in vitro*

Après 24h de survie *in vitro*, la note morphologique des embryons biopsiés et témoins n'est pas significativement différente entre les deux lots ($1,17 \pm 0,4$ versus $1,20 \pm 0,4$ respectivement ; $P = 0,89$). Elle n'est pas non plus significativement différente de la note morphologique donnée à la collecte, et ce pour les deux lots (embryons biopsiés : $P = 0,32$; embryons témoins, $P = 0,90$).

2.2.2. Survie *in vivo*

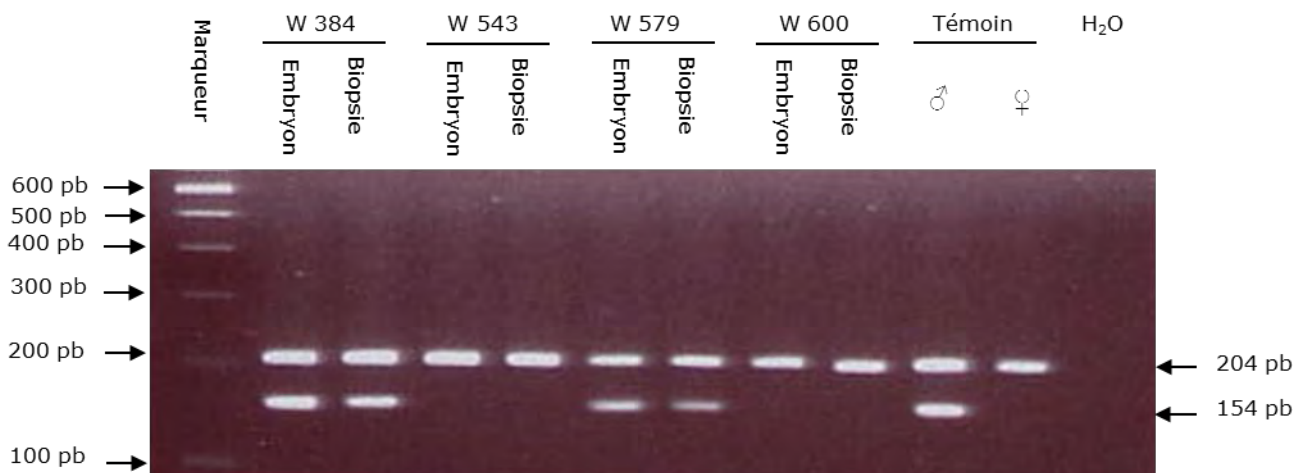
Quatre heures après biopsie, tous les embryons biopsiés ont été jugés 'transférables', tout comme les embryons témoins. A DG 30, la moitié des ponettes transférées avec des embryons biopsiés était gestante et environ un tiers des ponettes avec des embryons témoins, ce qui n'est pas significativement différent ($P=0,53$). Pour l'une des gestations issues d'un transfert d'embryon biopsié, la vésicule observée par échographie était claire, c'est à dire qu'aucun battement cardiaque n'a pu être décelé. Pour toutes les autres, le cœur fœtal battait.

2.3. Fiabilité de sexage

2.3.1. Après biopsie par coupe

Le sexe des embryons a pu être prédit sur toutes les biopsies analysées. Après confrontations avec les résultats obtenus sur le reste des embryons respectifs, toutes les prédictions se sont avérées exactes. La figure II montre les résultats obtenus sur un gel électrophorétique pour 4 d'entre eux. Deux fragments de 204 et 154 paires de bases ont été observés sur le gel pour les biopsies réalisées sur les embryons des ponettes W 384 et W 579 (sexe mâle) contre un seul de 204 paires de bases pour les embryons des ponettes W 543 et W 600 (sexe femelle). Le même résultat est clairement visible pour les embryons correspondants.

Figure II : Sexage d'embryons et de biopsies embryonnaires équines
Figure II : Sexage of embryos and embryonic biopsies in equine species



2.3.2. Après biopsie par aspiration

Le sexe des embryons a pu être prédit sur plus de 80% des biopsies analysées. Après confrontations avec les résultats obtenus sur le reste des embryons respectifs, toutes les prédictions se sont avérées exactes.

3. Discussion

L'ensemble de ces résultats montre que le choix de la technique de biopsie embryonnaire à appliquer pour pouvoir génotyper un embryon avant transfert est primordial dans l'espèce équine. Après avoir mis en évidence que le milieu utilisé pour la biopsie par coupe n'était pas un milieu délétère pour l'embryon, nous avons observé clairement que la technique de biopsie, par elle-même, était délétère (étude 1). A contrario, nous avons mis en évidence que la technique de biopsie par micro aspiration associée à 24h de culture *in vitro* dans les conditions appliquées n'était pas du tout délétère à l'embryon équin. La même observation a été faite en associant la technique de biopsie par micro aspiration à 4h de survie *in vitro* suivi d'un transfert dans une receveuse. Dans cette espèce, au stade blastocyste, seule la technique d'aspiration de cellules du trophectoderme permet une bonne viabilité de l'embryon, *in vitro* comme *in*

vivo. Ces résultats confortent ceux rapportés précédemment par Seidel et al après transfert d'embryons biopsiés (2010).

Quant aux résultats de sexage, quelle que soit la technique de biopsie appliquée, à chaque fois le sexe prédit s'est avéré exact avec la technique de sexage mise en œuvre. De plus, grâce au couplage avec la méthode d'amplification globale du génome embryonnaire sur kit appliquée, il est possible de réaliser du multi-génotypage, donc des diagnostics beaucoup plus complets, ce qui est d'un intérêt économique certain. Il faut cependant noter qu'après biopsie par aspiration, le taux de prédiction du sexe est plus faible comparé à celui obtenu avec la technique de biopsie par coupe. Ce résultat est dû à la taille des biopsies que nous avons réalisées (1 à 3 cellules pour la biopsie par aspiration contre 8 à 50 pour la biopsie par coupe) et ne remet nullement en cause la technique de sexage que nous avons mise en place. Une solution pour augmenter le taux de prédiction à l'avenir serait d'aspirer 1 à 2 cellules supplémentaires sans risque accru pour la survie de l'embryon.

Remerciements

A l'ensemble du personnel de la jumenterie de l'UEPAO de Nouzilly.

A Marc Le Bert de l'INEM, UMR7355 CNRS Université d'Orléans pour son aide dans l'approvisionnement du système piezo.

A l'IFCE qui a financé une grande partie de ces expériences.

Références

Choi, Y.H., Gustafson-Seabury, A., Velez, I.C., Hartman, D.L., Bliss, S., Riera, F.L., Roldan, J.E., Chowdhary, B., Hinrichs, K. 2010. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction* 140, 893-902.

Guignot, F., Baril, G., Dupont, F., Cognié, Y., Folch, J., Alabart, J.L., Poulin, N., Beckers, J.F., Bed'hom, B., Babilliot, J.M., Mermillod, P. 2009. Determination of sex and scrapie resistance genotype in preimplantation ovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 76 (2), 183-90.

Guignot, F., Perreau, C., Cavarroc, C., Touzé, J.L., Pougard, J.L., Dupont, F., Beckers, J.F., Rémy, B., Babilliot, J.M., Bed'Hom, B., Lamorinière, J.M., Mermillod, P., Baril, G. 2011. Sex and PRNP Genotype Determination in Preimplantation Caprine Embryos. *Reprod Dom Anim* 46, 656-663.

Herrera, C., Revora, M., Vivani, L., Miragaya, M.H., Losinno, L., Quintans, C., Pasqualini, R.S. 2008. Effect of high glucose concentrations during in vitro culture of equine embryos. *7th Int Symp on Equine Embryon Transfer, Suffolk, UK* 52-53.

Huhtinen, M., Peippo, J., Bredbacka, P. 1997. Successful transfer of biopsied equine embryos. *Theriogenology* 48, 361-367.

Moussa, M., Bersinger, I., Doligez, P., Guignot, F., Duchamp, G., Vidament, M., Mermillod, M., Bruyas, J.F. 2005. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 64, 1619-1632.

Peippo, J., Huhtinen, M., Kotilainen, T. 1995. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 44, 619-627.

Seidel, G.E., Cullingford E.L., Stokes, J.E., Carnevale, E.M., McCue, P.M. 2010. Pregnancy rates following transfer of biopsied and/or vitrified equine embryos: evaluation of two biopsy techniques. *International Symposium on Equine Reproduction (ISER), 26 - 30 July, Kentucky, USA*. Abstract 44.

Squires, E.L. 1995. Morphologic assessment of the equine embryo. *Collection and transfer of equine embryos* chapter 7, 18-23.

Thibier, M., Nibard, M. 1995. The sexing bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43, 71-80.

Troedsson, M. H. T., Paprocki, A. M., Koppang, R. W., Syverson, C. M., Griffin, P., Klein, C., Dobrinsky, J.R. 2010. Transfer success of biopsied and vitrified equine embryos. *International Symposium on Equine Reproduction (ISER), 26 - 30 July, Kentucky, USA*. Abstract 207.