



26 février 2003

LES HARAS NATIONAUX

L'influence de l'âge de l'embryon équin sur la viabilité après 24h de conservation à 5°C: comparaison 2 système de conservation

Par : M. Moussa,^{1,2} G. Duchamp,¹ J-F. Bruyas² and P.F. Daels¹

¹UMR INRA-CNRS-Univ. Tours, PRC
Equipe "Reproduction Equine", 37 380 Nouzilly
²Department de Reproduction, Ecole Nationale
Vétérinaire de Nantes, BP 40706, 44307 Nantes

Résumé

La possibilité de transporter des embryons à 5°C d'un endroit à l'autre offre de nombreux intérêts pour l'utilisation en routine du transfert d'embryons. Les objectifs de cette étude étaient de 1) tester l'influence du stade de développement embryonnaire des embryons âgés de 7 et 8 jours sur la capacité des embryons équins à être conservés par le froid et de 2) comparer 2 systèmes de conservation de l'embryon. Les résultats montrent que l'âge des embryons ne modifie pas leur aptitude à la conservation par réfrigération. Il n'y a pas de différence significative entre les témoins et les embryons conservés 6 heures en bouteille. En revanche, il existe une différence significative entre ces lots d'embryons et ceux conservés 24 h. Pour les embryons conservés dans 5 ml pendant 24h, il n'y a pas de différence entre les 2 milieux. En revanche, une différence significative existe entre les embryons conservés 24h dans 5 ml et ceux conservés 24h en bouteille. Ces résultats montrent qu'il est possible de conserver les embryons pendant 6h dans un grand volume de milieu de récolte à 5°C, ce qui peut être utilisé en routine dans le cadre d'une structure commerciale de transfert d'embryons.

Mots-clés : Embryons, âge, conservation, bouteille

Summary

The age of embryo is one of the embryonic factors that may affect pregnancy rates. The aim of this study was to compare the viability of equine embryos on Day 7 or 8 after 6h and 24h cooled-storage and to compare 2 systems of transportation. The mean number of dead cells in Group-0h and B-6h was similar but was significantly lower than for embryos stored for 24h in Groups B-24h, E-24h and H-24h. The mean number of dead cells was similar for Groups E-24h and H-24h, but was significantly lower than for embryos stored in a bottle at 5°C for 24h. Within each storage system (0h, B-6h, B-24h, E-24h and H-24h) no significant difference in the number of dead cells/mm² between embryos collected on Day 7 and 8 was observed. These results suggest that there is no significant difference between embryo aged 7 or 8 days and storage in 0.5l bottle of EFS at 5°C for 6h (but not for 24h) offers a good alternative to storage in 5 ml tube in Equitainer.

Key-words : Embryos, age, storage, bottle

INTRÓDUCTION

La possibilité de transporter des embryons à 5°C d'un endroit à l'autre offre de nombreux intérêts pour l'utilisation en routine du transfert d'embryons. La technique de transfert, bien qu'elle soit de plus en plus diffusée en France reste tout de même relativement contraignante du fait que l'embryon doit être transféré dans une jument synchrone à la donneuse. C'est pourquoi, une méthode simple, permettant de conserver les embryons suffisamment longtemps pour les faire voyager présente de nombreux avantages. Cette technique permettait de transporter l'embryon vers une jument au stade idéal du cycle.

En 2001, avec des embryons collectés 7 jours post ovulation, des études sur les milieux de conservation (prêt à l'emploi) contenant des tampons ne nécessitant pas de gazage ont été effectuées, et il fut démontré que ces milieux prêts à l'emploi (notamment EMCARE® et VIGRO®) sont aussi performants que le milieu classique gazé Ham's F10 (Moussa *et al.* 2002). Ce dernier doit être gazé pour maintenir une pression constante en CO₂. Ces études ont donc permis de simplifier la technique de conservation de l'embryon et de démontrer que les petits embryons (<400µ) supportaient moins bien la conservation que les embryons plus gros. Cette nouvelle étude avait deux objectifs : 1) tester l'influence de l'âge (7 ou 8 jours) de l'embryon sur sa capacité à être conservé, 2) tenter de simplifier encore la technique de conservation.

MATERIEL ET METHODES

Animaux

Le suivi de la croissance folliculaire au cours de l'oestrus des ponettes donneuses d'embryons était effectué par un examen échographique quotidien. Dès que le diamètre du follicule préovulatoire atteignait 33 mm de diamètre, l'ovulation était induite par une injection intraveineuse de CEG (Crude Equine Gonadotrophin ; Duchamp *et al.* 1987). Les ponettes ont été inséminées le lendemain de l'injection de CEG avec du sperme frais contenant environ $600 \cdot 10^6$ spermatozoïdes provenant de 3 étalons fertiles.

Récolte

La collecte des embryons a eu lieu aléatoirement à J7 ou J8 post ovulation par 3 lavages utérins successifs dans 0.5L/lavage d'EMCARE® Complete Flush Solution® (ECFS, ICP, Auckland, NZ) chauffé à 37°C. Dès leur sortie du milieu de collecte les embryons ont été lavés 10 fois dans le Emscare Holding Solution (EHS, ICP, Auckland, NZ). Ils ont été évalués d'après les critères morphologiques définis par McKinnon *et al.* (1988) (sous loupe binoculaire) et mesurés à l'aide d'un réticule micrométrique.

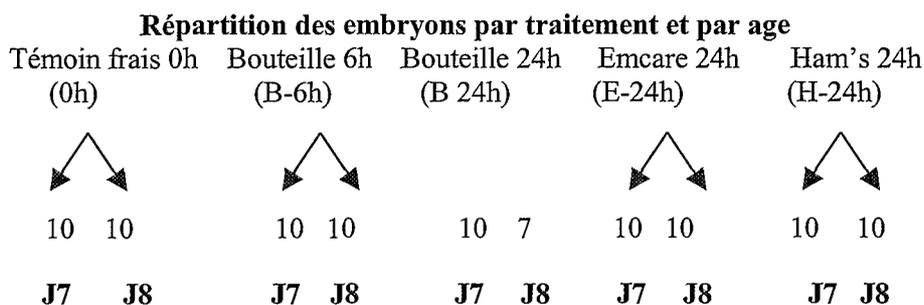
Schéma expérimental

Quatre vingt dix sept embryons ont été utilisés dans cette étude. Ils ont été récoltés 7 ou 8 jours après constat de l'ovulation. Les 97 embryons récoltés se répartissaient en 50 embryons de 7 jours et 47 embryons de 8 jours. Les récoltes étaient en fait programmées respectivement 184 h (36 h + 7 x 24h) et 208 h (36h + 8 x 24h) post injection de CEG puisque l'ovulation induite se produit en moyenne 36h après l'injection (Bezard *et al.* 1989 ; Duchamp *et al.* 1987).

Les embryons ont ensuite été repartis pour chacune des deux classes d'âge dans 5 lots subissant des traitements différents à raison de 20 embryons par lot : 20 embryons ont été utilisés comme embryons témoins, 17 embryons ont été conservés directement dans le flacon de collecte (n=10 en bouteille pendant 6 heures, n=7 en bouteille pendant 24heures), et 40 embryons conservés avec le system classique (n=20 dans 5 ml de EHS, n=20 dans 5 ml de Ham's F10).

- Traitement 0h : 20 embryons Témoin frais ont été évalués à la collecte juste après les 10 lavages successifs
- Traitement B-6h : 20 embryons ont été conservés pendant 6 heures au réfrigérateur à 5° C dans un des flacons (0.5l de ECFS) qui a servi à la collecte des embryons.
- Traitement B-24h: 20 embryons ont été conservés selon les conditions du traitement précédent, mais sur période de 24 heures de conservation.

- Traitement E-24h : 20 embryons, après avoir été lavés, ont été conservés dans un tube de 5ml du Emcare holding solution®, (EHS) à l'intérieur d'un Equitainer (Hamilton-Thorn, S. Hamilton, MA) comme défini déjà par Carnevale *et al* 1987 à 5° C pendant 24 heures.
- Traitement H-24h : 20 embryons ont été conservés dans un tube de 5ml du Ham's F10 (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO) en conditionnement identique au traitement précédent.



A la fin de chaque période de conservation les embryons ont été évalués d'après les mêmes critères morphologiques qu'au moment de la récolte (diamètre + notation) et par coloration des cellules mortes avec le colorant vital DAPI tel que décrit par Huhtinen *et al.*, (1995) et Moussa *et al.* (2002)

Coloration au DAPI

Tous les embryons, témoins frais ou après conservation ont été lavés 3 fois dans le EHS ensuite placé dans une solution de EHS contenant 1µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Les embryons sont incubés avec la solution de DAPI pendant 15 min à température ambiante, puis lavés 3 fois dans le EHS. Le nombre de cellules mortes (DAPI positif, cellules fluorescentes) a été déterminé pour chaque embryon sous microscope inversé à fluorescence (Olympus, IMT-2). Pour compenser l'hétérogénéité des tailles des embryons, nous avons calculé le ratio entre le nombre de cellules mortes et la surface extérieure des embryons (Moussa *et al* 2002).

Analyse statistique

Pour l'analyse des résultats nous avons utilisé le Student test et le test de Kruskal Wallis ($P \leq 0.05$).

RESULTATS

Les différentes valeurs moyennes (\pm SEM) observées dans chaque lot (diamètre, nombre de cellules mortes par embryon, et nombre moyen de cellules mortes/unité de surface) sont présentés dans le tableau 1. Le diamètre (μ m) respectif moyen des embryons pour les lots témoins frais, B-6h, B-24h, E-24h et H-24h est de 387 ± 56.3 , 388 ± 33.1 , 374 ± 37.6 , 418 ± 40.8 et 390 ± 43.5 pour les embryons de 7 jours et de 940 ± 79 , 966 ± 92 , 863 ± 130 , 1018 ± 124 , 1080 ± 82.9 pour les embryons 8 jours. Concernant la taille des embryons à l'intérieur de chaque âge il n'y a pas de différence significative entre les lots. Par contre les embryons collectés à Jour 7 sont significativement plus petits que les embryons collectés à Jour 8 ($P < 0.001$).

Le nombre moyen (\pm SEM) de cellules mortes fluorescentes par embryon est 2 ± 0.9 , 6.6 ± 1.3 , 71.9 ± 21.6 , 29.9 ± 10.1 et 22.7 ± 8.2 respectivement pour chacun des lots : 0h, B-6h, B-24h, E-24h et H-24h : (Tableau 1). Il n'y a pas de différence significative entre le lot 0h et le lot B-6h et également pas de différence significative entre E-24h et H-24h. Mais nous avons observé une différence significative entre les lots 0h, B-6h, et les lots B-24h, E-24h, H-24h. Nous avons observé également une différence significative entre les lots E-24h, H-24h et le lot B-24h.

De la même manière, en prenant en compte le nombre de cellules mortes par unité de surface, il n'y a pas de différence significative entre le lot 0h et le B-6h. En revanche, nous avons observé une différence significative entre les lots 0h, B-6h et les lots B-24h, E-24h, H-24h. Pour les embryons conservés 24 heures en Equitainer (E-24h et H-24h), il n'y a pas de différence entre les 2 milieux. Une différence significative

existe entre les embryons conservés 24h en Equitainer et ceux conservés 24h en bouteille. Pour chaque lot de conservation (0h, B-6h, B-24h, E-24h et H-24h), il n'y a pas de différence significative quant au nombre de cellules mortes/mm² entre les embryons collectés le jour 7 et le jour 8 (Figure 1).

Pour les embryons de 7 jours conservés 24 heures en Equitainer, le nombre de cellules mortes/mm² pour les embryons de diamètre $\leq 400\mu\text{m}$ (101.7 ± 22.2)(n=13) est plus élevé ($P < 0.002$) que pour les embryons dont le diamètre est $> 400\mu\text{m}$ (29.3 ± 13.0) (n=7).

DISCUSSION

Ces résultats confirment que le milieu EHS, qui est un milieu prêt à l'emploi ne nécessitant pas de gazage, est un milieu de conservation fiable pour les embryons équins. Cependant le conditionnement joue un rôle sur la viabilité des embryons équins après 24 heures de conservation. En effet le mode de conservation des embryons en bouteille dans le milieu de collecte, ne peut être utilisable que sur une courte durée (6h).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer la mauvaise conservation des embryons en bouteille pendant 24h : premièrement bien que le ECFS contienne un antibiotique, l'embryon séjourne dans un milieu contaminé au moment de la collecte. En effet, lorsque l'on conserve l'embryon avec le système classique, celui-ci est lavé plusieurs fois avant d'être placé dans le milieu de conservation stérile. Deuxièmement, le milieu de collecte ECFS et le milieu de conservation EHS n'ont pas exactement la même composition. L'EHS contient en particulier un taux plus élevé de BSA (0.4% versus 0.1%) mais renferme également des facteurs de croissance, des vitamines, et des acides aminés qui ne sont pas présents dans le milieu de collecte (ECFS).

Dans l'étude précédente (Moussa *et al.* 2002), il apparaissait que les embryons de diamètre $< 400\mu\text{m}$ supportaient moins bien la conservation. Pour l'ensemble des embryons de 7 jours conservés par réfrigération dans cette nouvelle étude, il apparaît à nouveau que les petits embryons de 7 jours supportent moins la conservation que les " gros " embryons de 7 jours.

Ces résultats semblent être en accord avec ceux d'autres études. Chez les bovins, Lindner *et al.*, (1983) ont montré que les blastocystes épanouis de 7 ou 8 jours résistent mieux au froid que les petits embryons. Les petits embryons bovins formés de moins de 100 cellules ont un taux de cellules apoptotiques plus élevé que les blastocystes épanouis possédant plus de 100 cellules (Byrne *et al.* 1999). Clark *et al.* 1987 ont montré que les petits embryons équins ($< 175\mu\text{m}$) sont plus sensibles à la conservation au froid que les gros embryons. Carnevale *et al.*, (2000) rapportent que les taux de gestation après transfert sont plus faibles avec les petits embryons frais et conservés par réfrigération (100 à 299 μm). En revanche dans notre étude, bien que les embryons de 8 jours soient de taille supérieure à celle des embryons de 7 jours, le stade à la collecte n'a eu aucune influence sur l'aptitude des embryons à être conservés au froid.

Il y a peu d'études disponibles concernant l'effet de l'âge de l'embryon sur son aptitude à être conservé au froid. Cependant nos observations sont en accord avec la littérature (Squires *et al.* 1999 ; Carnevale *et al.* 2000). Luliano et Cook (1985) ont comparé le taux de gestation après un transfert chirurgical ou non chirurgical d'embryons faits de 7 et 8 jours: 43 transferts ont été réalisés avec des embryons de 7 jours et 40 avec des blastocystes de 8 jours et les taux de gestations furent respectivement 60% et 57%.

CONCLUSION

Ces résultats montrent que le stade de développement embryonnaire n'a pas d'influence sur l'aptitude des embryons équins à être conservés pendant 24h à 5°C. La conservation des embryons en bouteille montre que ce système offre une bonne méthode de conservation, si l'on ne dépasse pas un temps supérieur à 6h. On peut donc utiliser ce système pour transporter des embryons équins, sur de courts trajets. En revanche, pour un transport plus long, ce mode de conservation ne doit pas être utilisé et il faut avoir recours à la conservation

dans un faible volume de milieu adapté à l'intérieur d'un Equitainer. L'ensemble de ces résultats est à prendre en compte pour une utilisation en routine dans le cadre d'une structure commerciale de transfert d'embryons.

BIBLIOGRAPHIES

- Byrne AT, Southgate J, Brison DR, and Leese HJ. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Journal of Reproduction and Fertility* 1999;117:97-105.
- Bezard J, Magistrini M, Duchamp G and Palmer E. Chronology of equine fertilisation and embryonic development in vivo and in vitro. *Equine Veterinary journal* 1989; Supplement 8:105-110.
- Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK and McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology* 2000;54:965-979.
- Clark K.E., E.L. Squires, A.O. McKinnon and G.E. Seidel JR. Viability of stored equine embryos. *Journal Animal Science*. 1987;65:534.
- Carnevale EM, Squires EL, McKinnon AO. Comparison of Ham's F-10 with CO₂ or HEPES buffer for storage of equine embryos at 5°C for 24h. *Journal of Animal Science* 1987;65:1775-1781.
- Duchamp G, Bour B, Combarnous Y and Palmer E Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility* 1987;Suppl 35:221-228.
- Huhtinen M, Bredbacka P and Kotilainen T. Non surgical transfer of 4',6'-Diamidino-2-Phenylindole-stained Equine demi-embryos treated with cytocholasin B and Nocodazole. *Biology of the Reproduction Monograph* 1995; Series 1:325-328.
- Iuliano M.F., Squires E.L. and Cook, V.M. Effect of age of equine embryos and methods of transfer on pregnancy rate. *Journal Animal Science* 1985;60: 258-263.
- Linder G.M., G.B. Anderson, R.H. BonDurant and P.T. Cupps. Survival of bovine embryos stored at 4°C. *Theriogenology* 1983;20:311.
- Moussa M, Duchamp G, Mahla R., Bruyas J-F. and Daels P.F. In-vitro and in-vivo comparison of Ham's F-10, Emcare Holding Solution and ViGro Holding Plus for the cooled storage of equine embryos. *Theriogenology* 2002;1-11.
- McKinnon AO, Squires EL. Morphologic assessment of the equine embryo. *Journal American Veterinary Medicine Association* 1988;192:401-406.
- Squires EL, McCue PM, Vanderwall DK. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* 1999;51:91-104.

Tableau 1

Distribution de diamètre des embryons, nombre de cellules morte/embryon et nombre de cellules morte/mm² pour les embryons équin conservés pendant 24h à 5°C.

	Diamètre des embryons (en µm)		Nb total cellules mortes/embryon		Nb. cellules mortes /mm ²	
	Jour 7	Jour 8	Jour 7	Jour 8	Jour 7	Jour 8
	Témoins frais	387±56.3 ^a	940±79 ^b	2 ± 0.9 ^a	46±28.7 ^d	12.47±6.6 ^a
lots-B-6h	388±33.1 ^a	966±92 ^b	6.6±1.3 ^a	105.2±51.8 ^d	25.44±4.6 ^a	22.1±15 ^a
lots-B-24h	374±37.6 ^a	863±130 ^b	71.9±21.6 ^b	400±125 ^e	140±48.3 ^b	196±67.5 ^b
lots-E-24h	418±40.8 ^a	1018±124 ^b	29.9±10.1 ^c	175.2±52.3 ^f	64.2±25.3 ^c	45.6±12.6 ^c
lots-H-24h	390±43.5 ^a	1080±82.9 ^b	22.7±8.2 ^c	272.4±53.2 ^f	77.5±32.6 ^c	64.2±15.6 ^c

a, b, c, d, e, f les valeurs avec des indices différant significativement P ≤ 0.05

Figure 1

Nombre de cellules mortes/mm² dans les différents lots de conservation pour les embryons âgés de 7 et 8 jours.

