



27 février 2002

LES HARAS NATIONAUX

Un milieu de stockage simplifié pour la réfrigération des embryons

M. Moussa, G. Duchamp, P.F. Daels, J.-F. Bruyas
Equipe de Recherche Equine

Physiologie de la reproduction et du comportement, INRA Centre de Tours
Nouzilly et ENV de Nantes

Résumé

Le but de cette expérience était de comparer la viabilité embryonnaire, dans 3 milieux différents : le Ham's F-10 qui nécessite une pression partielle en CO₂ constante, et les milieux prêts à l'emploi que sont l'Emcare® et le Vigro® qui n'imposent aucune contrainte d'ambiance gazeuse. Après conservation 24h à +4°C, la viabilité des embryons a été évaluée après 0,6 et 24h de conservation à 4°C sur les embryons in toto par une technique de coloration vitale au DAPI et par transferts dans des juments receveuses. La moyenne du nombre (\pm SEM) de cellules mortes (fluorescentes) par embryon est $0,4 \pm 0,2$, $2,4 \pm 1,1$, $14,4 \pm 5,2$, $19,3 \pm 5,1$ et $24,5 \pm 7,2$. Pour les lots 0h, E-6h, H-24h, E-24h et V-24h respectivement. Il n'y a pas de différence significative entre les 3 lots d'embryons conservés pendant 24h dans chacun des 3 milieux. Le taux global de gestation chez les receveuses est de 75% (15/20) et le taux de survie des embryons conservés 24 h dans Ham's F10 et Emcare est similaire.

Les résultats de cette étude nous mènent à conclure que le milieu Emcare® offre une bonne alternative pour la conservation des embryons équins à +4°C par rapport au milieu Ham's F10.

Mots-clés : Jument, transfert d'embryon, transport, réfrigération

Summary

In the present study, we have evaluated two embryo holding media containing zwitterionic buffers for the cooled storage of equine embryos. In a first experiment, we have compared the viability in-vitro of 7-day old, equine embryos after 0h, 6h and 24h cooled-storage in Ham's F-10 (Sigma, St. Louis, MO), Embryo Holding Solution Emcare (EHS) (ICP, Auckland, NZ) and ViGro Holding Plus (AB Technology, Pullman, WA). The mean (\pm SEM) number of fluorescent dead cells per embryo was 0.4 ± 0.2 , 2.4 ± 1.1 , 14.4 ± 5.2 , 19.3 ± 5.1 and 24.5 ± 7.2 for Groups 0h, E-6h, H-24h, E-24h and V-24h, respectively. The mean number of dead cells in Group-0h and E-6h was similar ($P > 0.05$). The mean number of dead cells at 0h and 6h was significantly lower than at 24h ($P < 0.05$). However, no significant differences in number of dead cells was observed between Group H-24h, E-24h, and V-24h, ($P > 0.05$). In the second study, we compared pregnancy rates after transfer of embryos stored for 24 hours in Ham's F-10 Nutrient Mixture and Embryo Holding Solution Emcare. No significantly difference in survival rate was observed ($p > 0.05$).

These results suggest that Emcare and ViGro offer a good alternative to Ham's F-10 for 24h cooled storage of equine embryos

Key-words : mare, embryo transfer, transportation, cooled storage

INTRODUCTION

Les techniques de conservation à 4°C de l'embryon équin représentent une demande actuelle réelle sur le terrain, aussi bien en France dans le cadre des Haras Nationaux et au sein de structures privées de transplantation embryonnaire qu'à l'étranger. La technique employée de manière routinière par les centres de transfert aux Etats-Unis a été mise au point de manière relativement empirique et est utilisée en suivant scrupuleusement le protocole proposé qui est relativement contraignant et non totalement « standardisable ». En particulier, le milieu de transport renfermant un tampon carbonate, doit être « gazé » pour maintenir une pression partielle en CO₂ constante. Cette étape de gazage est délicate et nécessite du matériel adapté afin d'éviter la contamination du milieu, ce qui rend difficile pour chaque structure de récolte d'embryons de produire aisément et de manière reproductible son propre milieu de transport.

Il est apparu urgent, du fait de la demande émanant du terrain, de mettre en place, en premier lieu, une étude sur la conservation des embryons à +4°C afin de permettre le transport pendant 24 à 48h. En effet, afin de limiter les contraintes de gestion de juments receveuses, la mise en place de quelques structures spécialisées dans le transfert des embryons permettrait de n'avoir sur l'hexagone que un ou deux troupeaux de juments receveuses. Les centres de récolte d'embryons étant eux dispersés afin de se situer à proximité des juments donneuses pourraient alors conditionner les embryons et les expédier réfrigérés au(x) centre(s) de transfert. Ces derniers spécialisés pourraient d'une part entretenir un troupeau de juments receveuses suffisamment nombreuses pour avoir toujours disponible une jument receveuse au stade idéal du cycle et d'autre part étant spécialisés pour offrir la ou les techniques de transfert parfaitement maîtrisées ce qui augmenterait sensiblement les taux de réussite de ces derniers. Des projets de constitution de tels troupeaux sont actuellement étudiés dans ces centres privés. En 2001, nous avons testé des milieux de conservation (prêts à l'emploi) contenant des tampons ne nécessitant pas de gazage et nous avons démontré que des milieux prêts à l'emploi (Emcare® et Vigro®) existent et sont aussi performants que le milieu classique gazé (Ham's F10).

BILAN DE LA PREMIERE ANNEE DE THESE DE M. MOUSSA MOHAMMAD

Pendant sa première année de travail (2001), Mohammad Moussa a concentré sa recherche sur la conservation pendant 24h par réfrigération à 4°C et le développement de techniques d'évaluation d'embryon in-vitro. Afin d'évaluer la viabilité des embryons in-vitro, le Dr Moussa a mis au point plusieurs techniques de laboratoire à l'INRA de Nouzilly et dans le laboratoire de reproduction à Utrecht, Pays-Bas. Ces techniques nous ont permis d'avancer plus rapidement dans la mise au point de milieux de conservation à +4°C car elles ont supprimé dans un premier temps le besoin des transferts dans des receveuses synchrones. En 2002, le Dr Moussa envisage de continuer son travail sur la conservation par le froid de l'embryon et de compléter la mise au point des tests de viabilité afin de les utiliser pour l'évaluation des embryons réfrigérés.

ETUDES IN VITRO (RESULTATS 2001)

Le but de cette expérience était de comparer la viabilité embryonnaire, dans 3 milieux différents : le Ham's F-10 qui nécessite une pression partielle en CO₂ constante, et les milieux prêts à l'emploi que sont l'Emcare® et le Vigro® qui n'imposent aucune contrainte d'ambiance gazeuse. Après conservation 24h à +4°C, la viabilité des embryons a été évaluée sur les embryons *in toto* par une technique de coloration vitale au DAPI.

Cinquante embryons équins ont été collectés le 7^{ème} jour post-ovulation par un lavage utérin utilisant le milieu Emcare® Flushing Solution (ICP, Auckland, NZ). Les embryons ont été répartis aléatoirement en 5 lots. Lot-0h (témoin), Lot-6h dans Ham's F10, Lot-H-24h dans Ham's F10, Lot-E-24h dans EHS et Lot-V-24h dans ViGro Holding Plus. La viabilité des embryons a été évaluée par une technique améliorée (quantitative et non plus approximative) de DAPI basée sur la technique (semi-quantitative) mise au point pour les embryons équins par Daniel Lagnaux de l'équipe INRA de Nouzilly. La moyenne du nombre (\pm SEM) de cellules mortes (fluorescentes) par embryon est respectivement pour chacun des lots de : $0,4 \pm 0,2$, $2,4 \pm 1,1$, $14,4 \pm 5,2$, $19,3 \pm 5,1$ et $24,5 \pm 7,2$ (Tableau 1). Il n'y a pas de différence significative entre les 3 Lots d'embryons conservés pendant 24h dans chacun des 3 milieux.

Quand on compare les embryons en fonction de leur taille (diamètre < ou $\geq 400 \mu\text{m}$), il semble que les embryons les plus gros soient plus résistants au froid. Le milieu Emcare® offre une bonne alternative au milieu Ham's F10 gazé pour cette conservation à +4°C.

Tableau 1

Groups (n=10)	Dia m e t r e	S c o r e D e p a r t	N o m b r e c e l l u l e s m o r t e s
F r a i s 0 h	394 ± 44 (200-600)	1 ± 0 (1)	0.4 ± 0.2 (0-1)
E m c a r e 6 h	390 ± 38 (200-600)	1.3 ± 0.2 (1-2)	2.4 ± 1.1 (0-12)
H a m s 24 h	412 ± 63 (200-840)	1.5 ± 0.3 (1-2)	14 ± 5 (0-48)
E m c a r e 24 h	418 ± 53 (200-700)	1.4 ± 0.3 (1-2)	19 ± 5 (1-52)
V i g r o 24 h	442 ± 59 (200-800)	1.4 ± 0.3 (1-2)	24 ± 8 (1-68)

ETUDE IN VIVO (RESULTATS 2001)

L'objectif de cette étude est la comparaison des taux de gestation obtenus après transfert d'embryons conservés 24h à +4°C dans deux milieux : le Ham's F-10 qui nécessite une pression partielle en CO₂ constante et le milieu Emcare® prêt à l'emploi sans contrainte d'ambiance gazeuse.

Les embryons récoltés par voie non chirurgicale ont été appariés deux à deux. L'appariement s'est fait de telle sorte que les embryons étaient récoltés le même jour, à un stade de développement le plus proche possible et issus de parents génétiques différents. Les 40 embryons ont ainsi formé 2 lots : un lot réfrigéré et conditionné selon la méthode utilisée au Colorado avec comme milieu de conservation le Ham's F-10, l'autre lot conditionné et réfrigéré en utilisant le milieu Emcare®. Les embryons ont été conservés pendant 24h dans un Equitainer. Chaque paire d'embryons de chacun des 2 lots a été transférée chirurgicalement dans l'utérus de la même jument receveuse. Un diagnostic de gestation a été réalisé par échographie tous les 2 jours dès le surlendemain du transfert jusqu'à ce que les embryons transférés soient âgés de 14 jours. A ce stade, lors de gestation non gémellaire, les receveuses subissaient une nouvelle collecte d'embryons. Pour déterminer l'identité de l'embryon présent et donc son lot expérimental d'appartenance, un test de paternité a été mis en œuvre selon un procédé déjà utilisé dans des études précédentes menées à l'INRA de Nouzilly et parfaitement maîtrisé par le laboratoire Labogéna qui a assuré ce génotype.

Le taux global de gestation chez les receveuses est de 75% (15/20). Il n'y a pas de différence entre les 2 lots (Tableau 2).

Tableau 2

Distribution des embryons équins entre Ham's F-10 et Emcare™

Milieu de conservation	Ham's F-10	Emcare™
Nombre des embryons transférés	20	20
Moyenne diamètre (μm)	510.5 \pm 33.9	468 \pm 27.4
Nombre d'embryons à J 14	9	8

($P > 0.05$)

CONCLUSION

Le milieu Emcare® offre une bonne alternative pour la conservation des embryons équins à +4°C par rapport au milieu Ham's F10.

BIBLIOGRAPHIE

PF Daels, M. Moussa, G. Duchamp and J-F. Bruyas. Un milieu de stockage à 4°C simplifié pour le transport d'embryon. Proceedings of Journées de l'Association Vétérinaire Equine Française (AVEF), Oct 11-13, Pau, France, 2001.

M. Moussa, G. Duchamp, J-F. Bruyas and P.F. Daels. Comparison of embryo quality of cooled stored equine embryos using 3 embryo holding solutions. Proceedings of the International Embryo Transfer Meeting, Brazil; Theriogenology (abstract - In Press) 2002.

M. Moussa, G. Duchamp, R. Mahla, J-F. Bruyas and P.F. Daels. Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 hours in Ham's f-10 and Emcare holding solutions. Proceedings of the International Symposium on Equine Reproduction Meeting, Theriogenology (abstract in press - oral presentation) 2002.