



**HAL**  
open science

# Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine : Application à la gestion des ressources génétiques.

Pascal Salvetti

► **To cite this version:**

Pascal Salvetti. Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine : Application à la gestion des ressources génétiques.. Biologie de la reproduction. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT : . tel-00363418

**HAL Id: tel-00363418**

**<https://theses.hal.science/tel-00363418>**

Submitted on 23 Feb 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# **THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON**

*Délivrée par*

**L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1**

**ECOLE DOCTORALE INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES - SANTE**

**DIPLOME DE DOCTORAT**

*(Arrêté du 7 août 2006)*

*Présentée et soutenue publiquement le 9 décembre 2008*

*par*

**Pascal SALVETTI**

## **Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine : Application à la gestion des ressources génétiques**

Composition du Jury :

M. Jean-François GUÉRIN, Président  
M. Gérard BOLET, Rapporteur  
M. Yves Ménézo, Rapporteur  
M. José Salvador VICENTE ANTÓN, Rapporteur  
Mme Michèle THEAU-CLEMENT, Examinatrice  
M. Pierre GUÉRIN, Directeur de Thèse  
Mme Marielle AFANASSIEFF, Co-encadrante de Thèse  
M. Thierry JOLY, Co-encadrant de Thèse

*Université de Lyon, Unité Cryobiologie ENVL/ISARA-Lyon,  
« Cryoconservation des ressources génétiques par la voie femelle »  
Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon / 1, Avenue Bourgelat / 69280 Marcy L'Etoile*

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie  
Universitaire

Secrétaire Général

**M. le Professeur L. COLLET**

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

## **SECTEUR SANTE**

### **Composantes**

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

## **SECTEUR SCIENCES**

### **Composantes**

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur G. CLERC

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

*Ce travail a été réalisé grâce au soutien financier de l'ISARA-Lyon et de l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) par l'intermédiaire du département PHASE (Physiologie Animale & Systèmes d'Elevage).*



# Remerciements

La réalisation d'une thèse est un travail de longue haleine qui constitue une formidable expérience scientifique mais surtout une véritable aventure humaine. Bien que délicate, l'écriture des remerciements est un élément indispensable pour témoigner ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué directement ou indirectement à ce travail.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes sincères remerciements aux membres du jury et tout particulièrement à Monsieur Jean-François Guérin pour m'avoir fait l'honneur d'en assurer la présidence.

Je veux aussi assurer à Monsieur Gérard Bolet, Monsieur Yves Ménézo et de Monsieur José Salvador Vicente Antón ma profonde reconnaissance pour avoir accepté de rapporter sur ce travail de thèse et pour m'avoir fait bénéficier de votre expertise.

Enfin, je veux exprimer toute ma gratitude à Madame Michelle Theau-Clément dont la présence au sein du jury est un immense honneur.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à Pierre Guérin pour avoir accepté d'encadrer ce travail de thèse, pour vos précieux conseils et votre appui scientifique tout au long de ces 3 années. Merci pour votre confiance et votre disponibilité qui m'ont permis de mener à bien ce travail.

J'exprime aussi ma profonde reconnaissance à Marielle Afanassieff pour le co-encadrement de cette thèse et pour son expertise dans les cultures cellulaires. Merci Marielle pour tous les moments que l'on a pu partager.

Pour le dernier membre du jury, je ne peux pas m'en tenir aux remerciements purement académiques et s'il y a une personne que je veux absolument remercier, c'est bien Thierry Joly que je connais depuis maintenant plus de 7 ans. Que dire... un bonhomme grand par la taille, grand par le poids mais aussi grand par le cœur ! Car si j'en suis là aujourd'hui, tu y as largement contribué... un grand et sincère merci pour tout ce que tu m'as appris et pour cette tranche de vie qu'on a pu partager au cours de nos nombreux déplacements...

Je veux aussi adresser mes remerciements à tous mes collègues de travail qui ont participé de près ou de loin à ces travaux :

- Merci à mes collègues de l'INRA de Jouy en Josas pour votre aide et votre accueil chaleureux. Merci tout particulièrement à Jean-Paul Renard et son équipe de la BDR dont Nathalie

Daniel, d'une gentillesse inouïe, sans qui une partie de ce travail n'aurait pu être réalisé... Je n'ose pas imaginer le nombre de cannelés que je te dois de préparer pour t'en remercier !!

- Merci à mes collègues de l'INRA de Toulouse dont Daniel Allain avec qui la collaboration est toujours fructueuse et amicale et surtout Michèle Theau-Clément ! Un grand merci Michèle pour ta rigueur scientifique, tes conseils précieux ainsi que pour tes qualités humaines incontestables et incontestées ! Je veux aussi exprimer ma profonde et sincère gratitude à tout le personnel d'élevage de la SELAP et de la SAGA pour leur contribution à ce travail.
- Merci à mes collègues de l'INRA du Magneraud pour la qualité de leur accueil et leur sympathie. Je pense en particulier à Gérard Auvinet à qui j'exprime ma sincère amitié.... C'est sûr, on reviendra !
- Merci à mes collègues de Grimaud Frères Sélection SAS dont la collaboration a dépassé le niveau purement scientifique pour se baser sur une relation amicale et de confiance. Ahhh, les heures passées dans l'algeco sans fenêtre, les boîtes de biscuits Delacre et le sourire de la patronne de la Gatine.... Je vous dois une « fière chandelle » et je tiens à vous exprimer ici ma reconnaissance la plus sincère. Merci donc à Jean-Jacques D., Pascal, Allain, Lucie et bien sûr Jacques H. pour l'aide et la confiance que vous m'avez accordées.
- Merci à mes collègues et amis de l'unité INRA/INSERM U846 pour leur aide lors des cultures *in vitro* d'embryons et pour la microscopie confocale. J'ai passé de très bons moments à vos côtés et j'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble. Merci donc à Louis Jan, Véronique, Guillaume, Irène et bien évidemment l'équipe « cellules souches lapin » dont Murielle, Emeline, Suzy, Pierre et bien sûr Marielle.
- Merci à mes collègues de l'UNCEIA de Châteauvillain et tout particulièrement à Catherine G.-J. pour son appui technique lors des essais de fécondation *in vitro* et pour nous avoir supportés dans nos études les plus folles.
- ¡Muchas gracias a mis colegas y amigos del centro de Tecnología Animal de Segorbe (España) y del Instituto Politécnico de Valencia para vuestra acogida calurosa! Una dedicatoria especial para Carmela. A través de esta colaboración, he encontrado una persona formidable y sobre todo una amiga de verdad... ¡Muchas gracias para tu alegría y tu amabilidad!

Il y a aussi mes collègues et amis de l'ISARA que je voudrais remercier et grâce à qui la thèse a été un peu moins difficile. Je ne peux pas tous les citer car ils sont trop nombreux alors un grand merci à tout ceux des bâtiments A, B & C et notamment à mes collègues de zootechnie et d'agronomie ! Mention spéciale pour les thésards qui viennent de débiter ou sur le point de finir (Annabelle V., David P., Florent A., Gaël G., Marion D.) et à qui je souhaite beaucoup de courage, pour mes coéquipiers de baby-foot pour les parties postprandiales endiablées (Florian C., Thomas L.,

Arnaud A., Mathieu G., Benoît S., Jean-Michel V.) et à Marie A. pour sa gentillesse et nos grandes discussions ! Bien sûr il y aussi et surtout mes deux colocataires de bureau, embarqués dans la même galère : Jeff et Cécile. J'ai beaucoup apprécié partager mon bureau avec vous ; on est arrivé à se supporter et on s'est aussi bien marré ! Bon courage pour la dernière ligne droite et bonne suite à vous deux mais je vous fais confiance, vous êtes les meilleurs !

Outre Pierre et Thierry, c'est toute l'unité Cryobio que je veux remercier ici : Anne-Cécile, Brigitte, Nadine, Samuel et particulièrement Vanessa. Merci pour votre aide et votre soutien. Ce fut un véritable plaisir de vous rencontrer et de travailler avec vous, toujours dans la bonne humeur. Il me reste beaucoup de petites anecdotes en tête... que de très bons souvenirs ! Plus largement, merci aux membres de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon et de l'Institut Claude Bourgelat que j'ai eu l'occasion de connaître.

Merci aussi à tous les étudiants que j'ai pu côtoyer au cours de ces 3 années autour d'un cours, d'un café ou encore lors de déplacements aux quatre coins de la France... Spéciale dédicace à :

- Sébastien R. pour les bons moments passés ensemble en cohésion d'équipe chez Thierry ou encore pour m'avoir accompagné à l'INRA de Toulouse quand il a fallu transporter la bonbonne d'azote liquide et autres lapins... Quel périple ! Bon vent pour la suite !
- Emma S. pour les quelques mois passés à nos côtés, toujours souriante et agréable... Ce fût un réel plaisir de partager ces instants.... même le repas indien plutôt épicé de Toulouse !
- Sophie V. avec qui le courant est tout de suite bien passé ! Que des bons souvenirs communs... Le jambon sauce mère « indigeste » restera dans les annales, ton déménagement aussi... Que tous tes projets d'avenir se réalisent !

Je voudrais aussi citer deux personnes extraordinaires que j'ai eu le plaisir de rencontrer dans le cadre de nos études. Un grand merci à Denise et Gilbert pour la mise à disposition de leur garage, leur aide et surtout leur générosité !

Je voudrais aussi exprimer ma plus profonde amitié à l'ensemble de mes amis d'ici et d'ailleurs dont Nono, Frédo & Laure, Mumu & Sylv, Loulou, Lorenz, the Pradier's family, gwennounette, soeurette, Raph, Oliv, Aurore, Karen, AL, Clo... pour ne citer qu'eux ! Merci pour tous ces instants partagés !

Comme on dit souvent, on garde le meilleur pour la fin et ces remerciements ne seraient pas complets sans remercier ma famille. Je tiens à rendre hommage tout particulièrement à mes parents pour tout ce qu'ils m'ont donné et appris et pour leur dévouement hors normes ainsi que mon frère et toute sa petite famille pour les bons moments que l'on continue de partager. Enfin, rien n'aurait été pareil sans l'amour que me témoigne ma moitié depuis maintenant plus de 5 ans ! Kirie, je sais que je te dois beaucoup alors un grand merci pour avoir su supporter mes absences prolongées, mes horaires décalés ou encore l'envahissement du frigo par diverses substances expérimentales ! Après ça, je pense qu'on est prêt à affronter pas mal de choses alors en route pour l'avenir !



# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>4</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>8</b>
<b>INDEX DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>14</b>
<b>1<sup>ERE</sup> PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>22</b>
I. LA REPRODUCTION CHEZ LA LAPINE .....	23
<i>I.1. Physiologie de la reproduction chez la lapine : de la formation des gamètes au sevrage des lapereaux.....</i>	<i>23</i>
I.1.1. Croissance folliculaire et ovogenèse .....	23
I.1.1.1. Mise en place de la réserve folliculaire et de l'activité ovarienne chez la lapine prépubère.....	24
I.1.1.2. Dynamique de la croissance folliculaire chez la lapine pubère.....	27
I.1.2. Cycles œstraux irréguliers et indéfinis chez la lapine.....	31
I.1.3. Pseudogestation.....	34
I.1.4. Ovulation.....	35
I.1.5. Fécondation et développement embryonnaire précoce .....	37
I.1.6. Implantation et développement fœtal.....	39
I.1.7. Mise bas et allaitement des lapereaux .....	40
<i>I.2. Maîtrise de la reproduction chez la lapine .....</i>	<i>42</i>
I.2.1. Stimulations de l'œstrus chez la lapine.....	42
I.2.2. Méthodes d'induction de l'ovulation :.....	43
I.2.3. Les techniques de superovulation.....	44
I.2.4. Les différentes techniques de collecte d'ovocytes et d'embryons .....	49
I.2.5. Les différentes techniques de transfert d'ovocytes et d'embryons.....	52
II. CRYOCONSERVATION DES RESSOURCES GENETIQUES ANIMALES.....	55
<i>II.1. Principales voies de cryoconservation des ressources génétiques .....</i>	<i>56</i>
II.1.1. La voie mâle : semence et tissu testiculaire .....	56
II.1.2. La voie femelle : ovocytes et tissu ovarien.....	58
II.1.3. La voie du clonage : fibroblastes et cellules souches embryonnaires.....	59
<i>II.2. La cryoconservation de l'ovocyte MII : avantages et inconvénients .....</i>	<i>59</i>
II.2.1. Cryoconservation des ovocytes isolés ou des embryons ?.....	60
II.2.2. Cryoconservation des ovocytes isolés ou du tissu ovarien ?.....	62
II.2.3. Cryoconservation des ovocytes au stade VG ou MII ? .....	63
<i>II.3. La cryoconservation de l'ovocyte MII chez le lapin : état des lieux et perspectives .....</i>	<i>65</i>
II.3.1. Etat des lieux sur la cryoconservation de l'ovocyte MII de lapin .....	66
II.3.2. Cryoconservation de l'ovocyte MII de lapin : quels défis ? .....	67
II.3.2.1. Production et collecte .....	67
II.3.2.2. Cryoconservation .....	68
II.3.2.3. Utilisation des ovocytes .....	71
II.3.3. Evaluation de l'ovocyte MII de lapin après cryoconservation.....	72
II.3.3.1. Evaluation structurale .....	73
II.3.3.2. Evaluation métabolique .....	74
II.3.3.3. Evaluation de la capacité de développement .....	75

<b>2<sup>EME</sup> PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE</b> .....	<b>79</b>
I. ESSAIS D'OPTIMISATION DES CONDITIONS DE PRODUCTION DES EMBRYONS .....	80
I.1. <i>Essais relatifs à la nature du traitement de superovulation</i> .....	80
I.1.1. Effet de l'absence ou de la présence de LH exogène dans les traitements de superovulation .....	80
I.1.1.1. Objectif.....	80
I.1.1.2. Matériel et méthodes .....	80
I.1.1.3. Résultats.....	85
I.1.1.4. Discussion et conclusion .....	90
I.1.2. Diminution du nombre d'injections de gonadotropines.....	92
I.1.2.1. Objectif.....	92
I.1.2.2. Matériel et méthodes .....	93
I.1.2.3. Résultats.....	95
I.1.2.4. Discussion et conclusion .....	96
I.2. <i>Essais relatifs à l'activité ovarienne</i> .....	100
I.2.1. Evaluation de l'efficacité d'un traitement de synchronisation des vagues folliculaires .....	100
I.2.1.1. Objectif.....	100
I.2.1.2. Matériel et méthodes .....	100
I.2.1.3. Résultats.....	102
I.2.1.4. Discussion et conclusion .....	104
I.2.2. Effet du moment de l'IA par rapport au sevrage sur la quantité et la qualité des embryons produits.....	106
I.2.2.1. Objectif.....	106
I.2.2.2. Matériel et méthodes .....	106
I.2.2.3. Résultats.....	108
I.2.2.4. Discussion et conclusion .....	110
I.3. <i>Méthodes de collecte et de transfert par endoscopie</i> .....	111
I.3.1. Objectif.....	111
I.3.2. Matériel et méthodes .....	112
I.3.3. Résultats.....	112
I.3.3.1. Coûts de collecte et de transfert par coelioscopie .....	112
I.3.3.2. Efficacité du transfert d'embryons sous coelioscopie .....	114
I.3.4. Conclusion et stratégies d'utilisation .....	114
II. DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE DE CRYOCONSERVATION DES OVOCYTES MII DE LAPIN .....	115
II.1. <i>Dosage de l'ATP ovocytaire : essais préliminaires</i> .....	115
II.1.1. Objectif .....	115
II.1.2. Matériel et méthodes.....	116
II.1.2.1. Essai 1 : Quantité d'ATP intraovocytaire après différentes durées d'incubation des ovocytes frais sur platine chauffante à 37°C .....	118
II.1.2.2. Essai 2 : Quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais et après 2 h de stockage à différentes températures .....	118
II.1.2.3. Essai 3 : Détermination de la durée d'incubation optimale à 38°C et sous 5 % CO <sub>2</sub> pour la reprise du métabolisme des ovocytes frais, vitrifiés et congelés .....	119
II.1.3. Résultats .....	120
II.1.4. Discussion et conclusions .....	123
II.2. <i>Comparaison de deux méthodes de cryoconservation des ovocytes MII de lapin : congélation lente et vitrification</i> .....	124
II.2.1. Effet de la congélation lente et de la vitrification sur la quantité d'ATP intraovocytaire et les taux de développement après activation parthénogénétique .....	124
II.2.1.1. Objectif.....	124
II.2.1.2. Matériel et méthodes .....	124
II.2.1.3. Résultats.....	127
II.2.1.4. Discussion et conclusion .....	130
II.2.2. Effet de la congélation lente et de la vitrification sur la configuration du réseau de filaments d'actine et du fuseau méiotique .....	133
II.2.2.1. Objectif.....	133
II.2.2.2. Matériel et méthodes .....	133

---

II.2.2.3. Résultats.....	135
II.2.2.4. Discussion et conclusion .....	138
<b>CONCLUSIONS - PERSPECTIVES .....</b>	<b>141</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>145</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>169</b>
ANNEXE 1. ETATS DES COLLECTIONS DE LA CRYOBANQUE NATIONALE CUNICOLE AU 1 <sup>ER</sup> MAI 2008 ET IMPORTANCE DES DIFFERENTS TYPES DE POPULATIONS CRYOCONSERVEES.....	170
ANNEXE 2. TABLEAU COMPARATIF DES DIFFERENTES METHODES DE CRYOCONSERVATION DE L'OVOCYTE MII DE LAPIN .....	172
ANNEXE 3. DETAILS DES CALCULS DES COUTS DE PRODUCTION ET DE TRANSFERT D'EMBRYONS SELON DIFFERENTES TECHNIQUES .....	174
<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>176</b>
<b>LISTE DES PUBLICATIONS.....</b>	<b>179</b>

## Index des symboles et abréviations

6, DMAP	6, Diméthylaminopurine
AC	Anticorps
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFP	Anti Freeze Protein
AMP	Assistance Médicale à la Procréation
ARN	Acide Ribonucléique
ASCEDIATE	Association pour le Contrôle Sanitaire, l'Etude et le Développement de l'Insémination Artificielle et du Transfert Embryonnaire
BRG	Bureau des Ressources Génétiques
BSA	Bovine Sérum Albumin
CIV	Culture <i>In Vitro</i>
CJ	Corps Jaunes
COL	Œufs collectés
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EBQ	Embryon de Bonne Qualité
eCG	equine Chorionic Gonadotropin
EG	Ethylène Glycol
EMQ	Embryon de Mauvaise Qualité
FAO	Food and Agriculture Organization
FFC	Fédération Française de Cuniculture
FH	Follicules Hémorragiques
FIV	Fécondation <i>In Vitro</i>
FP	Follicules Préovulatoires
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GDO	Gènes Diffusion Optimal
GIFT	Gametes Intrafallopian Transfer
GLM	General Linear Model
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
hCG	human Chorionic Gonadotropin
Hg	Mercure
hMG	human Menopausal Gonadotropin

---

IA	Insémination Artificielle
i.m.	Intra musculaire
i.v.	Intra veineux
ICSI	Intracytoplasmic Sperm Injection
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IUCN	International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources
LH	Luteinising Hormone
LHRH	Luteinising Hormone Releasing Hormone
LN2	Azote liquide
LNCR	Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs
MII	Métaphase II
MAP-kinase	Mitogen Activated Protein kinase
MB	Milieu de base
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
MPF	M phase Promoting Factor
OPS	Open Pulled Straw
PBS	Phosphate Buffered Saline
<i>p.c.</i>	<i>Post coïtum</i>
pFSH	porcine Follicle Stimulating Hormone
PG	Propylène Glycol
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandine F <sub>2α</sub>
pLH	porcine Luteinising Hormone
PM	Poids Moléculaire
PN	Pronoyaux
PROH	1,2-propanediol
<i>p.p.</i>	<i>Post partum</i>
p.p.i.	Pour preparation injectable
PVP	Polyvinylpyrrolidone
OV	Ovocyte
RLU	Relative Light Unit
s.c.	Sous cutané
SE	Standard Error
Tamb	Température ambiante
TC	Taux de collecte
TE	Taux d'élimination

---

TEC	Taux d'embryons collectés
TV	Taux de viabilité
UI	Unité Internationale
UMOTEST	Union Montbéliarde de testage
VG	Vésicule Germinative
Xmes	Chromosomes

# INTRODUCTION

Le lapin *Oryctolagus cuniculus* est le seul mammifère domestiqué dont l'origine se situe en Europe de l'Ouest, en Espagne, où des fossiles datant de 6 millions d'années ont été retrouvés. Les premiers écrits mentionnant l'élevage de lapins sont ceux de Varon (116-127 avant J.C.) sans pour autant que l'on puisse parler de domestication puisque les lapins étaient alors conservés dans des parcs à gibiers murés appelés « *leporaria* ». A cette époque, les Romains avaient l'habitude de consommer des fœtus de lapereaux qu'ils appelaient « laurices », coutume entretenue au moyen âge par les moines qui initièrent l'élevage des lapins en clapiers (Sandford, 1992). Dès lors, l'espèce s'est répandue dans le monde entier et s'est étoffée de nombreuses races qui en font aujourd'hui une des espèces animales domestiques présentant une des plus grandes diversités notamment au niveau de ses utilisations. Actuellement, même si le lapin peut être trouvé à l'état sauvage (lapin de garenne), celui-ci est de plus en plus « plébiscité » en tant qu'animal de compagnie mais est aussi largement utilisé comme animal d'élevage (chair, fourrure), comme animal modèle pour la recherche médicale ou plus récemment comme bioréacteur pour la production de protéines thérapeutiques.

Proche du berceau d'apparition de l'espèce lapin, la France a logiquement su développer l'élevage cunicole pour arriver en 3<sup>ème</sup> position au niveau européen derrière l'Italie et l'Espagne en ce qui concerne la production de viande (respectivement 51 700, 230 000 et 99 000 tonnes de carcasses/an) (FAO, 2007). Le développement de l'insémination artificielle et de la conduite en bandes dans les élevages ont permis de rationaliser le travail, de réduire les risques sanitaires liés aux saillies naturelles et d'augmenter la taille des exploitations. Actuellement, l'élevage moyen en France comprend près de 500 lapines reproductrices qui sont inséminées tous les 42 jours aboutissant à la production de 65 lapins vendus par lapine et par an. Bien que l'objectif de production principal des élevages cunicoles soit la production de viande, certains ateliers produisent de la fourrure destinée en grande partie à l'industrie textile. Cette valorisation est plus importante que la production de fourrure de vison (25 à 35 millions de peaux par an) et atteint, en France, 70 millions de peaux par an issues de génotypes particuliers tels que les lapins Orylag® Rex (Lebas *et al.*, 1997). De plus, les récentes avancées réalisées en matière de manipulation du génome ont permis de créer des lapins génétiquement modifiés produisant dans leur lait des protéines d'intérêts (Bosze *et al.*, 2003; Bosze et Houdebine, 2006). Les caractéristiques physiologiques et zootechniques de la lapine la rendent particulièrement bien adaptée à ce type d'applications ce qui lui ouvre de grandes perspectives d'utilisation dans le domaine médical en lien direct avec les industries pharmaceutiques.

La conservation des ressources génétiques chez cette espèce comprend donc la conservation d'une diversité expérimentale mais aussi d'une diversité zootechnique avec une large dimension patrimoniale. La sauvegarde de cette diversité génétique passe par la gestion *in situ* des différentes populations de lapins notamment grâce aux sélectionneurs professionnels ou amateurs. De manière complémentaire, la gestion *ex situ* consiste essentiellement au développement des techniques de cryoconservation permettant de préserver à long terme les potentialités de reproduction d'une population ou d'un individu. Si aujourd'hui la nécessité de préserver les ressources génétiques ne fait plus de doutes, il n'en a pas toujours été ainsi et ce n'est qu'en 1968 lors de la première conférence des Nations Unies sur la biosphère à Paris que l'on a évoqué, pour la première fois, l'importance de préserver la diversité génétique. La prise de conscience de l'importance des ressources génétiques et de la nécessité de les conserver s'est traduite en France par la mise en place de programmes d'actions consécutifs à la ratification de la Convention sur la Diversité Biologique à Rio (1992). Ainsi, le Bureau des Ressources Génétiques (BRG, créé en 1982 et regroupé depuis le 26 février 2008 avec l'Institut Français de la biodiversité au sein de la Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité) a vu ses moyens renforcés ce qui s'est traduit par la rédaction de la Charte Nationale pour la gestion des ressources génétiques (BRG, 1999) mais aussi par la création de la Cryobanque Nationale. Sous l'impulsion du Ministère chargé de l'Agriculture, la Commission Nationale d'Amélioration Génétique a mis en place ce groupement d'intérêt scientifique en 1999 avec pour mission principale d'assurer la préservation à long terme des ressources génétiques animales françaises. L'établissement de cette cryobanque a nécessité l'engagement de onze partenaires impliqués dans la gestion des schémas d'amélioration des principales espèces domestiques françaises. L'objectif visé est de gérer de manière dynamique les ressources génétiques de neuf espèces d'animaux d'élevage en conservant dans les collections nationales un échantillon représentatif de leur diversité génétique à très basses températures. Les espèces concernées par ces actions de sauvegarde comprennent actuellement les bovins, caprins, ovins, asins, équins, porcins ainsi que les espèces cunicoles, avicoles et aquacoles. Les échantillons biologiques cryoconservés sont stockés en deux exemplaires, l'un sur le site de stockage primaire situé au LNCR (Laboratoire National de Contrôle des Reproducteurs)/ASCEDIATE (Association pour le Contrôle Sanitaire, l'Etude et le Développement de l'Insémination Artificielle et du Transfert Embryonnaire) à Maisons-Alfort et l'autre réparti sur un ou plusieurs sites secondaires selon les espèces concernées (tableau 1). Cette stratégie permet d'apporter une sécurité supplémentaire pour la conservation des collections nationales.



Tableau 1. Localisation des sites de stockage secondaires pour les espèces domestiques impliquées dans la Cryobanque Nationale

Espèces	Site(s) de stockage secondaire(s)
Asine et Equine	Haras National des Bréviaires
Bovine	AMELIS, GDO, CREVIA, UMOTEST
Caprine	Capri-IA
Cunicole	Etablissement Français du Sang de Tours
Avicole	Etablissement Français du Sang de Tours
Aquacole	URCEO de Saint Aubin du Cormier (mise en service en 2009)
Ovine et Porcine	INRA de Rouillé

Source : Cryobanque Nationale, communication personnelle

Dès sa mise en place, la Cryobanque Nationale n'accueillait des échantillons biologiques que pour quelques espèces (bovins, équins, caprins, ovins, porcins) car chaque filière n'avait pas eu le temps d'organiser des actions de cryoconservation ou ne bénéficiait pas encore de méthodes de cryoconservation efficaces. L'ouverture officielle des collections nationales à l'espèce lapin s'est déroulée lors des 10<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole à Paris en novembre 2003 après un important travail de cryoconservation de Joly *et al.* (2003). De la même manière, la Cryobanque Nationale compte aujourd'hui dans ses collections patrimoniales des échantillons biologiques asins et avicoles. En novembre 2006, la Cryobanque Nationale comptait près de 130 000 doses issues de plus de 1 400 animaux dans 73 races différentes et déposées par 26 organismes différents. L'état des Collections Nationales stockées au sein de la Cryobanque est consultable sur internet (<http://www.cryobanque.org/>).

Si la cryoconservation des ressources génétiques cunicoles revêt un caractère moins urgent que pour d'autres espèces sauvages inscrites sur la liste rouge de l'IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources), elle n'en reste pas moins importante. Depuis la rationalisation du travail dans les élevages de lapins, les schémas de sélection établis par les sélectionneurs ont permis de développer et diffuser des souches hybrides issues du croisement de deux souches (Néo-Zélandaise & Californienne). Actuellement, cela se traduit par la perte progressive des races patrimoniales élevées auparavant en clapiers familiaux pour une consommation personnelle. Un programme européen mis en place en 1996 et coordonné par l'INRA (RESGEN) a permis d'évaluer la diversité génétique et les caractéristiques zootechniques de ces races patrimoniales pour aboutir à la création d'une banque de données européenne (Bolet *et al.*, 2000). Désormais, l'objectif de la cryoconservation ne se limite pas à cette dimension patrimoniale de

préservation de races. On peut distinguer trois grands types de matériel biologique en fonction des objectifs recherchés et de l'originalité génétique de l'échantillon cryoconservé :

Le matériel de « **type I** » représente les populations d'animaux domestiques menacées regroupant en général des races rustiques, non utilisées dans les schémas de sélection actuels et qui possèdent un fort ancrage culturel et patrimonial. Chez le lapin, le « type I » regroupe la majeure partie des races identifiées dans le Standard Officiel par la Fédération Française de Cuniculture (Fédération Française de Cuniculture, 2000). On y trouve à la fois des populations à grands effectifs (Fauve de Bourgogne, Papillon...) et des populations menacées de disparition (Brun Marron de Lorraine, Lièvre Belge...) qui sont entretenues grâce au travail d'éleveurs amateurs appartenant ou non à des clubs de races (figure 1). Pour ces populations, l'objectif de la cryoconservation est principalement de pérenniser la race sur le long terme tout en assurant aux éleveurs la possibilité de reproduire leurs animaux en race pure et de limiter la consanguinité. La diminution du nombre d'éleveurs amateurs et d'élevages familiaux accentue l'importance des actions de conservation des populations de cette catégorie.

Le matériel de « **type II** » regroupe les animaux originaux par un ou plusieurs caractères et issus de populations sélectionnées mais dont les reproducteurs ne sont pas diffusés par les schémas de sélection établis. Le caractère original de ces animaux peut résider dans des performances zootechniques extrêmes (fertilité, prolificité, aspect de la fourrure...), une généalogie remarquable ou encore une génétique originale par une combinaison de gènes unique. La plupart des populations utilisées comme modèle de recherche comme les animaux transgéniques, rentre dans cette catégorie. A titre d'exemples, on peut citer pour l'espèce cunicole, les lapins « Sauteurs d'Alfort moderne » porteurs du gène  $S^{am}$  issu d'une mutation naturelle et ponctuelle du génome (gène récessif) qui leur confère une locomotion très particulière (figure 1) ! Les populations Albinos Rex et Orylag® noir présentent des fourrures aux caractéristiques inédites qui ne sont pour l'instant pas diffusées par les sélectionneurs (figure 1). Enfin, on peut citer les nombreux modèles transgéniques utilisés dans la recherche biomédicale et par l'industrie pharmaceutique pour la production de protéines thérapeutiques. En plus de garantir à long terme la conservation de ces animaux, la cryoconservation des ressources génétiques de ce type de matériel représente un formidable outil de gestion des populations transgéniques face à la demande de l'industrie pharmaceutique ou des autres populations en réponse aux réorientations des schémas de sélection.

Les populations qui constituent le matériel de « **type III** » regroupent l'ensemble des races retenues par les schémas de sélection avec des reproducteurs à forte valeur commerciale largement diffusés par les sélectionneurs (figure 1). La conservation de ces ressources génétiques représente pour cette catégorie une sécurité importante pour les sélectionneurs face à un risque sanitaire éventuel qui pourrait entraîner l'abattage de cheptels entiers. De plus, la cryoconservation de

Figure 1. Exemples de populations de types I, II et III chez le lapin.



*Brun Marron de Lorrain (Type I)*



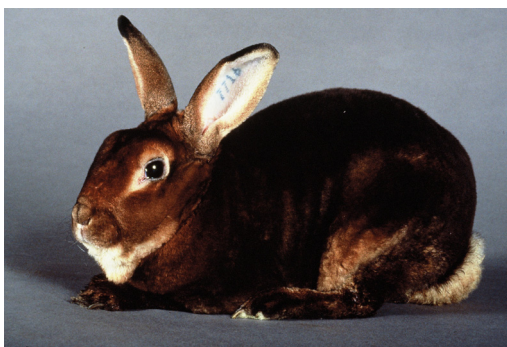
*Fauve de Bourgogne (Type I)*



*Angora (Type II)*



*Lapins Sauteurs d'Alfort (Type II)*



*Orylag® Castor (Type III)*



*INRA 1077 (Type III)*

certaines noyaux de sélection permet aux filières de réagir rapidement face à une réorientation des schémas de sélection ; il devient alors possible de retrouver la population originelle. Aujourd'hui, certaines lignées de lapin sont complètement éteintes et ne subsistent que sous forme d'embryons congelés en attendant une éventuelle perspective de réutilisation (populations Dutch Petit Russe, Chinchilla 1229, INRA 2666...).

Enfin, la cryoconservation garantit, pour l'ensemble des matériels considérés, la sauvegarde d'une image de la diversité génétique d'une population à un instant « t » donné. De cette manière, elle permet de mesurer à partir de critères établis (zootecniques, morphologiques, génétiques, comportementaux...) le progrès génétique réalisé sur une population après plusieurs générations de sélection. La cryoconservation des ressources cunicoles passe essentiellement par la congélation lente de l'embryon au stade morula compactée qui représente une technique sûre et efficace de gestion *ex situ* des ressources génétiques chez cette espèce (Joly *et al.*, 1998). Les résultats obtenus après décongélation et transfert dans des femelles receveuses permettent des taux de survie (nombre de lapereaux nés vivants sur nombre d'embryons transférés) de l'ordre de 50 %. Bien que les coûts de constitution des stocks soient équivalents entre la semence et l'embryon, les coûts de reconstitution d'une population sont très inférieurs à partir d'embryons congelés (Joly et Renard, 1998). De plus, l'utilisation d'embryons congelés permet de recréer la population cryoconservée dès la première génération après transfert dans des femelles receveuses contrairement à la semence congelée qui nécessite 5 ou 6 générations de croisements en retour (Ollivier et Renard, 1995). Enfin, les caractéristiques zootecniques de la lapine (faible intervalle de génération, durée de gestation courte et maturité sexuelle précoce) rendent la congélation de l'embryon particulièrement bien adaptée à la conservation des ressources génétiques chez cette espèce. La Cryobanque Nationale cunicole est actuellement l'une des branches les plus actives en matière d'approvisionnement des collections nationales avec près de 20 000 embryons congelés issus de 56 populations différentes recensées au 1<sup>er</sup> mai 2008 (annexe n°1). On constate alors qu'en 5 années seulement le stock initial d'embryons qui avait été officiellement déposé lors des 10<sup>èmes</sup> Journées de la Recherche Cunicole (9385 embryons issus de 32 populations différentes) a doublé. Cependant, l'approvisionnement des collections nationales s'est fait de manière déséquilibrée entre les différents types de populations de lapins (annexe n°1). En 2003, 15,3 % et 24,1 % des embryons congelés étaient issus de populations respectivement de type I et II, les populations de type III étant majoritaires (60,6 % des embryons congelés). En 2008, ce déséquilibre s'est accentué pour atteindre respectivement 4,8 et 15,7 % des embryons congelés toujours au profit des populations de type III devenues largement majoritaires (79,5 %). Cette évolution s'explique d'un côté par le fait qu'on ne disposait à ce jour d'aucun outil de collecte peu invasif utilisable en conditions de terrain et qu'il devenait paradoxal d'abattre des femelles appartenant à des populations à petit effectif.

Aujourd'hui, si la Cryobanque est devenue une réalité concrète chez le lapin, elle ne constitue pas encore un outil dynamique et efficace de gestion *ex situ* des ressources génétiques lapin.

En effet, la production d'embryons par les femelles donneuses doit être optimisée aussi bien en termes de production proprement dite (quantité, qualité et variabilité), qu'en termes de méthodes de collecte et de transfert. Aujourd'hui, les populations précieuses de types I et II sont sous représentées au sein de la Cryobanque et nécessitent le développement de nouvelles techniques de collecte et de transfert d'embryons qui soient peu invasives et qui permettent la répétition des collectes sur une même femelle sans compromettre sa capacité de reproduction ultérieure. Les techniques coelioscopiques pourraient répondre à cette attente mais, étant encore au stade expérimental, leur efficacité technique et leur coût financier doivent être évalués en conditions de terrain pour définir leur stratégie d'utilisation en fonction du type de population concernée. De plus, la production d'embryons est très variable d'une femelle à l'autre ce qui rend difficile toute estimation du nombre et de la qualité des embryons produits. Cette limite technique représente un obstacle important pour déterminer avec certitude l'effectif de femelles traitées nécessaire à la production de suffisamment d'embryons congelés pour assurer la cryoconservation d'une population. Ce problème est d'autant plus important pour les populations précieuses dans la mesure où l'échantillon génétique choisi n'est pas facilement réajustable par abattage d'autres femelles comme cela pourrait être fait pour une population de type III. La réduction de la variabilité des réponses aux traitements de superovulation passe par l'optimisation des traitements hormonaux (nature du traitement, conditions d'administrations) ainsi que par la définition de protocoles de préparation des lapines donneuses aux traitements de superovulation (statut physiologique, conditions d'environnement).

De plus, la congélation de l'embryon est une méthode éprouvée qui permet de cryoconserver efficacement une population sous réserve d'une gestion maîtrisée de la variabilité génétique et d'un bon échantillonnage préalable des couples de reproducteurs. Cependant, cette méthode présente des limites, particulièrement lors de situations d'urgence (mort d'un animal précieux) ou lorsque l'accouplement préalable des reproducteurs n'est pas envisageable (animaux sauvages). Ainsi, il paraît important de développer de nouvelles techniques de cryoconservation notamment au travers de l'utilisation de tissus reproducteurs pour les situations d'extrême urgence (tissus ovarien, testiculaire ou somatique) ou encore des gamètes isolés pour la conservation du patrimoine génétique d'un seul individu (semence ou spermatozoïdes épидидymaires, ovocytes immatures au stade VG ou matures au stade MII).

La gestion *ex situ* des Ressources Génétiques du lapin nécessite de s'affranchir de ces obstacles techniques pour faire de la Cryobanque Nationale un outil efficace de gestion génétique des populations. Cependant, la Cryobanque Nationale doit faire face à d'autres obstacles d'ordre génétique et sociologique (Salveti *et al.*, 2008) mais nous nous attacherons dans cette étude uniquement aux difficultés d'ordre technique précédemment citées.

Ainsi, nous réaliserons dans un premier temps une étude bibliographique sur les particularités physiologiques et zootechniques de la lapine avant de présenter les biotechnologies de la reproduction susceptibles d'être utilisées dans les stratégies de cryoconservation de la diversité génétique cunicole. Cette partie sera l'occasion de mettre en évidence les problématiques de notre étude et de déterminer quels sont les obstacles à surmonter pour optimiser la production d'embryons lors des opérations de cryoconservation. Par la suite, après un rapide tour d'horizon des voies de cryoconservation chez cette espèce, nous nous intéresserons à la cryoconservation de l'ovocyte mature ou MII (métaphase de deuxième division méiotique) choisie comme méthode alternative à la congélation de l'embryon. Il s'agira alors de mettre en évidence les principaux intérêts et les limites de la cryoconservation des ovocytes matures.

Dans un second temps, nous présenterons notre travail expérimental dont l'objectif est d'optimiser la cryoconservation des ressources génétiques cunicoles à travers deux axes d'étude :

- **Essais d'optimisation des conditions de production des embryons chez la lapine.** Cette partie comprendra l'étude des traitements de superovulation (nature, mode d'administration), la préparation des lapines donneuses ainsi que la définition des avantages et des limites des techniques coelioscopiques.
- **Développement d'une méthode de cryoconservation des ovocytes MII de lapin.** Cette partie s'attachera au développement d'un outil d'évaluation du métabolisme énergétique ovocytaire puis à la comparaison de deux techniques de cryoconservation (congélation lente contre vitrification).

Par la suite, nous essaierons de dresser le bilan de ce travail et des apports obtenus avant de mettre en évidence les perspectives qui s'ouvrent en matière de cryoconservation de la diversité génétique chez le lapin.

# **1<sup>ère</sup> partie : étude bibliographique**

# **I. La reproduction chez la lapine**

Chez la plupart des mammifères domestiques, les femelles pubères présentent un cycle œstral régulier avec une ovulation dite spontanée qui a lieu à intervalles réguliers au cours des périodes de chaleurs. Il existe cependant d'autres espèces où l'ovulation est induite par des stimuli externes (stress, accouplement...) ; on parle alors d'ovulation réflexe (Fox et Laird, 1970). Parmi eux, la chatte, le furet, la chamelle mais aussi la lapine, espèce polytoque dont l'ovulation est provoquée par l'accouplement (Boussit, 1989). Cette particularité confère à la lapine des spécificités physiologiques qu'il est nécessaire d'étudier pour le développement et l'application des différentes biotechnologies de la reproduction chez cette espèce (Driancourt, 2001).

## **I.1. Physiologie de la reproduction chez la lapine : de la formation des gamètes au sevrage des lapereaux**

### **I.1.1. Croissance folliculaire et ovogénèse**

La croissance folliculaire ou folliculogénèse est un processus continu initié à partir de la réserve de follicules primordiaux jusqu'à l'ovulation ou l'atrésie des follicules en croissance (Peters, 1978). Elle résulte à la fois de la croissance de l'ovocyte, de la multiplication des cellules de la granulosa mais aussi du développement de l'antrum lors des dernières étapes de la folliculogénèse. Lors de la croissance des follicules jusqu'au stade préovulatoire, on assiste en parallèle à l'ovogénèse qui consiste en la croissance et à la maturation des ovocytes qu'ils renferment pour leur conférer leur aptitude à être fécondés et à se développer. Les processus d'ovulation et d'atrésie marquent la fin de l'ovogénèse et de la croissance folliculaire.

Les travaux portant sur l'étude de la folliculogénèse et l'ovogénèse chez la lapine sont peu nombreux et relativement anciens malgré les nouveaux outils dont dispose la recherche comme l'imagerie par ultrasons. Cette technique permet d'observer l'évolution de la population folliculaire de manière non invasive (Hildebrandt *et al.*, 2000) grâce notamment à l'ultrasonographie transrectale, souvent utilisée pour observer les vagues de croissance folliculaire en parallèle à l'étude des profils hormonaux en particulier chez les animaux sauvages (McCorkell *et al.*, 2006; Bronneberg *et al.*, 2007). De telles études n'ont encore jamais été effectuées chez la lapine et semblent difficilement réalisables compte tenu de la petite taille des structures folliculaires. Ainsi, la majeure partie des études menées chez cette espèce se consacre à l'évolution des profils hormonaux et de la croissance folliculaire *post-coïtum* (Hunter et Leglise) ou *post-partum (p.p.)* qui représentent les étapes clés des élevages fonctionnant en rythme de reproduction intensif. Peu de travaux ont porté sur l'étude simultanée du renouvellement folliculaire et des sécrétions hormonales hors

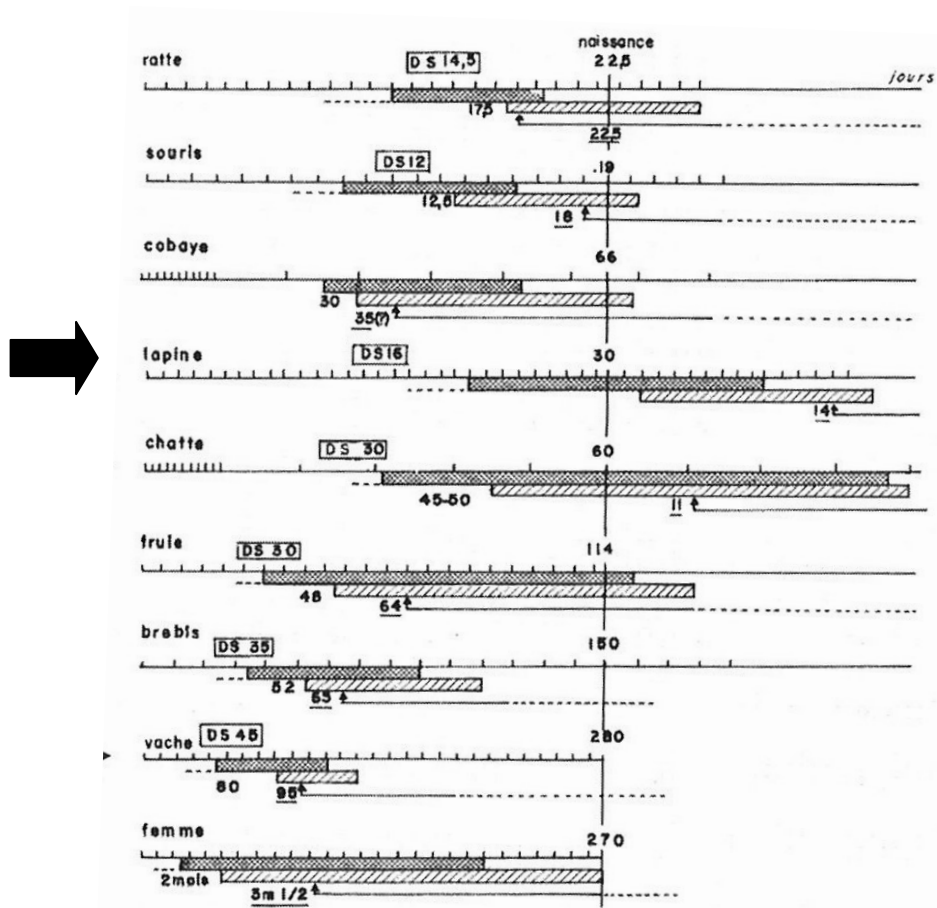


accouplement contrairement à d'autres espèces domestiques (Driancourt *et al.*, 2001). Récemment une étude a été menée sur l'observation échographique de la dynamique folliculaire de lapines pseudogestantes laissant entrevoir d'autres perspectives d'étude (Marongiu et Gulinati, 2008).

#### 1.1.1.1. Mise en place de la réserve folliculaire et de l'activité ovarienne chez la lapine prépubère.

La différenciation sexuelle s'établit, comme chez le mâle, au 16<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire. Contrairement à la plupart des Mammifères (brebis, vache,...) le stock de follicules primordiaux chez la lapine, comme chez la chatte, n'est pas déterminé pendant la vie fœtale mais s'établit pendant la période néonatale, lors des premières semaines qui suivent la naissance (figure 2).

Figure 2. Comparaison du déroulement de l'ovogenèse chez les mammifères



Source : Mauléon (1967)

DS : Différentiation sexuelle

La durée de chaque phase de l'ovogenèse est située par rapport à la durée de la gestation. Le premier chiffre correspond à l'âge du premier stade de prophase. Le chiffre souligné correspond à l'âge d'apparition des premiers diplotènes. Le début de la phase d'intenses dégénérescences des cellules germinales est indiqué par la flèche verticale et sa durée par le trait horizontal.



Période de divisions ovogoniales



Prophase méiotique, depuis l'apparition des leptotènes jusqu'à la disparition des pachytènes

La lapine naît avec des gonades immatures contenant uniquement des ovogonies provenant de la migration en direction des crêtes génitales des cellules germinales primordiales, localisables dès le 9<sup>ème</sup> jour *p.c.* au niveau de l'endoderme. La plupart des cellules germinales sont présentes dans les crêtes génitales dès le 16<sup>ème</sup> jour *p.c.* lors de l'établissement de la différenciation sexuelle. Parallèlement à leur migration qui s'achève au 19<sup>ème</sup> jour *p.c.*, les cellules germinales primordiales se multiplient avec une activité mitotique intense entre le 16<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> jour *p.c.* Au 26<sup>ème</sup> jour *p.c.*, le stock d'ovogonies est maximal et atteint 12 500 (contre 16 000 chez le mâle) pour ensuite diminuer par dégénérescence et arriver à 8 000 (contre 11 000 chez le mâle) quelques jours avant la mise bas (Chretien, 1966). Mauléon (1967) a réalisé une comparaison inter-espèces intéressante sur la constitution du stock de follicules primordiaux incluant les multiplications mitotiques des ovogonies et leur différenciation en ovocytes (entrée en prophase I de méiose). Les résultats concernant la lapine sont issus des travaux de Teplitz et Ohno (1963) et de Peters *et al.* (1965) qui avaient pu mettre en évidence les multiplications par mitoses successives des ovogonies qui débutent dès le 21<sup>ème</sup> jour *p.c.* pour s'arrêter 10 jours après la naissance.

L'entrée en prophase de première division méiotique correspond à la différenciation des ovogonies en ovocytes au stade vésicule germinative (VG). D'après Peters *et al.* (1965), cette étape est observée dès le 1<sup>er</sup> jour après la naissance avec une apparition progressive des différents stades de prophase I : 1<sup>er</sup> leptotènes à 1 jour *post-partum* (*p.p.*), zygotènes à 4 jours *p.p.*, pachytènes à 6 jours *p.p.* et diplotènes (blocage méiotique) à 10 jours *p.p.* . Par la suite, Kennelly *et al.* (1970) ont apporté des précisions sur les durées respectives de chacune des phases de la prophase méiotique et concluaient que la phase leptotène dure 3 à 8 h, zygotène 44 h, pachytène 216 h et la phase diplotène 96 h. Au 14<sup>ème</sup> jour après la naissance, le stock d'ovocytes est défini et plus aucune ovogonie n'est observée sur les coupes histologiques. A ce jour, la taille de la réserve folliculaire est donc déterminée et diminuera progressivement au cours de la vie de l'animal principalement par atrophie (>99,9 % des follicules) ou par évolution en ovocytes au stade MII qui seront ovulés (Rodriguez *et al.*, 1987). La population folliculaire totale peut varier de façon considérable entre

individus d'une même espèce appartenant ou non à des races différentes. Boussit (1989) affirme que la taille de la réserve folliculaire n'est pas limitante pour la vie reproductive d'une lapine, notamment dans le cadre de l'élevage. D'une façon générale, le nombre de follicules en croissance représente toujours une faible proportion de l'effectif folliculaire total qui est d'environ 20 000 chez la ratte et 160 000 chez la brebis (Driancourt *et al.*, 2001).

Au 20<sup>ème</sup> jour *p.p.*, l'ensemble des ovocytes sont bloqués au stade diplotène de la prophase I et sont majoritairement sous la forme de follicules primordiaux (ovocytes au stade VG entourés de quelques cellules aplaties). Les signaux induisant la rentrée en croissance des follicules primordiaux quiescents sont encore mal connus et aboutissent à la formation de follicules primaires présentant une couche de cellules folliculaires périphériques ovoïdes. La croissance folliculaire se poursuit alors progressivement jusqu'à la formation de la cavité antrale ou antrum qui apparaît comme chez la plupart des autres Mammifères (Driancourt *et al.*, 2001) lorsque le follicule a atteint un diamètre approximatif de 200  $\mu\text{m}$  (Hulot et Mariana, 1985). Les premiers follicules secondaires, tertiaires et à antrum apparaissent respectivement à 4, 8 et 12 semaines après la naissance (Foote et Carney, 2000). Ces données confirment les observations de Mariana et Solari (1993) qui n'ont décelé que des follicules secondaires ou tertiaires dans les ovaires de lapines de 30 jours. A ce stade, l'apparition des premiers follicules à antrum ne marque pas l'établissement de la puberté chez la lapine car l'immaturité des structures ovariennes et du système hormonal ne permet pas le développement de ces follicules jusqu'au stade préovulatoire. Les premiers follicules régressent alors par atresie dès lors que leur croissance devient dépendante des hormones gonadotropes. L'âge à la puberté est d'ailleurs difficile à définir puisqu'il n'est pas possible de déterminer un âge au premier œstrus comme chez les autres espèces. Celui-ci est donc déterminé par des critères indirects qui dépendent plus du type de population considéré que des individus eux-mêmes comme :

- La race, avec une plus grande précocité sexuelle chez les races de petit ou moyen format (4 à 6 mois) que chez les races de grand format (5 à 8 mois).
- Le développement corporel, avec une précocité sexuelle plus grande quand la croissance a été rapide. La puberté des lapines est atteinte en général quand elles parviennent à 70-75 % du poids adulte.

Les lapines peuvent cependant montrer un comportement d'œstrus et accepter pour la première fois l'accouplement vers 10-12 semaines mais sans entraîner l'ovulation et donc de fécondation. Ce comportement de réceptivité ne peut donc être utilisé par l'éleveur comme un signe de puberté mais comme un signe précurseur de la maturité sexuelle. Dans les élevages, les femelles sont couramment mises à la reproduction à 120-130 jours quand celles-ci ont atteint 80 % de leur poids adulte.

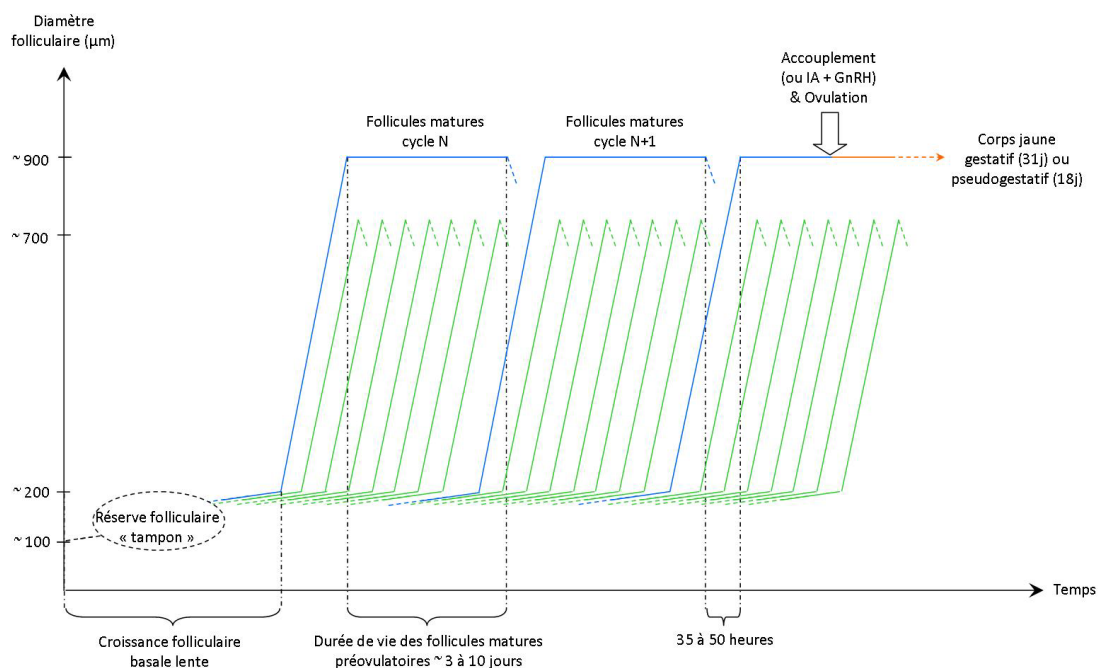
### 1.1.1.2. Dynamique de la croissance folliculaire chez la lapine pubère.

Les données concernant l'établissement de la puberté sont indispensables pour déterminer l'âge de la mise à la reproduction mais l'activité ovarienne des femelles pubères est le point clé pour la maîtrise de la reproduction en élevage. Or, la bibliographie existante nous renseigne peu sur la succession des vagues de croissance folliculaire chez la lapine sexuellement active. La lapine est un animal non cyclé qui produit des follicules matures en continu qui deviennent atrétiques si l'ovulation n'est pas induite par l'accouplement ou une stimulation hormonale. Potentiellement, tous les follicules en croissance peuvent évoluer jusqu'au stade de follicules matures ( $\varnothing > 900 \mu\text{m}$ ) qui seront soit ovulés, soit résorbés par atrésie (un follicule tertiaire est considéré comme atrétique quand 5 % des cellules de la granulosa présentent un noyau pycnotique).

La première estimation de la durée de la croissance folliculaire chez la lapine à été donnée par Desai (1947) à partir d'un modèle de renouvellement des follicules dans l'ovaire de lapine se basant sur des démonstrations mathématiques complexes. Près de 40 ans plus tard, Kranzfelder *et al.* (1984) ont étudié les croissances des follicules tertiaires ( $\varnothing > 250 \mu\text{m}$ ) grâce à l'analyse histologique des ovaires de lapines pubères. Chez la lapine non stimulée, on retrouve une majorité de follicules dont le diamètre est compris entre 250 et 700  $\mu\text{m}$ , seulement quelques follicules de diamètre compris entre 700 et 900  $\mu\text{m}$  et un peu plus de follicules matures de diamètre supérieur à 900  $\mu\text{m}$ . Le nombre de follicules matures est relativement constant entre les individus avec, en permanence, 8 follicules susceptibles d'évoluer jusqu'à l'ovulation. La présence des follicules matures entraîne l'inhibition de la croissance des follicules tertiaires dont le diamètre est inférieur à 900  $\mu\text{m}$  qui évoluent en follicules atrétiques sans dépasser le stade 700 $\mu\text{m}$ . Le mécanisme d'inhibition est encore mal cerné mais il serait probablement lié à la forte sécrétion d'œstrogènes par les follicules matures. Après injection d'hCG (induction artificielle de l'ovulation) et rupture des follicules matures, le mécanisme d'inhibition est alors temporairement levé permettant une forte croissance des follicules de diamètre compris entre 500 et 900  $\mu\text{m}$  jusqu'au stade de follicules matures. Lorsqu'un nombre suffisant de follicules matures est atteint, le mécanisme d'inhibition est alors rétabli et les follicules de diamètre supérieur à 700  $\mu\text{m}$  deviennent atrétiques alors que les follicules matures se rompent pour libérer des ovocytes matures (Kranzfelder *et al.*, 1984). En l'absence de stimulation, les follicules matures présents à la surface de l'ovaire ont une durée de vie de 7 à 10 jours (Hill, 1933) ou de 3 à 6 jours (Smelser *et al.*, 1934) selon les auteurs, avant de régresser par atrésie. La phase de dominance des follicules matures est alors levée comme après l'injection d'hCG et on assiste à une nouvelle vague de croissance folliculaire avec l'apparition de nouveaux follicules préovulatoires dans un intervalle de 35 à 50 h (figure 3).

Mariana *et al.* (1986) ont pu comparer les croissances folliculaires de deux souches de lapines issues du schéma de sélection (Californien et Néo-Zélandais) en suivant, par des études histologiques, l'évolution des follicules primordiaux ( $\varnothing \sim 100 \mu\text{m}$ ) jusqu'au stade préovulatoire ( $\varnothing \sim 800 \mu\text{m}$ ). Cette étude est complémentaire à celle de Kranzfelder *et al.* (1984) qui ne s'intéressait qu'à la description de la croissance folliculaire terminale, écartant la croissance basale des follicules primordiaux.

**Figure 3.** Schématisation de la dynamique des vagues folliculaires chez la lapine



Tracés verts : Ensemble de follicules en croissance qui deviendront atrophiques

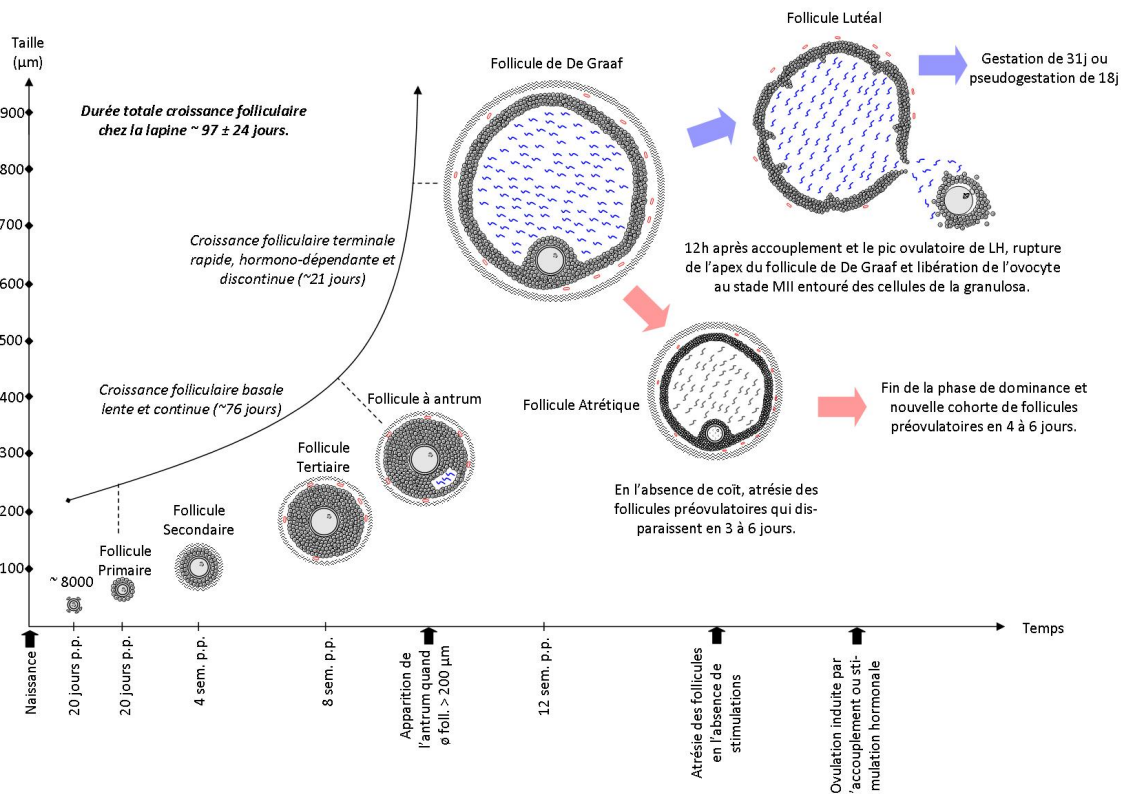
Tracés bleus : Ensemble de follicules en croissance qui évolueront en follicules préovulatoires puis en follicules atrophiques en l'absence d'ovulation ou en corps jaunes après ovulation.

Ainsi, la durée totale de la croissance folliculaire a été estimée à 2 mois pour la race Néo-Zélandaise et à 6 mois pour la race Californienne, la différence étant principalement due à la croissance folliculaire basale particulièrement lente qui précède l'apparition de l'antrum (1,5 mois pour la race Néo-Zélandaise contre 5 mois pour la race Californienne). Par la suite, la même équipe a évalué une nouvelle fois la durée moyenne de la croissance folliculaire ( $100 \mu\text{m}$  à  $> 950 \mu\text{m}$ ) chez des femelles nullipares appartenant aux mêmes souches (Mariana *et al.*, 1989b). Les chiffres présentés dans ces études diffèrent de ceux avancés dans leur première étude et mettent en évidence une durée de croissance folliculaire totale de  $97 \pm 24$  jours, identique pour les deux souches. Ces différences sont surprenantes mais peuvent s'expliquer par la variabilité entre individus et le nombre

de lapines utilisées, plus faible dans la première étude (10 femelles contre 24 dans le deuxième essai). Diaz *et al.* (1987) ont estimé la durée de la phase de croissance folliculaire à 12 jours mais les auteurs ne précisent pas la limite de taille inférieure qui a été prise en compte rendant difficile toute comparaison avec les autres travaux. Concernant la reprise des cycles folliculaires après la mise bas, le 1<sup>er</sup> cycle folliculaire débiterait pendant la phase finale de la gestation (29<sup>ème</sup> ou 30<sup>ème</sup> jour de gestation), parallèlement à la chute des taux de progestérone, avec un maximum 3 à 5 jour *p.p.* (multipares vs. primipares) période durant laquelle les performances de reproduction sont les plus faibles (Theau-Clement, 2007). Le 2<sup>ème</sup> cycle folliculaire atteindrait une croissance maximale au 9<sup>ème</sup> jour post-partum ce qui impliquerait une superposition des cycles pendant une période de 4 à 6 jours. Ces observations suggèrent la présence de vagues folliculaires plus espacées que les travaux précédents mais ces résultats sont probablement à prendre avec précaution.

Cependant, la croissance folliculaire se déroulerait en deux phases avec une première phase où le développement des follicules est lent (les follicules passeraient de 100 à 200  $\mu\text{m}$  en 76 jours) et une deuxième phase au cours de laquelle la croissance s'accélère lorsque les follicules se creusent d'une cavité antrale pour arriver au stade préovulatoire (durée de 21 jours) (figure 4).

**Figure 4.** Schématisation du déroulement de la folliculogénèse chez la lapine



Concernant la croissance folliculaire basale, Mariana *et al.* (1986; 1989b) émettent dans plusieurs de leurs travaux une hypothèse novatrice sur la mise en place de la croissance folliculaire. A partir de leurs observations histologiques, ils arrivent à la conclusion qu'une très faible proportion des follicules primaires (100  $\mu\text{m}$  de diamètre) entre en croissance (peu de mitoses ou de phases de duplication de l'ADN). L'hypothèse émise consiste alors à dire que dès le 30<sup>ème</sup> jour après la naissance, un grand nombre de follicules primaires rentrent en croissance pour constituer un stock « tampon » de follicules dont la taille est comprise entre 100 et 200  $\mu\text{m}$ . Cette entrée en croissance correspond au moment où la FSH commence à être activement sécrétée avant de retomber à son niveau de sécrétion basal (Blanc et Hulot, 1982). Ainsi, c'est par l'intermédiaire de cette réserve tampon que la femelle assurerait son activité ovarienne, la taille de cette réserve diminuant au cours de la vie reproductive de l'animal par atresie ou par formation de follicules préovulatoires de plus de 800  $\mu\text{m}$ . Il existerait toujours un renouvellement de la réserve tampon par l'entrée en croissance des follicules primaires mais ce renouvellement semble faible et décroît au cours de la vie de l'animal. La croissance terminale du follicule est assurée en partie par la multiplication des cellules folliculaires particulièrement active dès la formation de l'antrum (l'index mitotique de 12 à 18 % quand le diamètre du follicule est compris entre 300 et 500  $\mu\text{m}$ ) et par une croissance de l'ovocyte qui atteint 80 % de sa taille maximale (soit  $\sim 100 \mu\text{m}$ ) quand le follicule atteint 400  $\mu\text{m}$  de diamètre. A partir de cet instant, la croissance de l'ovocyte est fortement atténuée et devient négligeable, la multiplication des cellules de la granulosa se poursuit mais diminue (index mitotique de 0 à 6 %) au profit de leur différenciation. La croissance folliculaire est alors principalement assurée par le développement de l'antrum qui atteint 60 à 70 % de la taille totale du follicule (Mariana *et al.*, 1989a).

Ces informations sont cohérentes avec les données de Foote et Carney (2000) sur l'apparition des différentes catégories de follicules pendant la période néonatale mais aussi avec ce qui est connu chez les autres espèces où l'on distingue deux phases dans le développement des follicules. La croissance folliculaire basale qui est indépendante des sécrétions gonadotropes jusqu'à la formation de l'antrum et le développement folliculaire terminal qui est dépendant des gonadotropines dont la FSH qui favorise la multiplication des cellules de la granulosa et donc la croissance du follicule (Kranzfelder *et al.*, 1984; Mariana et Solari, 1993; Driancourt *et al.*, 2001). Dès l'apparition de l'antrum, l'ovocyte qui a fini sa croissance entre dans sa phase de maturation qui lui confère sa capacité de développement. Cette phase de maturation est assez complexe et comprend une maturation cytoplasmique (accumulation des transcrits maternels, migration des granules corticaux,...) puis nucléaire (rupture de la vésicule germinale et reprise de la méiose,...) indispensable à l'ovocyte. L'acquisition de cette aptitude à être fécondé et à se développer est bien loin d'être cernée, notamment chez la lapine, ce qui explique les faibles résultats obtenus après maturation *in vitro* des ovocytes au stade vésicule germinale (VG).

Ainsi, la croissance folliculaire chez la lapine est un processus continu qui présente des vagues de croissance suffisamment rapprochées pour permettre une présence quasi permanente de follicules préovulatoires matures prêts à ovuler. En absence de stimuli (coït ou stimulation hormonale), les follicules préovulatoires se maintiennent de 3 à 10 jours entraînant l'atrésie de tout follicule en croissance atteignant un diamètre de 700  $\mu\text{m}$  (phase de dominance). L'atrésie des follicules matures permet le renouvellement folliculaire en l'espace de 35 à 50 h. Par conséquent, la lapine possède, en théorie, la capacité d'ovuler à tout moment de son cycle de reproduction.

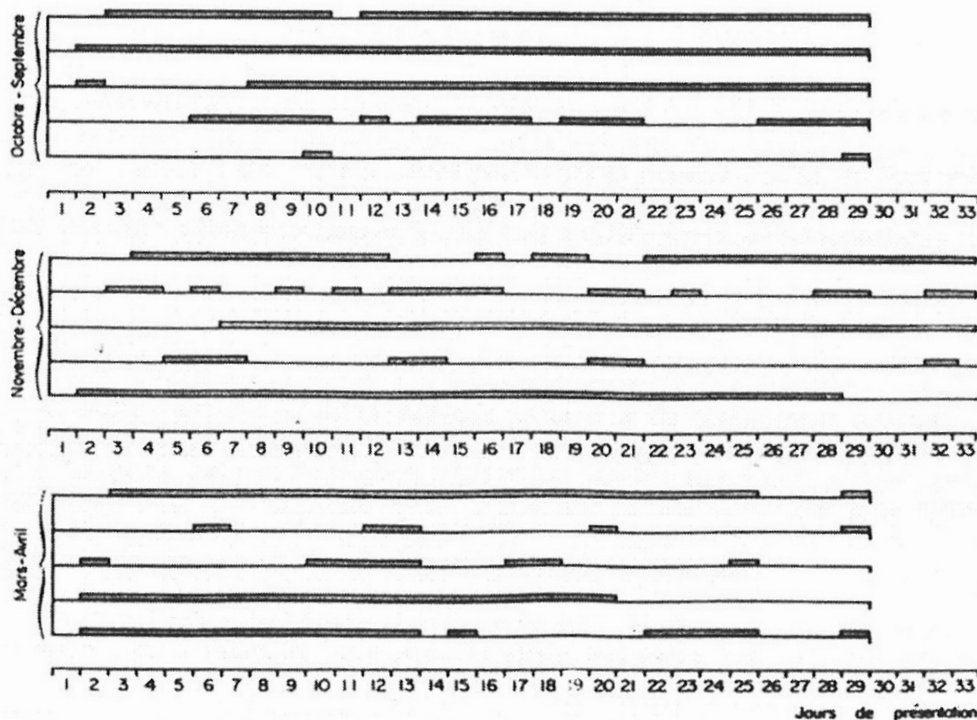
### I.1.2. Cycles œstraux irréguliers et indéfinis chez la lapine

Les performances de reproduction sont directement liées à l'état de réceptivité des lapines lors de l'insémination ou de la saillie naturelle. Une lapine est dite « réceptive » lorsqu'elle manifeste un comportement d'acceptation de l'accouplement en présence d'un mâle caractérisé par l'adoption d'une position de lordose (croupe relevée). Au contraire, si la lapine refuse l'accouplement, elle est dite « non réceptive » (Theau-Clement, 2001). Il a été montré que la fertilité (nombre de lapines mettant bas par rapport au nombre de lapines mises à la reproduction) des lapines réceptives est significativement plus élevée (>75 %) que celle des non réceptives (35 à 55 %) (Theau-Clement et Poujardieu, 1994; Alabiso *et al.*, 1996; Theau-Clement, 1996; Rodriguez de Lara et Fallas, 1999) notamment grâce à un taux d'ovulation plus élevé et une mortalité embryonnaire plus faible (Theau-Clement, 2001). De la même façon, la prolificité est fortement augmentée si la lapine est réceptive au moment de l'insémination artificielle avec un nombre de lapereaux sevrés par insémination artificielle (IA) multiplié par 3,9 et 2,7 respectivement pour les lapines primipares et multipares (Theau-Clement, 2001). Ainsi, il semble particulièrement important d'induire la réceptivité sexuelle des lapines avant saillie ou insémination pour maximiser ses performances de reproduction. Avant chaque insémination, l'état de réceptivité de la femelle peut être déterminé par observation de son comportement en présence d'un mâle mais ce test est difficilement envisageable en unité de production compte tenu de sa lourdeur d'exécution (Theau-Clement, 2001). Plus simplement, il a été montré que l'observation de la couleur et de la turgescence de la vulve peut constituer un bon indicateur de la réceptivité sexuelle (Gosalvez *et al.*, 1985) mais ce critère de jugement est controversé notamment à cause de sa subjectivité qui amène à des différences d'appréciation entre les personnes. Du fait que l'ovulation soit induite par l'accouplement, la lapine a longtemps été considérée comme étant en œstrus de manière plus ou moins permanente (Hammond et Marshall, 1925) comme l'illustrent les propos de Parkes en 1929 : « The ovarian cycle (in the Rabbit) consists in the maturation of Graafian follicles at the beginning of the breeding season and persistence of



mature follicles until copulation takes place or until the breeding season ends ». Par la suite, ces propos ont été démentis par les travaux de Hill (1933) et de Smelser *et al.* (1934) qui ont montré que la durée de vie des follicules matures n'excédait pas 10 jours. Les études menées sur la folliculogénèse mettent en évidence une production continue de follicules préovulatoires à la surface de l'ovaire conférant à la lapine la capacité d'ovuler à tout moment un nombre relativement constant d'ovocytes. Grâce à ces observations et aux connaissances acquises chez les autres espèces domestiques, il est logique de penser que la lapine est en œstrus permanent. Or, plusieurs observations ont mis en évidence une alternance de périodes d'acceptation de l'accouplement caractérisées par l'adoption d'une position de lordose et de périodes où la lapine refuse d'être chevauchée par le mâle. On parle alors de lapines « réceptives » en période d'œstrus ou, au contraire, de lapines « non réceptives » en période de dioœstrus. Myers et Poole (1962) avaient observé une succession de « pics de réceptivité » tous les cinq à six jours marquant l'existence d'un rythme de réceptivité. Cependant, Moret et Baratte (1980) ont montré que les durées de réceptivité sont très variables d'un individu à l'autre et qu'il n'existe aucun rythme défini dans le comportement d'œstrus des lapines. Certaines lapines peuvent être en œstrus effectif pendant 28 jours consécutifs tandis que d'autres ne le sont que 2 jours en 4 semaines (figure 5).

Figure 5. Comportement sexuel et durée d'œstrus chez des lapines nullipares



Source : Moret et Baratte (1980)

Ce schéma présente les périodes (zones grisées) au cours desquelles la lapine est réceptive. L'observation a été réalisée sur 15 lapines présentées au mâle durant 30 jours consécutifs. L'échelle graduée correspond aux jours de présentation au mâle.

Cette étude a été aussi menée sur des lapines gestantes ou nullipares à partir du 5<sup>ème</sup> jour après la saillie et jusqu'à la mise bas et montre que, même en période de gestation, la lapine peut accepter l'accouplement. Ce comportement est même fréquent en deuxième partie de gestation correspondant à la diminution des taux de progestérone circulants (13 % des lapines réceptives de J5 à J9 vs. 80 % de J25 à J30).

Ainsi, on ne sait actuellement pas prévoir les durées respectives des périodes de réceptivité ou de non-réceptivité, ni quels sont les facteurs ambiants ou hormonaux qui les déterminent. Yaschine *et al.* (1967) ont observé qu'une ovariectomie entraînait la suppression du comportement sexuel chez la lapine et que celui-ci pouvait être restauré par l'administration d'œstrogènes (Mac Donald *et al.*, 1970). De son côté, Elsaesser (1980) a observé que la suppression du comportement sexuel pouvait être obtenue par immunisation des femelles contre le 17 $\beta$ -œstradiol. Ces travaux montrent que l'état de réceptivité des lapines est lié au niveau de sécrétion en œstrogènes des cellules de la thèque interne entourant chaque follicule préovulatoire. De plus, Lefèvre et Caillol (1978) ont mis en évidence une relation étroite entre l'apparition du comportement d'œstrus, la croissance folliculaire et l'évolution des concentrations en stéroïdes sexuels dans le liquide folliculaire. Les femelles réceptives avaient un nombre de gros follicules (2,4 vs 0,3 follicules de diamètre > 1,5 mm), des concentrations en œstradiol (79,5 vs 14,5 pg/mg) et œstrone (147,8 vs 18,9 pg/mg) beaucoup plus élevés que les lapines non réceptives. De la même manière, Nicosia *et al.* (1975) ont isolé et classifié les follicules de lapines selon leur taille et ont montré que la concentration en œstradiol et en progestérone augmente dans les follicules en fonction de leur diamètre. Ainsi un follicule primaire dont la taille n'excède pas 200  $\mu$ m renferme  $26,6 \pm 6,6$  pg d'œstradiol et  $24,2 \pm 5,9$  pg de progestérone alors que les follicules tertiaires d'un diamètre supérieur à 700  $\mu$ m contiennent  $77 \pm 33,8$  pg d'œstradiol et  $105,2 \pm 28,5$  pg de progestérone. Même si les concentrations plasmatiques en œstrogènes semblent être trop faibles et trop variables pour être reliées au comportement sexuel (Stoufflet et Caillol, 1988), Rebollar *et al.* (1992) ont observé une corrélation positive entre le niveau de réceptivité des lapines et le taux plasmatique de 17 $\beta$ -œstradiol. Enfin, Kermabon *et al.* (1994) et Yaschine *et al.* (1967) ont confirmé que le niveau de réceptivité des lapines était positivement corrélé à la présence de follicules pré-ovulatoires dont le diamètre est supérieur à 1 mm. Par conséquent, la présence de gros follicules pré-ovulatoires, la sécrétion d'œstrogènes et le comportement d'œstrus des lapines semblent étroitement liés même si

Diaz *et al.* (1987) affirment ne pas pouvoir établir de relation directe entre la croissance folliculaire et le comportement sexuel de la lapine.

Actuellement, le débat reste ouvert mais le fait que des follicules préovulatoires soient produits de manière continue à la surface de l'ovaire alors que l'on observe une grande variabilité dans le comportement d'œstrus signifie que d'autres facteurs viennent interagir entre la sécrétion d'œstradiol et l'expression des chaleurs. De plus, il est possible que la dynamique folliculaire soit variable d'une lapine à l'autre mais aucune étude n'a été malheureusement réalisée sur le long terme pour évaluer les variabilités entre individus d'une même souche. En effet, d'autres facteurs de variation de la folliculogénèse sont à prendre en compte comme le génotype, la parité des femelles, la lactation et le stade de lactation, la saison (Hulot et Mariana, 1985), l'alimentation (Hulot *et al.*, 1982) ou encore le rythme de reproduction de leur mère (Fortun-Lamothe et Mariana, 1998).

### I.1.3. Pseudogestation

Au moment de l'IA, les cas de pseudogestations peuvent atteindre 20 à 30 % des lapines dans les élevages conduits en insémination artificielle (Boiti *et al.*, 2008), situation anormale pour des femelles dont l'ovulation est induite par injection d'un analogue de GnRH 11 jours après la mise bas.

Lorsque les ovules libérés ne sont pas fécondés, il s'installe alors un phénomène de « pseudogestation » d'une durée de 14 à 20 jours pendant laquelle la lapine n'est pas fertile (Perreaud, 1978; Browning *et al.*, 1980). Suite à l'ovulation, le développement des corps jaunes et l'évolution de l'utérus sont les mêmes que pour une gestation, mais n'atteignent pas la taille ni le niveau de production de progestérone des corps jaunes gestatifs. Durant cette période, la progestérone aurait une action inhibitrice locale sur le développement folliculaire et la stéroïdogénèse (Setty et Mills, 1987; Mills et Stopper, 1989). De plus, la progestérone serait responsable des défauts de fécondation associés à une altération du transport des gamètes (Takeda *et al.*, 1978; Tsutsumi *et al.*, 1980). Des travaux plus anciens avaient montré que la pseudogestation inhibait l'ovulation des lapines sans interférer sur la croissance folliculaire (Klein et Mayer, 1942) même si cette conclusion est aujourd'hui controversée. En conséquence, la lapine pseudogestante peut accepter l'accouplement (comportement fréquent dans la deuxième moitié de la gestation) mais ne peut être fécondée durant cette période.

Au 12<sup>ème</sup> jour de pseudogestation, les corps jaunes commencent à régresser (Scott et Rennie, 1970; Browning *et al.*, 1980; Boiti *et al.*, 1999) puis disparaissent sous l'action de la prostaglandine F<sub>2α</sub>.

(PGF<sub>2α</sub>), facteur lutéolytique sécrété par l'utérus. La fin de la pseudogestation est accompagnée de l'apparition d'un comportement maternel et de la construction d'un nid lié à l'abaissement rapide du taux de progestérone. Afin de mettre fin à l'état pseudogestatif, une injection de PGF<sub>2α</sub> ou de ses analogues de synthèse effectuée au 10-11<sup>ème</sup> jour de la pseudogestation permet d'arrêter cette dernière et de féconder la lapine seulement 14 jours après une première insémination inféconde. Les corps jaunes deviennent progressivement sensibles aux facteurs lutéolytiques. Boïti *et al.* (1998) avaient d'ailleurs montré que la grande majorité des corps jaunes pouvait être lysée dès le 9<sup>ème</sup> jour de pseudogestation par injection de 200 µg d'alfaprostol (analogue de PGF<sub>2α</sub>).

Les pseudogestations peuvent être fréquentes lorsque les lapines sont élevées en cages collectives si la femelle dominante chevauche les autres lapines. Dans ces conditions, les lapines dominées qui sont en œstrus peuvent ovuler et développer une pseudogestation. Cependant, l'origine de ces pseudogestations est beaucoup moins claire dans le cas de lapines logées en cages individuelles. Ainsi, il est généralement conseillé de séparer les lapines futures reproductrices dans des cages individuelles au moins 3 semaines avant leur mise à la reproduction pour éviter tout risque de pseudogestation.

#### I.1.4. Ovulation

Plusieurs expériences montrent que le stimulus associé à l'accouplement est plus d'ordre physiologique que mécanique dont celle de Fee et Parkes (1930) qui ont mis en évidence qu'une anesthésie du cervix des lapines n'empêche pas l'ovulation de se produire. De plus, le fait qu'une simulation d'accouplement avec deux lapines induise l'ovulation chez la lapine dominée confirme cette hypothèse. Plus précisément, le coït agit comme un stimulus qui va entraîner une cascade neuroendocrine complexe (Spies *et al.*, 1997; Ramirez et Beyer, 1998; Bakker et Baum, 2000) aboutissant à la stimulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, à la décharge préovulatoire de LH et donc à l'ovulation 10 à 12 h après l'accouplement (Harper, 1961; Foote et Carney, 2000). Le réflexe ovulatoire fait donc successivement intervenir la voie afférente, qui transmet au système nerveux central les stimuli associés au coït par voie nerveuse, et la voie efférente qui, par la voie humorale, permet l'achèvement de la maturation ovocytaire (maturation nucléaire) et l'ovulation (Gallouin, 1981). Des études récentes menées sur les Lamas et les Alpagas (Adams *et al.*, 2005; Ratto *et al.*, 2005) ont nuancé cette théorie en montrant que l'ovulation ne serait pas uniquement provoquée par l'accouplement mais aussi par un facteur présent dans le plasma séminal. En effet, l'injection de 2 ml de plasma séminal en intramusculaire chez ces animaux provoquait un pic de LH

plasmatique 75 minutes après le traitement et aboutissait à l'ovulation dans plus de 90 % des cas. Aucune étude comparable n'a été publiée à ce jour chez la lapine.

Hors accouplement, le niveau de sécrétion des hormones folliculo-stimulantes est relativement stable au cours du temps (Blanc et Hulot, 1982) malgré la présence de follicules préovulatoires sécrétant de l'œstradiol. Cette particularité physiologique de la lapine est totalement différente des processus existants chez les autres Mammifères domestiques où la sécrétion d'œstrogènes par les follicules dominants entraîne, à partir d'un certain seuil, un feed back positif sur la sécrétion de LH entraînant le pic préovulatoire et l'ovulation. L'absence d'ovulation spontanée chez la lapine serait ainsi principalement due à la déficience du rétrocontrôle positif des œstrogènes et donc à une difficulté à provoquer le pic de LH (Ramirez et Beyer, 1998; Bakker et Baum, 2000). Cependant, l'existence d'ovulations spontanées de manière ponctuelle n'est pas exclue chez la lapine ce qui expliquerait les cas de pseudogestation inexpliqués.

Après l'accouplement, le taux d'ocytocine s'accroît dans la minute suivant le coït tandis que celui de la prolactine décroît. Cette décharge d'ocytocine semble avoir pour fonction de permettre aux spermatozoïdes de franchir les cols utérins et commencer à progresser dans les cornes utérines. Dans le même temps, l'hypothalamus émet une décharge de GnRH qui atteint immédiatement l'hypophyse par le système porte hypothalamo-hypophysaire. Seule une très faible fraction de cette décharge de GnRH se retrouve diluée dans le flot sanguin général, ce qui a pour conséquence que les taux circulants dans le sang périphérique n'ont aucune relation avec les taux physiologiques efficaces. En réponse à la sécrétion de GnRH, il y a une décharge de LH par l'anté-hypophyse. La concentration maximale est observée 90 minutes après le coït (Dufy-Barbe *et al.*, 1973; Meunier *et al.*, 1983) alors que Jones *et al.* (1976) avaient mis en évidence une élévation du niveau de LH dans les 3 minutes après l'accouplement et un pic atteint après 15 minutes maintenu pendant au moins 1h avant de retrouver sa valeur basale. Cette équipe concluait qu'une augmentation du taux sérique de LH à 300 ng/ml était suffisante pour provoquer l'ovulation et la formation de corps jaunes par lutéinisation des cellules folliculaires.

Une élévation beaucoup plus modeste du taux sanguin de FSH est observée après le coït avec un maximum situé une demi-heure post-coïtum. La décharge de FSH permet la reprise de la méiose jusqu'au stade métaphase II alors que celle de LH est responsable de l'ovulation à proprement parlé en stimulant la synthèse d'œstradiol, de progestérone et de 20 $\alpha$ -di-hydroxyprogestérone qui maintiennent l'action ovulatoire (Knobil et Neil, 1988) et activerait une collagénase présente dans la thèque des follicules (Boussit, 1989). Les follicules à antrum de grande taille (diamètre supérieur à 0,8 mm) se transforment en environ 10 heures en follicules de De Graaf qui libèrent chacun un ovule. Hill *et al.* (1935) ont mené une étude cinématographique de l'ovulation chez la lapine et montrent

que la croissance terminale des follicules préovulatoires dure 1 à 2 h avec une augmentation importante de la vascularisation 20 à 30 minutes avant l'ovulation. L'expulsion du liquide folliculaire se fait en 30 à 60 secondes environ. Grâce à son modèle d'étude *in vitro* de l'ovulation chez la lapine, Lambersten *et al.* (1976) a pu confirmer que l'ovulation se déroule 10 à 14 h après son induction et montrer que suite à la décharge ovulante, plus aucun facteur extra-gonadique n'était nécessaire au déroulement de l'ovulation. La lapine présente la particularité d'avoir un deuxième pic de FSH, moins marqué que le premier, 20 à 48 h *p.c.* (Osteen et Mills, 1979; Meunier *et al.*, 1983) et dont le rôle serait de stimuler de nouveaux follicules à antrum susceptibles d'ovuler ultérieurement. Bolet (1984) en étudiant les facteurs contrôlant cette deuxième élévation du niveau de FSH, observe ce phénomène à 10 h *p.c.* et montre qu'il est indépendant du déroulement de l'ovulation, du premier pic de FSH et du pic préovulatoire de progestérone. Les conditions favorisant l'apparition de cette deuxième élévation de FSH ne sont pas encore connues mais il est clair que ce processus permet de stimuler des follicules en croissance pour l'établissement d'une nouvelle vague folliculaire.

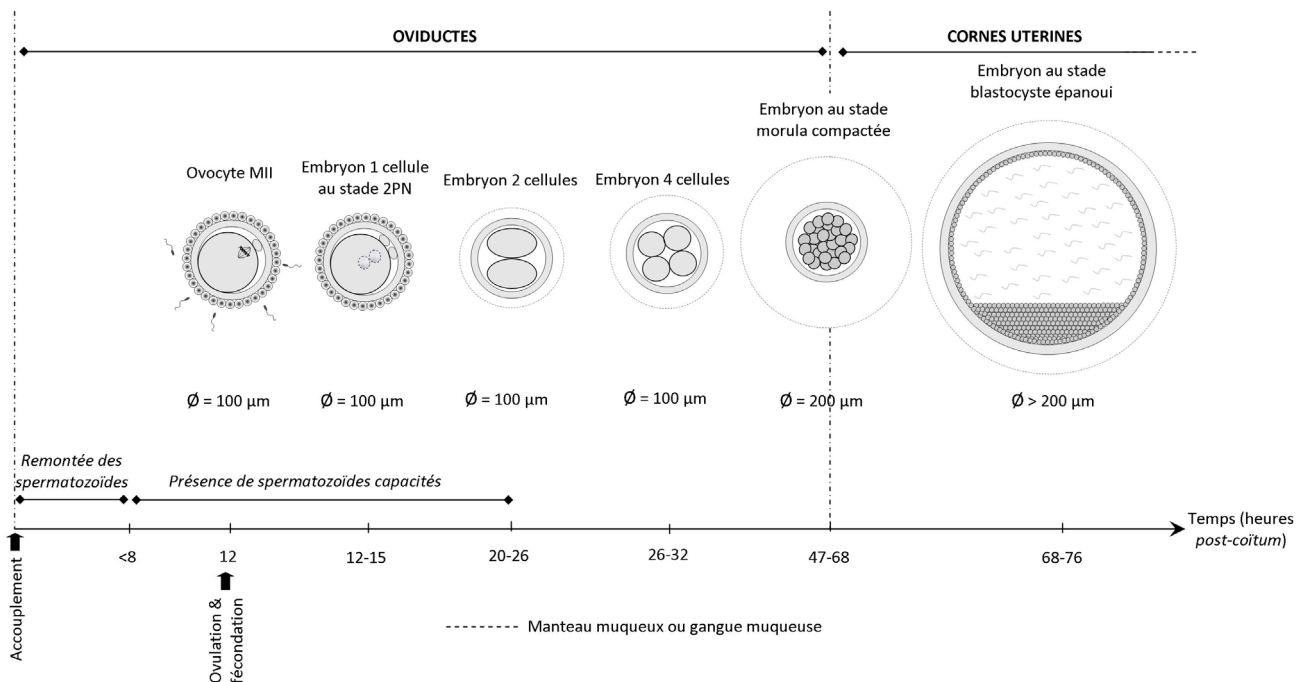
#### I.1.5. Fécondation et développement embryonnaire précoce

Une cicatrice appelée « stigma » correspondant à la rupture des couches périphériques et aux réactions inflammatoires associées à l'ovulation reste visible sur la partie apicale des follicules ayant ovulés (Bolet *et al.*, 1992). Dès leur libération, les ovocytes sont « aspirés » par le pavillon de l'oviducte et sont fécondables, avec un maximum de fécondabilité situé entre 12 et 15 h *p.c.* avant de diminuer progressivement jusqu'à 19 h *p.c.* où les ovocytes commencent à dégénérer (Thibault, 1967). Chez les femelles pubères, le sperme a été déposé par le mâle ou le dispositif d'insémination artificielle dans la partie supérieure du vagin. La durée de la remontée des spermatozoïdes jusqu'à la partie distale de l'ampoule est variable selon les auteurs, allant de 30 minutes après le coït à 8 h *p.c.* (Austin, 1955; Boussit, 1989). Durant leur remontée, les spermatozoïdes subissent une phase de maturation appelée capacitation qui les rend aptes à féconder les ovocytes. Il a été mis en évidence que les spermatozoïdes de lapin étaient recouverts d'un antigène bloquant la fécondation qui est inhibé lors de la capacitation dans les voies femelles (Hunter et Nornes, 1969). Sur les 150 à 200 millions de spermatozoïdes éjaculés, 2 millions (1 %) seront présents dans l'utérus et seulement une vingtaine de spermatozoïdes sur chaque ovocyte au moment de la fécondation (1 h 30 à 2 h après l'ovulation) avec un seul capable de traverser la membrane ovocytaire pour assurer la fécondation proprement dite. La pénétration du spermatozoïde fécondant entraîne l'exocytose des granules corticaux sous membranaires aboutissant au durcissement de la zone pellucide qui empêche toute autre pénétration polyspermiq (Ducibella, 1996). Il est important de noter qu'*in vivo*, un nombre de spermatozoïdes trop important au voisinage de l'ovule au moment de la fécondation perturbe le

déroulement de celle-ci (Hunter et Leglise, 1971). En l'absence d'ovocytes, les spermatozoïdes conservent un maximum de fécondabilité entre 10 et 18 h *p.c.* en étant liés à l'épithélium tubaire (Talevi et Gualtieri, 2004). Par la suite, leur fécondance diminue progressivement (minimum de fécondabilité de 18 à 25 h *p.c.*) avant d'aboutir à la dégénérescence des spermatozoïdes (31 à 32 h *p.c.*).

Après fécondation, tous les embryons sont présents dans l'isthme de l'oviducte 24 heures après le coït (Bourdage et Halbert, 1988). D'après les observations de López-Béjar (1995), les embryons ont terminé leur premier cycle cellulaire à 26 h *p.c.*, puis poursuivent leurs divisions pour atteindre les stades 4 cellules (26-32 h *p.c.*), 8 cellules (32-40 h *p.c.*), 16 cellules (40-47 h *p.c.*), morula (47-68 h *p.c.*) et blastocyste (68-76 h *p.c.*). Parallèlement à leur développement, les embryons migrent le long de l'oviducte où ils acquièrent leur manteau muqueux avant d'arriver dans la corne utérine, siège de l'implantation (figure 6). Les embryons de lapin possèdent deux couches extracellulaires dont l'intégrité est primordiale pour la survie embryonnaire. La couche la plus interne est la zone pellucide (11 à 30  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) mise en place dans les ovaires lors de folliculogénèse (formation des follicules secondaires) et indispensable pour la nutrition des ovocytes lors de la croissance folliculaire et la reconnaissance des gamètes lors de la fécondation (Dunbar, 1983; Motta *et al.*, 1994).

**Figure 6.** Schématisation du développement embryonnaire chez le lapin



La couche la plus externe est la couche muqueuse qui est mise en place plus tardivement lors de la migration des embryons dans l'oviducte et dont l'épaisseur augmente de 10  $\mu\text{m}$  à 24 h *p.c.* à 100  $\mu\text{m}$  à 72 h *p.c.* (Lopez-Bejar, 1995). Cette couche est d'une grande importance pour l'implantation de l'embryon dans l'utérus, avec un rôle encore plus essentiel que la zone pellucide dans le développement *in vivo* des embryons (Lopez-Bejar, 1995; Murakami et Imai, 1996). Plusieurs auteurs ont pu mettre en évidence l'importance de l'intégrité de la couche muqueuse sur le développement *in vitro* et le transfert d'embryons de lapin (Carney et Foote, 1990; Kasai *et al.*, 1993; Murakami et Imai, 1996). Ainsi, Bourdage et Halbert (1988) ont montré qu'environ 30 % des embryons ont passé la jonction utero-tubaire à 78 h *p.c.* et que plus de 90 % des embryons ont atteint les cornes utérines 84 h *p.c.* La paroi utérine se différencie, mais la dentelle utérine n'apparaît qu'entre 5 et 8 jours après le coït sous l'action de la progestérone sécrétée par les corps jaunes gestatifs. C'est la synchronisation de ces phénomènes qui permet l'implantation des blastocystes observée entre 120 et 144 h *p.c.* (Lopez-Bejar, 1995). Avant leur sortie de la zone pellucide, les embryons pré-implantatoires possèdent un diamètre interne relativement constant à 115-128  $\mu\text{m}$  (Alliston et Pardee, 1973) qui augmente approximativement jusqu'à 1 mm à 5 jours *p.c.* (Jung et Fischer, 1988). A l'implantation, les embryons atteignent un diamètre de 5 mm (Davies et Hesseldahl, 1971; Alliston et Pardee, 1973).

#### I.1.6. Implantation et développement foetal

On distingue plusieurs phases dans l'implantation des blastocystes épanouis caractérisées par le degré de contacts entre les cellules épithéliales utérines et trophoblastiques. A 7 jours post ovulation, les blastocystes perdent leur zone pellucide qui est remplacée par des couches de glycoprotéines dont les propriétés adhésives jouent un rôle important dans l'implantation (Alliston et Pardee, 1973). Le type d'implantation et le positionnement du blastocyste par rapport au plan mésométrial est variable selon les espèces. Chez le lapin, les blastocystes adoptent, sous l'effet des contractions du myomètre, une position de type antimésométrial caractérisée par un site d'implantation distinct situé à l'opposé du bouton ou disque embryonnaire. Les premiers contacts entre les cellules trophoblastiques et utérines correspondent à la phase d'apposition qui précède la phase d'adhésion et d'implantation proprement dite. Le trophoblaste pénètre ensuite dans l'épithélium utérin par un mécanisme de fusion du syncytio-trophoblaste et des cellules utérines aboutissant à la formation de grosses cellules multinucléées. Dès le 12<sup>ème</sup> jour de gestation, on peut assister au développement du placenta de type bi-discoïde qui assurera la croissance et le développement du fœtus jusqu'à la parturition (Rodriguez *et al.*, 1985).



Du 3<sup>ème</sup> au 12<sup>ème</sup> jour suivant l'accouplement, le taux de progestérone ne cesse d'augmenter passant de 5 à 20 ng/ml, puis reste relativement stationnaire avant de diminuer rapidement dans les quelques jours précédant la mise bas (Browning *et al.*, 1980). Chez la lapine, la sécrétion de progestérone n'est pas modifiée par la présence des embryons pendant les deux premières semaines de gestation. Ensuite, un facteur protéique antilutéolytique produit par la partie fœtale du placenta constitue, en synergie avec l'œstradiol, un facteur lutéotrope indispensable au maintien de la gestation (Browning et Wolf, 1981).

Les pertes embryonnaires estimées par comparaison du nombre de corps jaunes et du nombre d'embryons vivants peuvent être importantes. En général, 70 à 80 % des ovocytes libérés donnent finalement des lapereaux vivants à la naissance (Adams, 1960; Hafez, 1965). La majeure partie des mortalités embryonnaires se produit entre la fécondation et le 17<sup>ème</sup> jour de la gestation (Adams, 1960). La mortalité embryonnaire préimplantatoire serait liée à la qualité des embryons alors que les mortalités fœtales seraient plus liées à l'emplacement de la nidation ainsi qu' à la qualité du milieu utérin (Torres, 1982). D'autres facteurs ont une influence non négligeable sur le développement embryonnaire comme par exemple la saison (température, lumière) et l'état physiologique des lapines (âge en particulier, ou état de lactation). Maurer et Foote (1971) ont confirmé que le système reproductif des femelles âgées devenait moins efficace avec notamment un nombre de lapereaux nés vivants plus faible s'expliquant en partie par des taux de mortalité embryonnaire préimplantatoire plus élevés.

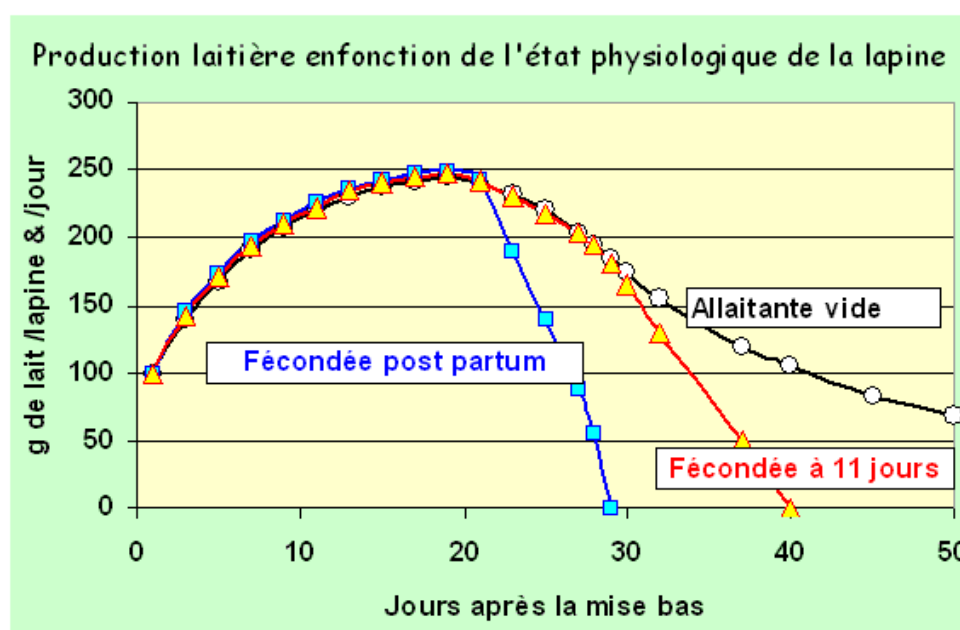
### **I.1.7. Mise bas et allaitement des lapereaux**

La mise bas dure 10 à 20 minutes indépendamment de la taille de portée qui peut varier de 1 à 20 lapereaux avec une moyenne située autour de 8 à 10 dans les élevages. Elle intervient généralement après 31 à 32 jours de gestation (Foote et Carney, 2000). Dès lors, la production quotidienne de lait augmente de 30 – 50 g les deux premiers jours à 200 – 250 g vers la fin de la 3<sup>ème</sup> semaine de lactation (figure 7). Elle décroît ensuite plus ou moins rapidement en fonction de la présence ou de l'absence simultanée d'une gestation. A partir du 22<sup>ème</sup> jour *p.p.*, la quantité de lait produite diminue brutalement chez les lapines gestantes alors que cette diminution est beaucoup moins rapide chez des lapines non gestantes (Lebas, 1972). Quelque soit le statut physiologique des lapines allaitantes la production laitière devient nulle au 28-29<sup>ème</sup> jour de gestation.

La lapine peut être mise à la reproduction aussitôt après la mise bas ou même pendant la période de lactation et alors assurer simultanément lactation et gestation. Cette situation est celle qui est le plus souvent rencontrée dans les élevages cunicoles avec une conduite en bande unique et

des inséminations artificielles (IA) tous les 42 jours (IA au 11<sup>ème</sup> jour de lactation). De nombreuses études ont été menées sur l'effet de la lactation sur les performances de reproduction des lapines de statut physiologique et de parité différents aussi bien en saillie naturelle qu'en insémination artificielle (Theau-Clement, 2001). De manière plus marquée en insémination artificielle qu'en saillie naturelle, il a été montré un fort effet dépressif de la lactation et de son intensité (nombre de lapereaux allaités) sur la réceptivité des lapines ainsi que sur leur aptitude à ovuler et à mener une gestation à terme.

*Figure 7. Évolution de la production laitière de lapines simplement allaitantes ou simultanément gestantes et allaitantes*



Source : Lebas (1972)

Le stade 4-5 jours après la mise bas semble être la période la plus défavorable pour la mise à la reproduction des lapines comme l'illustre la réceptivité qui est maximale aussitôt après la mise bas (proche de 100 %), diminue pour atteindre un minimum 3-5 jours (40-65 %) pour enfin remonter au niveau initial d'après sevrage 11 jours après le part (Theau-Clement, 2007). La fertilité et la prolificité des lapines allaitantes sont globalement plus faibles que celles des lapines non allaitantes avec un effet négatif de la lactation sur le pourcentage de femelles ovulantes (-26 %), le taux de gestation (-33 %), et la viabilité fœtale (-10 %). Les effets négatifs de la lactation sur le taux d'ovulation semblent moins marqués pour des lapines allaitantes au 11<sup>ème</sup> jour *p.p.* (Theau-Clement *et al.*, 1990; Theau-Clement et Poujardieu, 1994) mettant en évidence l'existence d'une période critique *post partum*. Enfin, la lactation semble retarder la puberté des futures reproductrices nées de femelles qui

allaitaient pendant la gestation ce qui peut diminuer fortement la productivité de l'atelier cunicole (Fortun-Lamothe et Mariana, 1998).

L'effet dépressif de la lactation sur les performances de reproduction des lapines peut s'expliquer d'une part par le déficit nutritionnel imposé aux femelles dans les systèmes d'élevages intensifs où les lapines doivent assurer simultanément gestation et lactation. De plus, l'hyperprolactinémie et la faible progestéronémie engendrées par la production laitière peuvent elles aussi contribuer à la diminution des performances de reproduction observée après le part (Fortun-Lamothe et Bolet, 1995; Fortun-Lamothe, 1998). D'un point de vue hormonal, la lactogénèse est sous la dépendance directe de la prolactine, hormone peptidique antéhypophysaire synthétisée et sécrétée par les cellules lactotropes du lobe antérieur de l'hypophyse. Contrairement à d'autres espèces domestiques, les niveaux sériques de prolactine dépassent rarement 100 ng/ml chez la lapine. Sa sécrétion est réalisée de manière pulsatile sous la dépendance de multiples facteurs hormonaux dont la progestérone, la dopamine ou encore les opiacés (Touraine et Goffin, 2005). Après la mise bas, les niveaux de progestérone et d'œstradiol chutent, levant ainsi l'inhibition sur la sécrétion de prolactine ce qui va déclencher l'établissement et le maintien de la lactogénèse. Bien que tous les effets de la prolactine sur la fonction gonadotrope ne soient pas encore élucidés, il semblerait que celle-ci agisse à différents niveaux du tractus génital et à différentes périodes. Chez la lapine, il a été montré un effet de la prolactine sur l'environnement utérin qui devient défavorable à la migration des gamètes et à la fécondation. De plus, elle perturberait la maturation folliculaire et ovocytaire et participerait au maintien de l'inhibition de l'ovulation notamment par inhibition de la sécrétion pulsatile de GnRH hypothalamique et abaissement des synthèses de gonadotropines (Yoshimura *et al.*, 1991; Theau-Clement, 2001).

## **I.2. Maîtrise de la reproduction chez la lapine**

### **I.2.1. Stimulations de l'œstrus chez la lapine**

La réceptivité de la femelle peut être estimée en la plaçant dans la cage d'un mâle et en observant si elle adopte un comportement d'acceptation de l'accouplement. En effet, une lapine en œstrus adopte une position de lordose caractéristique alors qu'une lapine en diœstrus tend à se blottir dans un angle de cage ou à devenir agressive vis-à-vis du mâle. Toutefois, ce test est trop long à réaliser dans les conditions de production intensives. Plusieurs auteurs ont montré que l'observation de la couleur et de la turgescence de la vulve de la lapine pouvait constituer un bon indicateur de réceptivité sexuelle des lapines lors de l'insémination. En effet, on constate que plus de 80 % des femelles ayant la vulve rose, rouge ou violette et turgescence acceptent l'accouplement et

ovulent. A l'inverse, moins de 20 % seulement des femelles ayant une vulve blanche acceptent de s'accoupler et sont fécondées (Delaveau, 1978; Gosalvez *et al.*, 1985).

Beaucoup d'études ont été menées pour induire et synchroniser le comportement d'œstrus chez la lapine de manière à augmenter et homogénéiser les performances de reproduction dans les élevages. Ainsi, l'administration d'hormones folliculo-stimulantes (gonadotropines), à une lapine 2 à 3 jours avant l'insémination a beaucoup été utilisée ces 15 dernières années. L'utilisation de l'hormone gonadotrope chorionique équine (eCG) aurait un effet positif sur la réceptivité des femelles (Alabiso *et al.*, 1994; Davoust *et al.*, 1994; Mirabito *et al.*, 1994; Theau-Clement et Lebas, 1996; Theau-Clement *et al.*, 1998) bien que les travaux de Bourdillon *et al.* (1992) et de Mehaisen *et al.* (2005) ne l'aient pas confirmé. Theau-Clément (2005) préconise l'administration de 20 UI de PMSG par lapine 48 heures avant l'insémination artificielle ce qui permet d'augmenter la réceptivité et la fertilité des femelles primipares et multipares allaitantes ainsi que la productivité (lapereaux sevrés/IA) de près de 17 à 20 %. Une administration tous les 35 jours n'entraîne pas de réponse immunitaire précoce (apparition d'anticorps anti-PMSG au bout de la 7<sup>ème</sup> injection) contrairement à ce qui avait pu être mis en évidence chez d'autres espèces comme les caprins ou les ovins (Roy *et al.*, 1995). En contre partie, il est parfois montré que les traitements à base d'eCG peuvent avoir des effets négatifs sur les taux de fécondation et les taux de viabilité à la naissance (Canali *et al.*, 1991; Alabiso *et al.*, 1994; Maertens et Luzi, 1995).

La limitation progressive de l'utilisation d'hormones dans les élevages en Europe a conduit la communauté scientifique à mener des recherches pour s'affranchir de ces traitements. Ainsi, plusieurs essais ont montré que des comportements d'œstrus pouvaient aussi être déclenchés chez la lapine par des "biostimulations" (Theau-Clement *et al.*, 1998; Theau-Clement, 2000; 2005) faisant intervenir plus directement le système nerveux central et sa capacité d'intégration des facteurs environnant la lapine (séparation temporaire mère-jeunes chez les lapines allaitantes, modulation des rythmes lumineux ou modulation de l'alimentation). Ceci confirme que la réceptivité et donc la croissance folliculaire résultent d'un ensemble de facteurs qui ne sont pas encore maîtrisés à ce jour.

### 1.2.2. Méthodes d'induction de l'ovulation :

L'ovulation peut être provoquée en intervenant à différents niveaux de l'axe hypothalamo-hypophysaire par différentes méthodes qui permettent d'aboutir au pic de LH pré-ovulatoire. L'ovulation étant déclenchée par l'accouplement, il est possible d'induire l'ovulation des lapines directement par saillie non fécondante avec un mâle vasectomisé (Khalifa *et al.*, 2000). La simulation

du coït par stimulation mécanique du vagin peut induire l'ovulation, mais les résultats sont très aléatoires et généralement faibles (Hulot et Poujardieu, 1976). Actuellement, le déclenchement de l'ovulation est généralement effectué juste après IA par injection de GnRH (i.m.), de LH (i.v.), d'hCG (i.v.) ou par une combinaison de ces deux méthodes.

Quelques études ont porté sur la relation entre les différents traitements utilisés pour l'induction de l'ovulation et les taux de collecte ainsi que les taux de survie *in vivo* ou *in vitro* (García-Ximenez et Vicente, 1992; Viudes-de-Castro *et al.*, 1995). Mehaisen *et al.* (2005) a pu mettre en évidence que l'utilisation d'hCG tend à augmenter le taux d'ovulation même si l'effet sur le taux de collecte d'embryons normaux n'est pas significatif, confortant les résultats obtenus par García-Ximénez et Vicente (1992) et Viudes-de-Castro *et al.* (1995). Cependant, il semblerait que les embryons obtenus à l'aide d'hCG soient moins résistants à la vitrification que ceux obtenus à l'aide de GnRH (Mehaisen *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que des injections répétées d'hCG ou de LH entraînent une immunisation et une perte d'efficacité au-delà de la 4<sup>ème</sup> ou de la 5<sup>ème</sup> injection contrairement à la GnRH qui ne connaît aucune baisse d'activité (Adams, 1981).

Plus récemment, Quintela *et al.* (2004) ont montré que l'ovulation chez la lapine pouvait être induite par administration de 16 µg de buséréline (analogue de GnRH) par femelle directement dans la dose de semence utilisée pour l'insémination artificielle. Cette technique a l'avantage de s'affranchir de l'injection intramusculaire de GnRH sans aucune répercussion sur les taux de mises bas (respectivement 91,7 % vs 87,5 %) et avec une meilleure prolificité (11,7 vs 9,4). Cependant, l'ovulation provoquée avec cette technique se déroule de manière plus précoce (60 vs 90 min post IA). Par la suite, la même équipe obtenait des résultats similaires en utilisant 25 µg par femelle de [des-Gly10, D-Ala6]-LHRH ethylamide, autre analogue de GnRH (Quintela *et al.*, 2007). Une expérience similaire a été menée par Viudes-de-Castro *et al.* (2007) qui testaient deux types d'analogues de GnRH et obtenaient des résultats similaires à la méthode conventionnelle en utilisant 5 µg de triptoreline par femelle.

### 1.2.3. Les techniques de superovulation

Les premiers essais de superovulation remontent aux années quarante où Pincus (1940) avait comparé deux traitements de superovulation chez la lapine (extrait hypophysaire vs. PMSG) et avait constaté que les lapines traitées produisaient 3 à 4 fois plus d'ovocytes que les lapines témoins non traitées. Ces traitements hormonaux visent à stimuler les ovaires pour recruter un plus grand nombre de follicules que lors d'un cycle ovarien classique. Ainsi, les follicules les moins sensibles à

l'action de la FSH peuvent être recrutés et résultent en un nombre d'ovocytes ovulés plus important. Mis à part les intérêts expérimentaux que cela représente, la superovulation peut s'avérer particulièrement intéressante dans le cadre des opérations de cryoconservation des ressources génétiques particulièrement chez les espèces peu prolifiques et/ou menacées d'extinction. Cependant, la réponse des lapines aux différents traitements de superovulation semble dépendre du type d'hormones utilisées, de leur mode d'administration mais aussi des populations de lapins concernées. Depuis le travail de Pincus (1940), les études sur le sujet se sont multipliées sans qu'aucune méthode de référence ne soit établie et acceptée par tous. Actuellement, les traitements de superovulation sont réalisés par injection(s) de FSH, d'eCG ou plus rarement d'hMG (human Menopausal Gonadotropin) à des quantités et à des intervalles de temps variables selon les auteurs (tableaux 2, 3 et 4).

**Tableau 2.** *Essais de superovulation avec des traitements à base de FSH*

Références	Traitement	Injection(s) /jour	Nb jour s	Mode d'injection	Induction de l'ovulation	Corps jaunes	Emb/ovo Collectés
Kennelly et Foote (1965)	0,186 mg pFSH	2	3	s.c.	2,5 mg eLH	20,8	15,2
	0,375 mg pFSH	2	3	s.c.	2,5 mg eLH	31,2	22,6
	0,93 mg pFSH	2	3	s.c.	2,5 mg eLH	38,1	26,2
	1,5 mg pFSH	2	3	s.c.	2,5 mg eLH	23,6	15,0
Varian <i>et al.</i> (1967)	3 mg pFSH	2	3	s.c.	2 mg pLH/Kg	45,1	36,8
Maurer <i>et al.</i> (1968a)	1,8 mg pFSH	2	3	s.c.	2,5 mg pLH	46,5	39,8
Maurer et Foote (1971)	1,8 mg pFSH	2	3	s.c.	2,5 mg pLH	54,9	35,0
Trotnow <i>et al.</i> (1981)	1,6 mg FSH	1	4	s.c.	100 U.I. hCG	33,1	31,5
Renard <i>et al.</i> (1982)	1,5 mg FSH	2	3	-	30 U.I. hCG	46,1	32,1
Fischer (1989)	1,8 mg FSH	2	3	s.c.	75 U.I. hCG	-	22,0
Carney et Foote (1990)	0,93 mg pFSH	2	3	s.c.	2,5 mg eLH	25,7	19,9
Schmidt <i>et al.</i> (1992)	1,8 mg pFSH	1	3	s.c.	40 U.I. hCG	34,6	14,2
Joly (1997)	2 mg pFSH	2	2,5	s.c.	0,2 ml GnRH	-	25,5
Treloar <i>et al.</i> (1997)	3,2 µg/h FSH	continu	3	s.c.	150 U.I. hCG	-	37,2
Kauffman <i>et al.</i> (1998)	3 UA FSH	2	3	s.c.	150 U.I. hCG	26,5	19,4
	4 UA FSH	2	4	s.c.	150 U.I. hCG	23,5	23,5
Hirabayashi <i>et al.</i> (2000a)	3 UA pFSH	2	3	s.c.	? U.I. hCG	47,4	40,1
	3,0 UA pFSH + 10% PVP	1	1	s.c.	? U.I. hCG	33,7	25,4
Hirabayashi <i>et al.</i> (2000b)	3 UA pFSH	2	3	s.c.	75 U.I. hCG	-	27,5
	3,0 UA pFSH + 10% PVP	1	1	s.c.	75 U.I. hCG	-	14,8
Besenfelder (2002)	13,5 mg pFSH	2	3	-	180 U.I. hCG	50,0	32,0
	Progest + 13,5 mg pFSH	2	3	-	180 U.I. hCG	63,0	42,0
Hashimoto <i>et al.</i> (2004)	3 U.A. pFSH + 10% PVP	1	1	s.c.	75 ou 150 U.I. hCG + 1µg GnRH	-	20,1
	3 U.A. rpFSH + 10% PVP	1	1	s.c.	75 ou 150 U.I. hCG + 1µg GnRH	-	27,1
Mehaisen <i>et al.</i> (2006)	1,8 mg FSH + 30% PVP	1	3	i.m.	75 U.I. hCG	25,2	20,3
Hashimoto <i>et al.</i> (2007)	3 U.A. pFSH + 10% PVP	1	1	s.c.	75 U.I. hCG	-	17,3
	3 U.A. pFSH ds Al-gel	1	1	s.c.	75 U.I. hCG	-	40,4
	3 UA pFSH	2	3	s.c.	75 U.I. hCG	-	47,4

**Tableau 3.** *Essais de superovulation avec des traitements à base d'hMG*

Références	Traitement	Injection(s) /jour	Nb jours	Mode d'injection	Induction de l'ovulation	Corps jaunes	Emb/ovo Collectés
Kanayama <i>et al.</i> (1992)	15 U.I. hMG + 25% PVP	1	1	s.c.	SN	19,8	18,5
	30 U.I. hMG + 25% PVP	1	1	s.c.	SN	38,0	36,5
	60 U.I. hMG + 25% PVP	1	1	s.c.	SN	65,3	41,0
	90 U.I. hMG + 25% PVP	1	1	s.c.	SN	50,3	38,0
	120 U.I. hMG + 25% PVP	1	1	s.c.	SN	47,0	38,5
Kanayama <i>et al.</i> (1995)	90 U.I. hMG	1	3	s.c.	75 U.I. hCG	-	15

**Tableau 4.** *Essais de superovulation avec des traitements à base d'eCG/PMSG*

Références	Traitement	Injection(s) /jour	Nb jours	Mode d'injection	Induction de l'ovulation	Corps jaunes	Emb/ovo Collectés
Kennelly and Foote (1965)	75 U.I. eCG	2	3	s.c.	2,5 mg LH	16,6	13,7
Maurer <i>et al.</i> (1968a)	90 U.I. eCG	1	3	s.c.	50 U.I. hCG	13,6	11,0
Fujimoto <i>et al.</i> (1974)	100 U.I. eCG	1	1	i.m.	100 U.I. hCG	22,1	16,3
Renard <i>et al.</i> (1982)	120 U.I. eCG	2	2	-	30 U.I. hCG	15,5	11,0
Hatton <i>et al.</i> (1985)	75 U.I. eCG	1	1	i.m.	50 U.I. hCG		25
Kanayama <i>et al.</i> (1995)	50 U.I. eCG	1	1	i.v.	75 U.I. hCG		15
Keefer <i>et al.</i> (1985)	150 U.I. eCG	1	1	-	75 U.I. hCG	-	21,3
Mayan <i>et al.</i> (1989)	100 U.I. eCG	1	1	s.c.	50 U.I. hCG	24,0	17,0
Rebollar <i>et al.</i> (1989)	50 U.I. eCG	1	1	i.m.	40 µg GnRH	16,0	-
García-Ximénez et Vicente (1990)	50 U.I. eCG	1	1	s.c.	50 U.I. hCG	19,7	17,9
Illera <i>et al.</i> (1990)	120 U.I. eCG	1	1	i.m.	60 U.I. hCG	-	21,3
Taneja <i>et al.</i> (1990)	50 U.I. eCG	1	1	i.m.	100 U.I. hCG	?	?
	75 U.I. eCG	1	1	i.m.	100 U.I. hCG	?	?
Schmidt <i>et al.</i> (1992)	100 U.I. eCG	1	1	i.m.	100 U.I. hCG	27,2	19,6
	100 U.I. eCG	1	1	i.m.	75 U.I. hCG	~20	10,8
	50 U.I. eCG	1	1	i.m.	40 U.I. hCG	~20	11,4
Chrenek <i>et al.</i> (1998)	20 U.I. eCG /Kg	1	1	-	160 U.I. hCG	-	18
Hirabayashi <i>et al.</i> (2000a)	? U.I. eCG	1	1	s.c.	? U.I. hCG	21,3	18,0
Besenfelder (2002)	120 U.I. eCG	1	1	-	180 U.I. hCG	44,0	27,0
López-Béjar et López-Gatius (2002)	80 U.I. eCG	1	1	s.c.	30 U.I. hCG	-	17,8
Tsiligianni <i>et al.</i> (2004)	20 U.I. eCG /Kg	1	1	i.m.	120 U.I. hCG	28,7	18,6
Mehaisen <i>et al.</i> (2005)	50 U.I. eCG	1	1	s.c.	75 U.I. hCG ou 2µg GnRH	15,5	8,2
	200 U.I. eCG	1	1	s.c.	75 U.I. hCG ou 2µg GnRH	19,2	5,8
Mehaisen <i>et al.</i> (2006)	20 U.I. eCG /Kg	1	1	i.m.	75 U.I. hCG	19,2	15,4

Kenelly et Foote (1965), Maurer *et al.* (1968a), Renard *et al.* (1982), Besenfelder *et al.* (2002) ou encore Mehaisen *et al.* (2006) ont pu mettre en évidence une réponse au traitement de superovulation plus élevée avec l'utilisation de la FSH par rapport à l'utilisation de l'eCG. Cependant, Schmidt *et al.* (1992) ont obtenu de meilleurs résultats en utilisant l'eCG par rapport à la FSH. Il apparaît donc que chaque équipe de recherche établit « son » protocole de superovulation de référence en se basant sur les résultats obtenus en interne.

De plus, il est certain que le protocole à base de FSH est assez lourd à cause du nombre d'injections à réaliser du fait de la demi-vie très courte de cette hormone (4 à 5 heures comme l'hMG) par rapport à celle de l'eCG (>5 jours). Ainsi, le stress infligé aux lapines est aussi plus

important contrairement au protocole utilisant de l'eCG qui est de ce fait un peu plus utilisé. Cependant, les résultats obtenus par injection d'eCG sont globalement de moins bon niveau que ceux obtenus par injections de FSH ou d'hMG.

Depuis les premiers travaux de Kennelly et Foote (1965), plusieurs études ont été conduites pour déterminer la combinaison optimale d'administration de la FSH. Bien que Kauffman *et al.* (1998) aient montré que 8 injections de FSH sur 4 jours permettaient d'obtenir une meilleure stimulation qu'avec les 6 injections classiques, la tendance générale est de réduire le nombre d'injections (Schmidt *et al.*, 1992; Joly, 1997). La méthode d'injection en continu de la FSH (Treloar *et al.*, 1997) à l'aide d'une micro-pompe placée sous la peau permet d'obtenir 37,2 embryons par lapine tout en diminuant le nombre d'interventions; cependant, cette technique nécessite une intervention chirurgicale légère qui limite son utilisation en routine. Hirabayashi *et al.* (2000a; 2000b) montrent que l'utilisation de polyvinylpyrrolidone (PVP; 10 %) dans la solution de FSH permet de passer de six à une injection unique 72 h avant l'induction de l'ovulation sans diminuer la réponse ovarienne. Le PVP en solution est un excipient qui va permettre de prolonger l'absorption des hormones injectées et donc d'augmenter leur durée de vie. L'utilisation de PVP a été reprise de manière concluante par Hashimoto *et al.* (2004) et Mehaisen *et al.* (2006) avec respectivement 27,1 et 20,3 embryons collectés par lapine. L'utilisation d'hMG avec (Kanayama *et al.*, 1992) ou sans PVP (Kanayama *et al.*, 1995) n'a jamais été comparée avec les hormones citées précédemment mais les résultats annoncés par Kanayama *et al.* (1992) sont élevés avec jusqu'à 41 embryons collectés par lapine. Récemment, Hashimoto *et al.* (2007) ont obtenu des résultats élevés après une seule injection de pFSH dissoute dans un gel d'hydroxide d'aluminium avec 40,4 embryons collectés par femelle mais compte tenu de la faiblesse des effectifs utilisés, les résultats nécessitent d'être confirmés.

L'administration de doses d'hormones plus importantes conduit à un nombre d'embryons produits plus élevé (Kennelly et Foote, 1965; Schmidt *et al.*, 1992). Cependant, cette corrélation positive est limitée par l'hyperstimulation de l'ovaire elle-même, puisque l'utilisation de niveaux élevés d'hormones, a des conséquences néfastes sur la qualité et le nombre d'embryons produits et leur capacité de développement (Donaldson et Ward, 1986; Levi-Setti *et al.*, 2006). Ainsi, il a été montré que la superovulation entraîne des ovulations avec des taux élevés de follicules immatures et anormaux (Garcia-Ximenez et Vicente, 1990; Schmidt *et al.*, 1992), une diminution des taux de collecte (Kennelly et Foote, 1965; Hafez, 1969; Schmidt *et al.*, 1992; Mehaisen *et al.*, 2005) et des taux de fécondation (Kennelly et Foote, 1965) ainsi que des défauts cytogénétiques et des altérations chromosomiques des embryons (Fechheimer et Beatty, 1974; Fujimoto *et al.*, 1974). De plus, Braun et Leidl (1980) ont observé que les embryons produits par superovulation montraient des modifications morphologiques ainsi qu'une plus grande sensibilité à la congélation. Ces observations



ont été confirmés dans d'autres travaux (Kauffman *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2006) et peuvent expliquer en partie un nombre de blastomères plus faible (Carney et Foote, 1990; Vajta, 2000) traduisant une qualité globale des embryons inférieure (Chrenek *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2006). De plus, l'administration de fortes doses d'eCG (200 UI) entraîne une forte augmentation du nombre de follicules hémorragiques (Mehaisen *et al.*, 2005) traduisant des dysfonctionnements dans le processus d'ovulation qui se répercutent sur la production d'embryons (Garcia-Ximenez et Vicente, 1990; Mehaisen *et al.*, 2005) et sur leur taux de survie (Renard *et al.*, 1982; Maertens et Luzi, 1995; Rebollar *et al.*, 2000; Mehaisen *et al.*, 2005; Mehaisen *et al.*, 2006). Les traitements de superovulation favorisent aussi l'accélération du transit et donc une arrivée prématurée dans l'utérus (Braun et Leidl, 1980; Carney et Foote, 1990).

De plus, la répétition des traitements de superovulation sur une même femelle présente des inconvénients majeurs tels que la diminution rapide du nombre de corps jaunes et du nombre d'embryons collectés probablement liée à une immunisation des lapines contre les hormones exogènes injectées par synthèse d'anticorps anti-gonadotrophines (Maurer *et al.*, 1968a; Maurer et Foote, 1971; Cortell et Viudes de Castro, 2008). Ce phénomène est plus marqué avec l'utilisation de l'eCG en combinaison avec l'hCG qu'avec l'utilisation de FSH en association avec LH (Maurer *et al.*, 1968a). En effet, la répétition du traitement eCG-hCG à 4 mois d'intervalle entraîne la diminution rapide du nombre d'embryons collectés (11 à 2,9 embryons par lapine) alors que le phénomène est observé de manière plus progressive avec FSH-LH (39,8 à 12,7 embryons par lapine en 12 mois). De la même manière, Mehaisen *et al.* (2006) ont confirmé ces observations aussi bien avec un traitement FSH-LH qu'avec un traitement eCG-hCG et montrent que la répétition de ces traitements affecte la viabilité des embryons avant et après vitrification. L'alternance des différentes méthodes de superovulation sur une même femelle représente une perspective intéressante pour maintenir un niveau de production élevé (Mehaisen *et al.*, 2006).

Par conséquent, il semble que les traitements de superovulation à base de FSH entraînent une production plus importante d'embryons de bonne qualité que les traitements à base d'eCG notamment à cause de la longue demi-vie et de la double activité FSH/LH de l'eCG. Cependant, il existe une variabilité de réponse importante entre les individus pour un traitement donné avec un taux d'ovulation pouvant varier de 10 à plus de 80 embryons par femelle. Ces disparités de réponse peuvent avoir plusieurs origines dont l'âge, le génotype, la parité, le statut physiologique ou encore les conditions d'élevage des femelles donneuses (Lerner *et al.*, 1986). De plus, il a été mis en évidence une grande hétérogénéité des préparations commerciales à base de FSH dont la teneur en LH est variable d'un lot de préparation à un autre (Murphy *et al.*, 1984; Lindsell *et al.*, 1986; Treloar

*et al.*, 1997). L'effet de la LH dans les traitements à base de FSH a été étudié principalement chez la femme et la vache et il semble qu'une concentration excessive en LH entraîne une activation trop précoce des ovocytes qui présenteraient alors des défauts de maturation (Moor *et al.*, 1984; Levi-Setti *et al.*, 2006) conduisant à des problèmes de fécondation, à une diminution des taux de collecte et de gestation ou à une baisse de la qualité des embryons (Chupin *et al.*, 1984; Donaldson et Ward, 1986; Howles, 2000). Mais les conclusions tirées sont parfois contradictoires et le rôle de la LH n'a pas clairement été établi comme dans une étude de Beckers (1987), où la réduction du contenu en LH des préparations hormonales était associée à une diminution du nombre d'embryons collectés bien que ceux-ci soient de meilleure qualité. De plus, de nombreux travaux n'ont pas montré de différences significatives entre les traitements avec ou sans LH exogènes sur la quantité et la qualité des embryons produits (Fleming *et al.*, 1998; Rosas *et al.*, 1998; Levi-Setti *et al.*, 2006; Tharasanit *et al.*, 2006; Welch *et al.*, 2006). 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.  $20,1 \pm 1,8$ ).

#### 1.2.4. Les différentes techniques de collecte d'ovocytes et d'embryons

Dans la plupart des cas, les embryons sont collectés chez le lapin à 65 à 72 h après l'induction de l'ovulation, par perfusion du tractus génital isolé après abattage de la femelle donneuse (photo 1) (Kennelly et Foote, 1965; Torres *et al.*, 1987a; Vicente et Garcia-Ximenez, 1993b; a; 1994; Viudes-de-Castro *et al.*, 1995; Vicente *et al.*, 1999; Vicente *et al.*, 2003; Tsiligianni *et al.*, 2004). Cependant, cette méthode n'est pas adaptée pour les animaux de plus grande valeur économique, scientifique ou sociale ou pour les expériences nécessitant des répétitions de collectes sur une même femelle.

La technique de collecte *in vivo* par laparotomie a été développée chez la lapine de manière à éviter l'euthanasie des animaux (Forcada et Lopez, 2000) et consiste à perfuser le tractus génital *in situ* au niveau du pavillon de l'oviducte et de la jonction utéro-tubaire (Maurer *et al.*, 1968a; Maurer et Foote, 1971; Taneja *et al.*, 1990; Kauffman *et al.*, 1998; Lopez-Bejar et Lopez-Gatius, 2002). Les embryons sont ainsi acheminés par le liquide collecte dans la cavité vaginale où ils sont collectés à l'aide d'une sonde reliée à une pompe d'aspiration (20 à 40 mm de Hg). Cependant, cette méthode est invasive et difficilement répétable sur une même femelle à cause du développement post-opératoire d'adhérences fibreuses liées à l'intervention chirurgicale (Torres et Sevellec, 1987). Pour limiter le développement de ces adhérences, un lavage du tractus génital avec une solution saline héparinée (2,5 %) après l'intervention peut être pratiqué (Forcada et Lopez, 2000). De plus, Carney et

Foote (1990) affirment que la collecte par laparotomie et perfusions rétrogrades à 19 h post-IA affecte l'épaisseur du manteau muqueux sans pour autant que cela altère les taux de développement des embryons. De plus, la collecte par voie chirurgicale s'accompagne souvent d'une réduction de la fertilité ultérieure des femelles opérées (Maurer *et al.*, 1968a).

Utilisée dans le cadre des transferts embryonnaires (Garcia-Ximenez *et al.*, 1991; Besenfelder et Brem, 1993), la coelioscopie a d'abord été développée pour visualiser les structures ovariennes (Theau-Clement et Bolet, 1987; Santacreu *et al.*, 1990) et pour collecter les embryons en limitant la taille des incisions et le développement d'adhérences (Besenfelder *et al.*, 1998). Cet outil permet donc d'accéder de manière répétée aux embryons et ovocytes d'une même femelle. Cette technique consiste à placer la lapine en décubitus dorsal inclinée avec la tête vers le bas et à réaliser deux petites incisions, sur la ligne blanche, au niveau de l'ombilic pour l'insertion de l'endoscope et de la pince permettant la préhension et la manipulation non invasive des organes (photo 2). Après visualisation de l'ovaire et du pavillon de l'oviducte, un cathéter veineux rigide est inséré par le flanc pour cathéteriser et perfuser l'oviducte. De la même façon, la corne utérine est perfusée au niveau de la jonction utéro-tubaire et le liquide de collecte est récupéré par aspiration directement dans la corne utérine (Besenfelder *et al.*, 1998) ou, plus simplement, dans la cavité vaginale (Mehaisen *et al.*, 2004; Mehaisen *et al.*, 2006).

Photo 1. Collecte d'embryons post-mortem

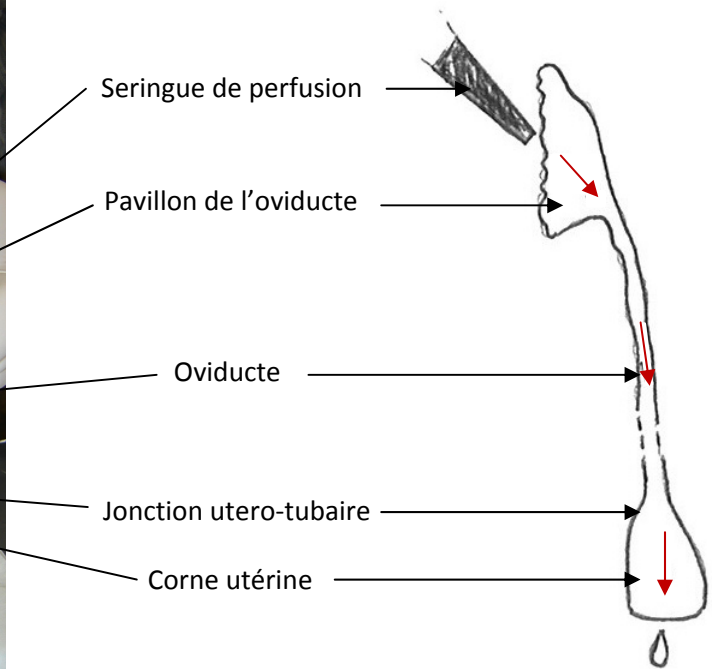
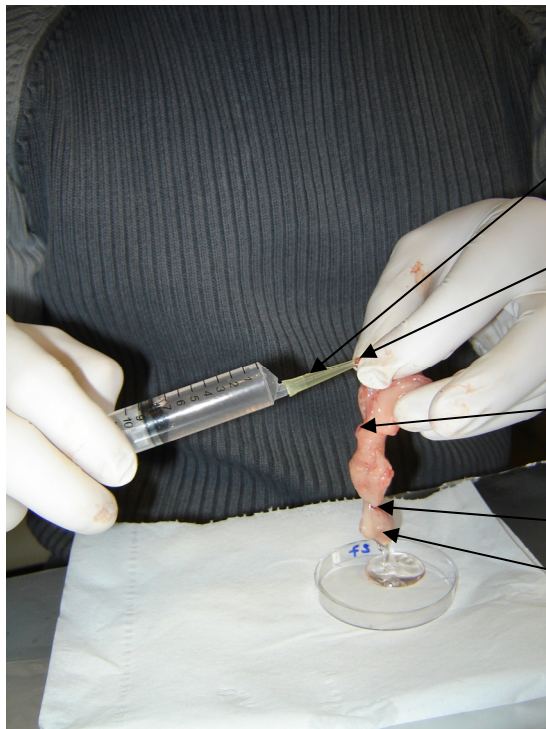
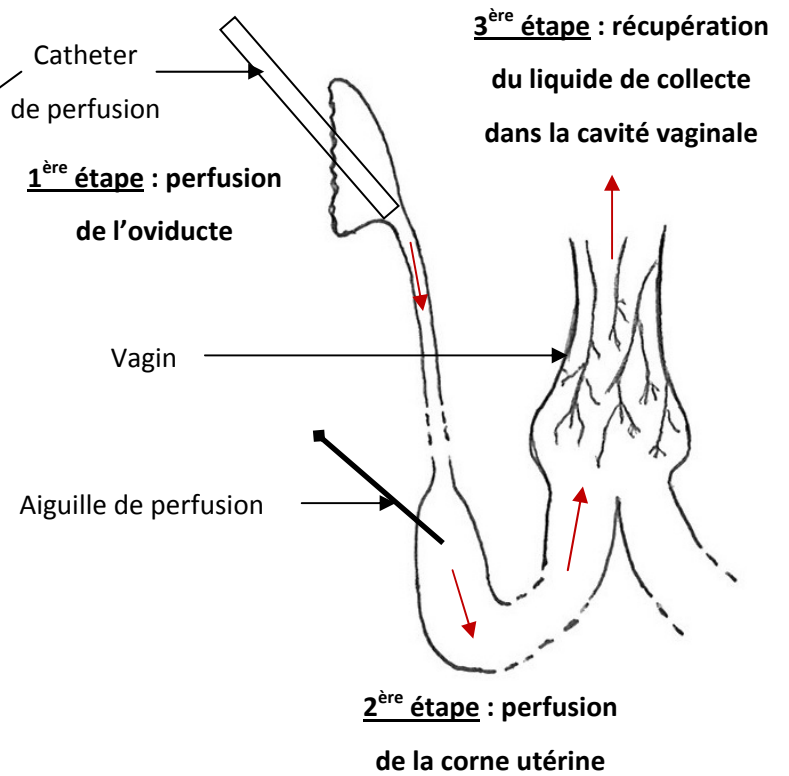
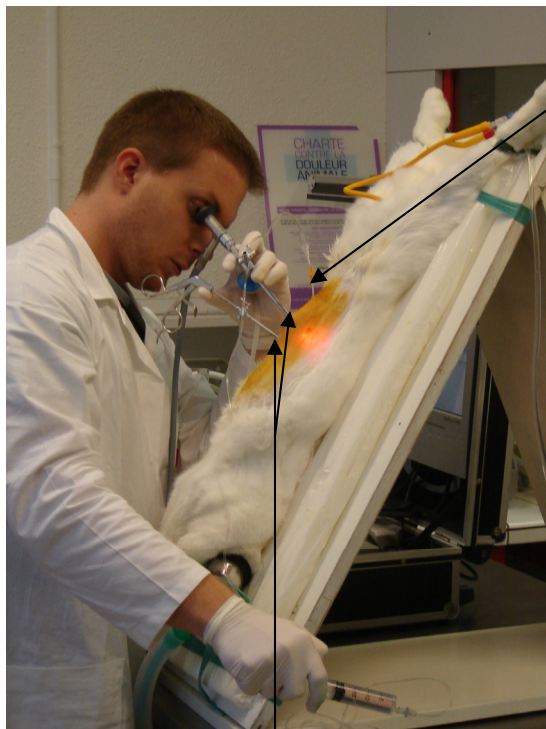


Photo 2. Collecte d'embryons sous cœlioscopie



Matériel endoscopique permettant la visualisation (optique) et la préhension (pince atraumatique) des organes

Parallèlement, des techniques de collecte par voie non chirurgicale ont été développées afin de pouvoir multiplier les collectes sur une même femelle tout en respectant le bien-être animal. La plupart de ces techniques sont basées sur l'utilisation de prostaglandines  $F_{2\alpha}$  administrées pour acheminer les embryons présents dans les oviductes et les cornes utérines en direction de la cavité vaginale où ils pourront être collectés de manière non invasive (Tsutsumi *et al.*, 1976; Takeda *et al.*, 1977; Takeda *et al.*, 1978; Takeda *et al.*, 1979; Tsutsumi *et al.*, 1979; Garnier *et al.*, 1986; Gajda *et al.*, 1988). Cependant, il a été montré que ces méthodes accélèrent le transit des embryons ce qui peut avoir des conséquences néfastes sur leur viabilité (Testart, 1969). Plus récemment, Kidder *et al.* (1999) ont mis au point une méthode de collecte par cathéterisation transcervicale et perfusions des cornes utérines sous visualisation endoscopique.

#### 1.2.5. Les différentes techniques de transfert d'ovocytes et d'embryons

Le premier transfert d'embryons réussi chez les mammifères a été réalisé par Walter Heape (1890) chez la lapine. Depuis ce succès, beaucoup d'études ont été menées chez les mammifères pour améliorer les taux de survie embryonnaire après transfert (Hahn, 1990). Le transfert embryonnaire comme l'insémination artificielle représente des outils de diffusion du progrès génétique efficaces avec tous les intérêts économiques et sanitaires qui en découlent. Le transfert d'embryons est utilisé chez plusieurs espèces domestiques pour multiplier la descendance de femelles à haute valeur génétique et donc augmenter l'efficacité d'un programme de sélection mais aussi comme outil de conservation de la diversité génétique en association avec la cryoconservation des embryons. Chez la plupart des mammifères, le facteur limitant au développement des techniques de transfert d'embryons est lié à la difficulté pour traverser le cervix et déposer les embryons directement dans le milieu utérin. Pour cela, le transfert d'embryons est majoritairement effectué par voie chirurgicale (photo 3) au niveau des oviductes ou des cornes utérines par laparotomie midventrale ou par le flanc (Chang, 1950; Maurer *et al.*, 1968b; Maurer et Foote, 1971; Techakumphu *et al.*, 1987; Torres *et al.*, 1987b; Carney et Foote, 1990; Tandle *et al.*, 1993).

Les embryons au stade morula ou blastocyste (65 à 72h *post coïtum*) seront transférés préférentiellement dans la corne utérine alors que les embryons plus jeunes seront transférés dans l'oviducte. Quel que soit le stade de développement, une attention particulière doit être portée à l'intégrité du manteau muqueux entourant l'embryon puisqu'il constitue un des facteurs limitant à la réussite des opérations de transfert chez le lapin (Carney et Foote, 1990; Kasai *et al.*, 1993).

Photo 3. Transfert d'embryons par laparotomie

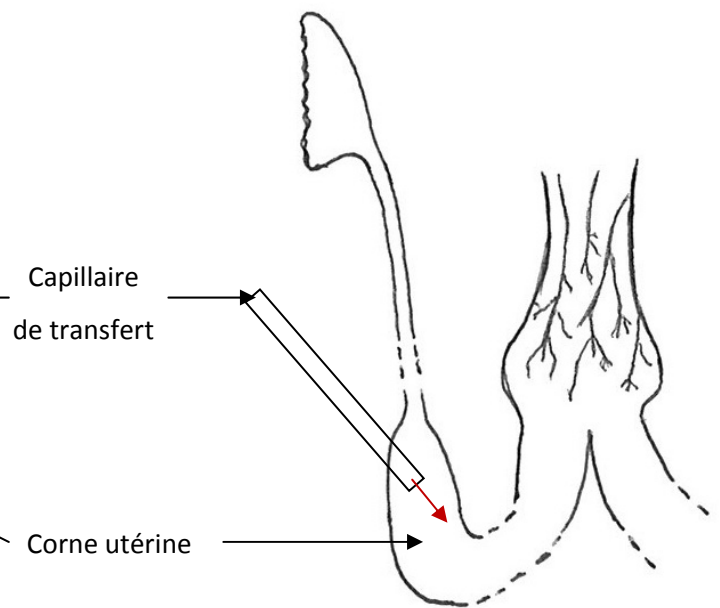
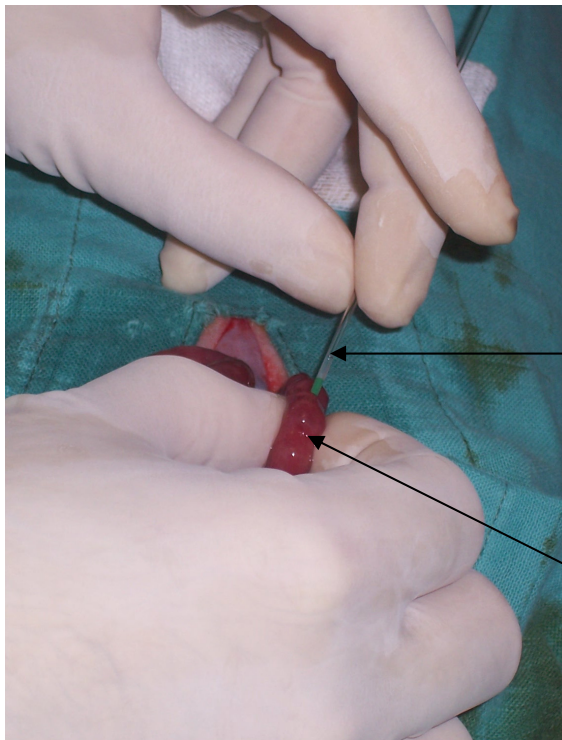
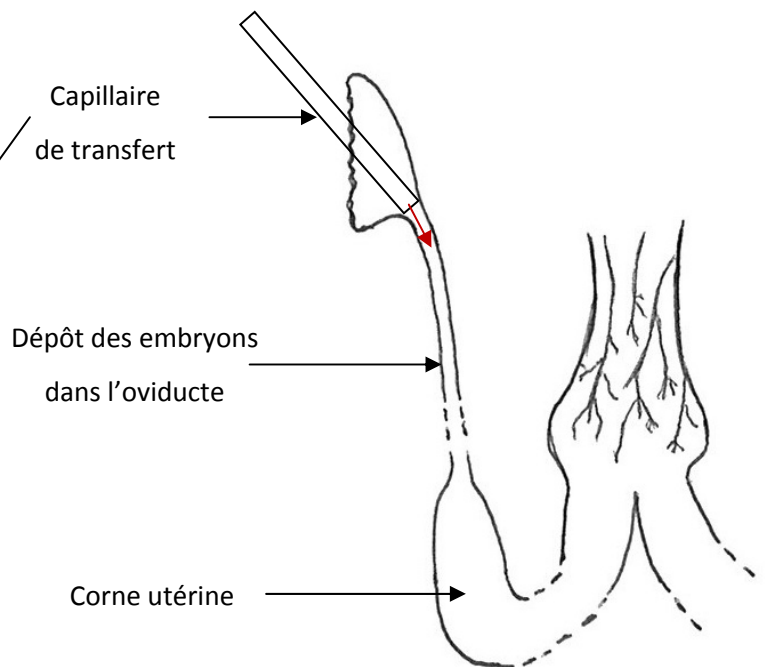


Photo 4. Transfert d'embryons sous coelioscopie



Optique de l'endoscope permettant la visualisation des organes

García-Ximenez *et al.* (1991) ont réalisé les premiers transferts d'embryons (64 à 66 h post insémination) sous coelioscopie au niveau des cornes utérines et ont obtenu un taux de gestation de 100 %. Deux ans plus tard, Besenfelder et Brem (1993) ont mis au point une technique de transfert des embryons sous contrôle endoscopique directement dans l'oviducte des lapines receveuses par insertion d'un cathéter veineux par l'infundibulum (photo 4). Le taux de gestation obtenu était de 86 % avec un taux de survie embryonnaire de 47 %. La coelioscopie a été reprise par Mehaisen *et al.* (2006) pour le transfert de 549 embryons vitrifiés ou non et a permis d'obtenir un taux de survie embryonnaire de 42,7 %.

Dans la même logique que pour le développement des techniques de collecte, certaines études ont été menées pour établir une technique de transfert par voie non chirurgicale. Déjà, Testart (1969) effectua, parmi d'autres techniques, le transfert transcervical d'embryons au stade utérin dans 12 lapines receveuses. Parmi elles, 8 ont été gestantes dont 3 ont développé des pyomètres. De plus, Besenfelder *et al.* (1998) ont réalisé le transfert transcervical, sous contrôle endoscopique, d'embryons au stade morula/blastocyste au niveau des cornes utérines de 23 lapines dont 10 sont devenues gestantes. En utilisant une technique similaire, Kidder *et al.* (1999) ont obtenu des taux de gestation de 80 % et un taux de survie embryonnaire de 20 % (23 lapereaux nés à partir de 116 embryons transférés).

Ainsi, nous avons vu dans cette première partie que la physiologie de la reproduction chez la lapine présente des spécificités dont il faut tenir compte pour les opérations de conservation des ressources génétiques chez cette espèce. Dans une deuxième partie, nous allons aborder les aspects de cryoconservation des ressources génétiques en faisant un état des lieux des techniques existantes chez le lapin.



## **II. Cryoconservation des ressources génétiques animales**

La cryoconservation désigne la conservation d'organes, de tissus ou de cellules à très basses températures (utilisation de l'azote liquide à  $-196^{\circ}\text{C}$ ) permettant de stopper le métabolisme cellulaire. A ces températures, les réactions chimiques seraient 8 millions de fois plus lentes qu'à  $0^{\circ}\text{C}$  et les échantillons biologiques ne seraient soumis qu'aux irradiations ionisantes dont les conséquences mutagènes sont négligeables à l'échelle des temps humain (Morris, 1981). La cryoconservation des tissus vivants, particulièrement prometteuse et intéressante, a depuis toujours passionné les scientifiques et représente aujourd'hui une discipline à part entière désignée sous le terme de « cryobiologie ». Bien en deçà du rêve d'immortalité, la cryopréservation présente de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, de l'agriculture ou encore de l'environnement.

La congélation d'organes, de tissus ou même de cellules isolées ouvre de formidables perspectives médicales avec des applications diverses et variées. Elle permettrait d'allonger le temps de conservation des organes en attente de greffe (48 à 72 h dans le cas des reins) pour la réalisation des tests de compatibilité donneur-receveur réduisant ainsi les risques de rejets. De plus, la conservation de différentes lignées cellulaires contribuerait au développement et à la mise au point de nouvelles solutions thérapeutiques pour la réparation d'organes ou de tissus endommagés (maladies neuro-dégénératives, grands brûlés...). Ces techniques permettraient aussi de préserver la fertilité des personnes soumises à des traitements stérilisant de type chimiothérapie ou radiothérapie.

D'un point de vue agronomique, la cryoconservation des cellules reproductrices des animaux domestiques permet la conservation à long terme des noyaux de sélection de manière sûre et efficace. Elle représente aussi un outil de gestion des cheptels intéressant pour les sélectionneurs qui bénéficient d'une plus grande rapidité d'adaptation face à une évolution des marchés ; il devient alors possible de « récupérer la génétique » des populations antérieures. De plus, ces techniques contribuent au développement des biotechnologies de la reproduction qui facilitent l'échange du matériel génétique au niveau international. La cryoconservation représente une alternative au transport d'animaux moins coûteux et plus sûre d'un point de vue sanitaire. La diffusion du progrès génétique est alors beaucoup plus rapide.

Enfin, la cryoconservation constitue un outil de sauvegarde et de gestion *ex-situ* de la diversité génétique animale (et végétale) complémentaire des programmes d'actions *in situ* menés directement dans l'habitat naturel des animaux. Chaque année, la Commission de Survie des Espèces de l'IUCN (International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources) publie une



« liste rouge » qui détermine les espèces animales menacées de disparition. Le nombre d'espèces de Vertébrés menacées d'extinction recensé par l'IUCN est en constante augmentation depuis les années 1990 et s'élève aujourd'hui à 5742 (IUCN, 2007) représentant 10 % des espèces décrites. Ainsi, la congélation des cellules reproductrices de ces animaux éviterait la perte définitive de certains gènes et permettrait la pérennisation des populations menacées par le raisonnement des accouplements.

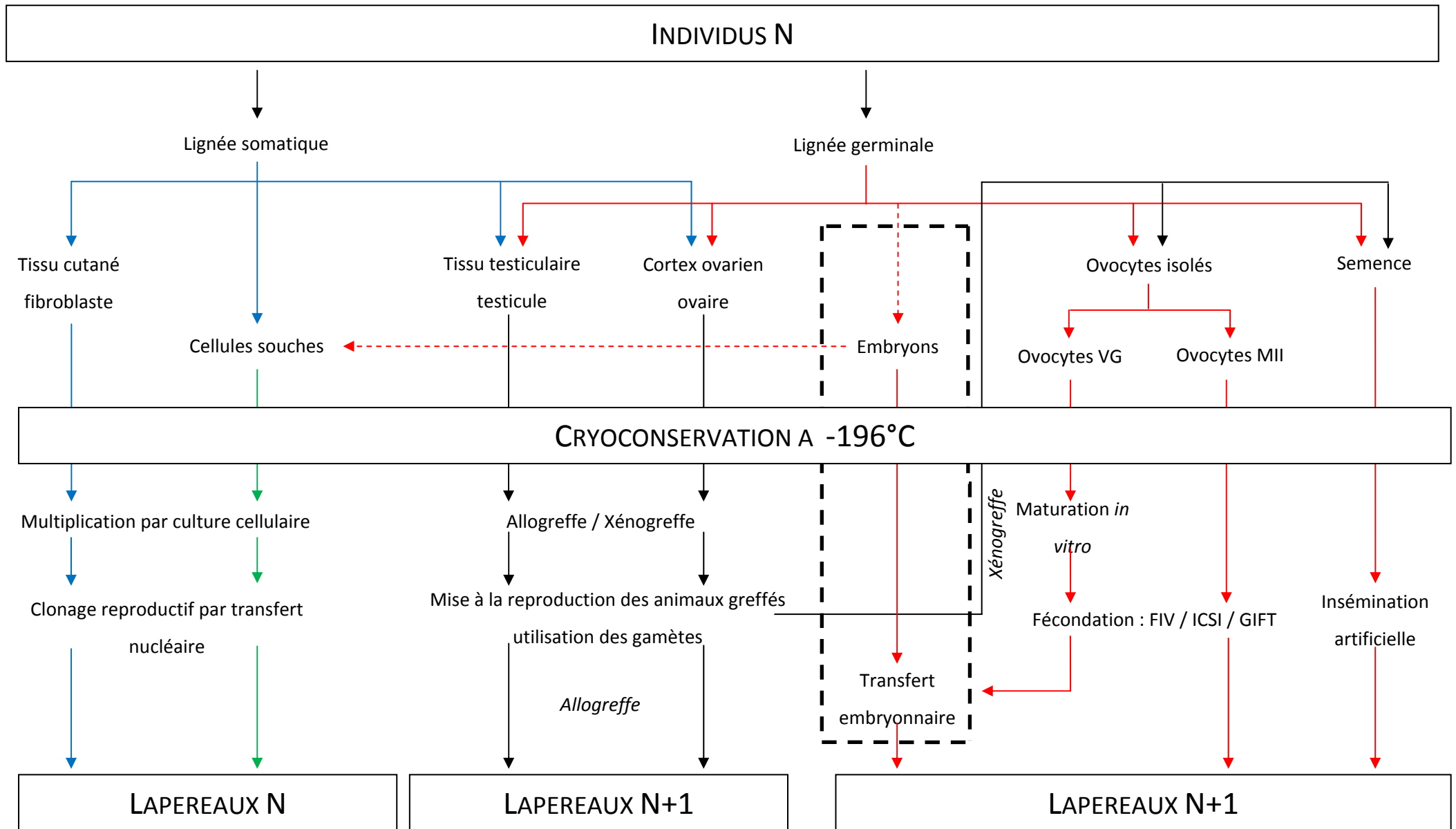
Il existe plusieurs voies possibles pour la cryoconservation des ressources génétiques (figure 8) qui sont complémentaires et qui présentent chacune leurs intérêts et leurs inconvénients. On distingue la lignée germinale (embryon, gamètes isolés ou au sein d'un tissu), la lignée somatique ou encore la voie des cellules souches qui peuvent être reprogrammées à partir de cellules germinales et somatiques. Chez le lapin, le matériel biologique privilégié pour la cryoconservation des ressources génétiques est l'embryon selon une méthode standardisée (Joly *et al.*, 1998). Cette technique ayant été largement décrite dans la bibliographie, nous nous contenterons ici de souligner les avantages et intérêts des autres voies de cryoconservation et particulièrement celle de l'ovocyte au stade MII. La congélation d'embryons nécessite, au préalable, la mise à la reproduction des femelles avec un raisonnement de leur accouplement. De ce fait, cette méthode n'est pas adaptée aux situations d'urgences (mort d'animaux précieux suite à une épizootie) ou à la sauvegarde du potentiel génétique d'un seul individu. Il apparaît donc aujourd'hui indispensable de développer de nouvelles voies de cryoconservation complémentaires à la congélation d'embryons pour une sauvegarde plus efficace de la diversité génétique chez cette espèce. La cryoconservation des voies mâles et femelles de manière complémentaire et indépendante permettra, à terme, une gestion beaucoup plus fine de la diversité génétique cunicole.

## **II.1. Principales voies de cryoconservation des ressources génétiques**

### **II.1.1. La voie mâle : semence et tissu testiculaire**

La conservation des ressources génétiques lapin par la voie mâle peut être envisagée avec différents outils utilisant directement la cryoconservation des spermatozoïdes matures en monospermie ou alors celle du tissu testiculaire (spermatozoïdes immatures) nécessitant une greffe pour retrouver la génétique de l'individu d'origine. En élevage cunicole, l'insémination artificielle est très largement utilisée par les éleveurs cunicoles (plus de 80 % des élevages ont une conduite en bande unique avec utilisation de l'IA) qui n'utilisent que de la semence fraîche ou réfrigérée à 4°C avec des durées de conservation n'excédant pas 48 heures.

Figure 8. Les différentes voies de cryoconservation des ressources génétiques animales



- - - Voie privilégiée chez le lapin

La congélation de la semence de lapin n'est encore aujourd'hui qu'au stade expérimental avec des résultats très variables d'un éjaculat à un autre (Salveti, 2004). Inspirées du modèle bovin pour lequel la semence congelée est largement utilisée par la filière, différentes écoles peuvent être distinguées pour la congélation de semence chez le lapin selon la nature des cryoprotecteurs utilisés (Andrieu et Courot, 1976; Chen *et al.*, 1989; Moce *et al.*, 2003) mais l'ensemble de ces études ont été menées de manière empirique sans une réelle définition des cinétiques de refroidissement et de réchauffement. Aujourd'hui, il est nécessaire pour la sauvegarde des ressources génétiques lapin de poursuivre les recherches sur la semence de manière plus précise et avec une approche pluridisciplinaire (Salveti, 2004). Même si le développement de l'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) permet l'utilisation de spermatozoïdes peu ou pas motiles avec succès (Daniel *et al.*, 2007), il convient de développer une technique de congélation permettant l'obtention d'une bonne fertilité après insémination en semence congelée. La cryoconservation du tissu testiculaire est une technique avantageuse qui pourrait être appliquée dans les situations d'urgence notamment dans le cas de mort d'un mâle prépubère précieux. Cette approche intéresse plus particulièrement les structures qui créent les reproducteurs parentaux des modèles transgéniques utilisés par l'industrie pharmaceutique. Actuellement, les résultats obtenus ne permettent pas d'envisager dès à présent cette technique comme une méthode de sauvegarde des ressources génétiques car les résultats obtenus varient d'une espèce à l'autre, particulièrement lorsque l'on considère le tissu testiculaire d'animaux sexuellement matures (Arregui *et al.*, 2008). Chez le lapin, des naissances ont pu être obtenues après xénogreffe de fragments testiculaires issus de lapins prépubères dans des testicules de souris immunodéprimées (Shinohara *et al.*, 2002).

### II.1.2. La voie femelle : ovocytes et tissu ovarien

La cryoconservation de la semence et des embryons est établie ou en passe de le devenir chez la plupart des animaux domestiques alors que la cryoconservation des gamètes femelles reste encore au stade expérimental notamment à cause d'obstacles techniques importants (Shaw *et al.*, 2000). Comme pour la voie mâle, la cryoconservation par la voie femelle concerne à la fois les ovocytes isolés à différents stades de maturation (stade VG ou vésicule germinative et stade MII ou métaphase de 2<sup>ème</sup> division méiotique) et à la fois le tissu ovarien regroupant l'ensemble du stock ovocytaire majoritairement au stade VG sous la forme de follicules principalement pré-antraux. Les ovocytes isolés peuvent être obtenus par perfusion du tractus génital après l'ovulation (stade MII) ou par ponction ovarienne avant (stade VG) ou après (stade VG à MII) la décharge de LH. Depuis quelques années, de nombreuses études ont été menées sur la cryoconservation du tissu ovarien (cortex ovarien, ovaire) et des ovocytes isolés notamment en médecine humaine compte tenu des

applications importantes pour les programmes d'AMP (Assistance Médicale à la Procréation). Ces travaux ont permis une nette amélioration des résultats illustrée par le nombre croissant de naissances issu d'ovocytes cryoconservés mais la variabilité des résultats est encore trop importante pour espérer son utilisation en routine. De la même façon, ces axes de recherche sont particulièrement intéressants et complémentaires pour la sauvegarde des ressources génétiques animales puisque la congélation du tissu ovarien serait un outil de sauvegarde utilisable dans les situations d'urgence alors que la cryoconservation des ovocytes isolés serait une technique utilisable en routine pour la conservation de la génétique d'individus isolés.

### **II.1.3. La voie du clonage : fibroblastes et cellules souches embryonnaires**

Actuellement, l'utilisation du clonage représente probablement la voie de sauvegarde des ressources génétiques la plus illusoire compte tenu des nombreux obstacles techniques qui restent encore à surmonter (Polgar et Dinnyes, 2008). Les recherches menées dans ce cadre visent principalement à développer un outil utilisable pour la construction et la multiplication des modèles transgéniques utilisés par l'industrie pharmaceutique et comme modèles pour la recherche fondamentale. Cette approche consiste à congeler des fibroblastes ou toutes autres cellules somatiques qui après décongélation et culture *in vitro* puissent être utilisées par clonage reproductif utilisant la technique de transfert nucléaire (Challah-Jacques *et al.*, 2003).

De la même façon, l'utilisation de cellules souches capables de s'auto-renouveler indéfiniment sans perte de leur totipotence pourrait là encore servir à l'établissement de clones. Chez le lapin, le problème réside dans la production des lignées de cellules souches stables qui puissent être cultivées facilement et indéfiniment. A ce jour, seulement deux équipes chinoises ont réussi à isoler de telles colonies qui se révèlent très sensibles aux conditions de culture (nature et concentration des MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts), nature du milieu, intervalles de repiquage...) se traduisant par une différenciation rapide associée à la perte de leur totipotence (Fang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007; Chiang *et al.*, 2008).

## **II.2. La cryoconservation de l'ovocyte MII : avantages et inconvénients**

Actuellement, la cryoconservation des ovocytes au stade MII représente une voie intéressante de sauvegarde par la voie femelle. En comparaison avec les autres formes de conservation des gamètes femelles, les ovocytes MII présentent en théorie de nombreux avantages mais la pratique soulève un certain nombre de limites qui posent encore problème pour le développement de ces techniques (Jain et Paulson, 2006).

### II.2.1. Cryoconservation des ovocytes isolés ou des embryons ?

La cryoconservation des ovocytes permet de conserver l'hérédité cytoplasmique et de différer le raisonnement de l'accouplement et de leur fécondation. Ainsi, l'utilisation d'ovocytes isolés assurerait une gestion beaucoup plus fine des ressources génétiques animales grâce à la conservation de la génétique d'un seul individu et non d'un couple de reproducteurs. Cet aspect touche plus particulièrement les espèces sauvages ou menacées d'extinction chez lesquelles les accouplements sont rendus difficiles (Shaw *et al.*, 2000). En médecine humaine, cette technique représente une solution idéale pour les femmes célibataires ou les adolescentes risquant une stérilité. En cas de séparation conjugale, la cryoconservation d'ovocytes et de semence lève les problèmes juridiques concernant la notion de propriété des embryons surnuméraires. De plus, cette technique permettrait de s'affranchir des problèmes éthiques qui entourent la manipulation et la congélation des embryons surnuméraires condamnées et parfois interdites dans certains pays comme l'Italie (Heng, 2007).

Les premiers essais de congélation d'ovocytes MII ont été réalisés chez la souris (Whittingham, 1977), le rat, le hamster et la gerbille (Parkening et Chang, 1977). Chez l'Homme, il aura fallu attendre jusqu'en 1986 pour compter les premières naissances obtenues à partir d'ovocytes tubaires congelés selon des protocoles proches de ceux utilisés pour les embryons (Chen, 1986). Alors que la congélation d'embryons est maintenant largement utilisée en médecine humaine dans les programmes d'aide à la procréation ou comme outil de diffusion du progrès génétique en élevage, aucune technique standardisée de cryoconservation des ovocytes isolés n'a encore vu le jour. Ceci s'explique par la variabilité et la faiblesse des résultats obtenus toutes espèces confondues (Gosden, 2005). Alors quels sont les éléments structuraux ou fonctionnels qui diffèrent des embryons et qui rendent la congélation des ovocytes si délicate ?

Rappelons qu'il existe pour les embryons des outils d'évaluation morphologiques « efficaces » (homogénéité des blastomères, intégrité de la zone pellucide...) permettant d'écarter les embryons de mauvaise qualité avant congélation. L'évaluation de la qualité ovocytaire est beaucoup plus délicate et représente un défi majeur à relever pour augmenter les taux de succès (Coticchio *et al.*, 2005; Wang et Sun, 2007). S'il existe des critères morphologiques comme la compacité des cellules du cumulus ou l'homogénéité du cytoplasme, ils ne reflètent pas nécessairement la compétence des ovocytes à être fécondés et à se développer (Coticchio *et al.*, 2004; Wang et Sun, 2007). Les avancées réalisées en matière de maturation (nucléaire et cytoplasmique) ovocytaire et de développement précoce sont notables mais encore insuffisantes pour établir des critères d'évaluation de la qualité ovocytaire permettant à la fois d'écarter les

ovocytes de mauvaise qualité avant cryoconservation mais aussi de disposer d'outils pour apprécier l'efficacité des techniques testées.

Les difficultés rencontrées avec les ovocytes pourraient être liées à la grande taille de cette cellule qui est la plus grande cellule de l'organisme (Coticchio *et al.*, 2004; Gosden, 2005). De ce fait, le faible ratio surface/volume rend les échanges avec le milieu extracellulaire beaucoup plus lents ce qui conduit à des difficultés pour déshydrater les ovocytes les exposant beaucoup plus au phénomène de cristallisation intracellulaire (Fabbri *et al.*, 2000). La forte teneur en eau des ovocytes constitue un compartiment cellulaire très peu conducteur lors des transferts de chaleur associés à la descente ou à la remontée en température (coefficient de conductivité  $\lambda=0,556$  W/m/K). Ainsi, la descente et la remontée en température sont aléatoires et difficilement maîtrisables pour les ovocytes ce qui constitue un élément de réponse concernant la variabilité des résultats obtenus après réchauffement. Enfin, l'ovocyte est une cellule très riche en lipides augmentant encore sa sensibilité au froid (Gosden, 2005). Cependant, la taille de la cellule et le contenu lipidique ne seraient pas la raison principale des difficultés rencontrées puisque la congélation des embryons une cellule au stade deux pronucléus donne de meilleurs résultats bien que leurs caractéristiques soient assez proches de celles des ovocytes (Siebzehnruebl *et al.*, 1989).

A la différence des ovocytes, la tolérance des embryons à la congélation tient aussi dans les nombreuses cellules totipotentes qui le constituent. Si des cellules sont altérées lors du processus de congélation et de décongélation, la survie de l'embryon ne sera compromise que si la proportion de cellules atrétiques est relativement élevée. De plus, la majorité des cellules embryonnaires sont en interphase cellulaire leur conférant une cryotolérance beaucoup plus élevée que les ovocytes isolés bloqués en première ou en deuxième division méiotique (Chen *et al.*, 2003).

Enfin, il existe des différences au niveau des caractéristiques de la membrane plasmique qui modifient leur tolérance à la cryoconservation. Après la fécondation, l'augmentation transitoire du calcium intracellulaire libre modifie les forces ioniques et le potentiel de membrane de la membrane plasmique. De plus, les filaments d'actine se densifient et changent de conformation en région sous membranaire. Ces changements assurent une meilleure déshydratation et une réduction des risques de cristallisation qui contribuent à une plus grande tolérance des embryons aux variations osmotiques.

Les protocoles de cryoconservation utilisés pour les embryons ne sont donc pas adaptés aux caractéristiques des ovocytes et doivent être modifiés notamment en augmentant les temps d'exposition aux cryoprotecteurs (Chen *et al.*, 2003).

## II.2.2. Cryoconservation des ovocytes isolés ou du tissu ovarien ?

En théorie, les ovocytes MII sont des cellules isolées dont la congélation est plus aisée que celle du tissu ovarien, de composition très hétérogène, avec la présence de différents types cellulaires (fibroblastes, ovocytes, cellules folliculaires, capillaires sanguins...) présentant chacun une sensibilité particulière à la cryoconservation. La congélation du tissu ovarien nécessite obligatoirement un protocole de cryoconservation qui soit un compromis entre les besoins de chaque type cellulaire. De plus, l'utilisation du tissu ovarien congelé/décongelé nécessite obligatoirement une greffe après réchauffement pour récupérer la génétique de l'individu d'origine. La greffe constitue une étape délicate notamment en termes de complications post-chirurgicales (ischémie, développement d'adhérences...). Chez la lapine, des lapereaux ont pu être obtenus après autogreffe de cortex ovariens congelés sur des femelles receveuses ovariectomisées avec des résultats proches du témoin frais (autogreffe de cortex ovarien non cryoconservé) soulignant la technique de greffe comme facteur limitant de la technique, notamment en ce qui concerne la maîtrise de l'ischémie (Almodin *et al.*, 2004; Neto *et al.*, 2008).

Cependant, La congélation du tissu ovarien présente l'avantage de conserver en une seule opération, sans stimulation préalable et à tout moment du cycle sexuel, l'ensemble de la réserve ovarienne d'un individu regroupant des milliers de follicules immatures. Cette technique représente un grand espoir pour la préservation de la fertilité des femmes amenées à subir des traitements stérilisants particulièrement pour les individus prépubères. Dans ces situations, la greffe est une autogreffe qui est réalisée après réchauffement du fragment ovarien sans risque de rejet du greffon. Pour la conservation des ressources génétiques animales, cette technique est complémentaire à la cryoconservation des gamètes isolés à réserver aux situations d'urgence, notamment en cas de mort d'un animal sauvage ou précieux. Les perspectives d'utilisation des fragments ovariens sont alors différentes et plus délicates puisqu'elles nécessitent une allogreffe ou une hétérogreffe pour récupérer le potentiel reproducteur de l'individu d'origine avec les risques de rejet du greffon. L'utilisation d'animaux immunodéprimés comme les souris SCID® permet de s'affranchir de réactions immunitaires mais entraîne une lourdeur et un coût d'exécution beaucoup plus importants. De plus, l'absence de modèle de lapins immunodéprimés ne permet pas l'utilisation d'allogreffes. Cet aspect représente un frein important à l'utilisation de cortex ovarien congelé en tant que matériel biologique stocké à la Cryobanque Nationale. Si les coûts de congélation ne sont pas très élevés, les coûts engagés pour la xénogreffe et la récupération d'ovocytes sont très importants. Ainsi, même si la congélation de tissu ovarien permet de conserver l'ensemble des potentialités de reproduction d'un individu post-mortem, elle semble être moins adaptée à l'espèce lapin que la cryoconservation

d'ovocytes isolés. Cependant, la congélation de cortex ovarien chez le lapin nécessite d'être développée en tant que modèle pour l'application de ces techniques chez la femme ou chez les animaux sauvages.

### II.2.3. Cryoconservation des ovocytes au stade VG ou MII ?

La majorité des ovocytes de la réserve ovarienne est immature, dans un état plus ou moins quiescent avec un blocage en prophase de première division méiotique. Leur matériel génétique est alors décondensé, regroupé dans un noyau ovocytaire appelé vésicule germinative (ovocyte au stade VG). Lors des vagues folliculaires, les ovocytes recrutés subissent une phase de maturation cytoplasmique et nucléaire avant d'être expulsés dans le pavillon de l'oviducte et d'être fécondés. La maturation ovocytaire représente un phénomène indispensable à l'acquisition de la compétence ovocytaire incluant notamment la reprise de la méiose jusqu'au stade de métaphase de la deuxième division méiotique (formation du fuseau méiotique), la migration des granules corticaux sous la membrane plasmique ou encore la synthèse des transcrits maternels assurant les premiers stades de développement du futur l'embryon. Après ovulation, on parle alors d'ovocytes MII ou compétents (ovocyte au stade MII). Les ovocytes VG et MII diffèrent par un certain nombre de caractéristiques structurales ou métaboliques qui leurs confèrent une tolérance plus ou moins grande vis-à-vis de la cryoconservation (Shaw *et al.*, 2000). Nous avons vu précédemment que la cryoconservation des ovocytes isolés présente de nombreux avantages chez le lapin mais quel est le stade de maturation le plus adapté pour une gestion efficace des ressources génétiques cynicoles ?

A la différence des ovocytes MII, les ovocytes VG cryoconservés nécessitent une phase de maturation *in vitro* qui est encore loin d'être maîtrisée notamment parce que les mécanismes de maturation *in vivo* restent encore mal connus (Gilchrist et Thompson, 2007). En effet, la maturation ovocytaire soulève encore beaucoup d'interrogations tant les mécanismes de régulation semblent complexes et imbriqués et même si des progrès notables ont été réalisés en maturation *in vitro* (Wynn *et al.*, 1998), elle reste néanmoins une étape coûteuse et délicate qui est préjudiciable pour la qualité des ovocytes (Krisner, 2004) et des embryons obtenus *in vitro* (Pomar *et al.*, 2005; Lonergan et Fair, 2008). Certains auteurs ont montré que les taux de maturation et de développement embryonnaires sont plus élevés lorsque les cellules du cumulus conservent leurs jonctions avec l'ovocyte (Ruppert-Lingham *et al.*, 2003; Coticchio *et al.*, 2004). Or, les jonctions ovocytes-cumulus semblent fortement altérées par les procédés de cryoconservation limitant ainsi les taux de maturation des ovocytes cryoconservés par rapport aux témoins frais (Ruppert-Lingham *et al.*, 2003). Ces différences de résultats sont probablement liées à une diffusion limitée des cryoprotecteurs à



travers le cumulus et donc à des difficultés d'équilibration des différents types cellulaires (Gosden, 2005).

Cependant, les ovocytes MII sont des cellules rares de l'organisme qui nécessitent une stimulation hormonale pour initier le recrutement ovocytaire et l'ovulation. Les ovocytes VG présentent quant à eux l'avantage de pouvoir être collectés à tout moment du cycle, sans stimulation préalable, par simple ponction folliculaire ce qui rend leur collecte moins contraignante et utilisable en situation d'urgence. De plus, le stade de blocage des ovocytes MII en métaphase de deuxième division méiotique représente un inconvénient majeur par rapport aux ovocytes au stade VG. Coticchio *et al.* (2004) expliquent que les problèmes de développement des ovocytes MII après réchauffement sont dus à une exocytose précoce des granules corticaux sous membranaires et à une altération du fuseau méiotique.

Plusieurs études ont montré que l'exposition des ovocytes MII à des concentrations élevées en cryoprotecteurs entraînait un influx de calcium intracellulaire provoquant l'exocytose prématurée des granules corticaux sous membranaires (Fuku *et al.*, 1995; Matson *et al.*, 1997). Ce phénomène est semblable à celui qui se déroule normalement après la fécondation pour initier le durcissement de la zone pellucide et empêcher la polyspermie (Ducibella, 1996; Wessel *et al.*, 2001). Les ovocytes MII cryopréservés seraient alors activés de manière trop précoce expliquant ainsi les développements parthénogénétiques de certains d'entre eux et entraînant un durcissement de la zone pellucide (phénomène dit de « zona hardening ») qui rend toute fécondation difficile (Fuku *et al.*, 1995; Matson *et al.*, 1997; Gardner *et al.*, 2007).

Le processus de cryoconservation induit des altérations du fuseau méiotique pour les ovocytes MII de vache (Aman et Parks, 1994; Saunders et Parks, 1999; Albarracin *et al.*, 2005b), de truie (Rojas *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007), de souris (Chen *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2008), de lapine (Vincent *et al.*, 1989; Cai *et al.*, 2005), de brebis (Succu *et al.*, 2007a) et de femme (Boiso *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Mandelbaum *et al.*, 2004). Celui-ci joue un rôle primordial pendant et après la fécondation puisqu'il permet la formation du deuxième globule polaire par ségrégation des chromosomes, la migration des pronuclei ou encore la formation du premier fuseau mitotique (Schatten *et al.*, 1985). Au niveau structural, le fuseau méiotique est constitué de microfilaments de tubuline (polymérisation de dimères  $\alpha$  et  $\beta$ ) organisés en forme de tonneau et présentant dans un plan équatorial l'alignement des chromosomes en attente de ségrégation (Zhou *et al.*, 2002). Plusieurs études ont mis en évidence que la cryoconservation des ovocytes altère le cytosquelette ovocytaire et entraîne la dépolymérisation des microfilaments de tubuline conduisant dans certains cas à une disparition totale du fuseau méiotique (Rienzi *et al.*, 2004). La dépolymérisation des

dimères de tubulines induit une mauvaise ségrégation des chromosomes se traduisant par de fortes proportions d'aneuploïdie ou de polyploïdie après fécondation qui empêche toute poursuite du développement embryonnaire (Eroglu *et al.*, 1998). Ces altérations seraient principalement dues à l'exposition des ovocytes à de fortes concentrations en cryoprotecteurs (Johnson et Pickering, 1987) ainsi qu'à des températures basses (Magistrini et Szollosi, 1980; Pickering et Johnson, 1987). Ainsi, il a été montré chez plusieurs espèces que l'exposition des ovocytes à des températures inférieures à la température corporelle altère le fuseau méiotique et diminue les taux de développement après fécondation (Martino *et al.*, 1996; Zenzes *et al.*, 2001; Songsasen *et al.*, 2002). L'ovocyte de lapin semblerait moins sensible au refroidissement puisque aucune altération des fuseaux méiotiques n'était observée après 30 minutes d'exposition à température ambiante (Vincent *et al.*, 1989).

Finalement, les études menées sur la cryoconservation des ovocytes MII et VG montrent qu'il est difficile de définir avec certitude quel est le stade de maturation le plus adéquat pour la conservation des ressources génétiques d'une espèce donnée. La plupart des travaux soulignent que la cryoconservation des ovocytes au stade MII donne des résultats plus satisfaisants que le stade VG (Lim *et al.*, 1992; Kubota *et al.*, 1998; Luvoni et Pellizzari, 2000; Shaw *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2004; Ledda *et al.*, 2007) dont le principal problème serait l'altération du cytoplasme (Ambrosini *et al.*, 2006). Or, d'autres auteurs ont montré que la forme VG des ovocytes était la plus adaptée notamment chez la femme (Boiso *et al.*, 2002) ou la truie (Wu *et al.*, 2006). Chez le lapin, compte tenu des difficultés de maturation des ovocytes *in vitro* et de l'intensité d'ovulation des femelles, les ovocytes MII semblent être la voie à privilégier pour la cryoconservation en routine des ressources génétiques lapin (RGL). L'utilisation des ovocytes MII est peu adaptée aux situations d'urgence mais cet aspect ne semble par primordial pour l'espèce lapin et concerne plus directement les espèces sauvages. Par conséquent, nous ne nous intéresserons par la suite qu'à ce stade de maturation en essayant de dresser un état des lieux et des perspectives d'amélioration de la cryoconservation des ovocytes MII chez le lapin.

### **II.3. La cryoconservation de l'ovocyte MII chez le lapin : état des lieux et perspectives**

Dans le cadre de la gestion *ex situ* des RGL, nous avons vu que l'ovocyte MII est une forme de matériel biologique adaptée pour la cryoconservation chez la lapine. Dès lors, il s'agit de dresser un tour d'horizon des travaux déjà réalisés sur la cryoconservation de l'ovocyte MII de lapin pour mettre en évidence les principales améliorations à apporter pour en faire un outil de sauvegarde des RGL utilisable à la Cryobanque Nationale.

### II.3.1. Etat des lieux sur la cryoconservation de l'ovocyte MII de lapin

Contrairement aux autres espèces domestiques ou à l'Homme, peu de travaux ont été réalisés sur la cryoconservation de l'ovocyte MII de lapin. Le travail le plus ancien est de celui de Al-Hasani *et al.* (1986b) où les auteurs ont congelé des ovocytes de lapines à 6, 9 et 12 heures après induction de l'ovulation et selon une cinétique proche de celle utilisée pour la congélation des embryons. Ces travaux sont à considérer avec précaution puisque les ovocytes collectés par ponction avant l'ovulation n'étaient probablement pas tous MII expliquant ainsi la faiblesse des taux de survie à la décongélation et des taux de développement obtenus après FIV (1 blastocyste obtenu à partir de 30 ovocytes intacts). Par la suite, Diedrich *et al.* (1988) reproduisaient une expérience similaire aboutissant à des résultats très proches. Un an plus tard, Al-Hasani *et al.* (1989) ont réalisé une étude proche de celle menée en 1986 en remplaçant le DMSO par le propylène glycol et en ne congelant que des ovocytes MII collectés *in vivo* 13 heures après l'induction d'ovulation. Les résultats sont alors légèrement améliorés et conduisent à la naissance de 4 lapereaux représentant seulement 0,42 % des ovocytes cryoconservés.

La même année, deux autres travaux sur la congélation d'ovocytes MII de lapin ont vu le jour. Siebzehnuebl *et al.* (1989) ont testé différents protocoles de cryoconservation en faisant varier la cinétique de congélation, la nature du cryoprotecteur ou encore les modalités de déshydratation des ovocytes. L'utilisation du DMSO et d'une température intermédiaire de -110°C ont abouti à 64 % de taux de survie après décongélation dont 75,4 % se sont développés après FIV. Là encore, les résultats sont à interpréter avec précaution car les auteurs ne précisent pas le stade de développement atteint par les ovocytes fécondés.

Enfin, Vincent *et al.* (1989) ont utilisé une technique de congélation rapide associant une cinétique de refroidissement plus élevée et une déshydratation plus importante des ovocytes. Ces auteurs ont montré que l'exposition des ovocytes aux cryoprotecteurs (DMSO ou propylène glycol) entraîne une dépolymérisation du fuseau méiotique qui peut, dans certains cas, se reformer après réchauffement et culture *in vitro*. De plus, l'incubation des ovocytes en présence de propylène glycol semble fortement altérer les microfilaments d'actine qui jouent le rôle de cytosquelette indispensable pour l'ancrage du fuseau méiotique à la membrane plasmique. L'utilisation de la fécondation *in vivo* d'ovocytes congelés en présence de propylène glycol a permis d'atteindre un taux de 9 % de fœtus implantés au 25<sup>ème</sup> jour de gestation (9 fœtus viables sur 105 ovocytes transférés dans 10 femelles receveuses).

Il a fallu attendre plus de 15 ans pour voir une nouvelle étude portant sur la cryoconservation des ovocytes MII de lapin. En 2005, Cai *et al.* ont obtenu des résultats prometteurs en utilisant la

vitrification avec des taux de survie à la décongélation allant jusqu'à 83,1 % et une très bonne préservation du fuseau méiotique (63 % des ovocytes cryoconservés présentaient un fuseau méiotique intact). Cependant, ces taux chutent fortement après ICSI où les taux de survie n'atteignent que 15,3 % et les taux de clivage de 2,3 % par rapport au nombre d'ovocytes vitrifiés !

Les travaux réalisés montrent que la cryoconservation des ovocytes MII chez le lapin est encore bien éloignée d'une application en routine. En se basant sur les travaux réalisés chez les autres espèces domestiques et chez l'homme, il est maintenant nécessaire de s'interroger sur les différentes stratégies d'amélioration de la survie des ovocytes cryoconservés.

### II.3.2. Cryoconservation de l'ovocyte MII de lapin : quels défis ?

L'amélioration de la survie ovocytaire après cryoconservation n'est possible que par l'optimisation de nombreuses étapes allant de la préparation des femelles donneuses d'ovocytes jusqu'à leur transfert dans des femelles receveuses après FIV ou ICSI en passant par l'étape de cryoconservation proprement dite. En se basant sur les travaux menés chez d'autres animaux domestiques, nous allons essayer d'identifier les étapes critiques qui pourraient permettre d'améliorer la cryoconservation des ovocytes chez cette espèce.

#### II.3.2.1. Production et collecte

L'évaluation de la production d'embryons en fonction de la nature des traitements de superovulation appliqués aux femelles donneuses a fait l'objet de nombreuses publications. Bien que la qualité des embryons soit étroitement liée à la qualité des ovocytes (Sirard *et al.*, 2006; Wang et Sun, 2007), aucune étude similaire n'a été menée sur la qualité des ovocytes. Chez le lapin, nous avons vu précédemment que les traitements de superovulation conduisent souvent à des défauts de fécondation mettant en évidence un effet probable sur la maturation ovocytaire. Les ovocytes sont souvent collectés le plus tôt possible après ovulation de manière à minimiser les risques d'atrésie ou d'activation parthénogénétique des ovocytes plus âgés. Chez la lapine, la collecte est souvent réalisée 12 à 15 h après l'induction d'ovulation.

L'influence de la méthode de collecte utilisée sur la qualité ovocytaire n'a pas été étudiée et aucun effet n'a été montré en production d'embryons. Cependant, les ovocytes étant très sensibles aux variations physico-chimiques, la collecte *post-mortem* semble être la plus adaptée pour une collecte sûre et rapide tout en limitant les variations de température et de milieu.

Souvent, les ovocytes sont cryoconservés après isolement des cellules du cumulus de manière mécanique ou enzymatique pour faciliter leur manipulation et améliorer les échanges osmotiques lors de leur cryoconservation. L'influence des cellules du cumulus sur la réussite des techniques de cryoconservation est encore sujet à controverses (Fabbri *et al.*, 2000). Certains auteurs soulignent leur effet protecteur (Imoedemhe et Sigure, 1992; Im *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2001; Ruppert-Lingham *et al.*, 2003) alors que d'autres auteurs observent un effet négatif (Hyttel *et al.*, 2000; Modina *et al.*, 2004; Fujihira *et al.*, 2005; Bogliolo *et al.*, 2007). Cependant, il est clairement établi que la cryoconservation altère fortement les jonctions entre les cellules du cumulus et l'ovocyte (Vincent *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 2006) et que l'un des problèmes majeurs pour la cryoconservation des ovocytes est le faible ratio surface/volume qui limite les échanges osmotiques et la déshydratation cellulaire (Chen *et al.*, 2003). Par conséquent, il semble théoriquement plus approprié d'isoler les ovocytes avant cryoconservation.

Enfin, des études récentes ont montré que des ovocytes soumis à de fortes pressions hydrostatiques avant cryoconservation avaient une tolérance plus élevée que les ovocytes témoins (Pribenszky *et al.*, 2004; 2005; Du *et al.*, 2008; Pribenszky *et al.*, 2008). De plus, il est nécessaire de maintenir les ovocytes collectés sur platine chauffante à des températures proches des températures physiologiques pour minimiser les risques de désorganisation du fuseau méiotique. Comme nous l'avons vu, les ovocytes sont très sensibles au refroidissement bien qu'il ait été montré que l'incubation d'ovocytes MII de lapin pendant 30 minutes à température ambiante n'a aucun effet sur l'organisation du fuseau méiotique (Vincent *et al.*, 1989).

### II.3.2.2. Cryoconservation

Les ovocytes peuvent être cryoconservés par congélation lente ou par une technique plus récente qui a été développée de manière prometteuse pour palier à la sensibilité de certains types cellulaires (ovocytes...) ou à la complexité de certains systèmes biologiques (tissus, organes...). Ce procédé repose sur l'utilisation des cryoprotecteurs en concentrations élevées (5 à 7 M), de durées d'exposition très courtes et de vitesses de refroidissement importantes. Il s'agit de la technique de « vitrification » qui consiste à figer les solutions aqueuses dans un état solide sans cristal de glace (état amorphe) possédant une très haute viscosité ( $>10^{13}$  poises) qui l'apparente à un verre. A titre d'exemple, la vitrification de l'eau pure nécessite d'utiliser des vitesses de refroidissement de l'ordre de 1 000 000°C/sec, vitesse impossible à obtenir (Rall, 1987). Heureusement, l'utilisation de fortes concentrations en cryoprotecteurs et la présence de sels minéraux et de substances organiques sous forme dissoute dans l'eau cellulaire permet d'abaisser les vitesses de refroidissement nécessaires

pour leur vitrification. L'utilisation de la paillette standard d'une capacité de 0,25 ml permet d'atteindre des vitesses de refroidissement de l'ordre de 1 500 à 2 000°C/min quand elle est plongée directement dans l'azote liquide (Matsumoto *et al.*, 2001; Camus *et al.*, 2006). De nombreuses études ont porté sur l'augmentation des cinétiques de refroidissement afin de passer plus rapidement les zones de températures critiques mais aussi de diminuer les concentrations en cryoprotecteurs utilisées et donc de diminuer la toxicité des milieux de vitrification. Pour répondre à cet objectif, plusieurs axes ont été développés avec notamment la diminution des volumes de solution à vitrifier et l'augmentation des transferts de chaleur entre l'échantillon et l'azote liquide.

- La vitrification dite « Open Pulled Straw » utilisant des paillettes classiques étirées de façon à diminuer l'épaisseur de sa paroi et la taille de l'échantillon (2 µl versus 250 µl pour la paillette standard) prélevé par capillarité (Vieira *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2006). Cette technique permet d'atteindre des vitesses de l'ordre de 18 000°C/min (Camus *et al.*, 2006) qui ont pu être augmentées en diminuant l'épaisseur de la paroi et le volume prélevé, on parle alors de paillettes SOPS (pour Super OPS). D'autres techniques reposent sur un contact direct entre l'échantillon et l'azote liquide pour augmenter encore les vitesses de refroidissement :
- La technique « Cryoloop » permet de maintenir les cellules dans un film de solution de vitrification (<1 µl) formé à l'intérieur d'une boucle de nylon (Cai *et al.*, 2005; Naik *et al.*, 2005; Larman *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2006; Succu *et al.*, 2007b).
- La technique "Minimum Drop Size" qui consiste à déposer des gouttelettes (0,1 à 0,5 µl) de solution de vitrification contenant les cellules sur une lamelle de verre avant de la plonger directement dans l'azote liquide (Arav et Zeron, 1997).
- Sur le même principe, la vitrification sur surface solide utilise comme support une feuille d'aluminium (Gasparrini *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2007).
- Le système utilisant une paillette standard de 0,25 ml coupée à son extrémité pour pouvoir déposer une micro-gouttelette de 0,3 µl sur la surface interne de la paroi (Vanderzwalmen *et al.*, 2003).
- Afin d'augmenter la surface d'échange de chaleur lors de la plongée dans l'azote liquide, les cellules peuvent être déposées sur des grilles de microscopie électronique avec des pores d'environ 50 µm (Park *et al.*, 2001).
- Enfin la technique du « Cryotop » permet de diminuer le volume des échantillons vitrifiés à des volumes inférieurs à 0,1 µl (Fujihira *et al.*, 2005; Kuwayama, 2007).
- Les micro-capillaires en quartz qui présentent une très bonne conductivité thermique par rapport au plastique ou au verre avec respectivement 8 ; 0,2 et 0,8 Wm<sup>-1</sup>K<sup>-1</sup> (He *et al.*, 2008) et qui permet d'atteindre des vitesses de refroidissement très élevées (Risco *et al.*, 2007).

Même si les méthodes de vitrification décrites ci-dessus permettent d'atteindre des vitesses de refroidissement et de réchauffement élevées, elles présentent un inconvénient majeur pour la cryoconservation des ressources génétiques. En cas de contamination virale de l'azote liquide, les échantillons seraient alors contaminés par contact direct lors du refroidissement (Bielanski *et al.*, 2000). Pour palier à ce problème, la méthode du « Cryotip® » dérivée de celle du Cryotop a été développée pour isoler l'échantillon et l'azote liquide (Kuwayama *et al.*, 2005; Kuwayama, 2007) mais les résultats obtenus après réchauffement sont plus faibles. Une autre approche, beaucoup plus coûteuse, consiste à utiliser de l'azote liquide stérile.

En pratique, alors que certains auteurs considèrent la vitrification comme une technique d'avenir pour la cryoconservation des ovocytes (Gardner *et al.*, 2007), d'autres continuent d'utiliser la congélation lente en obtenant des résultats parfois prometteurs (Coticchio *et al.*, 2006). Le choix de la méthode de cryoconservation doit être raisonné en prenant en compte les spécificités liées à l'espèce comme chez l'homme dont l'ovocyte présente une très faible perméabilité à l'eau et aux cryoprotecteurs qui nécessite une congélation lente (Gosden, 2005). Actuellement, il existe un manque important de connaissances à ce niveau chez le lapin où aucune comparaison entre vitrification et congélation n'a été réalisée. La comparaison des résultats de la littérature est délicate car les facteurs de variations sont nombreux et les outils d'évaluation de la viabilité ovocytaire différents.

En dehors du choix de la méthode, le principal défi est d'arriver à préserver l'intégrité du fuseau méiotique lors du processus de cryoconservation. De nouvelles voies d'amélioration de la stabilité du fuseau ont été développées utilisant l'exposition des ovocytes à des agents stabilisateurs des microtubules ou encore en diminuant la concentration en cryoprotecteurs par l'augmentation des vitesses de refroidissement. Il a été montré qu'un prétraitement des ovocytes à la cytochalasine B ou D permet d'augmenter significativement le taux de conservation du fuseau méiotique des ovocytes MII (Rho *et al.*, 2002) et VG (Isachenko *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2002; Fujihira *et al.*, 2004). De la même façon, un prétraitement au Taxol semble être bénéfique lors de la vitrification d'ovocytes porcins maturés *in vitro* (Shi *et al.*, 2006), d'ovocytes murins MII (Park *et al.*, 2001) ou humains immatures (Fuchinoue *et al.*, 2004). Mais là encore, d'autres travaux ne mettent en évidence aucun effet (Albarracin *et al.*, 2005b; Silvestre *et al.*, 2006) ou pire encore montrent un effet négatif (Bogliolo *et al.*, 2007) de ces agents stabilisateurs du fuseau. Le développement de nouvelles techniques de vitrification avec des cinétiques de refroidissement encore plus élevées permettant de réduire le temps d'exposition des ovocytes aux basses températures et la concentration en cryoprotecteurs pour une meilleure préservation du fuseau méiotique et des résultats après cryoconservation en général (Chen *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2005; Gardner *et al.*,

2007; Ko *et al.*, 2008). L'augmentation des vitesses de refroidissement en vitrification passe par l'utilisation d'azote liquide sous pression permettant d'atteindre une température de -210°C et par l'utilisation de nouveaux containers permettant un contact direct des échantillons avec l'azote liquide (micro-capillaires de quartz, cryoloop, grille de microscopie électronique...). Bien qu'avantageux d'un point de vue de la survie ovocytaire, ces containers ne sont pas adaptés à la cryoconservation des ressources génétiques car très peu sécuritaires d'un point de vue sanitaire compte tenu des contaminations possibles par l'azote liquide (Bielanski *et al.*, 2000; Bielanski *et al.*, 2003). Au contraire, l'utilisation d'azote liquide pressurisé permet d'augmenter sensiblement les vitesses de refroidissement en limitant la formation de vapeurs d'azote isolantes lors de la plongée des containers dans l'azote liquide (Arav et Zeron, 1997) qui diminuent les échanges de chaleur entre l'azote liquide et les échantillons (Yavin et Arav, 2007). Ce procédé améliore considérablement les résultats après réchauffement notamment chez le lapin (Cai *et al.*, 2005) conduisant d'autres équipes à étudier la limitation de la formation de vapeurs d'azote (Jiao *et al.*, 2006).

Jain et Paulson (2006) proposent de favoriser l'utilisation du tréhalose comme cryoprotecteur non pénétrant et de limiter l'apport de sodium dans les milieux de cryoconservation. Le remplacement du sodium par de la choline permet une amélioration notable de la survie des ovocytes MII de souris congelés (Stachecki *et al.*, 1998a) en accord avec les résultats précédemment publiés sur l'implication du sodium dans la rupture des membranes et l'altération des fonctions cellulaires (Stachecki *et al.*, 1998b). Ces résultats ont été confirmés chez l'homme où le remplacement du chlorure de sodium par de la choline dans les solutions de congélation a permis d'améliorer nettement les résultats après congélation lente d'ovocytes VG et maturés *in vitro* (Goud *et al.*, 2000) conduisant même à la naissance de deux bébés lors d'une étude clinique (Quintans *et al.*, 2002).

### II.3.2.3. Utilisation des ovocytes

Comme nous l'avons vu précédemment, la cryoconservation entraîne une désorganisation du fuseau méiotique qui est cependant un phénomène partiellement réversible. En effet, l'observation du fuseau méiotique a permis de montrer chez l'homme qu'après décongélation, celui-ci était visible dans 35,7 % des ovocytes avant de disparaître au cours des différents bains permettant le retrait des cryoprotecteurs mais qu'une incubation à 37°C sous atmosphère contrôlée entraîne la réapparition du fuseau dans tous les ovocytes survivants (Rienzi *et al.*, 2004). Ainsi, les ovocytes mis en culture à 37°C pendant quelques heures après réchauffement ont la capacité de reformer leur fuseau méiotique par repolymérisation des microfilaments de tubuline (Sathananthan *et al.*, 1992). Ce



phénomène a été mis en évidence chez plusieurs espèces (Vincent *et al.*, 1989; Saunders et Parks, 1999; Chen *et al.*, 2001; Rienzi *et al.*, 2004). Ainsi, il existe pour chaque espèce animale une durée optimale d'incubation après réchauffement et avant fécondation qui a largement été étudiée chez l'homme pour déterminer le moment optimal de fécondation des ovocytes cryoconservés dans le cadre des programmes d'aide à la procréation (Chen *et al.*, 2001). Succu *et al.* (2007b) ont observé que contrairement aux ovocytes maturés *in vivo* les ovocytes ovins maturés *in vitro* n'étaient pas capables de restaurer leur fuseau après réchauffement. Pour l'heure, aucune étude n'a été menée chez le lapin pour déterminer la durée optimale d'incubation après réchauffement même si Vincent *et al.* (1989) annonçaient une restauration du fuseau 3 h après le retrait du cryoprotecteur. Les autres études menées chez le lapin respectaient des temps d'incubation après réchauffement allant de 0 à 2h avant évaluation (Siebzehnruebl *et al.*, 1989; Vincent *et al.*, 1989; Cai *et al.*, 2005).

Enfin, il est important de surmonter le problème de durcissement de la zone pellucide ou « zona hardening ». L'émergence de l'ICSI a permis de résoudre en partie ce problème en s'affranchissant de la pénétration de la zone pellucide par les spermatozoïdes (Chen *et al.*, 2003; Gosden, 2005) bien que les ovocytes présentent toujours un décalage dû à leur activation prématurée (Larman *et al.*, 2006). Grâce à l'utilisation de l'ICSI, Kazem *et al.* (1995) ont significativement amélioré le taux de fécondation en comparaison de la fécondation *in vitro* classique alors que la même année, Gook *et al.* (1995) ne montrèrent aucune différence significative entre les deux méthodes. De plus, l'ICSI pourra faciliter l'éclosion des blastocystes épanouis surmontant alors les problèmes d'éclosion dans l'utérus causés par le durcissement de la zone pellucide (Ambrosini *et al.*, 2006). D'autres pistes d'amélioration ont été proposées consistant à minimiser l'apport de calcium dans les milieux de cryoconservation et de culture et à bien choisir les cryoprotecteurs utilisés (Gardner *et al.*, 2007). En effet, les cryoprotecteurs en plus de présenter des toxicités cellulaires différentes entraînent des influx de calcium dans les ovocytes plus ou moins importants. Ainsi, l'éthylène glycol semble être le plus adapté alors que l'utilisation du DMSO est à proscrire. Chez la souris, Larman *et al.* (2006) ont réussi à augmenter les taux de fécondation et de développement jusqu'au stade « 2 cellules » d'ovocytes vitrifiés par appauvrissement du milieu de vitrification en calcium. L'embryon fécondé est alors transféré dans une femelle receveuse préalablement synchronisée directement après fécondation ou après développement *in vitro*.

### II.3.3. Evaluation de l'ovocyte MII de lapin après cryoconservation

Les outils d'évaluation de la qualité ovocytaire *in vitro* jouent un rôle prépondérant dans l'étude des différentes combinaisons de facteurs visant à optimiser les techniques de

cryoconservation. De plus, il est nécessaire que les critères d'évaluation retenus reflètent la compétence de développement *in vivo* des ovocytes après réchauffement tout en apportant des éléments de réponses quant aux altérations structurales et métaboliques subies. Contrairement aux embryons, un bel aspect morphologique des ovocytes après cryoconservation (intégrité de la zone pellucide, homogénéité du cytoplasme) n'est pas obligatoirement synonyme de viabilité (Coticchio *et al.*, 2004). Par exemple, un cytoplasme sombre et granuleux est caractéristique d'un ovocyte de faible qualité chez la femme alors que cette apparence morphologique est toute à fait normale chez la truie (Wang et Sun, 2007). De plus, un grand nombre d'éléments reflétant la qualité des ovocytes immatures ne sont pas utilisables au stade MII puisque les observations portant sur le fluide folliculaire ou les cellules du cumulus ne sont plus possibles (Wang et Sun, 2007). Dans ce contexte, il est nécessaire de définir des outils d'évaluation de la qualité des ovocytes MII qui soient fiables, objectifs et non invasifs (Coticchio *et al.*, 2005).

#### II.3.3.1. Evaluation structurale

L'évaluation de la qualité ovocytaire passe obligatoirement par l'évaluation de l'intégrité du fuseau méiotique. Chez le lapin comme chez les autres espèces concernées, l'évaluation du fuseau et du cytosquelette des ovocytes est souvent réalisée sur échantillons fixés et immunomarqués observés en microscopie à fluorescence classique à partir de coupes minces en série (Vincent *et al.*, 1989) ou en microscopie confocale (Cai *et al.*, 2005). Ce type d'observation nécessite le sacrifice des ovocytes qui seront évalués alors qu'il serait intéressant de mettre en parallèle l'ultrastructure des ovocytes et leur capacité de développement après fécondation. Plus récemment, une technique appelée Polscope (Polarized light microscopy) a été développée permettant la visualisation du fuseau méiotique sur ovocytes non fixés et sans compromettre leur viabilité (Liu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001a; Wang *et al.*, 2001b; c; Wang et Keefe, 2002; Keefe *et al.*, 2003; Moon *et al.*, 2003; Rienzi *et al.*, 2004). Néanmoins, Ledda *et al.* (2007) affirment que ce système d'évaluation est difficilement utilisable pour les ovocytes des animaux domestiques compte tenu de leur contenu lipidique très important.

De plus, il est important d'évaluer le durcissement de la zone pellucide des ovocytes même si cet aspect revêt un intérêt moindre lorsque l'ICSI est utilisée comme technique de fécondation. Ce phénomène de « zona hardening » peut être étudié par observation de la répartition et de la densité des granules corticaux en microscopie à fluorescence classique ou confocale (Vincent *et al.*, 1990; Gook *et al.*, 1993; Hurtt *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2004) ou par microscopie électronique à transmission (Fuku *et al.*, 1995; Ghetler *et al.*, 2006). Une autre approche consiste à évaluer le temps

de digestion enzymatique totale de la zone pellucide des ovocytes cryoconservés placés à 37°C et observés à fort grossissement (Manna *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2008). Cependant, Coticchio *et al.* (2005) concluent que les problèmes de fécondation observés après cryoconservation ne seraient pas directement liés au durcissement de la zone pellucide mais à des modifications des flux calciques. L'observation des oscillations calciques en réponse à l'exposition des ovocytes à un ionophore (Ozil et Huneau, 2001) permet d'évaluer l'intégrité des canaux calciques et constitue un outil d'évaluation de la qualité ovocytaire.

La microscopie électronique représente un outil précieux pour l'étude détaillée de l'ultrastructure cellulaire permettant d'observer les altérations des membranes, des différents organites ou encore de la zone pellucide (Fuku *et al.*, 1995; Hyttel *et al.*, 2000; Ghetler *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006). Néanmoins, ces observations ne sont pas encore très répandues dans les études portant sur la cryoconservation des ovocytes notamment chez l'homme (Coticchio *et al.*, 2005) en partie à cause de son coût élevé et de sa lourdeur d'exécution.

#### II.3.3.2. Evaluation métabolique

L'importance du métabolome pour l'appréciation de la qualité ovocytaire est indiscutable et de ce fait intéresse de plus en plus les scientifiques (Singh et Sinclair, 2007). Dans la grande majorité des études menées sur la cryoconservation des ovocytes, l'évaluation de la viabilité ovocytaire comprend uniquement des critères structuraux comme l'intégrité du fuseau méiotique ou de l'organisation des granules corticaux. Peu d'études ont utilisé des outils pour évaluer le métabolisme des ovocytes après réchauffement. Considérant l'importance du rôle des mitochondries dans les processus de fécondation et de développement embryonnaire précoce, il est étonnant que ces organites n'aient pas été plus étudiés. Chez l'homme, Jones *et al.* (2004) ont étudié le potentiel de membrane des mitochondries d'ovocytes MII congelés et ont montré que les mitochondries péricorticales perdaient leur hyperpolarisation lors du refroidissement sans pour autant établir un lien direct avec la quantité d'ATP présente. D'autres travaux ont permis d'évaluer les conséquences des processus de cryoconservation sur l'intégrité des mitochondries en microscopie électronique ou immunochimie mais là encore, aucun lien direct avec la quantité d'ATP disponible ne peut être établi (Rho *et al.*, 2002; Valojerdi et Salehnia, 2005; Boonkusol *et al.*, 2007; Nottola *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2007). Plusieurs travaux ont porté sur le contenu en ATP des spermatozoïdes (Rieger, 1997; Guthrie *et al.*, 2008), des embryons (Spielmann *et al.*, 1984; Rozell *et al.*, 1992; Rieger, 1997) et des ovocytes à différents stades de maturation chez différentes espèces (Slotte *et al.*, 1990; Van Blerkom *et al.*, 1995; Rieger, 1997; Stojkovic *et al.*, 2001; Herrick *et al.*, 2003; Tamassia *et al.*, 2004). Cet outil

d'évaluation n'a jamais été repris dans les études menées sur la cryoconservation des ovocytes alors que la diminution du métabolisme énergétique pourrait expliquer les difficultés de régulation du calcium intracellulaire par les pompes ATP dépendantes des ovocytes cryoconservés (Ledda *et al.*, 2007). Un autre métabolite souvent cité comme élément prédictif de la qualité ovocytaire est le glutathion (Herrick *et al.*, 2003; Wang et Sun, 2007; Laborda *et al.*, 2008) considéré comme corrélé à la maturation cytoplasmique et au développement embryonnaire (de Matos *et al.*, 2002; Wang et Day, 2002). Ces outils permettraient d'évaluer le métabolisme des ovocytes mais cela ne représenterait qu'un seul aspect de la viabilité ovocytaire. Par conséquent, ces observations devront nécessairement être complétées par l'évaluation de leur intégrité structurale et de leur aptitude au développement. De plus, avec le développement récent de la spectrométrie de masse, il est maintenant possible d'analyser des profils d'expression de gènes spécifiques et à plus large échelle le protéome (ensemble des protéines synthétisées dans une cellule) d'ovocytes dans le cadre d'études sur la cryoconservation (Gardner *et al.*, 2007; Larman *et al.*, 2007). Par exemple, il a été montré que le niveau d'expression du gène Bcl-2 est beaucoup plus important dans les ovocytes de bonne qualité alors que le gène Bax a un niveau d'expression plus élevé dans les ovocytes de faible qualité (Yang et Rajamahendran, 2002). A un autre niveau d'expression, il apparaît important d'étudier le transcriptome (ensemble des ARN messagers transcrits à partir du génome) des ovocytes cryoconservés compte tenu du rôle primordial de certains transcrits maternels dans le déroulement de la fécondation et des premiers stades de développement embryonnaire (Mager *et al.*, 2006; Bettegowda *et al.*, 2008).

### II.3.3.3. Evaluation de la capacité de développement

La maîtrise de la fécondation est une étape clé pour la conservation des ressources génétiques chez le lapin et représente le meilleur critère d'évaluation de la viabilité des gamètes après cryoconservation. Aujourd'hui, plusieurs techniques de fécondation sont disponibles avec des degrés de réussite variables d'une technique à l'autre.

Avant d'envisager la fécondation *in vitro*, les chercheurs ont utilisé le transfert des gamètes (semence et/ou ovocytes) directement dans l'oviducte d'une femelle receveuse pour la réalisation de la fécondation *in vivo*. Cette technique appelée **GIFT** (Gamete Intra Fallopian Transfer) est cependant assez lourde et nécessite une synchronisation délicate entre l'état des gamètes et le profil physiologique de la femelle receveuse (Chang, 1955; Vincent *et al.*, 1989). En testant différents temps de désynchronisation, Harper (1973) a réussi à obtenir un taux de fécondation de 66 % avec une désynchronisation de 6h entre les ovocytes transférés (13-14 h) et la femelle receveuse (19-20 h post IA). Le GIFT a même permis la réalisation de fécondations xénogènes (spermatozoïdes bovins,

caprins, ovins, porcins, de primates et de hamster) à l'intérieur des oviductes de lapine pseudogestantes (Baker et Coggins, 1969; Trounson *et al.*, 1977; Hirst *et al.*, 1981; Rao *et al.*, 1984; DeMayo *et al.*, 1985).

La notion de fécondation *ex situ* et *in vitro* est apparue quelques années plus tard pour s'affranchir de l'utilisation de femelles receveuses et mieux maîtriser les étapes conduisant à la fusion des gamètes mâle et femelle. Dès les premiers essais de **fécondation *in vitro*** (FIV) chez l'homme en 1973 et la naissance du premier bébé éprouvette (Steptoe et Edwards, 1978), le lapin a longtemps été utilisé comme modèle d'études pour le développement des techniques de FIV (Hahn *et al.*, 1980; Trotnow *et al.*, 1981; Al-Hasani *et al.*, 1986a). Aujourd'hui, les bons résultats de FIV obtenus en médecine humaine permettent la naissance de plus de 4 000 enfants chaque année avec un taux de fécondation proche de 60 % en intraconjugal (Agence de la Biomédecine, 2006). Dès lors, les travaux sur la FIV chez le lapin sont devenus moins fréquents et la majorité des études qui ont été menées sont relativement anciennes (tableau 5).

Depuis les premiers essais de FIV chez le lapin (Chang, 1959), l'amélioration des protocoles a permis l'obtention de taux de clivage supérieurs à 80 % (Seitz *et al.*, 1970). Dans ces études, la capacitation des spermatozoïdes était réalisée *in vivo* après insémination d'une femelle dont les cornes utérines étaient perfusées 14 à 15h après IA. Compte tenu de la lourdeur d'exécution et pour des raisons éthiques, la capacitation des spermatozoïdes est maintenant réalisée *in vitro* comme chez la plupart des autres espèces domestiques mais les taux de fécondation s'en trouvent affectés même si ponctuellement de bons résultats ont pu être obtenus. Ainsi, les mauvais taux de fécondation *in vitro* chez le lapin seraient principalement attribués à des problèmes de capacitation de la semence (Brackett et Oliphant, 1975; Akruk *et al.*, 1979; Brackett *et al.*, 1982) eux mêmes liés à la faible perméabilité de la membrane plasmique des spermatozoïdes (Curry *et al.*, 1995; Curry *et al.*, 2000). Chez l'homme, l'utilisation de l'**ICSI** permet de sélectionner un spermatozoïde sans défaut apparent et de l'injecter dans le cytoplasme d'un ovocyte receveur en cas d'infertilité paternelle. Son utilisation a largement été éprouvée en procréation médicalement assistée avec près de 7 000 enfants nés grâce à cette technique en 2005 (Agence de la Biomédecine, 2006) alors que peu d'expériences ont été menées chez le lapin aussi bien en ovocytes frais (Hosoi *et al.*, 1988; Deng et Yang, 2001; Li *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004; Daniel *et al.*, 2007) que congelés (Cai *et al.*, 2005). Cette technique permet de valoriser les ovocytes présentant un durcissement de la zone pellucide constituant un test de viabilité ovocytaire intéressant notamment après cryoconservation (Chen *et al.*, 2003). Depuis les premiers essais de Hosoi *et al.* (1988), les résultats les plus probants actuellement sont ceux de Daniel *et al.* (2007) avec 36,3 % de blastocystes et 21,8 % de survie embryonnaire après transfert dans des femelles receveuses désynchronisées de 14h (7 lapereaux nés vivants sur 32 transférés). Les résultats de Deng et Yang (2001) sont aussi à souligner avec un taux de

développement en blastocystes de 39 % et l'obtention de 7 lapereaux à partir du transfert de 113 embryons (6,2 %). De même, Liu *et al.* (2004) ont réussi à valoriser de la semence de lapin lyophilisée et stockée pendant plus de 2 ans et à obtenir la naissance d'un lapereau après transfert de 230 embryons issus d'ICSI. L'ICSI fait partie des techniques de micromanipulation des ovocytes et embryons avec des applications variées allant de la fécondation assistée à la reproduction par clonage reproductif (Polgar et Dinnyes, 2008).

**Tableau 5. Essais de fécondation in vitro chez le lapin \***

Références	n	Capacitation de la semence	Stade des ovocytes	Âge des ovocytes (h)	[Spz/ml]	Taux fécondation (%)
(Thibault <i>et al.</i> , 1954)	?	?	?	?	?	?
(Chang, 1959)	?	?	?	?	?	?
(Bedford et Chang, 1962)	?	?	?	?	?	?
(Brackett et Williams, 1965)	?	?	?	?	?	?
(Brackett et Williams, 1968)	?	?	?	?	?	?
(Brackett, 1969)	?	?	?	?	?	?
(Brackett et Server, 1970)	?	?	?	?	?	?
(Brackett, 1970)	?	?	?	?	?	?
(Seitz <i>et al.</i> , 1970)	143	In utero	Folliculaire	11,5	-	81,0
(Brackett <i>et al.</i> , 1971)	?	?	?	?	?	?
(Brackett <i>et al.</i> , 1972b)	?	?	?	?	?	?
(Brackett <i>et al.</i> , 1972a)	?	?	Folliculaire	10	?	43,7
(Mills <i>et al.</i> , 1973)	?	?	Folliculaire	10	?	49,5
(Lambert <i>et al.</i> , 1978)	?	In utero	?	?	?	83,0
(Hahn <i>et al.</i> , 1980)	?	?	?	?	?	?
(Hosoi <i>et al.</i> , 1981)	126	In vitro	Ovulé	14-15	0,5-2.10 <sup>6</sup>	68,3
(Trotnow <i>et al.</i> , 1981)	426	In utero	Folliculaire	9	-	81,0
(Brackett <i>et al.</i> , 1982)	60	In vitro	Ovulé	-	8-65.10 <sup>5</sup>	78,0
(Niwa <i>et al.</i> , 1983)	?	In vitro	?	?	?	99,0
(Al-Hasani <i>et al.</i> , 1984)	232	In utero	Folliculaire	9	-	83,2
(Keefer <i>et al.</i> , 1985)	55	In utero	Ovulé	16-17	8,7.10 <sup>4</sup>	69,0
	55	In vitro	Ovulé	16-17	10 <sup>6</sup>	47,0
(Al-Hasani <i>et al.</i> , 1986b)	30	In utero	Cryoconservé	6/9/12	-	60,0
(Al-Hasani <i>et al.</i> , 1986a)	1187	In utero	Folliculaire	9	-	82,0
(McCulloh <i>et al.</i> , 1987)	?	In vitro	?	?	?	?
(Chen <i>et al.</i> , 1988)	61	In vitro	Ovulé	12,5-14	10 <sup>7</sup>	87,0
(Asakawa <i>et al.</i> , 1988)	267	In utero	Folliculaire	9-10	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	71,4
(Al-Hasani <i>et al.</i> , 1989)	246	In utero	Cryoconservé	13	-	74,0
(Kim <i>et al.</i> , 1989)	?	?	?	?	?	?
(Roudebush <i>et al.</i> , 1990)	?	In vitro	?	?	?	63,0
(Xu Jun <i>et al.</i> , 1990)	363	In vitro	Ovulé	12,5	2-7.10 <sup>6</sup>	63,0
(Roudebush <i>et al.</i> , 1993)	?	In vitro	Ovulé	?	?	?
(Zheng <i>et al.</i> , 2004)	?	In vitro	?	?	?	91,6
(Viudes-de-Castro <i>et al.</i> , 2005)	131	In vitro	Ovulé	14	2.10 <sup>6</sup>	26,7

\* Les données présentées dans ce tableau correspondent aux meilleurs résultats obtenus dans les différents travaux.

Enfin, l'intérêt de l'activation parthénogénétique est d'imiter les processus se produisant au moment de la fécondation avec notamment l'augmentation de calcium intracytoplasmique, la diminution de l'activité du MPF (M phase Promoting Factor), des protéines MAP-Kinase et du facteur

cytostatique et enfin le début des transcriptions d'ARN maternel. L'utilisation de l'activation parthénogénétique des ovocytes permet l'obtention d'embryons mais les fœtus obtenus après transfert des parthénogénotes diploïdes au stade 4 cellules ne sont pas viables au delà du 11<sup>ème</sup> jour de gestation, comme cela avait été observé chez la souris (Ozil, 1990). La **parthénogenèse** permet essentiellement de s'assurer de la compétence au développement des ovocytes et particulièrement de l'intégrité des filaments impliqués dans les divisions cellulaires ainsi que la capacité du matériel chromosomique à se diviser. Depuis les premiers essais de Pincus et Shapiro (1940), les taux de développement des parthénogénotes jusqu'au stade blastocyste ont été nettement améliorés après activation électrique (Ozil, 1990; Escriba et Garcia-Ximenez, 1999; 2000; 2001; Ozil et Huneau, 2001), chimique (Ha *et al.*, 1998; Mitalipov *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2002) ou de manière combinée (Yin *et al.*, 2000). Les pulses électriques pourraient induire l'afflux de calcium ionique et les agents chimiques (cycloheximide, 6-DMAP) permettraient la formation des pronoyaux. Par conséquent, cet outil représente un test alternatif à la FIV ou à l'ICSI pour l'évaluation de la viabilité ovocytaire dès lors que ces techniques ne sont pas entièrement maîtrisées comme cela peut être le cas chez le lapin. Cependant, la parthénogénèse ne constitue qu'un test d'évaluation expérimental et il sera nécessaire de maîtriser les techniques de FIV et/ou d'ICSI pour espérer obtenir des individus viables à partir d'ovocytes MII cryoconservés bien que García-Ximenez et Escribá (2002) ont montré que la congélation des parthénotes stade 16/32 cellules pouvait être une voie intéressante de cryoconservation.

L'évaluation de la qualité des ovocytes MII cryoconservés constitue un véritable défi pour la communauté scientifique. De nombreuses pistes d'évaluation sont explorées concernant aussi bien leur ultrastructure que leur métabolisme mais les outils actuellement disponibles sont trop souvent invasifs et ne permettent pas de déterminer la qualité d'un même échantillon avant et après cryoconservation. Au regard des applications potentielles de la cryoconservation des ovocytes MII, il est nécessaire de poursuivre les recherches pour augmenter l'efficacité des techniques disponibles pour les rendre utilisables en routine notamment dans le cadre des aides à la procréation chez l'homme. Chez le lapin, peu d'études ont été conduites sur cette thématique mais les avancées obtenues chez les autres espèces entrouvrent de grandes perspectives d'optimisation des méthodes existantes.

## **2<sup>ème</sup> partie : étude expérimentale**



Devenue une réalité bien concrète, la Cryobanque Nationale cunicole a mené depuis sa création en 2003 de nombreuses actions de cryoconservation permettant d'augmenter considérablement les collections de populations de lapin conservées sous forme d'embryons et de semence congelés. Ces activités ont principalement porté sur des populations de type III, au détriment des deux autres types (I et II) qui sont pourtant les plus menacés par l'érosion de la diversité génétique lapin engendrée principalement par l'évolution de notre société et les schémas de sélection établis. A l'avenir, il sera nécessaire de développer des techniques de production d'embryons fiables et peu variables pour sauvegarder efficacement ces populations où chaque individu est précieux, allant de la préparation de la femelle donneuse d'embryons à leur collecte et à leur transfert dans le respect des règles de bioéthique en matière de bien être animal. Actuellement, l'abattage systématique des femelles donneuses et la variabilité des réponses aux traitements de superovulation ne permettent pas d'atteindre ces objectifs. De plus, les actions de sauvegarde des ressources génétiques cunicoles passent principalement par la congélation de l'embryon et d'autres voies de cryoconservation doivent maintenant être développées pour mettre à disposition des outils complémentaires permettant de conserver la génétique d'un seul individu ou encore de réagir en situation d'urgence.

## **I. Essais d'optimisation des conditions de production des embryons**

### **I.1. Essais relatifs à la nature du traitement de superovulation**

#### **I.1.1. Effet de l'absence ou de la présence de LH exogène dans les traitements de superovulation**

##### **I.1.1.1. Objectif**

Comme nous l'avons observé dans la partie bibliographique, le rôle de la LH exogène dans les traitements de superovulation est mal cerné et ce point est sujet à controverse. L'objectif de cette expérience est de comparer la quantité et la qualité des embryons produits sur des lapines superovulées avec 31,5 µg de FSH<sub>porcine</sub> supplémentés ou non de 20 % (w/w) de LH<sub>porcine</sub>.

##### **I.1.1.2. Matériel et méthodes**

### **ANIMAUX**

Les animaux étaient issus de 5 génotypes différents dont une lignée Castor® sélectionnée par la production de fourrure et élevée au centre INRA du Magneraud (Surgères, France), trois lignées mâles (AGP38, AGP39 et AGP79) et une lignée femelle (croisement AGP77 et AGP59) fournies par le

sélectionneur Grimaud Frères Sélection SAS (Roussay, France). Pour chaque lignée, les lapines étaient logées individuellement dans les mêmes conditions avec l'eau et l'aliment fournis *ad libitum*. Les lapines ont été réparties de façon homogène dans trois groupes expérimentaux en prenant en compte le génotype et la parité de chaque femelle :

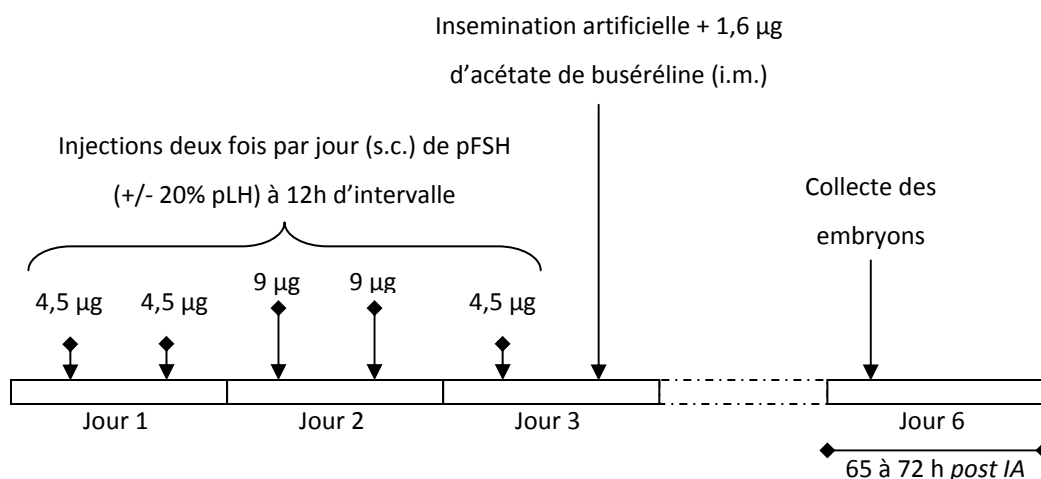
- « **T** » Groupe témoin comprenant des lapines non superovulées (n=93).
- « **pFSH + pLH** » Groupe de lapines superovulées avec une préparation commerciale (Stimufol®, Reprobiol, Belgique) contenant de la pFSH et de la pLH (ratio pLH/pFSH ~ 20 %) isolée d'hypophyses porcines (n=80).
- « **pFSH** » Groupe de lapines superovulées avec une préparation de gonadotropines raffinée contenant uniquement de la pFSH (ratio pLH/pFSH ~0 %) isolée d'hypophyses porcines (n=81).

Tous les traitements ont été administrés à des femelles en repos sexuel, au moins deux semaines après le sevrage.

#### TRAITEMENTS HORMONAUX

Les préparations hormonales proviennent de la Faculté de Médecine Vétérinaire de Liège (Belgique) et étaient présentées en flacons contenant les hormones sous forme de lyophilisat. Chaque flacon contenait 500 µg de pFSH (lot 04I24) avec ou sans 20 % (w/w) de pLH. Juste avant de réaliser les injections, les hormones ont été dissoutes dans 56 ml de sérum physiologique pour obtenir une concentration finale en pFSH de 9 µg/ml. Les préparations hormonales de superovulation des groupes « pFSH+pLH » et « pFSH » ont été administrées en 5 injections successives (i.m.) réparties sur cinq demi-journées représentant une dose totale de 31,5 µg de pFSH par femelle (figure 9).

Figure 9. Protocole de superovulation des femelles donneuses d'embryons

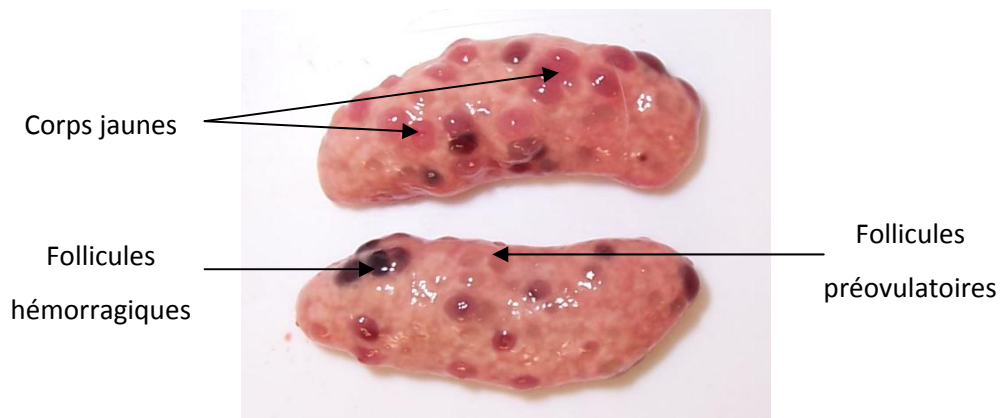


Dix à douze heures après la dernière injection de gonadotropines, les femelles ont été inséminées avec 0,5 ml d'un mélange polyspermique et l'ovulation était induite immédiatement après par injection (i.m.) de 0,4 ml de Receptal® (Intervet, France) représentant 1,6 µg d'acétate de buséréline (analogue de synthèse de GnRH) par femelle. Les femelles du groupe témoin n'ont reçu aucun traitement de superovulation préalable et ont été inséminées au même moment que les lapines des autres groupes.

#### COLLECTE DES EMBRYONS

Les embryons de tous les groupes ont été collectés après euthanasie des femelles donneuses, 65 à 72 heures après l'induction d'ovulation. A ce moment, les embryons sont au stade morula (32 cellules) à morula compactée. Les tractus génitaux (oviductes et cornes utérines) sont alors immédiatement prélevés et perfusés de manière normograde avec 20 ml de liquide de collecte (Euroflush®, IMV Technologies, France) ; les embryons sont alors collectés dans une boîte de pétri. Les structures ovariennes sont observées et le nombre de follicules préovulatoires (diamètre > 1mm), de follicules hémorragiques (diamètre >1mm avec présence de sang) et de corps jaunes sont enregistrés (photo 5).

*Photo 5. Structures ovariennes d'une lapine superovulée ayant ovulée*



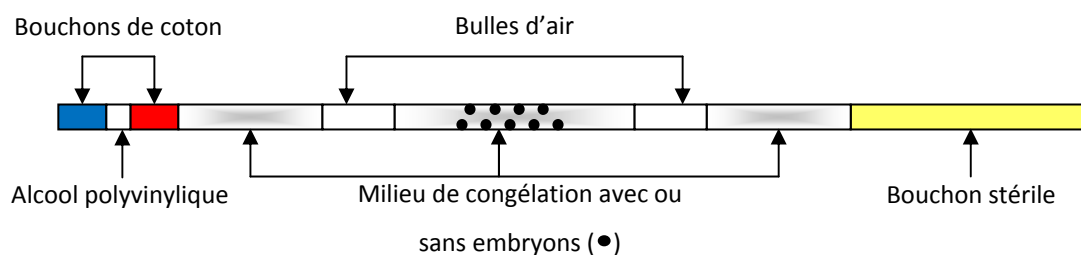
Les embryons et les ovocytes collectés sont ensuite dénombrés et observés sous loupe binoculaire (x10) pour évaluer leur qualité selon les critères morphologiques établis par l'IETS (International Embryo Transfer Society). L'évaluation de l'intégrité de la zone pellucide et du manteau muqueux et de l'homogénéité des blastomères permet de distinguer les embryons de bonne qualité (qualités 1 à 2 notées Q<sub>1</sub> & Q<sub>2</sub>) et ceux de mauvaise qualité (qualité 3 notée Q<sub>3</sub>). Les embryons sont stockés à température ambiante et dans l'obscurité avant congélation pendant une durée n'excédant pas 2h. Pour chaque groupe expérimental, le pourcentage de femelles donneuses

d'embryons (pourcentage de femelles ayant donné au moins un embryon de bonne qualité), le taux de collecte (nombre total collecté / nombre de corps jaunes) et le taux de viabilité embryonnaire (nombre d'embryons de bonne qualité / nombre total collecté) ont été déterminés.

#### CONGELATION ET DECONGELATION DES EMBRYONS

Seuls les embryons de bonne qualité ont été conservés et plus de 3000 embryons ont été congelés selon le protocole décrit par Joly *et al.* (1998). Brièvement, les embryons sont exposés successivement pendant 5 minutes à trois bains contenant respectivement 0,5 ; 1 et 1,5M de DMSO (réf. D2650, Sigma-Aldrich, France) dans une solution d'« IMV holding medium » (IMV Technologies, France). Placés dans le dernier bain, les embryons sont alors montés en paillettes stériles de 0,25 ml (IMV Technologies, France) scellées par un bouchon stérile permettant l'identification (figure 10).

*Figure 10. Schématisation du montage des embryons en paillettes avant congélation*



Après 5 minutes dans le dernier bain, les paillettes sont placées dans un congélateur programmable (Cryocell 1200, IMV Technologies, France) préalablement équilibré à  $-7^{\circ}\text{C}$ . Après 5 minutes d'équilibration, le « seeding » (induction de la cristallisation) est réalisé en touchant l'extrémité de la paillette située à côté du bouchon avec des pinces refroidies dans l'azote liquide jusqu'à l'apparition des premiers cristaux de glace (opacification du milieu). Une deuxième période d'équilibration de 5 minutes est observée avant de refroidir les paillettes jusqu'à  $-30^{\circ}\text{C}$  avec une vitesse de  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , puis elles sont directement plongées dans l'azote liquide pour un stockage d'une durée minimum de 48 h.

Les paillettes d'embryons stockées dans l'azote liquide sont décongelées en les plaçant à température ambiante pendant 10 à 15 secondes avant immersion dans un bain-marie à  $20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à fonte complète des cristaux de glace (environ 1 minute). Après réchauffement, les embryons sont incubés pendant 5 minutes à température ambiante dans chaque bain contenant des concentrations décroissantes en cryoprotecteurs. Cette étape est nécessaire pour le retrait du DMSO et réhydrater les embryons. Les embryons sont donc placés successivement dans l'« IMV holding medium » contenant 1 ; 0,5 puis 0M de DMSO.

### CULTURE IN VITRO DES EMBRYONS DECONGELES

Au total, 349 embryons ont été décongelés pour évaluer leur viabilité *in vitro* dont 117 embryons du lot « pFSH+pLH », 128 embryons du lot « pFSH » et 104 embryons du lot « T ». Après décongélation et retrait du cryoprotecteur, les embryons ont été cultivés dans un milieu TCM199 (Sigma-Aldrich, France) supplémenté avec 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (Sigma-Aldrich, France) dans une atmosphère humide à 38°C et 5 % CO<sub>2</sub>. La capacité de développement *in vitro* des embryons décongelés est évaluée par le taux de développement des morulas jusqu'au stade blastocyste/blastocyste épanoui après 24 et 48 h de CIV.

### TRANSFERT DES EMBRYONS DECONGELES

Trois cent quatorze embryons ont été transférés dans 28 femelles receveuses PS19 (Grimaud Frères Sélection SAS) dont 96 embryons « pFSH+pLH », 107 embryons « pFSH » et 111 embryons « T ». L'ovulation de ces femelles est induite par injection (i.m.) de 1,6 µg d'acétate de buséreline correspondant à 0,4 ml de Receptal® (Intervet, France) 50 à 60 h avant la réalisation du transfert conférant un léger asynchronisme (~12h) de ces femelles par rapport aux lapines donneuses. Les receveuses ont été anesthésiées à l'aide d'une injection (i.m.) de kétamine (5mg/kg, Imalgène 1000®, Biomérieux, France) et de médétomidine (80µg/kg, Domitor®, Orion Pharma, Finland) 10 minutes avant la chirurgie. Après décongélation, les embryons sont rapidement montés dans un capillaire de transfert en verre de 50 µl avec un minimum de milieu « IMV holding medium » (~10 µl) connecté à une seringue de 1 ml. En moyenne, 11,2 embryons ont été transférés dans chaque femelle receveuse. Les transferts ont été réalisés par laparotomie midventrale au niveau de la ligne blanche directement dans la lumière des cornes utérines, juste en dessous de la jonction utéro-tubaire. La capacité de développement *in vivo* des embryons décongelés a été mesurée par l'évaluation du taux de parturition (nombre de femelles mettant bas / nombre de femelles transférées), du total de lapereaux nés et le taux de survie embryonnaire (nombre de lapereaux nés vivants & morts / nombre d'embryons transférés).

### ANALYSE STATISTIQUE

Les variables de collecte mesurées pour la production d'embryons sont tout d'abord le pourcentage de femelles donneuses puis pour chaque femelle donneuse, on a dénombré : les follicules préovulatoires (FP), les follicules hémorragiques (FH), les corps jaunes (CJ), les ovocytes (OV), le total des embryons collectés (TEC), les embryons de bonne qualité (EBQ) et de mauvaise qualité (EMQ). A l'exception du pourcentage de femelles donneuses, l'analyse statistique a été

réalisée uniquement à partir des données obtenues chez les femelles donneuses d'embryons. Les variables mesurées pour l'évaluation *in vitro* et *in vivo* de la viabilité embryonnaire sont les taux de développement jusqu'au stade blastocyste après culture *in vitro* et les taux de parturition, de survie embryonnaire après transfert dans une femelle receveuse.

Un test du Chi-deux avec la correction de Yates (SAS/STAT®, SAS Institute Inc.) a été utilisé pour comparer les effets des 3 groupes expérimentaux sur le pourcentage de femelles donneuses d'embryons et les résultats des expériences d'évaluation de la viabilité embryonnaire *in vitro* et *in vivo*. Les effets du traitement de superovulation utilisé, du génotype des lapines traitées et de leur interaction sur les variables de collecte décrites ci-dessus ont été analysés par un modèle linéaire général (GLM) à deux effets fixés (SAS/STAT®, SAS Institute Inc.). L'effet de la parité n'est pas inclus dans le modèle statistique présenté car seules des femelles nullipares ont été utilisées pour le génotype AGP39. Néanmoins, l'effet de la parité a été évalué en appliquant le modèle statistique pour chaque niveau de parité (nullipare, primipare, multipare).

### 1.1.1.3. Résultats

#### REPONSE OVARIENNE ET PRODUCTION D'EMBRYONS

Tableau 6. Influence du traitement de synchronisation sur la réponse ovarienne des lapines des lots T, pFSH+pLH et pFSH.

	Femelles donneuses	Répartition femelles non donneuses			
		Non ovulée	Non fécondée	TC nul <sup>(1)</sup>	EMQ <sup>(2)</sup>
T	89/93 (95,7 %) <sup>a</sup>	0	3/93 (3,2 %)	0	1/93 (1,1 %)
pFSH+pLH	65/80 (81,3 %) <sup>b</sup>	10/80 (12,5 %)	2/80 (2,5 %)	3/80 (3,8 %)	0
pFSH	63/81 (77,8 %) <sup>b</sup>	13/81 (16,0 %)	5/81 (6,2 %)	0	0

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b) dans la même colonne sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

<sup>(1)</sup> Taux de collecte nul : femelle ayant ovulée mais où aucun embryon ni ovocyte n'a pu être collecté.

<sup>(2)</sup> Femelle ayant ovulée mais où les embryons collectés étaient tous de mauvaise qualité.

Le tableau 6 montre les réponses ovariennes des lapines aux différents traitements testés. Le pourcentage de lapines donneuses est significativement plus élevé pour le groupe témoin que pour les deux autres groupes expérimentaux avec 95,7 % de donneuses contre 81,3 et 77,8 % respectivement pour le groupe « pFSH+pLH » et « pFSH » ( $p < 0,005$ ). Les lapines qui n'ont pas donné d'embryons de bonne qualité étaient principalement des femelles présentant des défauts d'ovulation (12,5 et 16,0 % des femelles traitées respectivement pour les groupes « pFSH+pLH » et

« pFSH ») et des défauts de fécondation (2,5 et 6,2 % des femelles traitées respectivement pour les groupes « pFSH+pLH » et « pFSH »). A l'exception de deux lapines immatures dont les ovaires ne présentaient pas de follicules préovulatoires, les lapines n'ayant pas ovulée (n=23) avaient en moyenne 16,4 follicules préovulatoires à la surface de leurs ovaires. Cette valeur est significativement plus élevée que celle observée chez les femelles donneuses d'embryons avec 10,2 follicules préovulatoires en moyenne ( $p < 0,05$ ). Les résultats de production d'embryons des femelles donneuses sont présentés dans le tableau 7. Le taux de collecte moyen obtenu sur cette expérience est de 82,3 % sans différence significative entre les groupes expérimentaux.

Les deux traitements de superovulation sont associés à une augmentation significative du nombre de corps jaunes en comparaison du groupe témoin avec  $27,1 \pm 1,0$  ;  $26,7 \pm 1,0$  et  $11,9 \pm 0,8$  points d'ovulation observés par femelle respectivement pour les groupes « pFSH+pLH », « pFSH » et « T » ( $p < 0,001$ ). Les traitements de superovulation entraînent aussi une augmentation significative du nombre d'embryons collectés (respectivement  $20,3 \pm 1,0$  et  $21,2 \pm 1,0$  contre  $9,6 \pm 0,8$ ) et du nombre d'embryons de bonne qualité par femelle donneuse (respectivement  $18,4 \pm 1,0$  et  $19,1 \pm 1,0$  contre  $8,8 \pm 0,8$ ). De plus, le nombre de follicules hémorragiques est significativement plus important chez les lapines superovulées que chez les lapines témoins (respectivement  $4,4 \pm 0,7$  et  $4,7 \pm 0,7$  contre  $2,7 \pm 0,5$ ). L'observation des erreurs standard montre que la variabilité des réponses aux traitements de superovulation est identique pour les groupes « pFSH+pLH » et « pFSH ». Cette variabilité est légèrement supérieure à celle observée pour le lot témoin.

Le génotype des femelles donneuses a un effet significatif sur l'ensemble des variables étudiées sauf pour le nombre d'ovocytes collectés (tableau 7). Le nombre de corps jaunes par femelle est significativement plus élevé pour les lignées Grimaud Frères Sélection que pour la lignée Castor®. Cette tendance est observée de la même façon pour les autres variables mesurées.

De plus, aucune interaction significative n'est observée entre les traitements administrés et le génotype des femelles traitées à l'exception de celles observées pour le nombre de follicules préovulatoires et d'embryons de mauvaise qualité. En effet, l'analyse statistique suggère que l'absence de LH exogène augmente significativement le nombre d'embryons de mauvaise qualité pour la lignée Castor® (figure 11) alors que pour les autres génotypes, la nature du traitement n'a aucun effet sur cette variable. L'interaction observée sur la variable « FP » ( $p = 0,0223$ ) montre que la nature du traitement à un effet très aléatoire sur le nombre de follicules préovulatoires observé qui peut être opposé d'un génotype à l'autre (données non exposées).

**Tableau 7.** *Influence du traitement de superovulation (3 niveaux) et du génotype (5 niveaux) sur différents paramètres de production d'embryons.*  
(LSmean  $\pm$  standard error)

	n	FP	FH	CJ	OV	TEC	EBQ	EMQ
<b>TRAITEMENT (valeur de p)</b>		NS	0,0361	<0,0001	0,0339	<0,0001	<0,0001	0,0132
T	89	9,0 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>	11,9 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	9,6 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	8,8 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
pFSH+pLH	65	9,5 $\pm$ 0,6	4,4 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	27,1 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	1,5 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	20,3 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	18,4 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	1,8 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
pFSH	63	9,0 $\pm$ 0,6	4,7 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	26,7 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	1,2 $\pm$ 0,3 <sup>a,b</sup>	21,2 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	19,1 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>	2,1 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>
<b>GENOTYPE (valeur de p)</b>		<0,0001	0,0024	<0,0001	NS	0,0048	<0,0001	<0,0001
GRIMAUD AGP 38	33	8,4 $\pm$ 0,7 <sup>a,b</sup>	5,1 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>	25,4 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>	1,5 $\pm$ 0,4	20,0 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>	19,0 $\pm$ 1,3 <sup>c</sup>	0,9 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>
GRIMAUD AGP 39	20	6,2 $\pm$ 1,0 <sup>b,c</sup>	3,1 $\pm$ 1,1 <sup>c,d</sup>	22,4 $\pm$ 1,7 <sup>c,d</sup>	0,7 $\pm$ 0,6	17,7 $\pm$ 1,7 <sup>c,d,e</sup>	16,7 $\pm$ 1,7 <sup>c,d,e</sup>	1,0 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>
GRIMAUD AGP 79	51	10,7 $\pm$ 0,6 <sup>d</sup>	4,1 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup>	22,1 $\pm$ 1,1 <sup>d</sup>	1,4 $\pm$ 0,4	15,2 $\pm$ 1,1 <sup>d,e</sup>	14,7 $\pm$ 1,1 <sup>d,e</sup>	0,6 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>
GRIMAUD 77 x 59	44	5,1 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	1,9 $\pm$ 0,7 <sup>d</sup>	22,4 $\pm$ 1,1 <sup>c,d</sup>	1,2 $\pm$ 0,4	17,6 $\pm$ 1,1 <sup>c,d</sup>	16,9 $\pm$ 1,1 <sup>c,d</sup>	0,7 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>
Castor <sup>®</sup>	69	15,3 $\pm$ 0,5 <sup>e</sup>	5,5 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	17,4 $\pm$ 0,9 <sup>e</sup>	0,5 $\pm$ 0,3	14,6 $\pm$ 0,9 <sup>e</sup>	9,8 $\pm$ 0,9 <sup>e</sup>	4,8 $\pm$ 0,3 <sup>d</sup>
<b>TRAITEMENT*GENOTYPE (valeur de p)</b>		0,0223	NS	NS	NS	NS	NS	=0,0001

n: effectif

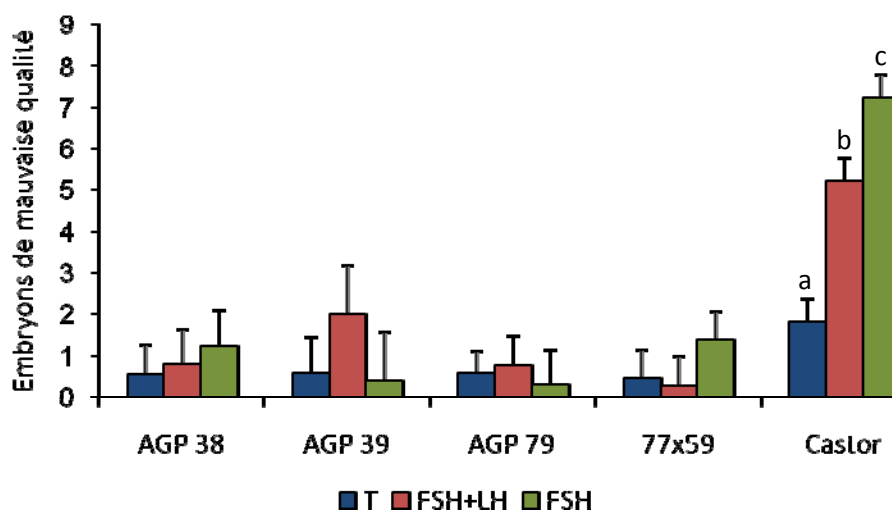
LSM: Least Square Means.

**ABBREVIATIONS:** nombre de follicules préovulatoires (FP), nombre de follicules hémorragiques (FH), nombre de corps jaunes (CJ), nombre d'ovocytes collectés (OV), nombre total d'embryons collectés (TEC), nombre d'embryons de bonne (EBQ) et de mauvaise qualité (EMQ).

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b, c, d, e) dans la même colonne sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ). NS signifie que l'effet observé n'est pas significatif ( $p > 0,05$ ).

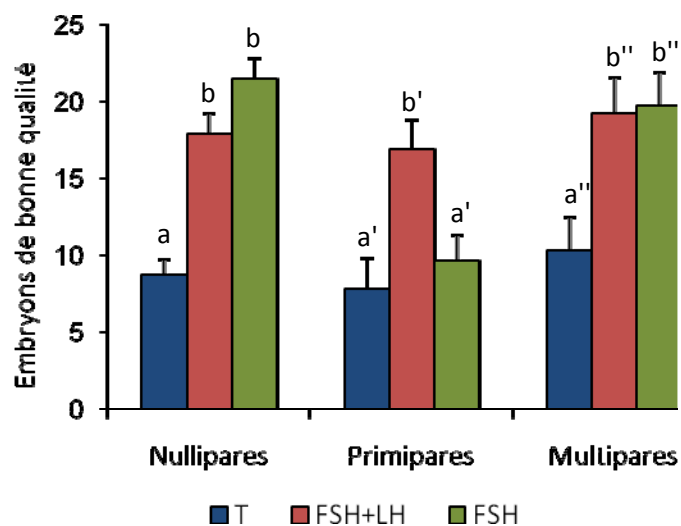


**Figure 11.** *Effet du génotype sur le nombre d'embryons de mauvaise qualité produits par femelle donneuse pour chaque traitement étudié. (LSmean  $\pm$  standard error)*



Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

**Figure 12.** *Effet de la parité sur le nombre d'embryons de bonne qualité collecté par femelle donneuse pour chaque traitement étudié. (LSmean  $\pm$  standard error)*



Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b ; a', b' ; a'', b'') sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

Les résultats des différentes analyses statistiques réalisées en fonction de la parité des femelles montrent que les conclusions peuvent être différentes entre les lapines nulli-, primi- et multipares (données non exposées). Par exemple, le traitement de superovulation avec 20 % de pLH

exogène entraîne une production d'embryons de bonne qualité plus importante que dans les deux autres groupes chez les lapines primipares (figure 12). Cette conclusion est en totale opposition avec celle tirée des observations réalisées sur les femelles nullipares ou multipares où aucune différence significative n'est observée.

#### CULTURE IN VITRO

Les taux de développement *in vitro* jusqu'au stade blastocyste expansé des trois groupes expérimentaux ne diffèrent pas significativement avec respectivement 81,7 (n = 104) ; 70,9 (n = 117) et 80,4 % (n = 128) pour les groupes « T », « pFSH+pLH » et « pFSH ». Aucune différence n'est observée entre les taux de développement *in vitro* des embryons issus des différents génotypes utilisés (données non exposées).

#### TRANSFERT D'EMBRYONS

Les résultats de l'évaluation *in vivo* de la viabilité des embryons décongelés issus des trois groupes expérimentaux sont présentés dans le tableau 8.

**Tableau 8.** Evaluation *in vivo* de la viabilité des embryons congelés/décongelés et après transfert dans des femelles receveuses synchronisées pour chaque traitement étudié.

Groupe	Nombre de receveuses	Nombre d'embryons transférés	Taux de parturition (%)	Nés totaux (vivants+morts)	Taux de survie embryonnaire (%)
T	10	111	80,0	58	52,3
pFSH+pLH	8	96	100,0	47	49,0
pFSH	10	107	100,0	47	43,9
Total	28	314	92,9	152	48,4

Les différences observées dans le tableau ci-dessus ne sont pas significatives ( $p > 0,005$ ).

D'une manière générale, près de 93 % des femelles receveuses transférées ont mis bas au moins un lapereau et seulement deux lapereaux sont morts nés sur 152. Aucune différence significative n'est observée entre les trois groupes expérimentaux aussi bien pour le taux de parturition que pour le taux de développement *in vivo* (48,4 % des embryons transférés sont nés).

#### 1.1.1.4. Discussion et conclusion

Cette expérience avait pour but d'évaluer les effets de la présence ou de l'absence de pLH exogène dans les traitements de superovulation à base de pFSH sur la quantité et la qualité des embryons produits ainsi que sur la variabilité des réponses entre les lapines traitées. De plus, cinq génotypes différents ont été utilisés dans cette étude de manière à évaluer si les conclusions établies pour un génotype sont confirmées ou infirmées chez les autres lignées étudiées.

Conformément aux observations de Kennelly et Foote (1965), l'administration de doses supra-physiologiques de gonadotropines exogènes conduit à une augmentation du nombre de follicules hémorragiques qui s'explique par une apoptose précoce des cellules de la granulosa conduisant à l'atrésie des follicules préovulatoires. De plus, nous avons observé que les traitements de superovulation conduisaient à des défauts d'ovulation chez 2 à 3 lapines traitées sur 10 ce qui confirme les résultats obtenus par Maurer *et al.* (1968a) dans leur étude sur la répétition des traitements de superovulation. Ces défauts d'ovulation avaient alors été attribués à la formation d'anticorps anti-hCG suite aux inductions répétées de l'ovulation ce qui ne peut pas expliquer nos observations, les lapines n'ayant jamais été stimulées auparavant. Plusieurs auteurs ont observé que l'administration de gonadotropines exogènes réduisait la fréquence et l'amplitude de la sécrétion pulsatile de LH endogène accompagné de l'augmentation des concentrations plasmatiques en œstradiol et en progestérone (Laborde *et al.*, 1981; Callesen *et al.*, 1986; Ben Jebara *et al.*, 1994; Gosselin *et al.*, 2000). L'augmentation de la concentration en œstradiol conduit à la diminution de la concentration en LH endogène qui devient trop faible pour activer le rétrocontrôle positif de l'œstradiol sur la sécrétion de LH par l'hypothalamus pendant la période préovulatoire. Cette hypothèse ne semble pas pouvoir être retenue puisque des travaux ont mis en évidence l'absence de rétrocontrôle positif chez les animaux à ovulation induite (Ramirez et Beyer, 1998; Bakker et Baum, 2000). Par conséquent, la concentration élevée en œstradiol peut inhiber le pic préovulatoire de LH et le mécanisme d'ovulation. Les défauts d'ovulation sont rarement observés dans le groupe témoin (< 1 lapine traitée sur 20) ce qui peut être expliqué par les plus faibles quantités d'œstradiol synthétisées par les follicules préovulatoires qui n'inhibent pas le déroulement du pic de LH. De plus, le fait que le nombre de follicules préovulatoires soit significativement plus élevé chez les femelles n'ayant pas ovulé que chez les femelles ayant ovulé (16,4 contre 10,2 follicules préovulatoire par femelle) suggère que la croissance folliculaire a bien été stimulée et que le processus d'ovulation a été inhibé ce qui confirme l'hypothèse formulée ci-dessus. Pour confirmer cette hypothèse, de nouvelles études doivent être menées pour évaluer les profils hormonaux des lapines avant et après administration de gonadotropines.

Aucune différence significative n'a été observée entre les deux traitements de superovulation à l'exception des femelles primipares pour lesquelles le traitement avec pLH semble plus adapté (figure 12). Ces observations suggèrent d'une part qu'il serait nécessaire de s'intéresser de manière plus précise aux réponses des lapines primipares dont le statut physiologique est un peu particulier du fait d'une croissance inachevée ainsi que . D'autre part les résultats montrent que l'utilisation de préparations hormonales sans LH exogène n'améliore pas la production d'embryons contrairement à ce qui avait été montré par Hashimoto *et al.* (2004). Dans leur étude, seuls les nombres d'œufs collectés et le nombre de follicules préovulatoires étaient enregistrés alors que les corps jaunes n'ont pas été observés. Les taux de collecte n'étant pas évoqués pour les différents groupes expérimentaux, l'évaluation de l'efficacité des traitements peut difficilement être envisagée sans qu'elle ne soit biaisée. De plus, aucun ratio LH/FSH n'est indiqué pour le traitement avec un contenu en pLH réduit rendant une nouvelle fois la comparaison entre les deux études délicate. A l'exception des femelles primipares, les résultats obtenus dans notre étude montrent que seule la FSH est nécessaire pour assurer la croissance folliculaire, indépendamment des quantités de LH administrées. Cependant, une petite quantité de LH semble nécessaire pour la maturation ovocytaire et donc pour la qualité du futur embryon (Balasch *et al.*, 1995). Chez quelques espèces, l'injection de LH exogène peut entraîner des effets délétères si les quantités administrées sont trop importantes mais notre étude suggère que cela ne s'applique pas à l'espèce lapin ou que les quantités utilisées étaient trop faibles. Or, la quantité de LH utilisée dans cette étude (ratio LH/FSH~20 %) est relativement élevée par rapport à d'autres études où les effets néfastes de fortes proportions de LH avaient été observés (Chupin *et al.*, 1984; Donaldson et Ward, 1986; Treloar *et al.*, 1997). Chupin *et al.* (1984) et Herrler *et al.* (1991) chez la vache ainsi que Howles (2000) chez l'homme ont observé l'existence d'une concentration optimale en LH pour assurer le bon déroulement de la maturation ovocytaire.

A la différence des femelles primipares, la concentration en LH endogène doit être suffisante pour assurer la maturation folliculaire et ovocytaire chez les nullipares et multipares superovulées puisque la présence ou l'absence de LH exogène n'a entraîné aucun effet sur la qualité des embryons produits et par extrapolation, sur la qualité des ovocytes ovulés. De plus, aucune différence n'a été observée sur la viabilité embryonnaire mesurée *in vitro* ou *in vivo* avec une moyenne de 77,7 % de développement *in vitro* jusqu'au stade blastocyste et 48,4 % de taux de survie embryonnaire après décongélation et transfert. Ces résultats sont supérieurs ou similaires à ceux obtenus dans d'autres études (Lopez-Bejar et Lopez-Gatius, 2002; Naik *et al.*, 2005) et confirment l'hypothèse formulée ci-dessus. Les différences de développement observées *in vitro* et *in vivo* peuvent s'expliquer par des défauts d'implantation des embryons et/ou par une mortalité embryonnaire tardive lors du développement de l'embryon puis du fœtus. Par conséquent, la superovulation des lapines peut aussi bien être réalisée avec ou sans LH sans affecter la quantité et la qualité des embryons produits.

L'importance du génotype des femelles donneuses dans l'interprétation des résultats n'est pas confirmée par ce travail puisque aucune interaction n'a été observée entre le traitement et le génotype des femelles sur le nombre d'embryons de bonne qualité. Cependant, notre étude met en évidence les différences de capacité de production d'embryons des différents génotypes et notamment entre les lignées Grimaud, sélectionnées pour la production de viande et la reproduction et la lignée Castor®, sélectionnée pour la production de fourrure. Les résultats obtenus en production d'embryons mettent en évidence l'efficacité des deux traitements de superovulation qui ont permis de doubler le nombre de corps jaunes et le nombre d'embryons de bonne qualité collectés par femelle donneuse par rapport aux lapines non superovulées du groupe témoin.

Cette expérience montre que les traitements de superovulation sont indispensables pour augmenter le nombre d'embryons produits lors des programmes de cryoconservation. On observe en général, une production d'embryons de bonne qualité deux à trois fois supérieure chez les lapines superovulées par rapport aux femelles témoins. De plus, les traitements de superovulation à base de FSH exogène peuvent être administrés, avec ou sans supplémentation en LH exogène, pour stimuler les ovaires des lapines des 5 génotypes considérés. Ainsi, l'utilisation de préparations commerciales qui ne sont pas purifiées en LH convient parfaitement pour la cryoconservation des ressources génétiques chez le lapin. A l'avenir, il sera nécessaire d'étudier les profils des gonadotropines endogènes avant, pendant et après superovulation de manière à connaître précisément les quantités réelles de LH disponibles pour assurer l'ovogenèse. Ces informations devraient aider à résoudre les problèmes d'ovulation ou de fécondation rencontrés et à diminuer la variabilité des réponses entre les lapines.

## 1.1.2. Diminution du nombre d'injections de gonadotropines

### 1.1.2.1. Objectif

Les traitements de superovulation à base de pFSH nécessitent l'administration régulière (deux fois par jour) de pFSH du fait de la très courte demi-vie de cette hormone induisant une charge de travail contraignante et une source de stress pour les lapines traitées. L'objectif de cette expérience est de diminuer le nombre d'injections réalisées en testant différents excipients susceptibles de relarguer progressivement l'hormone dans la circulation générale.

### 1.1.2.2. Matériel et méthodes

#### ANIMAUX

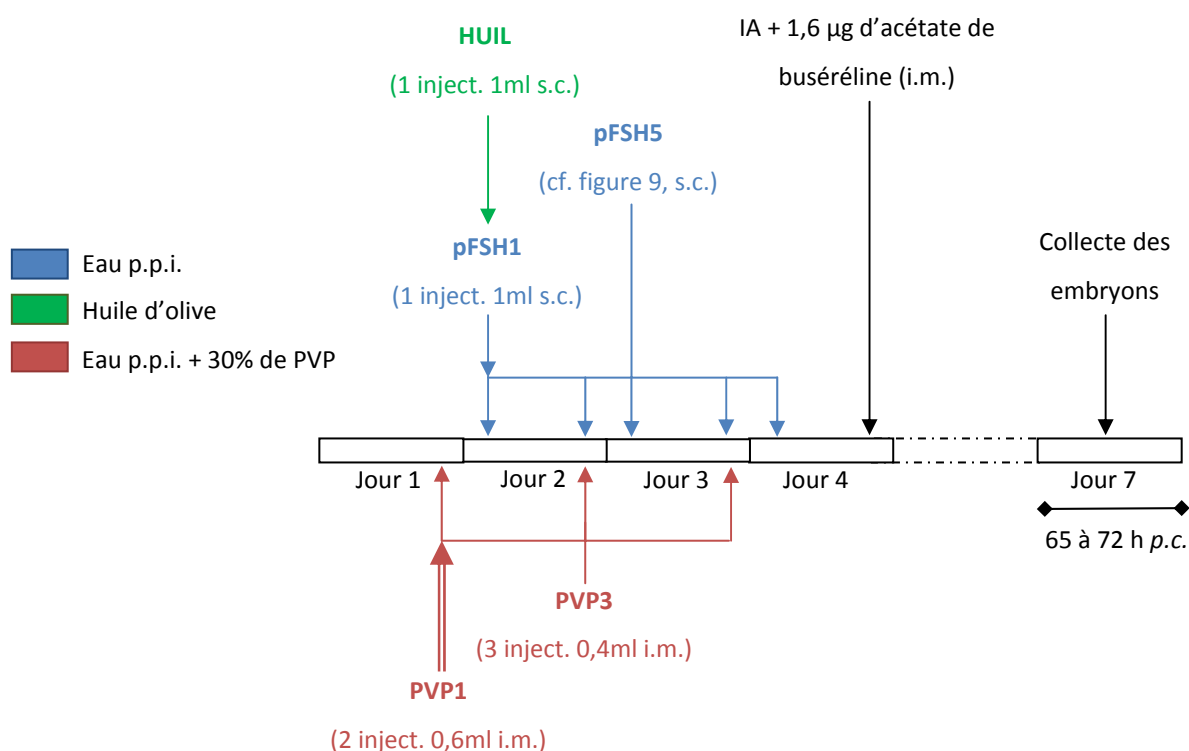
Cette expérience a été réalisée en deux séries d'opérations réalisées chez Grimaud Frères Sélection SAS (Roussay, France). Lors de la première série, 110 femelles multipares de génotype AGP77 (44 ♀) et PS19 (66 ♀) ont été utilisées et 64 femelles nullipares PS19 pour la deuxième série de manipulations. Les lapines étaient toutes en repos sexuel depuis au moins 15 jours après le dernier sevrage et logées individuellement sous les mêmes conditions environnementales (16 h de lumière par jour) avec l'eau et l'aliment fournis *ad libitum*. Les lapines ont toutes été superovulées avec la même quantité de Stimufol® (Reprobiol, Belgique), seuls l'excipient et le mode d'administration variaient. Les lapines ont été réparties de façon homogène dans les 3 groupes expérimentaux en fonction de leur génotype :

- « **pFSH5** » Groupe de lapines témoins superovulées (Stimufol®, Reprobiol, Belgique) en 5 injections répétées (s.c.) et utilisant comme excipient de l'eau pour préparation injectable (ppi) comme décrit précédemment pour le groupe « pFSH+pLH » de l'expérience 1 (n = 15♀ AGP77 et 43♀ PS19).
- « **pFSH1** » Groupe de lapines superovulées (Stimufol®, Reprobiol, Belgique) en une seule injection (s.c) de 1 ml d'eau ppi contenant la dose totale de FSH à injecter (solution à 31,5 µg de pFSH/ml), réalisée en même temps que la première injection du groupe pFSH5 (n = 14♀ AGP77 et 22♀ PS19).
- « **HUIL** » Groupe de lapines superovulées (Stimufol®, Reprobiol, Belgique) en une seule injection (s.c) comme pour le groupe pFSH1 mais en utilisant comme excipient de l'huile d'olive raffinée (réf. O1514, Sigma, France) pour un relargage progressif des gonadotropines (n = 15♀ AGP77 et 22♀ PS19).
- « **PVP1** » Groupe de lapines superovulées (Stimufol®, Reprobiol, Belgique) en deux injections simultanées (i.m.) dans 0,6 ml d'eau ppi + 30 % (w/v) de polyvinylpyrrolidone (réf. P0930, Sigma, France) contenant la dose totale de FSH à injecter (solution à 26,25 µg de pFSH/ml) et réalisées 72 h avant IA (n=22 ♀ PS19).
- « **PVP3** » Groupe de lapines superovulées (Stimufol®, Reprobiol, Belgique) en trois injections (i.m.) dans 0,4 ml d'eau ppi + 30 % (w/v) de polyvinylpyrrolidone – PVP – (réf. P0930, Sigma, France) contenant la dose totale de FSH à injecter (solution à 26,25 µg de pFSH/ml). La première injection est réalisée 72 h avant IA puis toutes les 24 h pour les deux restantes (n=22 ♀ PS19).

## TRAITEMENTS HORMONAUX

Le protocole de superovulation utilisé dans cette expérience pour le groupe pFSH5 est similaire à celui appliqué aux femelles du groupe « pFSH+pLH » dans l'expérience 1 (figure 9) auxquelles il a été administré 31,5 µg de FSH<sub>porcine</sub> supplémentés de 20 % de LH<sub>porcine</sub> (Stimufol®). La même dose totale de pFSH a été administrée aux femelles des autres groupes mais selon des modalités différentes (figure 13).

*Figure 13. Schématisation des protocoles de superovulation utilisant différents excipients et modes d'administration*



## COLLECTE DES EMBRYONS

Les embryons ont été collectés et évalués selon le même protocole que celui décrit dans l'expérience 1 (cf paragraphe I.1.1.2.).

## ANALYSE STATISTIQUE

Le pourcentage de femelles donneuses d'embryons et les variables de collecte mesurées pour la production d'embryons ont été calculés puis analysés selon la même méthode que celle décrite dans l'expérience 1 (cf paragraphe I.1.1.2.).

La présence de données manquantes ne nous a pas permis de réaliser une analyse de variance à trois effets fixés pour évaluer les effets du mode d'administration de Stimufol®, du

génotype, de la parité des femelles traitées. Par conséquent, les résultats ont été analysés à l'aide d'une analyse de variance à un effet fixé (StatView®, SAS Institute Inc.) correspondant à l'effet du traitement (5 niveaux).

### 1.1.2.3. Résultats

**Tableau 9.** Influence du mode d'administration de la pFSH (5 niveaux) sur la réponse ovarienne des lapines

	Femelles donneuses	Répartition femelles non donneuses			
		Non ovulée	Non fécondée	TC nul <sup>(1)</sup>	EMQ <sup>(2)</sup>
pFSH5	41/58 (70,7 %) <sup>b</sup>	10/58 (17,2 %)	5/58 (8,6 %)	2/58 (3,4 %)	0
pFSH1	9/36 (25,0 %) <sup>a</sup>	1/36 (2,8 %)	20/36 (55,6 %)	5/36 (13,9 %)	1/36 (2,8 %)
HUIL	26/37 (70,3 %) <sup>b</sup>	1/37 (2,7 %)	9/37 (24,3 %)	1/37 (2,7 %)	0
PVP1	18/23 (78,3 %) <sup>b</sup>	0	2/23 (8,7 %)	1/23 (4,3 %)	2/23 (8,7 %)
PVP3	18/23 (78,3 %) <sup>b</sup>	0	1/23 (4,3 %)	3/23 (13,0 %)	1/23 (4,3 %)

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b) dans la même colonne sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

<sup>(1)</sup> Femelle ayant ovulée mais pour laquelle aucun embryon ni ovocyte n'a pu être collecté.

<sup>(2)</sup> Femelle ayant ovulée mais pour laquelle les embryons collectés étaient tous de mauvaise qualité.

Le tableau 9 montre les réponses ovariennes des lapines superovulés par injection(s) de 31,5 µg de pFSH selon différentes modalités. Le pourcentage de femelles ayant donné au moins un embryon de bonne qualité du groupe pFSH1 est significativement différent ( $p < 0,0001$ ) des résultats obtenus pour les autres groupes expérimentaux qui ne diffèrent pas significativement entre eux. Les lapines n'ayant pas donné d'embryons de bonne qualité présentaient principalement des problèmes de fécondation et notamment pour le groupe pFSH1 où plus de 55% des lapines traitées n'ont pas été fécondées. La deuxième cause mise en évidence représente des femelles dont le taux de collecte était nul.

Les résultats de production d'embryons des femelles donneuses des différents groupes sont présentés dans le tableau 10. Le taux de collecte moyen obtenu dans cette expérience est de 80,0 % sans différence significative entre les groupes expérimentaux même si le groupe pFSH1 présente un taux plus faible avec 61,4 %. On observe que le traitement a un effet significatif sur l'ensemble des critères mesurés à l'exception du nombre d'ovocytes. Ainsi, le nombre de corps jaunes par femelle donneuse est significativement plus élevé pour les femelles superovulées témoins du groupe pFSH5



que pour les femelles du groupe pFSH1 ( $38,1 \pm 2,4$  contre  $28,0 \pm 5,0$ ). De la même façon, le nombre de corps jaunes du groupe pFSH1 est supérieur à celui des autres groupes étudiés ( $15,0 \pm 0,8$  ;  $14,1 \pm 1,6$  et  $14,9 \pm 1,4$  respectivement pour les groupes HUIL, PVP1 et PVP3).

L'effet traitement observé pour le nombre d'œufs collectés et pour le nombre d'embryons de bonne qualité est identique à celui observé pour la variable CJ. On observe aussi un effet traitement sur la variable EMQ mais les écarts restent toutefois assez faibles avec 0 à  $0,6 \pm 0,2$  embryons de mauvaise qualité par femelle donneuse.

#### *1.1.2.4. Discussion et conclusion*

Cette expérience avait pour but de diminuer le nombre d'injections de FSH lors des traitements de superovulation des lapines de manière à réduire la charge de travail et le stress des lapines. Dans cette étude, 4 traitements de superovulation avec un nombre réduit d'injections (1 à 3 injections) ont été comparés au traitement témoin comprenant 5 injections successives en deux jours et demi. Les résultats obtenus montrent que ces traitements alternatifs ne permettent pas de superovuler les femelles. Les productions d'embryons obtenues avec ces traitements sont inférieures à celle des lapines témoins superovulées avec le traitement classique.

L'administration en une seule injection (s.c.) de la dose totale de pFSH diluée dans de l'eau ppi s'accompagne d'une stimulation ovarienne intéressante bien qu'inférieure à celle permise par le traitement témoin ( $28,0 \pm 5,0$  contre  $38,1 \pm 2,4$  corps jaunes par femelle donneuse). Cependant, l'utilisation de ce traitement conduit à un très faible pourcentage de lapines donneuses d'embryons parmi les lapines traitées (25,0 %) qui diffère significativement des autres groupes expérimentaux. Ce résultat s'explique principalement par des problèmes de fécondation et de collecte des embryons qui peuvent être reliés à la qualité des ovocytes produits et/ou à un transit plus rapide des ovocytes non fécondés et atrétiques dans les voies génitales femelles. Ces problèmes de collecte concernent aussi bien les lapines où aucun œuf n'a pu être collecté que les lapines donneuses d'embryons puisque seuls  $17,2 \pm 2,9$  œufs ont pu être collectés en moyenne sur  $28,0 \pm 5,0$  corps jaunes (taux de collecte de 61,4 % contre 84,5 % pour le groupe témoin). Les lapines des différents groupes ayant été inséminées avec le même mélange de semence, ces résultats traduisent probablement un problème au niveau de la qualité des ovocytes ovulés. L'injection unique de pFSH diluée dans l'eau ppi doit entraîner une élévation brutale du niveau de FSH plasmatique provoquant une forte stimulation de la croissance folliculaire pour les lapines présentant des follicules en phase de croissance terminale. Cette élévation permet le recrutement de nombreux follicules qui vont initier la maturation de l'ovocyte qu'ils renferment.

**Tableau 10.** *Influence du mode d'administration de la pFSH (5 niveaux) sur différents paramètres de production d'embryons. (Mean ± standard error)*

	n	FP	FH	CJ	COL	EBQ	EMQ	OV
<b>TRAITEMENT (valeur de p)</b>		0,0025	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0269	NS
pFSH5 (5 injections, eau ppi)	41	8,9 ± 0,9 <sup>a,c</sup>	5,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	38,1 ± 2,4 <sup>b</sup>	32,2 ± 2,2 <sup>a</sup>	30,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,0 ± 0,3
pFSH1 (1 injection, eau ppi)	9	7,0 ± 1,1 <sup>c</sup>	4,1 ± 1,1 <sup>a,b</sup>	28,0 ± 5,0 <sup>a</sup>	17,2 ± 2,9 <sup>b</sup>	16,2 ± 3,0 <sup>b</sup>	0,4 ± 0,4 <sup>a,b</sup>	0,6 ± 0,6
HUIL (1 injection, huile)	26	10,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	15,0 ± 0,8 <sup>c</sup>	11,0 ± 0,9 <sup>b</sup>	10,7 ± 0,9 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,1
PVP1 (1 injection, PVP)	18	7,5 ± 1,2 <sup>c</sup>	2,0 ± 0,6 <sup>b</sup>	14,1 ± 1,6 <sup>c</sup>	12,0 ± 1,2 <sup>b</sup>	11,8 ± 1,2 <sup>b</sup>	0,2 ± 0,1 <sup>a,b</sup>	0,1 ± 0,1
PVP3 (3 injections, PVP)	18	4,8 ± 0,7 <sup>b,c</sup>	1,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	14,9 ± 1,4 <sup>c</sup>	11,4 ± 0,7 <sup>b</sup>	11,1 ± 0,8 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,2

n: effectif

**ABBREVIATIONS:** nombre de follicules préovulatoires (FP), nombre de follicules hémorragiques (FH), nombre de corps jaunes (CJ), nombre d'ovocytes collectés (OV), nombre total d'œufs collectés (COL), nombre d'embryons de bonne (EBQ) et de mauvaise qualité (EMQ).

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b, c, d, e) dans la même colonne sont statistiquement différentes ( $p < 0.05$ ). NS signifie que l'effet observé n'est pas significatif ( $p > 0,05$ ).

Or, la FSH ayant une faible demi-vie qui a été estimée à 5h chez les bovins (Demoustier *et al.*, 1988), la croissance folliculaire se poursuivra pendant plus de 50h (induction de l'ovulation 55 à 60h après la l'injection de pFSH) sans maintien du niveau de FSH initial. On peut donc logiquement penser que le niveau de FSH plasmatique sera trop faible pour assurer le bon déroulement de la maturation ovocytaire, notamment pour les follicules les moins dominants, recrutés grâce à l'élévation initiale de la concentration plasmatique en FSH. L'évaluation de la qualité des ovocytes produits avec une injection unique de pFSH dans de l'eau ppi permettrait de valider ou d'infirmer cette hypothèse. Pour cela, la quantité d'ATP intracellulaire a été évaluée 14 à 15h après l'induction d'ovulation dans des ovocytes produits à partir de femelles traitées selon les protocoles de superovulation pFSH5 et pFSH1 (données non exposées). Cette expérience complémentaire a mis en évidence un contenu en ATP identique pour les ovocytes pFSH1 et pFSH5 (respectivement  $3,6 \pm 0,3$  et  $3,7 \pm 0,1$  pmol d'ATP par ovocyte) ce qui ne permet pas de définir les problèmes de viabilité ovocytaire liés au protocole appliqué. Cependant, l'intensité d'ovulation et le taux de collecte obtenus chez les femelles pFSH1 étaient plus faibles que pour les femelles pFSH5 (respectivement 17,7 et 55,7 corps jaunes par femelle donneuse et des taux de collecte de 46,2 et 94,6 %) traduisant peut être un problème de stimulation ovarienne par la pFSH et/ou un problème d'accélération du transit des ovocytes dans l'oviducte. Les effets néfastes des traitements de superovulation ont déjà été soulignés (Fujimoto *et al.*, 1974) notamment sur les changements induits au niveau du milieu oviducto-utérin (Foote et Ellington, 1988) qui pourraient expliquer les problèmes de transit observés. De plus, il a récemment été observé que les lapines présentant une intensité d'ovulation élevée produisaient des ovocytes de moins bonne qualité et notamment une concentration en glutathion plus faible (Laborda *et al.*, 2008). De nouvelles études sont nécessaires pour déterminer si les problèmes rencontrés sont attribuables à une faible qualité ovocytaire, à des changements du milieu oviducto-utérin ou à une combinaison des deux facteurs.

Afin de réduire le nombre d'injections, il apparaît donc nécessaire d'utiliser des techniques permettant de relarguer progressivement la FSH exogène. Pour cela, Treloar *et al.* (1997) ont implanté sous la peau des lapines traitées une pompe micro-osmotique qui permettait de délivrer 0,1 µl par heure d'une solution à 32 UI de FSH sur une durée de 3 jours. Les résultats obtenus étaient de niveau similaire à ceux obtenus dans notre étude avec 37,2 corps jaunes et 26,9 œufs collectés en moyenne par femelle mais le protocole était coûteux, et difficile à mettre en œuvre dans le cadre d'opérations de cryoconservation des ressources génétiques.

Une autre approche a été largement étudiée et consistait à diluer les hormones dans des excipients métabolisables progressivement et permettant un relargage continu des hormones. Le principal excipient testé a été des solutions de PVP à différentes concentrations et de différents poids

moléculaires pour les traitements de superovulation chez le lapin (Kanayama *et al.*, 1992; Hirabayashi *et al.*, 2000a; Hirabayashi *et al.*, 2000b; Hashimoto *et al.*, 2004; Mehaisen *et al.*, 2006) mais aussi chez les bovins (Yamamoto *et al.*, 1994; Takedomi *et al.*, 1995; Satoh *et al.*, 1996; Sugano et Shinogi, 1999), les ovins (D'Alessandro *et al.*, 2001), les porcins (Dattena *et al.*, 1994). Les résultats obtenus dans notre expérience avec l'utilisation du PVP en une injection (PVP1) et trois injections (PVP3) sont similaires à ceux obtenus par Hirabayashi *et al.* (2000b) mais inférieurs à ceux obtenus par Hashimoto *et al.* (2004), Hirabayashi *et al.* (2000a), Kanayama *et al.* (1992) et Mehaisen *et al.* (2006). Ces écarts peuvent s'expliquer principalement par des différences de protocoles au niveau de la concentration en PVP (généralement 10 %) qui semble jouer un rôle important dans la réponse ovarienne, contrairement au poids moléculaire du PVP utilisé (D'Alessandro *et al.*, 2001). Dans notre étude, l'intensité d'ovulation obtenue avec le traitement témoin pFSH5 montre que les lapines traitées avec les protocoles PVP1 et PVP3 n'ont pas été superovulées et donc que la pFSH injectée n'a pas stimulé les ovaires. La concentration en PVP utilisée (30 %) a peut être été trop élevée conduisant à un relargage beaucoup trop lent de la pFSH.

Mehaisen *et al.* (2006) ont obtenu des résultats plus élevés (respectivement 25,2 et 20,3 corps jaunes et embryons récoltés par femelle) avec une concentration en PVP identique, soulignant une faible répétabilité du protocole utilisant le PVP. Cette variabilité a été soulignée récemment par Hashimoto *et al.* (2007) qui ont utilisé un gel d'hydroxyde d'aluminium (3,2 mg d'aluminium/ml) comme « excipient retard » permettant l'obtention de résultats préliminaires encourageants (> 40 embryons collectés) qui seront à confirmer compte tenu du très faible effectif utilisé. Cet excipient, généralement utilisé pour les vaccins (Baylor *et al.*, 2002), a été utilisé avec succès en superovulation chez les bovins avec une concentration de 3 mg d'aluminium/ml (Kimura *et al.*, 2007). Dans notre étude, le groupe expérimental HUIL permettait de tester un nouvel excipient naturel ; l'hypothèse émise consistait à penser que l'émulsion lipidique formée par l'adjonction de l'huile d'olive permettait le relargage progressif des microgouttelettes de pFSH. Cependant, les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus avec le PVP et montrent que l'huile n'a pas été métabolisée selon la cinétique souhaitée et que la dégradation de la pFSH n'a pas été assez rapide.

A l'avenir, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour étudier de manière plus précise les cinétiques de libération de la FSH exogène dans l'organisme en fonction de la nature et de la concentration de l'excipient utilisé. Cette étude montre que dans le cadre de la conservation des ressources génétiques chez le lapin, seul le traitement de superovulation standard avec 5 injections sous-cutanées de pFSH peut être préconisé pour augmenter significativement la production d'embryons par les femelles traitées.

## **I.2. Essais relatifs à l'activité ovarienne**

### **I.2.1. Evaluation de l'efficacité d'un traitement de synchronisation des vagues folliculaires**

#### **I.2.1.1. Objectif**

Hormis la nature du traitement de superovulation administré, la variabilité des réponses aux traitements de superovulation peut s'expliquer par des différences physiologiques existantes entre les lapines traitées. Par exemple, les lapines multipares peuvent avoir un statut ovarien variable d'un individu à l'autre et des vagues folliculaires asynchrones. L'objectif de cette expérience est d'évaluer l'efficacité d'un traitement de synchronisation des vagues folliculaires utilisant les prostaglandines  $F_{2\alpha}$  sur la production quantitative et qualitative d'embryons et sur la variabilité des réponses des lapines superovulées.

#### **I.2.1.2. Matériel et méthodes**

#### **ANIMAUX**

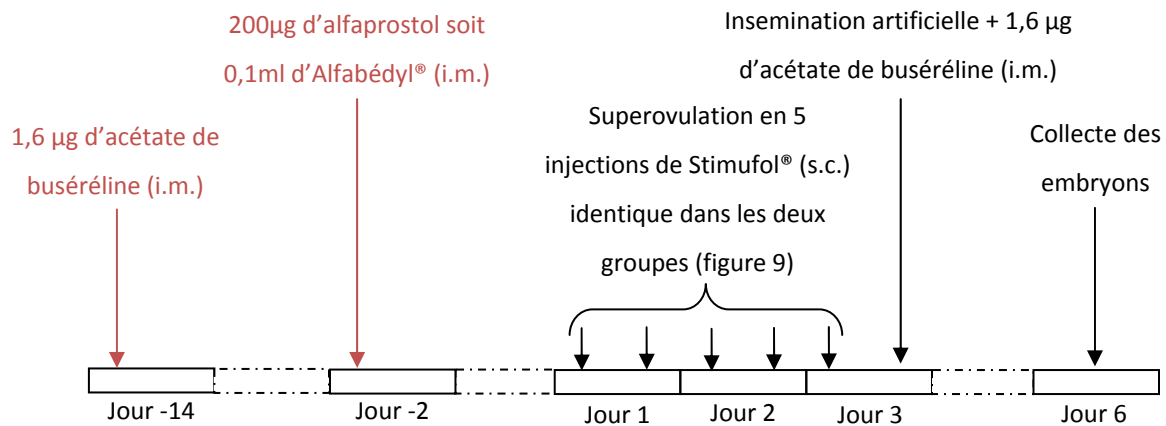
Au total, 128 lapines multipares en repos sexuel depuis plus de deux semaines après leur sevrage et appartenant à 4 génotypes différents (Lignées GRIMAUD mâle AGP40 & AGP79 et femelle AGP07 & AGP77). Pour chaque génotype, les lapines étaient logées individuellement sous les mêmes conditions environnementales avec eau et aliment fournis *ad libitum*. Les lapines ont été réparties de façon homogène dans deux groupes expérimentaux :

- « **pFSH5** » Groupe de lapines témoins (n=61) superovulées avec le Stimufol®, (Reprobiol, Belgique).
- « **SYN** » Groupe de lapines (n=81) superovulées selon le même protocole que le groupe « pFSH5 » mais ayant subi, au préalable, un traitement de synchronisation.

#### **TRAITEMENTS HORMONAUX**

Le protocole de superovulation utilisé dans cette expérience est identique à celui appliqué aux femelles du groupe « pFSH+PLH » dans l'expérience 1 (figure 9) auxquelles il a été administré 31,5 µg de FSH<sub>porcine</sub> supplémentés de 20 % de LH<sub>porcine</sub> (Stimufol®). Le protocole de synchronisation des vagues folliculaires des lapines est présenté en figure 14.

**Figure 14.** Protocole de synchronisation préalable au traitement de superovulation des lapines



L'objectif de ce traitement consiste à synchroniser les vagues folliculaires des lapines du groupe « SYN » par une première induction d'ovulation 14 jours avant le début du traitement de superovulation par injection de 1,6 µg d'acétate de buséréline (i.m.) correspondant à 0,4ml de Receptal® (Intervet, France). Ensuite, une injection (i.m.) de 200 µg d'alfaprostol (Alfabédyl®, Ceva Santé Animale, France) par femelle 12 jours après la première induction d'ovulation permet d'entraîner la lutéolyse et la fin de la pseudogestation. Le traitement de superovulation débute 48 h après l'injection de prostaglandines, aussi bien pour les femelles du groupe « SYN » que celles du groupe « pFSH5 ». L'insémination artificielle est réalisée 8 à 10 h après la dernière injection de Stimufol® et l'ovulation est immédiatement induite par injection de 0,4 ml de Receptal®.

#### COLLECTE DES EMBRYONS

Les embryons ont été collectés et évalués selon le même protocole que celui décrit dans l'expérience 1 (cf paragraphe I.1.1.2.).

#### ANALYSE STATISTIQUE

Le pourcentage de femelles donneuses d'embryons et les variables de collecte mesurées pour la production d'embryons ont été calculés puis analysés selon la même méthode que celle décrite dans l'expérience 1 (cf paragraphe I.1.1.2.). Les effets du traitement de synchronisation, du génotype des lapines traitées et de leur interaction sur les variables de collecte décrites ci-dessus ont été analysés par une analyse de variance à deux effets fixés (StatView®, SAS Institute Inc.).

### 1.2.1.3. Résultats

Le tableau 11 présente les réponses ovariennes des lapines superovulées témoins (pFSH5) et synchronisées (SYN). Le traitement de synchronisation des vagues folliculaires n'améliore pas significativement le pourcentage de femelles donneuses (83,6 contre 77,0 % respectivement pour les lapines synchronisées et témoins). Quelque soit le groupe expérimental, la proportion de femelles n'ayant pas donné d'embryons de bonne qualité résulte principalement de défauts de fécondation.

Tableau 11. Influence du traitement de synchronisation sur la réponse ovarienne des lapines superovulées.

	Femelles donneuses	Répartition femelles non donneuses			
		Non ovulée	Non fécondée	TC nul <sup>(1)</sup>	EMQ <sup>(2)</sup>
pFSH5	47/61 (77,0 %)	1/61 (1,7 %)	11/61 (18,0 %)	0	2/61 (3,3 %)
SYN	55/66 (83,6 %)	1/66 (1,5 %)	10/66 (15,2 %)	0	0

<sup>(1)</sup> Femelle ayant ovulée mais où aucun embryon ni ovocyte n'a pu être collecté.

<sup>(2)</sup> Femelle ayant ovulée mais où les embryons collectés étaient tous de mauvaise qualité.

Le tableau 12 montre l'effet du traitement de synchronisation sur les différents paramètres de production d'embryons mesurés. Aucune différence significative n'est observée entre le groupe de lapines témoins et synchronisées. Néanmoins, on observe une production d'embryons similaire entre les deux groupes mais la variabilité des réponses entre femelles est plus importante pour le groupe témoin comme le montre la figure 15 ( $29,8 \pm 2,6$  contre  $26,2 \pm 1,6$  embryons de bonne qualité respectivement pour les groupes pFSH5 et SYN,  $p = 0,215$ ). La synchronisation des vagues folliculaires permet de diminuer la variabilité de réponse des lapines sur l'ensemble des critères pris en compte.

Le génotype des femelles utilisées a un effet significatif sur l'ensemble des paramètres mesurés à l'exception du nombre de follicules hémorragiques et du nombre d'embryons de mauvaise qualité. Aucune interaction n'est observée entre le type de traitement administré et le génotype des femelles traitées à l'exception du nombre d'embryons de mauvaise qualité.

**Tableau 12.** *Influence du traitement de synchronisation (2 niveaux) et du génotype (4 niveaux) sur différents paramètres de production d'embryons.*  
(Mean ± Standard error)

	n	FP	FH	CJ	OV	COL	EBQ	EMQ
<b>TRAITEMENT</b> (valeur de p)		NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
pFSH5	47	12,4 ± 1,1	4,3 ± 0,5	38,5 ± 2,4	1,3 ± 0,6	32,9 ± 2,6	29,8 ± 2,6	1,7 ± 0,3
SYN	55	13,4 ± 0,8	3,2 ± 0,4	33,6 ± 1,7	1,4 ± 0,4	29,5 ± 1,6	26,2 ± 1,6	1,9 ± 0,4
<b>GENOTYPE</b> (valeur de p)		0,0001	NS	0,0057	0,0006	0,0058	0,0007	NS
AGP 07	45	13,3 ± 1,1 <sup>ab</sup>	4,0 ± 0,4	40,3 ± 2,4 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	37,0 ± 3,3 <sup>a</sup>	35,3 ± 2,2 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,3
AGP 40	20	10,8 ± 1,0 <sup>a</sup>	2,8 ± 0,5	26,8 ± 2,4 <sup>b</sup>	0,6 ± 0,3 <sup>b</sup>	24,8 ± 2,6 <sup>b</sup>	22,2 ± 2,4 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,6
AGP 77	16	18,8 ± 1,1 <sup>b</sup>	2,9 ± 0,6	32,6 ± 2,4 <sup>a,b</sup>	4,5 ± 1,6 <sup>a</sup>	29,1 ± 3,1 <sup>b</sup>	22,7 ± 3,4 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,5
AGP 79	21	9,8 ± 1,1 <sup>ab</sup>	4,3 ± 1,0	37,4 ± 3,2 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,6 <sup>a,b</sup>	26,1 ± 3,2 <sup>b</sup>	21,3 ± 2,9 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,8
<b>TRAITEMENT*GENOTYPE</b> (valeur de p)		NS	NS	NS	NS	NS	NS	0,0446

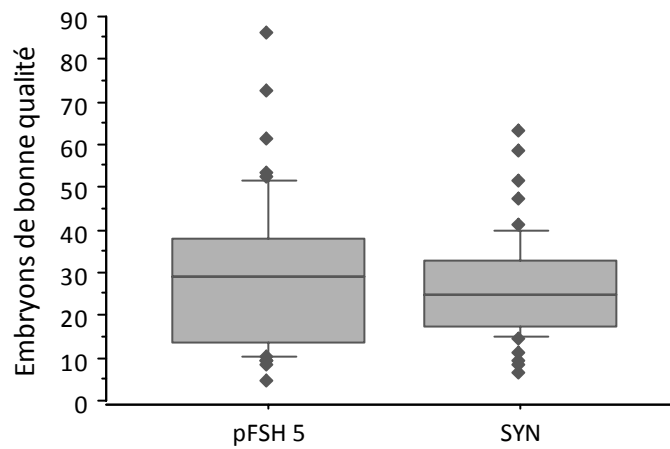
n: effectif

**ABBREVIATIONS:** nombre de follicules préovulatoires (FP), nombre de follicules hémorragiques (FH), nombre de corps jaunes (CJ), nombre d'ovocytes collectés (OV), nombre total d'œufs collectés (COL) et nombre d'embryons de bonne (EBQ) et de mauvaise qualité (EMQ).

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b) dans la même colonne sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ). NS signifie que l'effet observé n'est pas significatif ( $p > 0,05$ ).



Figure 15. Variation du nombre d'embryons de bonne qualité produits par les lapines témoins et synchronisées



#### 1.2.1.4. Discussion et conclusion

Lors des opérations de cryoconservation, l'homogénéisation des réponses des lapines aux traitements de superovulation est particulièrement importante quand les populations concernées sont de type I ou II et que les individus sont précieux. L'objectif de cette expérience était d'évaluer l'efficacité d'un traitement hormonal de synchronisation des vagues folliculaires pour homogénéiser la production d'embryons de lapines superovulées. Les résultats obtenus montrent que le nombre d'embryons congelables par femelle donneuse n'est pas significativement amélioré par l'utilisation du traitement de synchronisation. Cependant, même si l'administration de ce traitement n'augmente pas le pourcentage de lapines donneuses (77,0 contre 83,6 % de lapines donneuses), il permet de diminuer légèrement la variabilité de leur réponse.

A notre connaissance, aucune étude récente n'a été menée sur la synchronisation des vagues folliculaires chez la lapine et ces résultats sont difficilement comparables à ceux obtenus chez les autres espèces domestiques présentant un cycle œstrien et dont l'ovulation se déroule spontanément. 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, les traitements hormonaux de synchronisation de l'œstrus et d'induction de l'ovulation sont nécessaires pour la mise à la reproduction des animaux en contre saison sexuelle. Chez la brebis et la chèvre, Baril *et al.* (2004) ont pu augmenter la production d'embryons par inhibition de la croissance folliculaire terminale lors du cycle précédant le traitement de superovulation. Cette inhibition a été réalisée grâce à l'administration d'analogues

anti-GnRH qui permettent d'augmenter la population de follicules recrutables lors du traitement de superovulation en inhibant leur recrutement lors de la vague folliculaire précédente. Aucune étude similaire n'a été menée chez le lapin et il serait intéressant de tester ce type de protocole pour essayer d'augmenter le nombre d'embryons produits.

Chez la lapine, un grand nombre d'expériences ont été conduites pour synchroniser et induire la réceptivité des femelles qui représente un facteur clé pour la réussite de l'insémination artificielle. Or, nous ne sommes pas capables aujourd'hui d'établir de relations de causes à effets entre le comportement d'œstrus et la croissance folliculaire mais l'observation de l'état de réceptivité des femelles représente actuellement le meilleur critère d'étude. Bien que les recherches portent actuellement sur l'utilisation de biostimulations (séparation mère-jeunes, flushes alimentaires et lumineux, proximité des mâles...), il a été montré que l'administration de 20 à 25 UI de PMSG 48 h avant l'insémination permettait d'augmenter significativement le pourcentage de femelles réceptives et leur productivité (Theau-Clement, 2007). De plus, la prostaglandine  $F_{2\alpha}$  ou ses analogues de synthèse peuvent être utilisés en association de la stimulation à l'eCG pour éviter le risque de pseudogestation dans le cheptel concerné. L'efficacité des traitements de synchronisation par rapport aux performances du groupe témoin dépend alors vraisemblablement du pourcentage de femelles pseudogestantes au moment de l'insémination. Dans notre expérience, le fait qu'aucune différence significative n'ait été observée entre les deux groupes pourrait venir du fait que les cheptels utilisés ne présentaient pas une grande proportion de femelles pseudogestantes (conditions d'environnement bien maîtrisées). Ainsi, il semble nécessaire d'évaluer l'efficacité du traitement de synchronisation proposé dans cette étude sur des cheptels élevés dans des conditions d'élevages non maîtrisées ou soumis à différents stress favorisant l'apparition de comportements pseudogestatifs (stress hydrique ou alimentaire, transport, cages collectives...).

Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'un traitement de synchronisation n'est pas nécessaire quand les lapines sont élevées dans des conditions environnementales maîtrisées. Celui-ci pourrait s'avérer efficace dans le cas de femelles soumises à un environnement favorisant les risques de pseudogestation comme dans les élevages fermiers traditionnels. De plus, le traitement de synchronisation administré a permis de diminuer la variabilité des réponses aux traitements de superovulation des lapines sans toutefois la supprimer totalement. Par conséquent, cette étude met aussi en évidence que la variabilité de réponses aux traitements de superovulation des lapines ne sont pas liées essentiellement à une folliculogénèse asynchrone mais probablement à des variations de la durée des croissances folliculaires entre individus de même génotype, placés dans un même environnement et soumis à des traitements identiques. Le manque de connaissances physiologiques

sur les croissances folliculaires chez la lapine et de ses variations entre individus ou même au cours des différents cycles d'un individu, représente l'obstacle principal pour la compréhension des sources de variations de la production d'embryons des femelles superovulées.

## 1.2.2. Effet du moment de l'IA par rapport au sevrage sur la quantité et la qualité des embryons produits

### 1.2.2.1. Objectif

Lors des opérations de cryoconservation des ressources génétiques, il est important de déterminer avec précision les stratégies de préparation des lapines afin de maximiser la production d'embryons et de limiter le pourcentage de femelles ne répondant pas aux traitements de superovulation. Ainsi, dans le cas d'une production d'embryons à partir d'un cheptel de lapines allaitantes, il est primordial de déterminer la période optimale par rapport au sevrage des lapereaux pour la réalisation des traitements de superovulation. Ces données sont aussi importantes pour la détermination du rythme d'IA optimal après sevrage dans les élevages. Dans d'autres termes, il s'agit d'évaluer l'influence du niveau de prolactine plasmatique sur la quantité et la qualité des embryons produits à partir de lapines superovulées.

### 1.2.2.2. Matériel et méthodes

#### **ANIMAUX**

Soixante et une femelles multipares de génotype INRA 1001 (lignée femelle lourde sélectionnée et entretenue à la station expérimentale lapins (SELAP) du centre INRA de Toulouse (Langlade, France)) ont été utilisées dans cette expérience. Les lapines étaient logées individuellement sous les mêmes conditions environnementales (passage brutal de 8 à 16h d'éclairément 6 jours avant l'IA) avec eau et aliment fournis *ad libitum*. Les lapines ont été réparties de façon aléatoire dans trois groupes expérimentaux en fonction du moment d'insémination par rapport au sevrage effectué au 32<sup>ème</sup> jour de lactation (figure 16) :

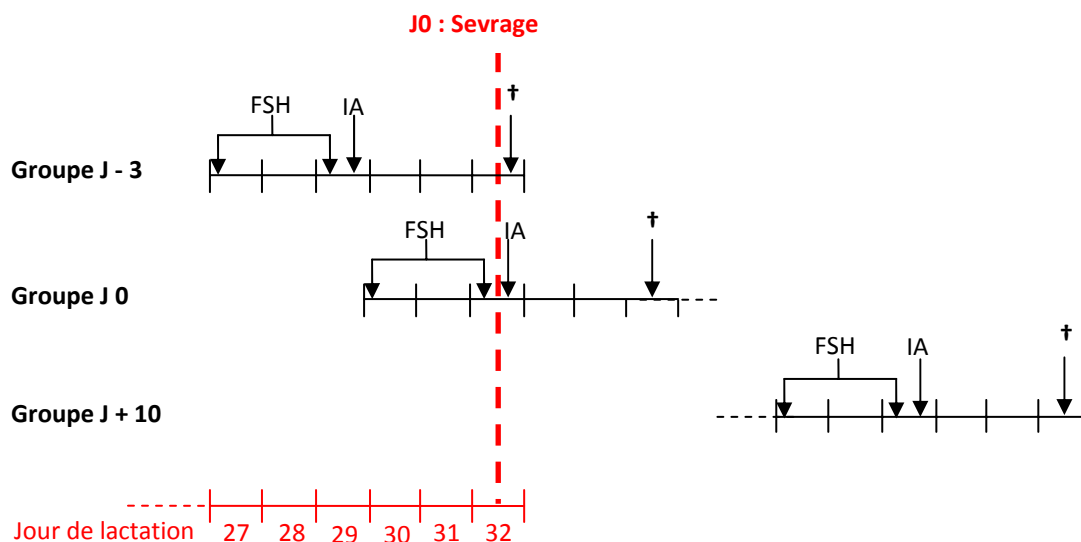
- « **J - 3** » Groupe de lapines allaitantes superovulées et inséminées 3 jours avant le sevrage des lapereaux correspondant au jour de collecte des embryons (n=20).
- « **J 0** » Groupe de lapines allaitantes superovulées et inséminées le jour du sevrage des lapereaux (n=20).
- « **J + 10** » Groupe de lapines non allaitantes superovulées et inséminées 10 jours après le sevrage des lapereaux (n=21).

Bien que l'existence d'un pic de réceptivité au moment du sevrage soit souvent évoqué chez la lapine, aucune étude ne l'a clairement démontré. Les moments d'insémination ont donc été choisis pour des raisons pratiques mais aussi physiologiques (niveaux de prolactine distincts entre les 3 groupes).

#### TRAITEMENTS HORMONAUX

Le protocole de superovulation utilisé dans cette expérience est identique à celui appliqué aux femelles du groupe « pFSH+pLH » dans l'expérience 1 (figure 9) auxquelles il a été administré 31,5 µg de FSH<sub>porcine</sub> supplémentés de 20 % de LH<sub>porcine</sub> (Stimufol®).

*Figure 16. Schématisation de la préparation des femelles des groupes J-3, J0 et J+10 par rapport au jour du sevrage*



Dix à douze heures après la dernière injection de gonadotropines, les femelles ont été inséminées avec 0,5 ml d'un mélange polyspermiqme et l'ovulation était induite immédiatement après par injection (i.m.) de 0,4 ml de Receptal® (Intervet, France) représentant 1,6 µg d'acétate de buséréline (analogue de synthèse de GnRH) par femelle.

#### COLLECTE DES EMBRYONS

Les embryons ont été collectés et évalués selon le même protocole que celui décrit dans l'expérience 1 (cf paragraphe I.1.1.2.).

## ANALYSE STATISTIQUE

Le pourcentage de femelles donneuses d'embryons et les variables de collecte mesurées pour la production d'embryons ont été calculés puis analysés selon la même méthode que celle décrite dans l'expérience 1 (cf paragraphe I.1.1.2.). Les effets du moment d'insémination par rapport au sevrage ont été analysés par une analyse de variance à un effet fixé (StatView®, SAS Institute Inc.).

I.2.2.3. Résultats

Le tableau 13 présente les réponses ovariennes des lapines des groupes J-3, J0 et J+10 et les principales raisons de non production pour les femelles n'ayant donné aucun embryon de bonne qualité. Les pourcentages de femelles donneuses d'embryons ne diffèrent pas significativement entre les 3 groupes expérimentaux bien que l'on observe une forte tendance en faveur des lapines allaitantes (J-3 et J0). La plupart des femelles non donneuses sont des femelles n'ayant pas ovulé ou dont les ovocytes n'ont pas été fécondés. Le taux de collecte global obtenu dans cette expérience est de 64,1 %.

Tableau 13. Influence du moment de l'IA par rapport au sevrage sur la réponse ovarienne des lapines des lots « j-3 », « J 0 » et « J + 10 ».

	Femelles donneuses	Répartition femelles non donneuses			
		Non ovulée	Non fécondée	TC nul <sup>(1)</sup>	EMQ <sup>(2)</sup>
J - 3	16/20 (80,0 %)	1/20 (5,0%)	3/20 (15,0%)	0	0
J 0	17/20 (85,0 %)	1/20 (5,0%)	2/20 (10,0%)	0	0
J + 10	14/21 (66,7 %)	2/21 (9,5%)	3/21 (14,3%)	2/21 (9,5%)	0

<sup>(1)</sup> Femelle ayant ovulée mais où aucun embryon ni ovocyte n'a pu être collecté.

<sup>(2)</sup> Femelle ayant ovulée mais où les embryons collectés étaient tous de mauvaise qualité.

Le tableau 14 montre les résultats de production d'embryons des lapines appartenant aux 3 groupes expérimentaux. A l'exception du nombre de follicules préovulatoires, l'intervalle IA-sevrage n'a aucun effet significatif sur les variables mesurées. En effet, le nombre de follicules préovulatoires est significativement plus élevées pour les lapines du lot « J+10 » que pour les deux autres groupes (15,6 ± 1,4 contre 7,4 ± 0,9 et 8,5 ± 0,8 respectivement pour les groupes J+10, J-3 et J0). Cependant, on peut souligner une tendance favorable pour le groupe dont l'IA a été réalisée le jour du sevrage (J0) puisque le nombre d'embryons de bonne qualité est supérieur à celui des autres groupes (18,5 ± 3,1 contre 14,8 ± 2,0 et 13,6 ± 2,1 respectivement pour les groupes J0, J-3 et J+10).

**Tableau 14.** *Influence du moment de l'IA par rapport au sevrage (3 niveaux) sur différents paramètres de production d'embryons. (Mean  $\pm$  standard error)*

	n	FP	FH	CJ	COL	EBQ	EMQ	OV
<b>TRAITEMENT (valeur de p)</b>		<0,0001	NS	NS	NS	NS	NS	NS
J - 3	16	7,4 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	4,4 $\pm$ 0,6	34,9 $\pm$ 2,5	23,9 $\pm$ 2,3	14,8 $\pm$ 2,0	2,5 $\pm$ 0,8	6,6 $\pm$ 1,8
J 0	17	8,5 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	4,6 $\pm$ 0,7	37,0 $\pm$ 3,5	24,5 $\pm$ 3,2	18,5 $\pm$ 3,1	4,4 $\pm$ 0,1	4,6 $\pm$ 1,0
J + 10	14	15,6 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>	5,8 $\pm$ 0,8	30,1 $\pm$ 2,7	16,6 $\pm$ 2,5	13,6 $\pm$ 2,1	0,8 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 1,3

n: effectif

**ABBREVIATIONS:** nombre de follicules préovulatoires (FP), nombre de follicules hémorragiques (FH), nombre de corps jaunes (CJ), nombre d'ovocytes collectés (OV), nombre total d'œufs collectés (COL), nombre d'embryons de bonne (EBQ) et de mauvaise qualité (EMQ).

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b) dans la même colonne sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ). NS signifie que l'effet observé n'est pas significatif ( $p > 0,05$ ).

### 1.2.2.1. Discussion et conclusion

L'objectif de cette expérience était de déterminer la réponse des lapines au traitement de superovulation à différents moments autour du sevrage et donc à différents niveaux de prolactine plasmatique. *In fine*, le but est de déterminer s'il est préférable d'utiliser des femelles au repos sexuel ou des femelles allaitantes pour maximiser la production d'embryons lors des opérations de cryoconservation des ressources génétiques.

Quelque soit l'intervalle IA-sevrage considéré, les taux de collecte ont été assez faibles avec en moyenne 64,1 % des œufs qui ont été collectés sur cette expérience. Normalement de l'ordre de 80 %, ces taux peuvent s'expliquer par une grande hétérogénéité dans la qualité des œufs collectés avec une proportion non négligeable d'embryons de mauvaise qualité ou d'ovocytes. De plus, les résultats obtenus ne montrent pas de différence significative de production d'embryons entre les lapines inséminées 3 jours avant sevrage (J-3), le jour du sevrage (J0) ou 10 jours après le sevrage (J+10) sauf pour le nombre de follicules préovulatoires. En effet, il semble les traitements de superovulation permettent de recruter davantage de follicules chez les lapines au repos sexuel depuis 10 jours. Cependant, aucune différence n'est observée sur le nombre de corps jaunes entre les 3 groupes. De plus, de fortes tendances sont observées en faveur du groupe J0 pour les embryons de bonne qualité et les écarts pourraient devenir significatifs avec des effectifs plus importants. De plus, le pourcentage de femelles donneuses d'embryons chez les femelles J+10 est anormalement bas (66,7 %) en comparaison des résultats généralement obtenus (70,7 à 77,8 %) sans qu'une explication puisse se dégager. Cependant, la fertilité après IA n'avait pas été très bonne sur ce génotype au cycle de reproduction précédent avec 63,4 % avec des femelles inséminées au 11<sup>ème</sup> jour de lactation.

En élevage, les femelles sont généralement inséminées au 11<sup>ème</sup> jour de lactation, voire exceptionnellement au 25<sup>ème</sup> jour de lactation pour les rythmes les plus extensifs. L'influence du statut physiologique des lapines dans la phase *post partum* a largement été étudiée pour définir l'influence de la prolactine en début de lactation sur les performances de reproduction (Theau-Clement, 2007). Theau-Clément *et al.* (2000) ont observé une grande variabilité de production d'embryons en fonction du stade de lactation des lapines avec l'obtention de 7,0 ; 7,0 ; 12,1 ; 13,3 et 13,6 embryons/IA respectivement à 1,4, 12 et 19 jours post partum et 48 h après sevrage. D'autres études ont aussi clairement mis en évidence l'existence d'une période critique au 4-5<sup>ème</sup> jour après la mise bas avant de retrouver le niveau de reproduction initial au 11<sup>ème</sup> jour *post partum* (Theau-Clement, 2007). La variabilité de ces performances semble être le reflet d'un antagonisme partiel au niveau hypothalamo-hypophysaire, entre la prolactine et les hormones gonadotropes, et d'un déficit

énergétique lié à la compétition entre les besoins pour la lactation et ceux de la nouvelle gestation (Boiti, 2004).

Peu d'études ont étudié l'influence de l'intervalle IA-sevrage, traduisant différents niveaux de prolactine sur la production d'embryons bien que soit souvent évoquée l'existence d'un pic de réceptivité sexuelle au moment du sevrage. A notre connaissance, seule une étude a comparé la production d'embryons de femelles superovulées inséminées au 2<sup>ème</sup> et au 7<sup>ème</sup> jour après sevrage (Theau-Clement *et al.*, 2007). Les résultats ont mis en évidence une intensité d'ovulation plus importante pour le lot inséminé au 2<sup>ème</sup> jour (35,5 contre 24,4 corps jaunes par femelle,  $p < 0,05$ ) mais ces résultats ne constituent que des résultats préliminaires compte tenu de la faiblesse des effectifs utilisés (10 lapines dans chaque lot). Les résultats obtenus dans notre expérience sont conformes à ceux de cette étude et confirment l'existence d'une période *post sevrage* où les performances de reproduction semblent améliorées. Ce pic de réceptivité observé après le sevrage résulte probablement de la levée de l'antagonisme entre la prolactine dont la concentration diminue et les hormones gonadotropes. On assiste alors, comme c'est le cas après la mise bas avec la levée de l'inhibition par la progestérone, à l'émergence de nouvelles vagues folliculaires synchronisées susceptibles de mieux répondre aux traitements de superovulation.

Les opérations de production d'embryons dans le cadre de la cryoconservation de lignées pourraient donc être réalisées sur femelles en fin de lactation, au moment du sevrage. Alors qu'il existe un antagonisme entre la lactation et des performances de reproduction, les lapines semblent montrer un pic de réceptivité sexuelle au moment du sevrage qui optimise le nombre d'embryons de bonne qualité collecté. A la vue de ces résultats préliminaires, il paraît intéressant de réaliser l'insémination des femelles le jour du sevrage et de commencer le traitement de superovulation 2 jours avant lorsque les lapines sont encore allaitantes. Cependant, cette étude ne constitue qu'une expérience préliminaire qui devra être consolidée par l'acquisition de données sur un plus grand nombre de lapines de différents géotypes.

### **I.3. Méthodes de collecte et de transfert par endoscopie**

#### **I.3.1. Objectif**

Les techniques de collecte et de transfert sous coelioscopie ont déjà été décrites dans la bibliographie comme des techniques innovantes et peu invasives (Garcia-Ximenez *et al.*, 1991; Besenfelder et Brem, 1993; Besenfelder *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2004). L'objectif de cette étude est d'éprouver concrètement ces techniques en conditions de terrain lors des opérations de cryoconservation ou de recréation de populations de lapin pour en évaluer les intérêts et les limites.



Une comparaison financière avec les méthodes de collecte (euthanasie) et de transfert (laparotomie) traditionnelles permettra de définir les stratégies d'utilisation des techniques coelioscopiques en fonction du type de populations à cryoconserver.

### I.3.2. Matériel et méthodes

Dix sessions de collectes d'embryons sous coelioscopie ont été réalisées selon la méthode décrite précisément dans la bibliographie (Garcia-Ximenez *et al.*, 1991; Besenfelder *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2004).

De plus, six sessions de transfert d'embryons sur 88 femelles receveuses ont été réalisées au cours des différents travaux de thèse :

- Transfert par laparotomie midventrale (cf paragraphe I.1.1.2.) de 448 embryons congelés sur 42 femelles « Grimaud Frères Sélection PS 19 ».
- Transfert sous coelioscopie de 204 embryons congelés sur 11 femelles « Grimaud Frères Sélection PS 19 » et 9 femelles « INRA 1077 PRP ».
- Transfert sous coelioscopie de 323 embryons frais sur 26 femelles « Grimaud Frères Sélection PS 19 » selon un protocole identique à celui utilisé pour les embryons congelés.

Les embryons congelés provenaient de populations différentes mais avaient tous été congelés selon la même procédure (cf paragraphe I.1.1.2.). A partir de ces essais, l'efficacité des différentes méthodes a été évaluée par le taux de parturition (Nb de femelles ayant mis bas / Nb de femelles transférées) ainsi que par le taux de développement (Nb de lapereaux nés vivants et morts / Nb d'embryons transférés) et le taux de survie (Nb de lapereaux nés vivants / Nb d'embryons transférés) des embryons transférés.

Les coûts de collecte et de transfert des embryons selon les différentes méthodes ont été estimés en fonction des différents essais réalisés et en se basant sur les prix hors taxes relevés au 1<sup>er</sup> juillet 2008 du matériel utilisé. Les détails des calculs sont présentés en annexe 3.

### I.3.3. Résultats

#### I.3.3.1. Coûts de collecte et de transfert par coelioscopie

Le tableau 15 présente les coûts des opérations de collecte et de transfert d'embryons comparés entre les méthodes traditionnelles et les méthodes coelioscopiques.

Les différences de coûts d'investissement s'expliquent principalement par le coût élevé du matériel endoscopique (source de lumière, trocard, optique, pince à préhension...). Hormis ces coûts d'investissement, on peut observer que le coût de la coelioscopie dépend du type d'intervention réalisée. En effet, la collecte des embryons sous coelioscopie est beaucoup plus onéreuse que celle utilisant l'euthanasie des femelles (69,7 € vs. 11,7€ par femelle collectée). Cet écart est à attribuer principalement aux coûts de main d'œuvre qui sont plus de dix fois plus élevés s'expliquant par la longueur d'exécution de la coelioscopie et le nombre de personnes mobilisées (5,5 € vs. 55,0 € par femelle collectée). Au contraire, la coelioscopie est très avantageuse pour les opérations de transfert d'embryons car elle est beaucoup plus rapide que les transferts par laparotomie qui nécessitent un important temps de suture. De ce fait, la laparotomie est beaucoup plus coûteuse que la coelioscopie (62,8 € vs. 26,3 € par femelle transférée), les coûts techniques étant assez proches entre les deux méthodes.

**Tableau 15.** *Comparaison des coûts de production et de transfert hors taxes d'un embryon de lapin par coelioscopie et par les méthodes traditionnelles (en € H.T.)*

		Collecte		Transfert	
		Euthanasie	Coelioscopie	Laparotomie	Coelioscopie
<i>Investissement matériel</i> <sup>(1)</sup>		3 000,0 €	10 000,0 €	3 000,0 €	9 000,0 €
<i>Coûts techniques</i> (I)	Coûts en consommables par femelle <sup>(2)</sup>	6,2 €	14,7 €	7,8 €	5,7 €
	Coûts de production ou de transfert d'un embryon <sup>(3)</sup>	0,3 €	0,7 €	0,8 €	0,6 €
<i>Coûts main d'œuvre</i> (II)	Nb de personnes mobilisées	1	2	3	3
	Temps d'exécution par femelle (min.)	5	30	30	10
	Nb de femelles traitées par jour <sup>(4)</sup>	50	10	15	40
	Coûts main d'œuvre par jour <sup>(5)</sup>	275,0 €	550,0 €	825,0 €	825,0 €
	Coûts main d'oeuvre par femelle	5,5 €	55,0 €	55,0 €	20,6 €
<b>Coûts totaux par femelle [= (I) + (II)]</b>		<b>11,7 €</b>	<b>69,7 €</b>	<b>62,8 €</b>	<b>26,3 €</b>

<sup>(1)</sup> Loupe binoculaire (euthanasie & laparotomie) + matériel endoscopique (coelioscopie).

<sup>(2)</sup> Hormones, fluide et matériel à usage unique.

<sup>(3)</sup> Coûts de production estimés à partir d'une femelle superovulée produisant 20 embryons de bonne qualité hors coûts de congélation et valeur économique de la lapine donneuse. Coûts de transfert estimés à partir du transfert de 10 embryons congelés/décongelés dans une femelle receveuse hors valeur de la lapine receveuse.

<sup>(4)</sup> Estimation à partir d'une journée de travail de 8h.

<sup>(5)</sup> Les coûts de main d'œuvre journaliers sont issus des grilles tarifaires de l'ISARA-Lyon pour une journée de prestation d'un technicien de laboratoire (source confidentielle, document à diffusion interne).

### 1.3.3.2. Efficacité du transfert d'embryons sous coelioscopie

Les résultats ont été regroupés pour comparer l'efficacité de la méthode de transfert sous coelioscopie par rapport à la laparotomie (tableau 16). L'ensemble des transferts a porté sur des embryons au stade morula compactés entre 65 et 72 h après insémination.

Tableau 16. Taux de parturition et de survie embryonnaire après transfert par laparotomie ou coelioscopie d'embryons frais ou congelés

	Laparotomie	Coelioscopie	
	Congelés (%)	Congelés (%)	Frais (%)
Taux de parturition <sup>(1)</sup>	40/42 (95,2)	15/20 (75,0)	23/26 (88,5)
Taux de développement <sup>(2)</sup>	222/448 (49,6)	91/204 (44,6)	186/323 (57,6)
Taux de survie <sup>(3)</sup>	219/448 (48,9) <sup>a,b</sup>	81/204 (39,7) <sup>a</sup>	176/323 (54,5) <sup>b</sup>

<sup>(1)</sup> Nombre de femelles ayant mis bas / Nombre de femelles transférées.

<sup>(2)</sup> Nombre de lapereaux nés au total (vivants+morts) / Nombre d'embryons transférés.

<sup>(3)</sup> Nombre de lapereaux nés vivants / Nombre d'embryons transférés.

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b) dans la même ligne sont statistiquement différentes après réalisation d'un test du Chi-deux ( $p < 0,05$ ).

Le taux de parturition des femelles receveuses est identique après transfert d'embryons congelés par laparotomie ou coelioscopie. La tendance en faveur de la laparotomie peut être expliquée par le temps d'adaptation nécessaire à la maîtrise technique du transfert par endoscopie. De la même façon, aucune différence significative n'apparaît entre les deux méthodes sur les taux de développement et de survie des embryons transférés après décongélation. Les résultats obtenus après transfert sous coelioscopie d'embryons non congelés sont similaires à ceux obtenus avec des embryons décongelés à l'exception du taux de survie qui est plus élevé pour les embryons frais.

### 1.3.4. Conclusion et stratégies d'utilisation

Compte tenu des résultats exposés précédemment, l'utilisation des techniques coelioscopiques doit être raisonnée au cas par cas, selon la population de lapins concernée et la nature du travail à réaliser (collecte ou transfert d'embryons).

En effet, la technique de collecte par endoscopie est beaucoup plus coûteuse que par euthanasie des femelles donneuses principalement à cause du faible nombre de femelles collectées par jour et du nombre de personnes mobilisées (69,7 € contre 11,7 €). Nous n'avons malheureusement pas pu éprouver concrètement cette méthode sur le terrain pour la comparer avec la technique de perfusion *post-mortem* mais son efficacité a déjà été éprouvée dans d'autres travaux avec l'obtention de bons taux de collecte (Besenfelder *et al.*, 1998; Mehaisen *et al.*, 2004; Mehaisen *et al.*, 2006). La collecte d'embryons sous coelioscopie apparaît comme une technique à réserver aux populations précieuses dont la valeur économique justifie le recours à une méthode coûtant plus de 60 € par lapine collectée. Ainsi, l'abattage des femelles donneuses est la solution la plus adaptée à la cryoconservation des populations de type III. A l'inverse, il faudra préférer la coelioscopie pour les populations de type I et II dont les valeurs patrimoniales et scientifiques dépassent la dimension économique comme, par exemple, pour les populations menacées d'extinction où il deviendrait paradoxal d'euthanasier les femelles donneuses d'embryons.

La situation est radicalement différente en matière de transfert d'embryons. A efficacité égale, la coelioscopie présente aussi l'avantage d'être beaucoup moins coûteuse que la laparotomie (26,3 € contre 62,8 €). Ainsi et à la différence de la collecte d'embryons, le transfert d'embryons sous coelioscopie est amené à remplacer progressivement la technique de la laparotomie quelque soit le type de la population concernée d'autant plus que celle-ci est beaucoup moins invasive (peu de délabrement tissulaire) réduisant ainsi les risques d'éventration et respectant mieux les règles d'éthique en matière de bien-être animal.

## **II. Développement d'une méthode de cryoconservation des ovocytes MII de lapin**

### **II.1. Dosage de l'ATP ovocytaire : essais préliminaires**

#### **II.1.1. Objectif**

L'évaluation de la qualité ovocytaire est une question délicate puisqu'aujourd'hui, seuls les tests de développement après fécondation permettent de discriminer efficacement leur viabilité. Compte tenu de la variabilité des résultats de fécondation *in vitro* chez le lapin, il est nécessaire de développer de nouveaux outils d'évaluation notamment pour les études liées à la cryoconservation des ovocytes. L'objectif de cette partie expérimentale était de mettre au point un test de viabilité rapide et objectif permettant d'évaluer le métabolisme énergétique des ovocytes par dosage de l'ATP intraovocytaire.

## II.1.2. Matériel et méthodes

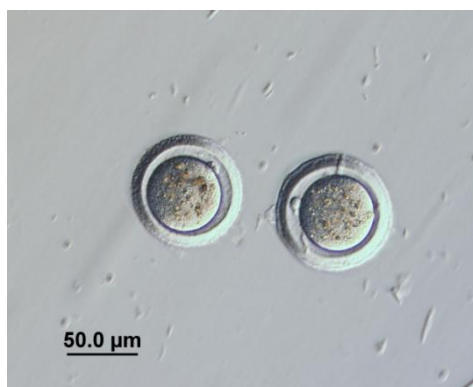
### ANIMAUX ET TRAITEMENTS HORMONAUX

Les ovocytes ont été produits par des femelles parentales multipares d'Hycole Sélection (Marcoing, France), superovulées par 5 injections successives (s.c.) réparties sur cinq demi-journées représentant une dose totale de 31,5 µg de pFSH par (figure 9). L'ovulation des femelles a été induite par injection (i.m.) de 0,4 ml de Receptal® (Intervet, France) représentant 1,6 µg d'acétate de buséréline (analogue de synthèse de GnRH) par femelle 10 à 12 heures après la dernière injection de gonadotropines.

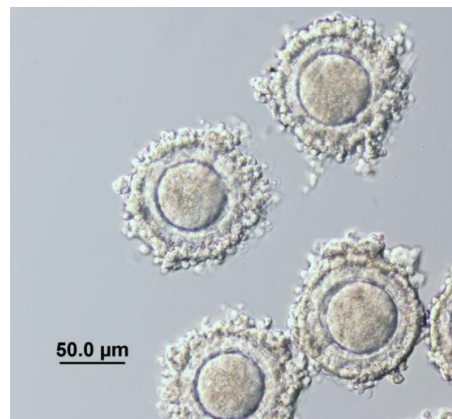
### COLLECTE DES OVOCYTES

Les ovocytes ont été collectés après euthanasie des femelles donneuses, 14 à 15 heures après l'induction d'ovulation. A ce moment, les ovocytes sont au stade MII et présents dans l'oviducte, contenus dans la masse de cellules du cumulus. Les oviductes sont alors immédiatement prélevés par section des tractus génitaux juste au dessus de la jonction utéro tubaire et perfusés de manière normograde avec 20 ml d'euroflush (IMV Technologies, France). Ensuite, les ovocytes sont individualisés de la masse de cellules du cumulus par incubation dans une solution de PBS + 0,1 % (w/v) de hyaluronidase (réf. H4272, Sigma, France) à 37°C jusqu'à isolement. Les ovocytes collectés sont placés dans une solution de TCM199 modifié Hépès (réf. M7528, Sigma, France) contenant 20 % (v/v) de sérum de veau fœtal (réf. F9665, Sigma Aldrich) représentant le milieu de base (MB). Par la suite les ovocytes sont dénombrés et leur qualité est appréciée morphologiquement par l'homogénéité de leur cytoplasme, l'intégrité de la zone pellucide et de la couronne radiée ainsi que par la compacité de la masse de cellules du cumulus (photo 6).

*Photo 6. Appréciation morphologique de la qualité des ovocytes collectés et isolés*



*Ovocytes de mauvaise qualité présentant un cytoplasme hétérogène et une absence de couronne radiée*

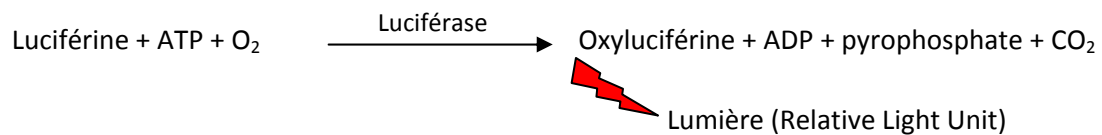


*Ovocytes de bonne qualité présentant un cytoplasme homogène et une couronne radiée*

**EVALUATION METABOLIQUE ET DOSAGE D'ATP**

Pour l'ensemble des essais préliminaires, les dosages d'ATP ont été réalisés selon le même protocole. Les quantités d'ATP intraocytaires ont été déterminées par un dosage utilisant la bioluminescence. L'ATP est dans un premier temps extrait des ovocytes puis dosé après ajout des réactifs (luciférine/luciférase) permettant la réaction lumineuse suivante :

Figure 17.      Réaction bioluminescente permettant le dosage de l'ATP intraocyttaire



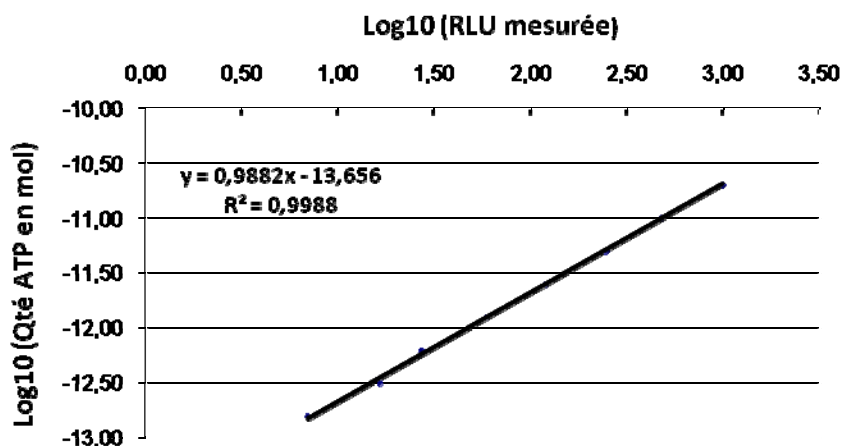
Le kit de dosage utilisé est le kit « bioluminescent somatic cell assay FL-ASC » (Sigma, France), déjà utilisé dans des travaux antérieurs (Stojkovic *et al.*, 2001; Tamassia *et al.*, 2004). Brièvement, les ovocytes sont rincés trois fois dans le MB avant d'être transférés dans une solution de PBS (P4417, Sigma, France) par groupe de 4 à 5 ovocytes. Puis, 50 µl de PBS contenant les ovocytes sont transférés dans des tubes à hémolyse de 5 ml (réf. N1773X, Fischer Bioblock Scientific, France) équilibrés sur bain de glace (0°C) et 100 µl de réactif refroidi « FL-SAR » est ajouté dans chacun des tubes. Le mélange obtenu est incubé pendant 5 minutes sur bain de glace pour extraire l'ATP des ovocytes sans que celui-ci ne soit dégradé. Ensuite, 100 µl du réactif refroidi « FL-AAB + FL-AAM » (dilution 1 :25 du réactif FL-AAM dans le tampon FL-AAB) sont ajoutés dans chacun des tubes. Les tubes sont alors incubés à température ambiante et à l'obscurité pour laisser passer le pic lumineux engendré par la dégradation de la luciférine.

Après 5 minutes d'incubation, la quantité d'ATP présente dans chaque tube est mesurée, à l'abri de la lumière, à l'aide d'un luminomètre (LB 9509 Junior; Berthold France SAS) présentant une très bonne sensibilité (0,01 pmol). Le signal lumineux est alors mesuré par le luminomètre en nombre de photons émis et exprimé en Unités de Lumière Relative (RLU). Afin d'obtenir une mesure simultanée des signaux lumineux, le signal émis par les tubes contenant les ovocytes est mesuré une première fois puis une deuxième fois en inversant l'ordre de mesure. Pour chaque tube, le signal lumineux exprimé en RLU représente la moyenne des deux valeurs obtenues.

Afin d'avoir la correspondance entre l'intensité du signal lumineux et la quantité d'ATP présente, une courbe étalon en 8 points (0 à 10 pmol) est réalisée avant chaque expérience et avec des quantités connues d'ATP (figure 18). Simultanément, le bruit de fond est estimé par la mesure du

signal lumineux dégagé par 50 µl de PBS seul. Le contenu d'ATP est déterminé pour chaque ovocyte à l'aide de la formule associée à la droite de régression linéaire obtenue avec les mesures étalon. Pour chaque modalité, un minimum de 5 répétitions du dosage d'ATP a été effectué.

*Figure 18. Courbe étalon expérimentale entre le signal lumineux mesuré (log<sub>10</sub> [RLU]) et la quantité d'ATP présente (log<sub>10</sub> [ATP])*



#### II.1.2.1. Essai 1 : Quantité d'ATP intraovocytaire après différentes durées d'incubation des ovocytes frais sur platine chauffante à 37°C

Dans cet essai, l'objectif était d'évaluer les capacités métaboliques des ovocytes après différents temps d'incubation sur platine chauffante à 37°C pour évaluer les effets de la durée de stockage avant cryoconservation. Les ovocytes ont été placés dans une solution de MB sur une platine chauffante à 37°C et à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation pour le dosage d'ATP. Le contenu en ATP des ovocytes a été évalué immédiatement après collecte ou après 1, 2 et 3 h d'incubation sur la platine chauffante.

#### II.1.2.2. Essai 2 : Quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais et après 2 h de stockage à différentes températures

Dans cet essai, l'objectif était d'évaluer le métabolisme des ovocytes après 2 h d'incubation à différentes températures pour déterminer les conditions optimales de stockage des ovocytes avant cryoconservation. Les ovocytes ont été placés dans une solution de MB puis disposés à l'abri de la lumière en étuve à 38°C, 5 % de CO<sub>2</sub>; au réfrigérateur à 7°C ou laissés à température ambiante (23°C). Le contenu en ATP des ovocytes a été évalué immédiatement après collecte ou après 2 h d'incubation à 7°C, 23°C ou 38°C.

II.1.2.3. Essai 3 : Détermination de la durée d'incubation optimale à 38°C et sous 5 % CO<sub>2</sub> pour la reprise du métabolisme des ovocytes frais, vitrifiés et congelés

Dans cet essai, l'objectif était d'évaluer le métabolisme des ovocytes frais et cryoconservés après 0, 1, 2 et 3 h d'incubation à 38°C, 5 % de CO<sub>2</sub> et sous atmosphère humidifiée pour déterminer l'instant optimal pour leur fécondation après cryoconservation. Après collecte les ovocytes de bonne qualité ont été gardés pour être exposés aux solutions cryoprotectrices des deux méthodes testées. Toutes les étapes de l'exposition aux solutions cryoprotectrices ont été réalisées à 37°C.

*La vitrification* selon le système « Open Pulled Straw » (OPS) et le protocole modifié de Cai *et al.* (2005). Les ovocytes sont incubés pendant 2 minutes dans une solution de MB contenant 10 % (v/v) d'éthylène glycol (réf. E9129, Sigma, France) et 10 % (v/v) de DMSO (réf. D2650, Sigma, France). Ensuite, les ovocytes sont transférés dans la solution de vitrification constituée de MB + 20 % (v/v) d'éthylène glycol + 20 % (v/v) de DMSO + 0,65 M de tréhalose (réf. T0167, Sigma, France) et 10 mg/ml de Ficoll 70 (réf. F2878, Sigma, France). Les ovocytes sont ensuite immédiatement montés en paillettes OPS (réf. 19050/0050, Minitübe, Allemagne) par capillarité et plongés directement dans l'azote liquide dans les 35 secondes suivant l'incubation dans la solution de vitrification. Cette technique permet de ne prélever qu'un très faible volume de solution (~2 µl).

Le réchauffement des ovocytes vitrifiés consiste à placer directement l'extrémité des paillettes OPS dans une solution de MB + 0,5 M de tréhalose à 37°C. L'évaporation de l'azote liquide permet l'expulsion des ovocytes directement dans la solution permettant le retrait d'une partie des cryoprotecteurs. Après 5 minutes, les ovocytes sont incubés successivement et à 5 minutes d'intervalle dans trois bains de MB contenant respectivement 0,3 ; 0,1 et 0 M de tréhalose.

*La congélation lente* selon une technique adaptée de travaux antérieurs (Al-Hasani *et al.*, 1986b; Diedrich *et al.*, 1988; Al-Hasani *et al.*, 1989; Siebzehnuebl *et al.*, 1989). Brièvement les ovocytes sont placés pendant 15 minutes dans une solution de MB + 1,5 M de PROH (réf. 134368, Sigma, France) avant d'être transférés dans la solution de congélation composée de MB + 1,5 M PROH + 0,2 M de tréhalose. Après 10 minutes d'incubation, les ovocytes sont montés en paillettes stériles de 0,25 ml (IMV Technologies, France) scellées par un bouchon stérile permettant l'identification (figure 10). Les paillettes sont immédiatement placées dans un congélateur programmable (Cryocell 1200, IMV Technologies, France) préalablement équilibré à -7°C. Après 5 minutes d'équilibration, le « seeding » (induction de la cristallisation) est réalisé en touchant l'extrémité de la paillette située à côté du bouchon avec des pinces refroidies dans l'azote liquide jusqu'à l'apparition des premiers cristaux de glace (opacification du milieu). Une deuxième période



d'équilibration de 10 minutes est observée avant de refroidir les paillettes avec une vitesse de 0,5°C/min jusqu'à -30°C, température à laquelle elles sont directement plongées dans l'azote liquide.

Les paillettes sont décongelées à température ambiante pendant 10 à 15 secondes avant immersion dans un bain-marie à 20°C jusqu'à fonte complète des cristaux de glace (environ 1 minute). Après réchauffement, les ovocytes incubés pendant 5 minutes à 37°C dans différents bains contenant des concentrations décroissantes en cryoprotecteurs. Ainsi, les ovocytes sont placés successivement dans 4 solutions de MB contenant respectivement 1M de PROH + 0,2 M de tréhalose ; 0,5 M de PROH + 0,2 M de tréhalose ; 0,2 M de tréhalose et 0 M de tréhalose (5 minutes dans chaque bain).

Quelle que soit la méthode de cryoconservation, les paillettes contenant les ovocytes ont été stockées pendant au moins 48 h dans l'azote liquide. La technique de vitrification permet de cryoconserver les ovocytes femelle par femelle alors que la congélation lente nécessite de regrouper les ovocytes de plusieurs femelles. Les ovocytes destinés à être congelés sont alors stockés dans le MB, sur platine chauffante à 37°C et à l'abri de la lumière pour des durées n'excédant pas 2 h.

Le contenu en ATP des ovocytes frais et exposés aux solutions cryoprotectrices a été évalué immédiatement après collecte/exposition et après 1, 2 et 3h d'incubation en étuve à 38°C et 5 % CO<sub>2</sub> dans une solution de MB.

## **ANALYSE STATISTIQUE**

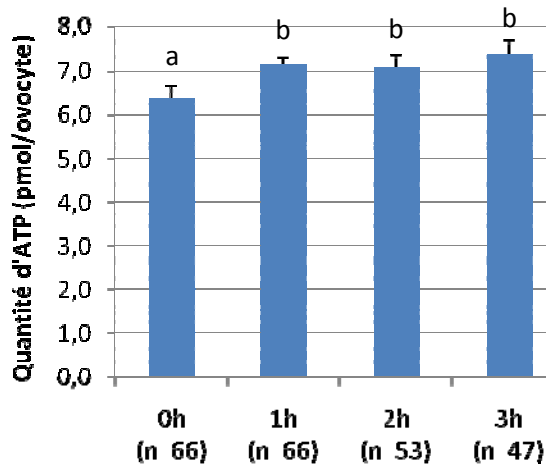
La comparaison des quantités d'ATP intraovocytaire entre les groupes expérimentaux a été effectuée par une analyse de variance (StatView®, SAS Institute Inc.) à un effet fixé. Les valeurs étaient considérées comme significativement différentes quand  $p < 0,05$ .

### **II.1.3. Résultats**

#### **ESSAI 1**

La figure 19 montre la quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines après collecte et après 1, 2 et 3h de stockage sur platine chauffante à 37°C et à l'abri de la lumière. La quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes frais juste après collecte est inférieure à celles des ovocytes stockés pendant 1, 2 et 3 h sur platine chauffante, qui elles, sont identiques (respectivement  $6,4 \pm 0,3$  ;  $7,2 \pm 0,2$  ;  $7,1 \pm 0,3$  et  $7,4 \pm 0,3$  pmol d'ATP par ovocyte ayant attendu 0, 1, 2 et 3h sur la platine chauffante).

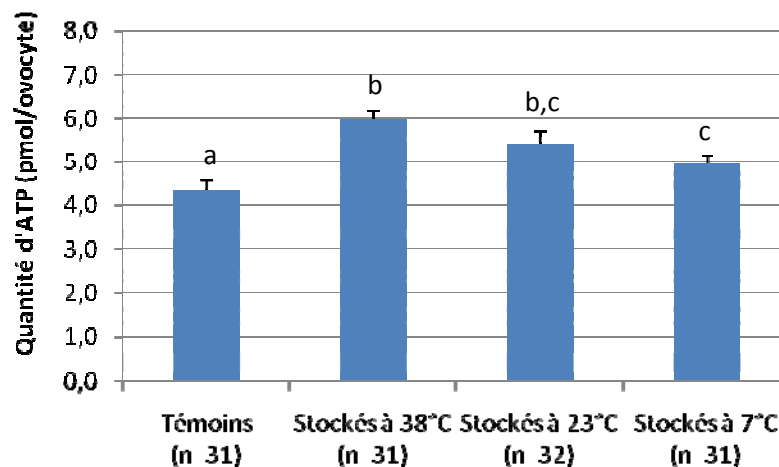
**Figure 19.** Quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais après 0, 1, 2 et 3h d'incubation sur platine chauffante équilibrée à 37°C.



Les valeurs présentées avec différentes lettres (a, b) sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

## ESSAI 2

**Figure 20.** Quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais et après 2h d'incubation à 7 et 23°C sous atmosphère non contrôlée et à 38°C, 5 % de CO<sub>2</sub> et atmosphère humidifiée.



Les valeurs présentées avec différentes lettres (a, b, c) sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

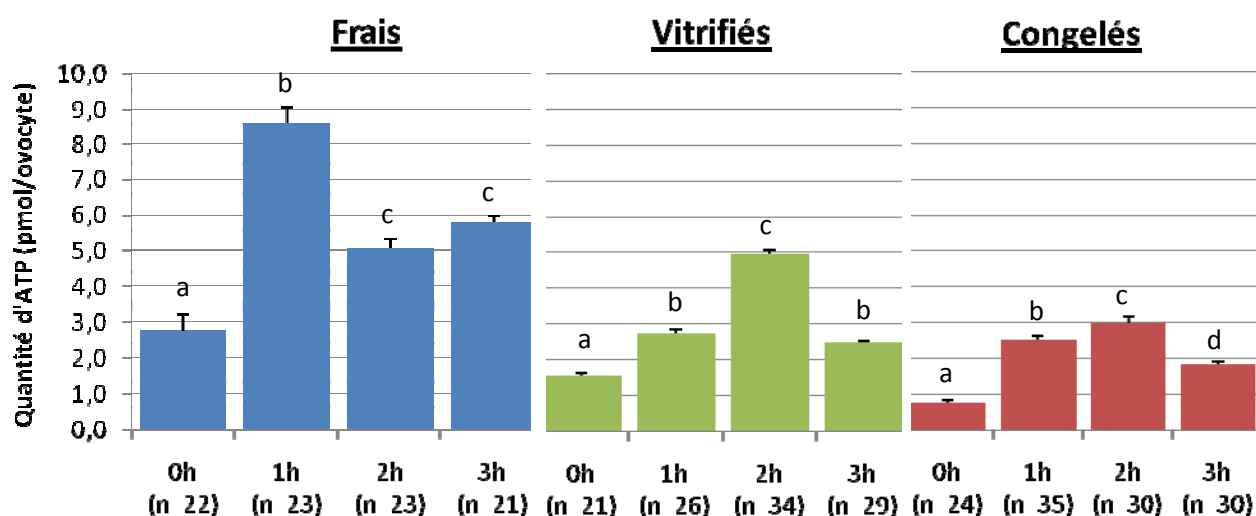
La figure 20 montre la quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines après collecte et après 2 h d'incubation à 7°C (réfrigérateur), 23°C (air ambiant) et 38°C (étuve à 5 % de CO<sub>2</sub>) et à l'abri de la lumière. Le contenu en ATP intraovocytaire le plus élevé est celui des ovocytes ayant été incubés pendant 2h en étuve à 38°C ( $6,0 \pm 0,2$  pmol). Celui-ci est significativement plus élevé que les ovocytes témoins ( $4,3 \pm 0,2$  pmol d'ATP par ovocyte) et que ceux incubés 2h à 7°C ( $5,0 \pm 0,3$  pmol d'ATP par ovocyte). La quantité d'ATP présente dans les ovocytes placés pendant 2h à température ambiante ne diffère pas significativement de ceux incubés à 7 et à 38°C ( $5,4 \pm 0,2$ ).

## ESSAI 3

La figure 21 montre la quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais après collecte, vitrifiés/dévitriifiés et congelés/décongelés après 0, 1, 2, et 3 h d'incubation à 38°C et sous atmosphère humide et 5 % de CO<sub>2</sub>.

Indépendamment de la nature des ovocytes, on observe que la quantité d'ATP présente dans les ovocytes varie selon la durée d'incubation avec, pour chaque catégorie d'ovocytes, l'existence d'un optimum. Pour les ovocytes frais n'ayant pas subi de traitements, le contenu d'ATP est significativement plus élevé après 1 h de CIV (respectivement  $2,8 \pm 0,4$  ;  $8,6 \pm 0,4$  ;  $5,1 \pm 0,3$  et  $5,8 \pm 0,2$  pmol d'ATP par ovocytes ayant été incubés 0, 1, 2 et 3 h). Cet optimum est différent pour les ovocytes ayant subi un traitement de cryoconservation comprenant une étape de refroidissement et de réchauffement.

*Figure 21. Quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais, congelés et vitrifiés après 0, 1, 2 et 3 h d'incubation à 38°C, 5 % de CO<sub>2</sub> et sous atmosphère humide*



Pour chaque graphique, les valeurs présentées avec différentes lettres (a, b, c, d) sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

Quelque soit la nature du traitement de cryoconservation, le contenu d'ATP est significativement plus élevé après 2 h de CIV (respectivement  $1,6 \pm 0,1$  ;  $2,8 \pm 0,1$  ;  $5,0 \pm 0,1$  et  $2,5 \pm 0,04$  pmol d'ATP par ovocytes vitrifiés et  $0,8 \pm 0,1$  ;  $2,5 \pm 0,1$  ;  $3,0 \pm 0,2$  et  $1,9 \pm 0,1$  pmol d'ATP par ovocytes vitrifiés ayant été incubés 0, 1, 2 et 3 h).

#### II.1.4. Discussion et conclusions

Le dosage de l'ATP ovocytaire n'a jamais été utilisé dans le cadre d'études sur la cryoconservation et aucune expérience utilisant cette technique n'a été menée chez le lapin à notre connaissance. L'objectif de ces mesures préliminaires sur le dosage de l'ATP ovocytaire, était de fixer un certain nombre de paramètres pour établir le protocole visant à comparer le niveau d'ATP présent dans les ovocytes avant et après vitrification et congélation lente.

L'essai 1 a montré que le stockage des ovocytes, jusqu'à 3 h, sur une platine chauffante à 37°C et à l'obscurité permet de maintenir le contenu en ATP des ovocytes sans altération de leur activité métabolique. Contrairement à la vitrification qui peut être réalisée femelle par femelle, la congélation lente nécessite de regrouper les ovocytes de plusieurs femelles avant d'initier la congélation proprement dite, comme cela est déjà pratiqué pour les embryons. Ces données signifient qu'après collecte, les ovocytes peuvent être stockés avant d'être congelés. De plus, les ovocytes contiennent moins d'ATP juste après collecte ce qui reflète probablement un stress thermique des ovocytes lors de la perfusion du tractus génital.

L'essai 2 a montré que la température de stockage idéale des ovocytes était 38°C en étuve bien que l'écart ne soit pas significatif avec les résultats obtenus après 2 h à température ambiante. Les ovocytes témoins, dosés juste après leur collecte mettent une fois de plus en évidence le stress subi lors de la perfusion du tractus génital. Cette observation est en accord avec les résultats de la littérature montrent que, sous des conditions de stress, les cellules relargent de l'ATP dans le milieu extracellulaire (Joseph *et al.*, 2003; Lazarowski *et al.*, 2003) qui est rapidement dégradé par les ecto-ATPases présentes à la surface des cellules (Schwiebert et Zsembery, 2003).

L'essai 3 visait à déterminer le temps de culture optimal avant de réaliser les dosages d'ATP sur les ovocytes vitrifiés et congelés. Comme cela avait déjà été mis en évidence pour des critères structuraux (Vincent *et al.*, 1989), il semble qu'il soit nécessaire d'observer un temps d'incubation après cryoconservation de manière à laisser le temps au métabolisme ovocytaire de redémarrer. Aussi bien pour les ovocytes frais que pour les ovocytes vitrifiés, le temps d'incubation optimal est de 2 h à 38°C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Ensuite, leur niveau d'ATP respectif s'effondre après 3 h d'incubation vraisemblablement à cause de l'âge avancé des ovocytes qui atteignent 18 h post induction de l'ovulation. En effet, il a été observé *in vivo*, que la fécondabilité des ovocytes est maximale entre 12 et 15 h avant de diminuer progressivement jusqu'à 19 h, moment où les ovocytes commencent à dégénérer (Thibault, 1967; Boussit, 1989). On peut logiquement penser qu'*in vitro*, les ovocytes rentrent en atresie de manière plus précoce, dès 18 h après l'induction de l'ovulation. La durée optimale d'incubation observée dans notre expérience est cohérente avec les observations faites par

Vincent *et al.* (1989) qui privilégient une incubation de 3 h des ovocytes de lapin décongelés par rapport à 0 h pour la restauration de leur fuseau méiotique. Sur les mêmes critères structuraux d'évaluation, Cai *et al.* (2005) observent un temps d'incubation de 2 h des ovocytes dévitrifiés avant de les utiliser en microscopie confocale ou en ICSI. Les études conduites chez d'autres espèces a confirmé la nécessité d'observer une période d'incubation des ovocytes après réchauffement pour permettre la restauration du fuseau méiotique (Chen *et al.*, 2003).

## **II.2. Comparaison de deux méthodes de cryoconservation des ovocytes MII de lapin : congélation lente et vitrification**

Les études portant sur la cryoconservation des ovocytes MII de lapines sont peu nombreuses (annexe 2) et ont porté principalement sur la technique de congélation à l'exception des travaux de Cai *et al.* (2005) qui ont étudié la technique de vitrification cryoloop. A ce jour, aucune expérience n'a été menée pour comparer l'efficacité des deux méthodes de cryoconservation. Actuellement, la vitrification semble privilégiée par la plupart des scientifiques pour ce type cellulaire pour les raisons que nous avons vu précédemment. Cependant, les résultats obtenus en congélation lente (Al-Hasani *et al.*, 1986b; Diedrich *et al.*, 1988; Al-Hasani *et al.*, 1989; Siebzehnuebl *et al.*, 1989) et la grande sensibilité des ovocytes de lapin aux cryoprotecteurs (Vincent *et al.*, 1989) viennent nuancer ce constat. L'objectif de cette étude est de comparer l'efficacité deux techniques de cryoconservation (congélation lente et vitrification) en évaluant la viabilité des ovocytes avant et après cryoconservation selon des critères métaboliques, structuraux et de leur aptitude à se développer.

### **II.2.1. Effet de la congélation lente et de la vitrification sur la quantité d'ATP intraovocytaire et les taux de développement après activation parthénogénétique**

#### **II.2.1.1. Objectif**

L'objectif de cette expérience est d'évaluer la quantité d'ATP ovocytaire et la capacité de développement après activation parthénogénétique des ovocytes MII frais, après exposition aux milieux de vitrification et de congélation sans étape de refroidissement et après congélation et vitrification.

#### **II.2.1.2. Matériel et méthodes**

### **PRODUCTION DES OVOCYTES**

Les ovocytes ont été produits selon le même protocole que celui décrit pour les essais préliminaires du dosage de l'ATP ovocytaire (cf paragraphe II.1.2.) à l'exception des femelles ayant

produit les ovocytes frais pour les expériences de parthénogenèse. Ces dernières étaient de génotype INRA 1077, superovulées selon le même protocole que celui décrit ci-dessus et dont l'ovulation a été induite par injection (i.v.) de 30 UI d'hCG (Chorulon®, Intervet, France).

Afin de gommer l'effet femelle, les ovocytes de bonne qualité ont été répartis de manière homogène dans les trois groupes expérimentaux de l'expérience 1 :

- « **Ovocytes incubés** » : ovocytes frais cultivés 2 h de CIV à 38°C et 5 % CO<sub>2</sub>.
- « **Exposés vitrification** » : ovocytes exposés aux solutions de vitrification et de dévitrification sans étape de refroidissement puis incubés 2h à 38°C et 5 % CO<sub>2</sub>.
- « **Exposés congélation** » : ovocytes exposés aux solutions de congélation et de décongélation sans étape de refroidissement puis incubés 2h à 38°C et 5 % CO<sub>2</sub>.

De la même façon, les ovocytes de bonne qualité ont été répartis de manière homogène dans les trois groupes expérimentaux de l'expérience 2 :

- « **Ovocytes frais** » : ovocytes frais utilisés directement après collecte.
- « **Ovocytes vitrifiés** » : ovocytes vitrifiés puis dévitrifiés et incubés 2h à 38°C et 5 % CO<sub>2</sub>.
- « **Ovocytes congelés** » : ovocytes congelés puis décongelés et incubés 2h à 38°C et 5 % CO<sub>2</sub>.

Après traitement, les ovocytes des six groupes ont été utilisés pour les tests de viabilité.

#### EXPOSITION ET CRYOCONSERVATION DES OVOCYTES

Les ovocytes ont été incubés dans le MB sur platine chauffante à 37°C et protégés de la lumière jusqu'à utilisation. Seuls les ovocytes de bonne qualité ont été exposés aux milieux de cryoconservation ou cryoconservés selon les deux méthodes de cryoconservation. Les protocoles de cryoconservation sont identiques à ceux décrits précédemment (cf paragraphe II.1.2.3.) et les protocoles d'exposition des ovocytes aux milieux de cryoconservation sont présentés ci-dessous.

*Exposés milieux de vitrification.* Les ovocytes ont été incubés pendant 2 minutes dans une solution de MB contenant 10 % (v/v) d'éthylène glycol (réf. E9129, Sigma, France) et 10 % (v/v) de DMSO (réf. D2650, Sigma, France). Les ovocytes ont été ensuite transférés dans la solution de vitrification constituée de MB + 20 % (v/v) d'éthylène glycol + 20 % (v/v) de DMSO + 0,65 M de tréhalose (réf. T0167, Sigma, France) et 10 mg/ml de Ficoll 70 (réf. F2878, Sigma, France) pendant une durée inférieure à 35 secondes. Ensuite les ovocytes ont été transférés successivement, à

5 minutes d'intervalle, dans quatre bains de MB contenant respectivement 0,5 ; 0,3 ; 0,1 et 0 M de tréhalose.

*Exposés milieux de congélation.* Les ovocytes ont été placés pendant 15 minutes dans une solution de MB + 1,5M de 1,2-Propanediol (PROH, réf. 134368, Sigma, France) avant d'être transférés dans la solution de congélation composée de MB + 1,5 M PROH + 0,2 M de tréhalose. Après 10 minutes d'incubation, les ovocytes ont été placés dans différents bains à 5 minutes d'intervalle avec des concentrations décroissantes en cryoprotecteurs (MB + 1 M de PROH + 0,2 M de tréhalose ; 0,5 M de PROH + 0,2 M de tréhalose ; 0,2 M de tréhalose et 0 M de tréhalose).

#### **EVALUATION METABOLIQUE ET DOSAGE D'ATP**

Les quantités d'ATP intraovocytaires ont été déterminées par un dosage utilisant la bioluminescence. L'ATP est dans un premier temps extrait des ovocytes puis dosé après ajout des réactifs (luciférine/luciférase) permettant la réaction lumineuse (figure 17). Le kit de dosage utilisé est le kit « bioluminescent somatic cell assay FL-ASC » (Sigma, France), dont le protocole a déjà été décrit ci-dessus (cf paragraphe II.1.2.).

#### **EVALUATION DU DEVELOPPEMENT PARTHENOGENETIQUE**

Les ovocytes frais, ont été cultivés comme les ovocytes vitrifiés et congelés pendant 2 h à 38°C sous atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub> avant de procéder à leur activation parthénogénétique. Le développement des parthénotes frais ne sera pas analysé ici en comparaison aux taux de développement des ovocytes cryoconservés mais constitue un indicateur de fiabilité de la manipulation d'activation.

Après incubation, les ovocytes des différents groupes expérimentaux ont été rincés trois fois dans une solution à 0,3 M de mannitol constituée d'eau milliQ + 0,3 M de mannitol (réf. M4125, Sigma, France) + 100 µM de MgSO<sub>4</sub> (réf. M7774, Sigma, France) + 100 µM de CaCl<sub>2</sub> (réf. M7902, Sigma, France). Les ovocytes ont été placés entre les électrodes du BTX Electro-cell Manipulator 200 (BTX Inc, Etats-Unis) pour recevoir une première série de trois pulses électriques de courant continu d'une tension de 3,2 KV/cm et d'une durée de 20 µs chacun. Les ovocytes ont ensuite été placés en culture pendant 1h à 38°C sous atmosphère humide à 5 % de CO<sub>2</sub> dans une solution de TCM 199 + 10 % de sérum de veau fœtal (MC) puis rincés trois dans le milieu mannitol avant de recevoir une seconde série de pulses, identique à la précédente. Ensuite, les ovocytes ont directement incubés pendant 1 h dans une solution de MC + 2 mM de 6-DMAP (6-Diméthylaminopurine = inhibiteur de kinase) + 5 µg/µl de cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique). Après 1h d'incubation, les

ovocytes activés sont minutieusement rincés pendant 30 minutes dans du MC avant mise en culture *in vitro* dans du milieu MC, sous huile minérale, à 38°C et 5 % de CO<sub>2</sub> pendant 120 h.

Le développement des parthénogénètes est évalué à 24 et 102 h après l'activation parthénogénétique afin d'évaluer les taux de développement jusqu'au stade 2 et 4 cellules puis jusqu'au stade blastocyste. Le pourcentage de clivage total représente le taux de développement des ovocytes jusqu'au stade 2 et 4 cellules après 24 h de culture *in vitro*.

#### ANALYSE STATISTIQUE

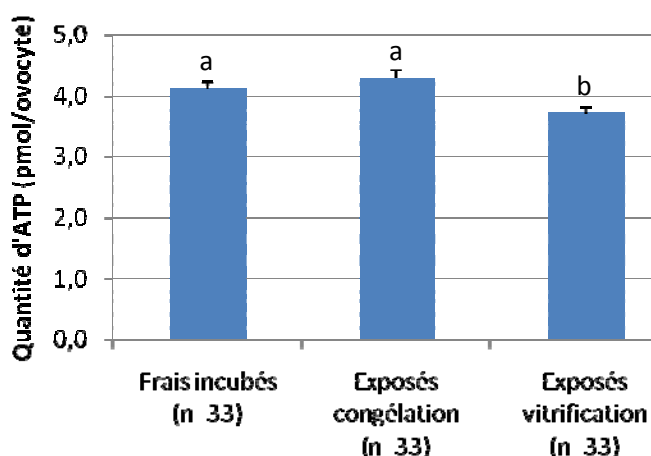
La comparaison des quantités d'ATP intraovocytaire entre les trois groupes expérimentaux « ovocytes frais », « vitrifiés » et « congelés » a été effectuée par une analyse de variance (StatView®, SAS Institute Inc.) à un effet fixé (3 niveaux). Les mesures réalisées sur l'exposition aux solutions de cryoconservation n'ayant pas été réalisées en même temps, ces résultats feront l'objet d'une analyse de variance à un effet fixé (3 niveaux) distincte de la première.

La comparaison statistique des taux de développement après activation parthénogénétique des ovocytes des six groupes expérimentaux ont été réalisées par un test du Chi-deux. Les valeurs étaient considérées comme significativement différentes quand  $p < 0,05$ .

#### II.2.1.3. Résultats

##### EXPERIENCE 1

Figure 22. Quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais et après exposition aux milieux de congélation/décongélation et vitrification/dévitrication



Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b) sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

La figure 22 montre la quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais, exposés aux milieux de vitrification/dévitrication et exposés aux milieux de



congélation/décongélation après 2 h d'incubation à 38°C et sous une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub>. On observe que le contenu d'ATP dans les ovocytes exposés aux milieux de vitrification est significativement inférieur à ceux mesurés dans les ovocytes frais incubés et exposés aux milieux de congélation (respectivement  $3,7 \pm 0,1$  pmol d'ATP contre  $4,3 \pm 0,1$  et  $4,1 \pm 0,1$  pmol d'ATP par ovocytes exposés aux milieux de vitrification, de congélation et frais incubés).

Le tableau 17 présente les taux de clivage (embryons 2 et 4 cellules) et les taux de développement jusqu'au stade blastocyste des ovocytes frais, exposés aux milieux de vitrification/dévitrication et congélation/décongélation après 2h de CIV.

**Tableau 17.** *Développement parthénogénétique à 24 et 102 h des ovocytes incubés frais, exposés aux milieux de vitrification et exposés aux milieux de congélation après 2 h de CIV*

	N	Observations à 24h			Observations à 102h
		2 cellules (%)	4 cellules (%)	Clivés (%)	Blastocystes (%)
Incubés frais	20	1 (5,0 %)	16 (80,0 %)	17 (85,0 %)	16 (80,0 %)
Exposés vitrification	20	0	17 (85,0 %)	17 (85,0 %)	11 (55,0 %)
Exposés congélation	19	0	17 (89,5 %)	17 (89,5 %)	12 (63,2 %)

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b, c) dans la même colonne sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

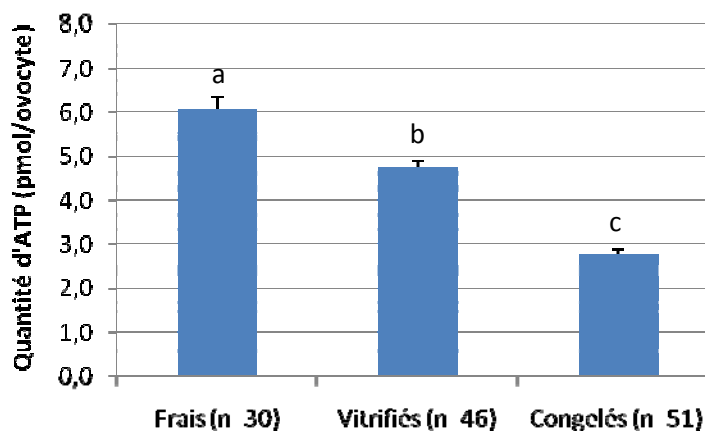
Le taux de clivage des embryons parthénogénétiques observé 24 h après activation des ovocytes n'est pas différent entre les trois groupes expérimentaux et s'échelonne de 85,0 à près de 90,0 % ( $p > 0,05$ ). Pour tous les groupes expérimentaux, aucun embryon parthénogénétique ne présentait de retard de développement 24 h après activation puisque une grande majorité d'embryons au stade 4 cellules étaient observés.

Le taux de développement au stade blastocyste des ovocytes frais incubés est identique au taux de clivage et est significativement supérieur à ceux des autres groupes avec 80,0 % de blastocystes 102 h après activation. Les taux de développement des embryons chutent 102 h après activation pour les groupes des ovocytes exposés aux milieux de congélation et de vitrification. Les ovocytes exposés aux milieux de vitrification ont un taux de développement jusqu'au stade blastocyste inférieur aux ovocytes exposés aux milieux de congélation (55,0 contre 63,2 % respectivement pour les ovocytes « exposés vitrification » et « exposés congélation »).

**EXPERIENCE 2**

La figure 23 montre la quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais juste après collecte, vitrifiés et congelés après 2 h d'incubation à 38°C et sous une atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub>. Les quantités d'ATP contenues dans les ovocytes des trois groupes expérimentaux sont significativement différentes ( $p < 0,0001$ ). Le contenu en ATP des ovocytes frais est supérieur à celui des ovocytes vitrifiés qui est supérieur à celui des ovocytes congelés (respectivement  $6,1 \pm 0,2$  ;  $4,7 \pm 0,1$  et  $2,8 \pm 0,1$  pmol d'ATP par ovocyte).

*Figure 23. Comparaison des quantités d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais et congelés et vitrifiés après 2 h d'incubation à 38°C, 5 % de CO<sub>2</sub> et sous atmosphère humide*



Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b, c) sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

Le tableau 18 présente les taux de clivage (embryons 2 et 4 cellules) et les taux de développement jusqu'au stade blastocyste des ovocytes frais, vitrifiés et congelés après 2 h de CIV.

Le pourcentage d'ovocytes activés qui se sont clivés 24 h après leur activation parthénogénétique est significativement plus élevé pour les ovocytes frais que ceux des ovocytes cryoconservés avec respectivement 92,3 % de clivés contre 31,0 % et 41,3 % pour les ovocytes vitrifiés et congelés. Le pourcentage d'embryons au stade 2 cellules à 24 h traduit un retard de développement pour une plus grande proportion d'ovocytes congelés et activés que pour les deux autres groupes expérimentaux (respectivement 14,7 % d'embryons parthénogénétiques au stade 2 cellules contre 2,5 % et 5,6 % pour les groupes frais et vitrifiés).

**Tableau 18.** Développement parthénogénétique à 24 et 102 h des ovocytes frais, vitrifiés et congelés après 2 h de CIV

	N	Observations à 24 h			Observations à 102h
		2 cellules (%)	4 cellules (%)	Clivés (%)	Blastocystes (%)
Ovocytes frais	39	1 (2,5 %) <sup>a</sup>	35 (89,7 %) <sup>a</sup>	36 (92,3 %) <sup>a</sup>	29 (74,4 %) <sup>a</sup>
Ovocytes vitrifiés	71	4 (5,6 %) <sup>a</sup>	18 (25,4 %) <sup>b</sup>	22 (31,0 %) <sup>b</sup>	3 (4,2 %) <sup>b</sup>
Ovocytes congelés	75	11 (14,7 %) <sup>b</sup>	20 (26,7 %) <sup>b</sup>	31 (41,3 %) <sup>b</sup>	1 (1,3 %) <sup>b</sup>

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b, c) dans la même colonne sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

Comme dans l'expérience 1, les taux de développement à 102 h chutent par rapport à ceux observés à 24 h, notamment pour les groupes d'ovocytes cryoconservés. A 102 h post-activation, le taux de développement des embryons jusqu'au stade blastocyste est significativement plus important (74,4 %) que ceux des embryons vitrifiés (4,2 %) et congelés (1,3 %).

#### II.2.1.4. Discussion et conclusion

L'objectif de cette étude était de comparer l'efficacité de la vitrification OPS et de la congélation lente sur la viabilité après exposition aux solutions cryoprotectrices (expérience 1) ou après réchauffement (expérience 2) des ovocytes MII de lapines à partir de critères métaboliques (dosage d'ATP intraovocytaire) et de développement (développement après activation parthénogénétique).

Les quantités d'ATP des ovocytes MII de lapines ont été mesurées pour la première fois dans cette expérience et les contenus s'échelonnaient de 4,1 à 6,1 pmol d'ATP par ovocyte frais. Dans les travaux menés sur le contenu en ATP intracellulaire des ovocytes de hamster (Lee *et al.*, 2006), humains (Slotte *et al.*, 1990; Van Blerkom *et al.*, 1995), murins (Van Blerkom *et al.*, 1995), bovins (Rieger, 1997; Stojkovic *et al.*, 2001; Tamassia *et al.*, 2004) et porcins (Herrick *et al.*, 2003), la quantité d'ATP évaluée par ovocyte « frais » s'échelonnait de 0,1 à 2,8 pmol d'ATP suivant les conditions expérimentales, le stade de maturation, le statut physiologique de la femelle donneuse et la méthode de dosage utilisée. Ces données sont nettement inférieures à la quantité d'ATP présente dans les ovocytes MII frais de lapin dont le contenu varie de 4 à 8 pmol par ovocyte. Ces différences reflètent probablement une spécificité liée à l'espèce mais aussi des différences au niveau de la conduite du protocole de dosage. En effet, les ovocytes ont été isolés de la masse de cellules du

cumulus en conservant la *corona radiata* alors que dans d'autres travaux les ovocytes étaient entièrement dénudés (Rieger, 1997; Stojkovic *et al.*, 2001; Tamassia *et al.*, 2004). La première hypothèse, consiste à associer ces différences à la quantité d'ATP apportée par les cellules du cumulus. La deuxième hypothèse consiste à considérer que le retrait de la couronne radiée entraîne une manipulation excessive et donc à un stress important des ovocytes qui relarguent d'importantes quantités d'ATP dans le milieu extracellulaire comme cela a déjà été mis en évidence pour d'autres types cellulaires (Joseph *et al.*, 2003; Lazarowski *et al.*, 2003).

L'évaluation de la quantité d'ATP intraovocytaire après exposition aux solutions cryoprotectrices montre que les solutions de vitrification sont suffisamment toxiques pour altérer le métabolisme énergétique des ovocytes, même sans passer par les phases de refroidissement et de réchauffement. Les ovocytes exposés aux milieux de congélation ont un métabolisme énergétique équivalent à celui des ovocytes frais. Les mesures réalisées après vitrification et congélation lente des ovocytes montrent que la cryoconservation, indépendamment de la méthode utilisée, a un effet important sur le niveau d'ATP présent dans les ovocytes. Les processus de cryoconservation ont donc perturbé le métabolisme énergétique des ovocytes par des mécanismes encore inconnus mais touchant probablement à l'intégrité des mitochondries, siège des synthèses d'ATP. Or, un niveau d'ATP insuffisant peut conduire à des problèmes de fécondation ou de développement embryonnaire précoce qui conduisent l'atrésie des ovocytes. Il a été mis en évidence que la capacité de développement des embryons dépendait fortement du contenu en ATP des ovocytes (Tamassia *et al.*, 2004) et qu'elle était plus élevée pour des ovocytes contenant plus de 2 pmol d'ATP (Van Blerkom *et al.*, 1995). Les taux de développement jusqu'au stade blastocyste obtenus après activation parthénogénétique des ovocytes exposés aux solutions de cryoconservation confirment cette observation puisque les ovocytes exposés aux solutions de vitrification présentent des résultats significativement plus faibles que ceux obtenus dans les autres groupes. Ces observations ont permis de souligner la grande sensibilité des ovocytes de lapin aux cryoprotecteurs puisque leur exposition à des concentrations peu élevées en cryoprotecteurs (groupe « exposés congélation ») altère leur capacité de développement après activation.

A la différence de l'expérience précédente, les dosages réalisés après cryoconservation conduisent à des conclusions différentes puisque le métabolisme énergétique des ovocytes vitrifiés est largement supérieur à celui des ovocytes congelés (respectivement  $4,7 \pm 0,1$  et  $2,8 \pm 0,1$  pmol d'ATP par ovocyte). Les altérations du métabolisme énergétique ont des origines différentes entre la vitrification et la congélation. La dégradation du niveau d'ATP des ovocytes vitrifiés serait liée principalement à la toxicité des milieux de vitrification et à leurs importantes concentrations en cryoprotecteurs alors que le problème de la congélation lente proviendrait plus du refroidissement,

de la cristallisation et des phénomènes associés. A partir de ce critère d'évaluation de la viabilité ovocytaire, la vitrification semble être la méthode la plus adaptée à la cryoconservation des ovocytes MII chez la lapine. Pour la méthode de congélation lente, on peut penser que la formation de cristaux de glace pendant le processus de refroidissement altère fortement la structure des mitochondries qui ne sont, pour la plupart, plus fonctionnelles après réchauffement. Ces observations reflètent les difficultés de congélation des ovocytes liées à la grande taille de la cellule qui rend difficile leur déshydratation.

Les taux de développement jusqu'au stade blastocyste obtenus après activation parthénogénétique des ovocytes frais sont équivalents et parfois même supérieurs à ceux obtenus dans d'autres études (Ozil, 1990; Escriba et Garcia-Ximenez, 1999; 2000; Yin *et al.*, 2000; Escriba et Garcia-Ximenez, 2001; Garcia-Ximenez et Escriba, 2002; Liu *et al.*, 2002). Cependant, les taux de développement obtenus après activation parthénogénétique des ovocytes vitrifiés et congelés sont très faibles et identiques pour les deux méthodes mais nettement inférieurs à celui des ovocytes frais (respectivement 74,4 ; 4,2 et 1,3 % de taux de développement jusqu'au stade blastocyste pour les ovocytes frais, vitrifiés et congelés). Les taux de développement obtenus ici après activation parthénogénétique sont voisins de ceux obtenus après FIV ou ICSI dans des travaux antérieurs (Al-Hasani *et al.*, 1986b; Diedrich *et al.*, 1988; Al-Hasani *et al.*, 1989; Siebzehnuebl *et al.*, 1989; Vincent *et al.*, 1989; Cai *et al.*, 2005). Les observations réalisées à 24 h ne laissaient pas présager la faiblesse des résultats obtenus à 102h après activation parthénogénétique. Par conséquent, si les ovocytes cryoconservés arrivent à se cliver et à se développer jusqu'au stade 4 cellules, ils rentrent en atrésie dans des stades de développement plus tardifs sans arriver jusqu'au stade blastocyste. De plus, la faiblesse des résultats obtenus après vitrification paraît surprenante et inattendue car si les résultats après congélation peuvent être liés à la chute du métabolisme énergétique, il n'en est pas de même pour les ovocytes vitrifiés. La méthode de vitrification altère la viabilité des ovocytes après réchauffement par des mécanismes non identifiés. Or, l'expérience 1 a permis de mettre en évidence la toxicité des milieux de vitrification dont la simple exposition des ovocytes suffisait à entraîner la réduction du contenu en ATP. Il a été mis en évidence que le processus de cryoconservation induit des altérations du fuseau méiotique chez les ovocytes bovins (Aman et Parks, 1994; Saunders et Parks, 1999; Albarracin *et al.*, 2005b), porcins (Rojas *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007), murins (Chen *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2008), ovins (Succu *et al.*, 2007a), de femme (Boiso *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003; Mandelbaum *et al.*, 2004) et de lapine (Vincent *et al.*, 1989; Cai *et al.*, 2005). Ces altérations conduiraient à une mauvaise ségrégation des chromosomes et donc à des problèmes de développement et résulteraient de l'exposition aux basses températures et à de hautes concentrations en cryoprotecteurs. Chez le lapin, les ovocytes ne semblent pas très sensibles aux

variations de température mais plus à l'exposition aux cryoprotecteurs (Vincent *et al.*, 1989). Il est donc probable que la toxicité des milieux de vitrification altère la structure méiotique des ovocytes qui ne peuvent se développer jusqu'au stade blastocyste. L'étude de la structure ovocytaire en microscopie confocale après congélation et vitrification permettrait de valider ou d'infirmer cette hypothèse.

Même si le meilleur critère d'évaluation de la viabilité des ovocytes est le pourcentage de blastocyste obtenu après fécondation et culture, le dosage d'ATP représente un bon outil d'évaluation de la qualité ovocytaire comme cela avait déjà été évoqué par Stojkovic *et al.* (Stojkovic *et al.*, 2001). Cependant, ce seul critère métabolique ne permet pas à lui seul d'expliquer les faibles taux de développement des ovocytes cryoconservés après activation parthénogénétique.

## II.2.2. Effet de la congélation lente et de la vitrification sur la configuration du réseau de filaments d'actine et du fuseau méiotique

### II.2.2.1. Objectif

L'objectif de cette expérience est d'évaluer les effets des méthodes de congélation lente et de vitrification sur la configuration du réseau de filaments d'actine, du fuseau de microtubules et de la plaque chromosomique des ovocytes MII de lapin. Cette étude vise à comprendre les faibles taux de développement après activation parthénogénétiques des ovocytes vitrifiés obtenus dans l'expérience précédente.

### II.2.2.2. Matériel et méthodes

#### **PRODUCTION DES OVOCYTES**

Les ovocytes ont été produits selon le même protocole que celui décrit pour les essais préliminaires du dosage de l'ATP ovocytaire (cf paragraphe II.1.2.). Afin de gommer l'effet femelle, les ovocytes de bonne qualité de chaque lapine donneuse ont été répartis de manière homogène dans les trois groupes expérimentaux :

- « **Ovocytes frais** » : ovocytes frais utilisés directement après collecte.
- « **Ovocytes vitrifiés** » : ovocytes vitrifiés puis dévitrifiés et incubés 2h à 38°C et 5 % CO<sub>2</sub>.
- « **Ovocytes congelés** » : ovocytes congelés puis décongelés et incubés 2h à 38°C et 5 % CO<sub>2</sub>.

Après traitement, les ovocytes des six groupes ont été utilisés pour l'évaluation structurale.

## CRYOCONSERVATION DES OVOCYTES

Les ovocytes ont été incubés dans le MB sur platine chauffante à 37°C et protégés de la lumière jusqu'à utilisation. Seuls les ovocytes de bonne qualité ont été cryoconservés selon les deux méthodes décrites précédemment (cf paragraphe II.2.1.2.).

## EVALUATION STRUCTURALE ET MICROSCOPIE CONFOCALE

Contrairement aux ovocytes frais utilisés immédiatement après collecte, les ovocytes cryoconservés sont incubés 2 h à 38°C sous atmosphère humidifiée à 5 % de CO<sub>2</sub> avant fixation (Vincent *et al.*, 1989; Cai *et al.*, 2005). Les ovocytes sont fixés par incubation pendant 30 minutes dans une solution de PBS contenant 4 % (w/v) de paraformaldéhyde (pH = 7,4) et perméabilisés par incubation dans une solution de PBS + 0,1 % de Triton® X-100 (réf. T9284, Sigma, France) à 37°C. Les ovocytes sont ensuite marqués simultanément pour l'évaluation des filaments d'actine, du fuseau de microtubules et de la plaque chromosomique. De même que la fixation et la perméabilisation, tous les marquages sont réalisés sur platine chauffante à 37°C sauf si mentionné. Entre les différents bains (étapes de fixation et perméabilisation comprises), les ovocytes sont rincés 3 fois dans une solution de PBS + 1 % de « Bovine Serum Albumine » (BSA) + 0,05 % de Tween® 80 (Prolabo, France).

Le marquage du fuseau de microtubule est réalisé en plaçant les ovocytes dans une solution d'anticorps (AC) anti- $\alpha$ -tubuline de poulet (réf. T9026, Sigma, France) (dilution 1 :200 soit 1  $\mu$ l d'AC + 199  $\mu$ l de PBS + 1 % BSA) pendant 1 h 30 avant d'être incubés dans une solution d'AC anti-souris couplé à l'Alexa Fluor® 488 (réf. A24920, Molecular Probes, Etats-Unis) (dilution 1 :500 soit 1  $\mu$ l d'AC + 499  $\mu$ l de PBS + 1 % BSA) pendant 2 h à température ambiante et à l'obscurité.

Les ovocytes sont ensuite placés dans une solution d'AC Alexa Fluor® 647 phalloïdine (réf. A22287, Molecular Probes, Etats-Unis) (concentration 8 UI/ml de PBS + 1 % BSA) pendant 30 min et à l'obscurité pour le marquage des filaments d'actine.

Enfin, les ovocytes sont placés dans un bain de Sytox® Orange (réf. S11368, Molecular Probes, Etats-Unis) (dilution 1 :1000 soit 1  $\mu$ l d'AC dans 999  $\mu$ l de PBS + 1 % BSA) pendant 20 minutes et à l'obscurité pour le marquage des chromosomes de la plaque métaphasique.

Après une dernière série de rinçages, les ovocytes sont placés, par groupe de 5 et avec un minimum de liquide, sur une lame recouverte d'un œillet permettant de ne pas écraser les ovocytes avec la lamelle puis recouverts de 10  $\mu$ l d'une solution de montage « anti-blanchiment » (Prolong® Gold, réf. P36930, Molecular Probes, Etats-Unis). Après dépôt de la lamelle et 24 h de stockage à température ambiante et à l'obscurité, les lames sont vernies puis placés au réfrigérateur, protégées

de la lumière jusqu'à leur observation. Celle-ci est réalisée dans la semaine suivant le marquage à l'aide d'un microscope confocal Leica muni d'un laser argon-krypton.

La configuration du réseau de filaments d'actine, du fuseau de microtubules et de la plaque chromosomique a été évaluée sous objectif à huile (25X/0,75) avec un zoom (X3) et classifiée en trois catégories : normaux, anormaux et absents. On considère un ovocyte comme ayant une configuration normale si le réseau de filaments d'actine est présent en région sous membranaire avec un fort marquage périphérique et des jonctions entre l'ovocyte et les cellules du cumulus, si le fuseau de microtubule présente sa forme classique en tonneau avec une orientation radiale et si la plaque métaphasique de chromosomes est régulière et située dans l'axe de symétrie horizontal du fuseau de microtubules. Toutes les configurations différentes de celles présentées ci-dessus sont considérées comme anormales (figure 24).

#### ANALYSE STATISTIQUE

La comparaison statistique du pourcentage de filaments d'actine, de fuseau méiotique et de plaque chromosomique normaux des ovocytes des trois groupes expérimentaux ont été réalisées par un test du Chi-deux. Les valeurs sont considérées comme significativement différentes quand  $p < 0,05$ .

##### II.2.2.3. Résultats

Le tableau 19 présente les pourcentages de réseaux de filaments d'actine ayant une configuration normale, anormale ou absente pour les ovocytes frais, vitrifiés et congelés.

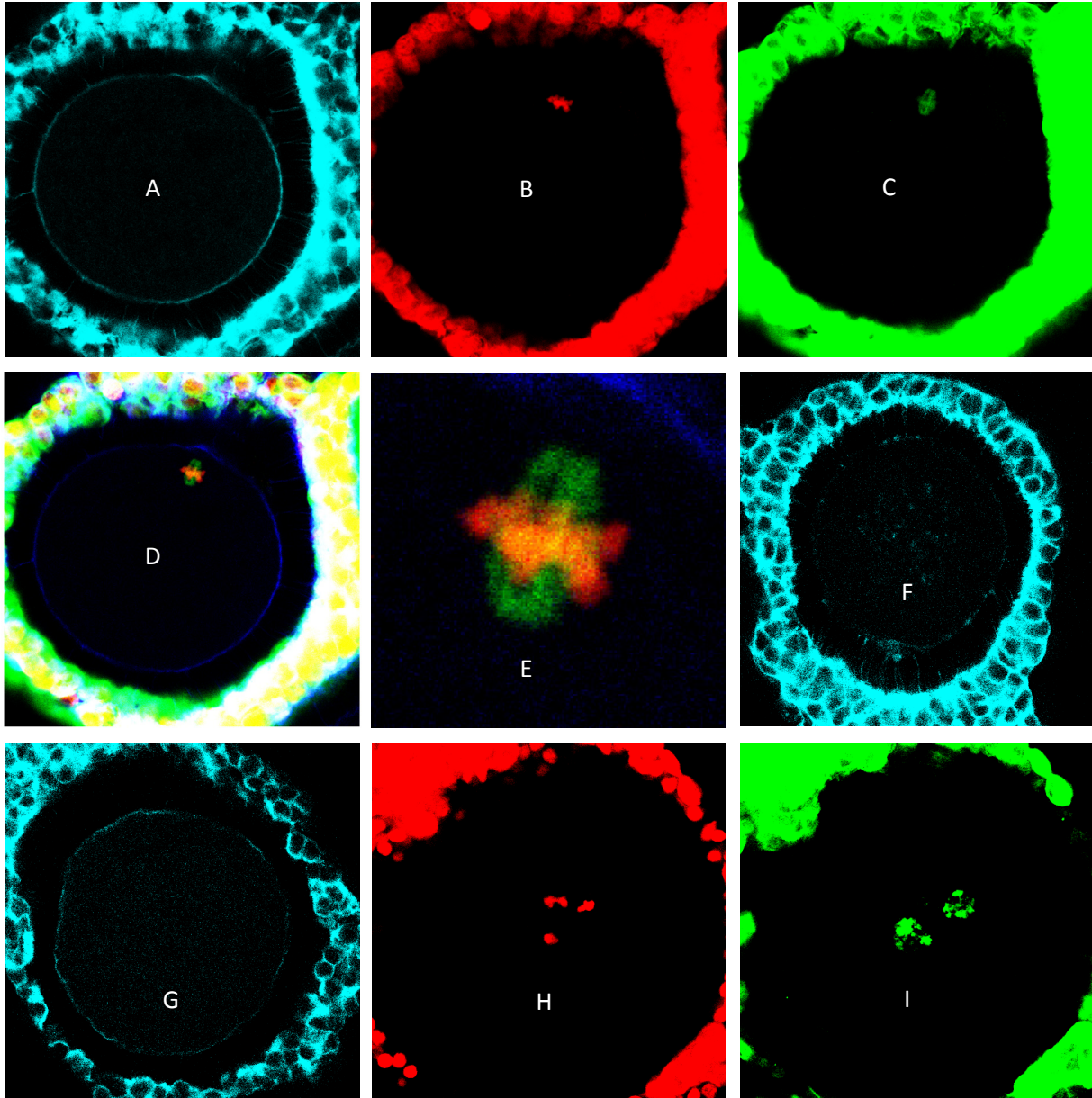
Tableau 19. Configuration du réseau de filaments d'actine des ovocytes vitrifiés et congelés après 2 h de CIV et des ovocytes frais

	N	Normaux (%)	Anormaux (%)	Absents (%)
Ovocytes frais	42	35 (83,3 %) <sup>a</sup>	7 (16,7 %)	0
Ovocytes vitrifiés	35	8 (22,9 %) <sup>b</sup>	11 (31,4 %)	16 (45,7 %)
Ovocytes congelés	48	28 (58,3 %) <sup>c</sup>	9 (18,8 %)	11 (22,9 %)

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b, c) dans la même colonne sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).



**Figure 24.** *Photographies d'ovocytes MII de lapin observés en microscopie confocale (X75) après immunomarquage des filaments d'actine (bleu), des chromosomes (rouge) et du fuseau de microtubules (vert).*



**(A)** configuration normale du réseau de filaments d'actine en région sous membranaire ; **(B)** configuration normale des chromosomes alignés pour former la plaque métaphasique ; **(C)** configuration normale des microtubules présentant un arrangement en forme de fuseau ; **(D)** superposition des trois marquages précédemment cités du même ovocyte ; **(E)** détail du fuseau méiotique dans sa configuration normale ; **(F)** absence de marquage du réseau de filaments d'actine en région sous membranaire ; **(G)** marquage anormal, discontinu du réseau de filaments d'actine ; **(H)** arrangement anormal des chromosomes dispersés dans le cytoplasme de l'ovocyte ; **(I)** configuration anormale des microtubules dispersés dans le cytoplasme de l'ovocyte.

Les observations en microscopie confocale montrent que le pourcentage de réseaux de filaments d'actine ayant une configuration normale est significativement différent entre tous les groupes expérimentaux. La proportion la plus élevée est observée dans le groupe des ovocytes frais (83,3 %) et la plus faible dans le groupe des ovocytes vitrifiés (22,9 %), les ovocytes congelés présentant un pourcentage intermédiaire (58,3 %). Le faible pourcentage observé pour les ovocytes vitrifiés s'explique principalement par une grande proportion d'ovocytes présentant une absence de marquage des filaments d'actine (45,7 %).

Le tableau 20 présente les pourcentages de fuseaux de microtubules et de chromosomes métaphasiques ayant une configuration normale, anormale ou absente pour les ovocytes frais, vitrifiés et congelés.

**Tableau 20.** *Configuration du fuseau de microtubules et de la plaque métaphasique des ovocytes vitrifiés et congelés après 2 h de CIV et des ovocytes frais*

	N	Fuseau de microtubules			Chromosomes métaphasiques		
		Normaux (%)	Anormaux (%)	Absents (%)	Normaux (%)	Anormaux (%)	Absents (%)
Ovocytes frais	42	39 (92,9%) <sup>a</sup>	3 (7,1%)	0	37 (88,1%) <sup>a</sup>	5 (11,9%)	0
Ovocytes vitrifiés	35	9 (25,7%) <sup>b</sup>	9 (25,7%)	17 (48,6%)	13 (37,1%) <sup>b</sup>	18 (51,4%)	3 (8,6%)
Ovocytes congelés	48	27 (56,3%) <sup>c</sup>	5 (10,4%)	16 (33,3%)	27 (56,3%) <sup>b</sup>	8 (16,7%)	10 (20,8%)

Les valeurs présentées avec différentes lettres en exposant (a, b, c) dans la même colonne sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).

Le pourcentage de fuseaux de microtubules ayant une configuration normale est significativement plus élevé pour les ovocytes frais (92,9 %) que pour les ovocytes congelés (56,3 %), lui-même supérieur à celui observé pour les ovocytes vitrifiés (25,7 %). Les faibles proportions observées pour les ovocytes cryoconservés s'expliquent principalement par une majorité d'ovocytes ne présentant aucun marquage des microtubules (respectivement 33,3 % et 48,6 % pour les ovocytes congelés et vitrifiés). Les mêmes observations peuvent être faites en ce qui concerne la configuration des chromosomes métaphasiques, avec une plus grande proportion de normaux pour les ovocytes frais (88,1 %) que pour les cryoconservés dont les pourcentages sont similaires (respectivement 56,3 % et 37,1 % pour les ovocytes congelés et vitrifiés). Pour les ovocytes vitrifiés, ce pourcentage s'explique par la grande proportion de plaques chromosomiques anormales.

#### II.2.2.4. Discussion et conclusion

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets de la vitrification et de la congélation lente sur l'intégrité du réseau de filaments d'actine et du fuseau méiotique des ovocytes et de déterminer la cause des faibles taux de développement après activation parthénogénétique. Les résultats montrent que la cryoconservation a un effet important sur la structure des ovocytes qui est encore plus marqué chez les ovocytes vitrifiés. Les altérations observées sur les ovocytes congelés sont probablement liées à l'exposition prolongée des ovocytes aux cryoprotecteurs à basse température. Cependant, cette durée d'exposition est nécessaire à la déshydratation des ovocytes pour limiter la formation de cristaux de glace et ne peut être écourtée. Par conséquent, il semble difficile d'améliorer les résultats obtenus après réchauffement des ovocytes congelés. La suite de la discussion sera donc principalement axée sur la vitrification et ses perspectives d'optimisation.

Bien que le nombre d'études portant sur l'effet de la cryoconservation sur l'intégrité du fuseau méiotique et des filaments d'actine soit important chez l'homme et la plupart des espèces domestiques, deux travaux seulement ont été menés chez le lapin (Vincent *et al.*, 1989; Cai *et al.*, 2005) dont un n'a pas présenté de données chiffrées de ses observations en microscopie confocale (Vincent *et al.*, 1989). Ces structures jouent pourtant un rôle essentiel dans l'ensemble des mouvements biologiques (filaments d'actine) et dans les divisions cellulaires (fuseau méiotique).

Les observations en microscopie confocale montrent que 83,3 % des ovocytes frais présentaient un réseau de filaments d'actine normal, alors que ce pourcentage était significativement plus faible pour les ovocytes congelés (58,3 %,  $p < 0,05$ ) et vitrifiés (22,9 %,  $p < 0,05$ ). Une seule étude a permis d'évaluer la configuration du réseau de filaments d'actine des ovocytes MII de lapin après congélation mais aucune donnée chiffrée n'a été présentée ; les auteurs soulignant alors l'effet notable de la congélation sur la distribution des filaments d'actine (Vincent *et al.*, 1989). Cependant, si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus dans d'autres espèces, le pourcentage obtenu pour les ovocytes vitrifiés est similaire à ceux trouvés par Wu *et al.* (2006) et Saunders et Parks (1999) et inférieur à ceux de Rojas *et al.* (2004) après vitrification des ovocytes MII porcins et à ceux de Albarracin *et al.* (2005a).

Les résultats obtenus dans notre expérience montrent qu'un très faible pourcentage d'ovocytes vitrifiés (25,7 %) présente un fuseau méiotique intact. Ce pourcentage est significativement plus faible que pour les ovocytes congelés (56,3 %,  $p < 0,05$ ), lui-même plus faible que celui observé pour les ovocytes frais (92,9 %,  $p < 0,05$ ). En comparaison, Cai *et al.* (2005)

trouvaient, avec un protocole de vitrification presque similaire à celui utilisé ici, un résultat assez proche avec 27,3 % d'ovocytes présentant un fuseau méiotique intact. Ce pourcentage était significativement amélioré par l'utilisation d'un système permettant d'atteindre des vitesses de refroidissement très élevées de l'ordre de 135 000°C/min (62,9 % de fuseaux intacts contre 76,9 % pour les ovocytes frais). Chez les autres espèces domestiques, le même effet de la cryoconservation sur la structure ovocytaire a été observé avec une incidence plus ou moins marquée selon l'espèce concernée et la sensibilité des ovocytes (Chen *et al.*, 2003). Ainsi, les résultats obtenus en termes de pourcentage d'ovocytes MII présentant un fuseau méiotique intact après vitrification ou congélation, s'échelonnent de 10,3 à 43,5 % chez les porcins (Rojas *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007), de 62,2 à 95 % chez la souris (Chen *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2008), de 16,2 à 69,7 % chez l'homme (Boiso *et al.*, 2002; Rienzi *et al.*, 2004; Coticchio *et al.*, 2006) et de 12,0 à 40,0 % chez les bovins (Saunders et Parks, 1999; Albarracin *et al.*, 2005a). Ces résultats confirment qu'il existe une variabilité entre et au sein des espèces de la sensibilité à la cryoconservation du fuseau méiotique ovocytaire. Les observations réalisées en microscopie confocale sur la configuration des chromosomes métaphasiques après immunomarquage suivent la même tendance que celles effectuées pour le fuseau méiotique. Il y a une relation de cause à effet entre les deux structures puisque c'est la dépolymérisation des microfilaments de tubuline qui entraîne la désorganisation de la plaque métaphasique.

De nouvelles voies d'amélioration de la stabilité du fuseau ont été développées par l'utilisation d'agents stabilisateurs des microtubules ou encore en diminuant la concentration en cryoprotecteurs par l'augmentation des vitesses de refroidissement. Ainsi, un prétraitement des ovocytes à la Cytochalasine B ou D ou au Taxol® permet d'augmenter significativement le taux de conservation du fuseau méiotique des ovocytes MII et leur viabilité après réchauffement (Park *et al.*, 2001; Rho *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2006) cependant leurs effets semblent être contestés (Albarracin *et al.*, 2005b; Fujihira *et al.*, 2005; Silvestre *et al.*, 2006; Bogliolo *et al.*, 2007). L'utilisation de cinétiques de refroidissement élevées permet de réduire le temps d'exposition des ovocytes aux basses températures et la concentration en cryoprotecteurs pour une meilleure préservation du fuseau méiotique et des résultats après cryoconservation en général (Chen *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2005; Gardner *et al.*, 2007; He *et al.*, 2008; Ko *et al.*, 2008). A l'avenir, une des voies possibles d'amélioration de la vitrification est l'utilisation d'azote liquide pressurisé à -210°C qui limite la formation de vapeurs d'azote isolantes lors de la plongée des containers dans l'azote liquide (Arav et Zeron, 1997). L'utilisation de nouveaux containers, comme les capillaires en quartz, permettraient d'augmenter les échanges thermiques entre les ovocytes et l'azote liquide (He *et al.*, 2008).

Ainsi, nous avons vu à travers cette étude que les taux de développement parthénogénétique des ovocytes après cryoconservation sont très faibles et peuvent s'expliquer différemment selon la technique considérée. D'une part la congélation entraîne une altération du métabolisme ovocytaire liée à des lésions des mitochondries par la formation de cristaux de glace intracellulaire. D'autre part, la vitrification entraîne des altérations majeures du fuseau méiotique qui peuvent s'expliquer par la grande sensibilité aux cryoprotecteurs des ovocytes et notamment à la combinaison éthylène glycol-DMSO utilisée à fortes concentrations.

A l'avenir, il semble plus prometteur de s'attacher à améliorer la technique de vitrification car il paraît plus aisé de diminuer la toxicité des solutions que de contrôler et maîtriser la formation des cristaux de glace dans l'ovocyte (difficultés de déshydratation). Les différents paramètres mesurés pour évaluer la viabilité ovocytaire ont apporté des indications complémentaires au sujet de la méthode de vitrification. Celle-ci paraissait adaptée à la cryoconservation des ovocytes au regard des résultats des dosages d'ATP mais pourtant, présentait des taux de développement parthénogénétique très faibles. Les pertes embryonnaires observées après activation parthénogénétique, entre les stades 4 cellules et blastocyste, sont probablement liées à des défauts de ségrégation des chromosomes lors de la reprise de la méiose. La ségrégation anormale des chromosomes peut induire des aberrations chromosomiques telles que l'aneuploïdie ou la polyploïdie qui compromettent le développement d'embryons viables.

Ainsi, de nouvelles études sont nécessaires pour déterminer des protocoles de vitrification utilisant des solutions cryoprotectrices moins toxiques, l'objectif étant de diminuer les altérations des structures ovocytaires indispensables au développement du futur embryon. Les voies d'amélioration résident principalement dans l'augmentation des vitesses de refroidissement pour utiliser des concentrations en cryoprotecteurs plus faibles ou encore dans la détermination de combinaisons en cryoprotecteurs moins toxiques (Fahy *et al.*, 2004). De plus, ces études devront nécessairement utiliser des critères d'évaluation de la qualité ovocytaire qui soient complémentaires en mesurant les impacts des techniques de vitrification sur l'aptitude au développement, le métabolisme, et la structure des ovocytes. Si l'évaluation des taux de développement après activation parthénogénétique, tout comme l'ICSI ou la FIV, représentent des outils indispensables, le dosage de l'ATP par bioluminescence et l'évaluation de la structure ovocytaire de manière non invasive (Polyscope) donnent des informations complémentaires qui seront à prendre en compte.

## Conclusions - Perspectives

Depuis sa mise en place officielle en 2003, la Cryobanque Nationale cunicole s'est structurée et développée pour atteindre aujourd'hui un stock de près de 20 000 embryons congelés produits à partir de plus de 1300 femelles issues de 56 populations différentes. Après les réticences initiales des sélectionneurs privés à remettre leurs lignées à la Cryobanque Nationale, l'ensemble des acteurs de la filière lapin est désormais impliqué et participe activement à la conservation de la diversité génétique chez cette espèce (Salveti *et al.*, 2008). De plus, l'efficacité de la méthode de congélation d'embryons a été confirmée récemment par la recréation de deux populations après une longue période de stockage dans l'azote liquide (Salveti *et al.*, 2007). Dans ce contexte, les travaux présentés dans ce document ont porté sur l'amélioration des conditions de production des embryons et le développement de la cryoconservation des ovocytes MII en tant que méthode complémentaire à la méthode standardisée de congélation d'embryons.

Les différents essais effectués pour augmenter et homogénéiser la réponse de lapines traitées aux traitements de superovulation n'ont pas entraîné d'amélioration significative de la production mais ont apporté des précisions sur la nature du traitement de superovulation à utiliser ou encore sur les conditions de préparations des femelles. Ainsi, la variabilité du ratio FSH/LH des préparations de superovulation ne semble pas affecter la réponse des lapines traitées. De plus, il n'est pas envisageable aujourd'hui de diminuer le nombre d'injections de FSH au risque d'en affecter la quantité et la qualité des embryons produits. La réduction du nombre d'injections présente pourtant des avantages notables pour le bien être animal (limitation du stress) et l'allègement des charges de travail et nécessitera le développement de nouveaux excipients permettant le relargage progressif des hormones. L'utilisation de prostaglandines  $F_{2\alpha}$  dans le cadre des traitements de synchronisation des vagues folliculaires n'apporte pas d'amélioration nette des résultats mais permet de diminuer légèrement la variabilité des réponses entre lapines cependant ce traitement pourrait être appliqué sur des cheptels hétérogènes regroupant des femelles de type I élevées en conditions d'élevage fermier traditionnel. De plus, ces résultats soulignent aussi le manque de connaissances précises sur la dynamique des croissances folliculaires des lapines et de sa variabilité entre individus. A l'avenir, il sera important de mener des études précises sur la caractérisation du développement folliculaire chez des lapines de génotypes, de parités, de statuts physiologiques différents notamment à partir d'observations échographiques, hormonales et comportementales. L'établissement de la relation entre l'état de réceptivité et un indicateur facilement accessible est primordial pour la synchronisation des femelles (stimulations hormonales ou naturelles) et

l'homogénéisation des performances de reproduction. Si l'observation de la couleur et de la turgescence de la vulve est parfois remise en cause, on pourrait préconiser d'utiliser l'endoscopie pour dénombrer le nombre de follicules préovulatoires préalablement à la superovulation ou à l'insémination. De plus, dans le cas de lapines allaitantes, notre étude a montré qu'il serait préférable de débiter le traitement de superovulation deux jours avant le sevrage avec une insémination des femelles le jour du sevrage plutôt que d'attendre que les femelles soient au repos sexuel bien que ces dernières aient un plus grand nombre de follicules préovulatoires. Ces observations sont particulièrement intéressantes pour augmenter la production d'embryons tout en diminuant la durée et les coûts d'entretien du cheptel mais devront être confirmées par de nouveaux essais.

Par conséquent, la stratégie préconisée pour la préparation de la population à cryoconserver est de superovuler les femelles en fin de lactation à l'aide de 5 injections consécutives de gonadotropines réparties sur 5 demi-journées et suivies d'une IA le jour du sevrage. Cette technique représente un protocole standard de préparation des lapines qui permet de maximiser la production d'embryons. Généralement, nous avons observé que les traitements de superovulation augmentent la fréquence des défauts d'ovulation et de fécondation par rapport au témoin et conduisent à un taux de femelles donneuses de l'ordre de 75 %. Cependant, la complexité physiologique de la lapine nécessite d'émettre des réserves puisqu'il existe des populations pour lesquelles ces traitements ne fonctionnent pas. A titre d'exemple, les premiers résultats obtenus à partir de femelles multipares INRA 2066 superovulées étaient très faibles (3,2 embryons congelés par femelle traitée et 33,3 % de femelles donneuses) sans qu'aucun problème de préparation des femelles ne puisse clairement être mise en cause. La même opération réalisée quelques temps plus tard sur les mêmes femelles non superovulées ont permis de cryoconserver la lignée avec 9,1 embryons congelés par femelle traitée et plus de 84 % de femelles donneuses. Sur cette lignée, les femelles ont très mal répondu au traitement de superovulation classique pour des raisons encore inexplicables. Actuellement, la population INRA 2066 est la seule population sur la cinquantaine cryoconservées après superovulation à avoir donné ce type de résultats. Ces observations suggèrent que le génotype représente donc un des facteurs de variation à prendre en compte pour la réussite des opérations de cryoconservation tout comme les conditions d'environnement des lapines. De plus, les stimulations environnementales peuvent être recherchées pour augmenter la réceptivité des lapines (biostimulations) ou subies (stress environnemental non maîtrisé). Par exemple, nous avons pu observer que le transport des lapines superovulées pouvait avoir de lourdes répercussions sur les résultats de production d'embryons (communication personnelle). Ces observations soulignent l'importance d'une bonne maîtrise des conditions d'élevage des lapines pour maximiser la production d'embryons. Cet aspect est particulièrement important pour les populations précieuses

dont les populations de type I pour lesquelles il est souvent difficile d'avoir une parfaite maîtrise des conditions d'environnement (élevages amateurs).

Ces populations précieuses ne représentent pas la majorité des populations cryoconservées à la Cryobanque Nationale notamment à cause de l'absence de techniques de collecte d'embryons qui soient non invasives et qui permettent la répétition des collectes sans compromettre la survie de la femelle donneuse. Aujourd'hui, l'utilisation des techniques cœlioscopiques permettra de collecter efficacement les populations dont les femelles sont suffisamment précieuses pour justifier d'un coût financier six à sept fois plus élevé que celui d'une collecte post-mortem. Inversement, la technique de transfert sous cœlioscopie constitue aujourd'hui la méthode privilégiée pour le transfert des embryons congelés puisqu'elle est plus rapide, moins onéreuse et aussi moins invasive que le transfert par laparotomie.

Ainsi, la première partie expérimentale nous a permis de dégager une stratégie de production des embryons en fonction du type de population concernée qui doit être nuancée en fonction des cheptels considérés (génotype, statut physiologique, conditions d'environnement...). La deuxième partie expérimentale a permis de réaliser un travail préliminaire sur la cryoconservation des ovocytes MII complémentaire à la congélation d'embryons. La comparaison des techniques de vitrification et de congélation lente a montré que quelque soit la méthode choisie, les taux de développement après activation parthénogénétique sont insuffisants pour envisager l'application d'une de ces techniques dans le cadre de la conservation à long terme de populations de lapins. Les taux de développement jusqu'au stade blastocyste des parthénogénotes représente un bon outil d'évaluation de l'intégrité fonctionnelle des ovocytes après réchauffement mais devront être complétés par des mesures de taux de développement après FIV ou ICSI et transfert dans des femelles receveuses. De plus, cette étude a souligné l'importance des critères d'évaluation de la viabilité ovocytaire qui sont pris en compte. D'un point de vue métabolique, le dosage d'ATP a montré que la vitrification semblait plus intéressante que la congélation lente alors que d'un point de vue structural, les conclusions étaient opposées. Ces observations expliquent les faibles taux de développement obtenus mais montrent que l'évaluation de la qualité ovocytaire doit obligatoirement passer par l'utilisation de différents critères d'évaluations métaboliques et structurales. A l'avenir, les études sur la cryoconservation des ovocytes devront nécessairement utiliser un maximum de tests de viabilité permettant d'évaluer différents aspects de la qualité ovocytaire (niveau du métabolisme, intégrité structurale, aptitude au développement) mais seul le développement des techniques de FIV et/ou d'ICSI permettra l'obtention de descendants viables.

Etant donné les difficultés de déshydratation des ovocytes, il semble aujourd'hui préférable de concentrer les efforts de recherche sur la technique de vitrification pour laquelle les marges de



progrès sont les plus importantes. Le principal défi sera de diminuer la toxicité des solutions de vitrification pour atténuer les altérations structurales des ovocytes et notamment du fuseau méiotique. Les principales voies d'amélioration reposent alors sur l'augmentation des vitesses de refroidissement qui permettrait de diminuer les concentrations en cryoprotecteurs nécessaires pour vitrifier la solution contenant les ovocytes. Par exemple, l'utilisation combinée de microcapillaires de quartz plongés dans de l'azote liquide pressurisé à  $-210^{\circ}\text{C}$  permettrait d'atteindre des vitesses de refroidissement dix fois plus élevées que celles permises par la paillette OPS utilisée dans nos travaux. Enfin, une attention particulière devra être apportée à la nature des cryoprotecteurs utilisés en fonction de leur toxicité cellulaire intrinsèque.

L'optimisation des conditions de production des gamètes et le développement de nouvelles techniques de cryoconservation sont nécessaires à l'établissement d'une Cryobanque Nationale efficace, capable de faire face à toutes les situations incluant les situations d'urgence (mort d'un animal....) ou de conservation du matériel génétique d'un seul individu. Aujourd'hui, la congélation de l'embryon assure une sauvergade *ex situ* efficace des ressources génétiques cynicoles sur le long terme mais représente une technique qui n'est pas adaptée à toutes les situations. La cryoconservation des ovocytes MII par vitrification représente une voie complémentaire à la congélation d'embryons, en association avec la congélation de la semence, qui permettrait de conserver le matériel génétique d'un seul individu lorsque celui-ci est précieux ou lorsque l'accouplement préalable n'est pas possible.

## Références bibliographiques

### A

- Adams, C.E., 1960. *Prenatal mortality in the rabbit *Oryctolagus cuniculus**. J Reprod Fertil 1, 36-44.
- Adams, C.E., 1981. *Artificial insemination in the rabbit: The technique and application to practice*. J Appl Rabbit Res 4, 10-13.
- Adams, G.P., Ratto, M.H., Huanca, W., Singh, J., 2005. *Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas*. Biol Reprod 73, 452-457.
- Agence de la Biomédecine, 2006. *Rapport annuel 2006 - Bilan d'activités*, p. 231.
- Akruk, S.R., Humphreys, W.J., Williams, W.L., 1979. *In vitro capacitation of ejaculated rabbit spermatozoa*. Differentiation 13, 125-131.
- Al-Hasani, S., Hahn, J., Dankowski, K., Schneider, U., 1984. *In vitro fertilization and embryo transfer of rabbit oocytes collected at different times after P-LH injection*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 17, 417-423.
- Al-Hasani, S., Trotnow, S., Sadtler, C., Hahn, J., 1986a. *In vitro fertilization and embryo transfer of pre-ovulatory rabbit oocytes*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 21, 187-195.
- Al-Hasani, S., Tolksdorf, A., Diedrich, K., van der Ven, H., Krebs, D., 1986b. *Successful in-vitro fertilization of frozen-thawed rabbit oocytes*. Hum Reprod 1, 309-312.
- Al-Hasani, S., Kirsch, J., Diedrich, K., Blanke, S., van der Ven, H., Krebs, D., 1989. *Successful embryo transfer of cryopreserved and in-vitro fertilized rabbit oocytes*. Hum Reprod 4, 77-79.
- Alabiso, M., Bonanno, A., Alicata, M.L., Portalano, B., 1994. *Trattamento "differenziato" con PMSG su coniglie inseminate artificialmente*. Rivista di Conigliicoltura 31, 25-30.
- Alabiso, M., Bonanno, A., Alicata, M.L., Leto, G., Todaro, M., 1996. *Productivity of rabbit does subjected to artificial insemination and natural mating*, 6th World Rabbit Congress, Toulouse (France), pp. 29-35.
- Albarracin, J.L., Morato, R., Rojas, C., Mogas, T., 2005a. *Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of in vitro matured prepubertal and adult bovine oocytes*. Theriogenology 63, 890-901.
- Albarracin, J.L., Morato, R., Izquierdo, D., Mogas, T., 2005b. *Effects of roscovitine on the nuclear and cytoskeletal components of calf oocytes and their subsequent development*. Theriogenology 64, 1740-1755.
- Alliston, C.W., Pardee, N.R., 1973. *Variability of embryonic development in the rabbit at 19 to 168 hours after mating*. Lab Anim Sci 23, 665-670.
- Almodin, C.G., Minguetti-Camara, V.C., Meister, H., Ferreira, J.O., Franco, R.L., Cavalcante, A.A., Radaelli, M.R., Bahls, A.S., Moron, A.F., Murta, C.G., 2004. *Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy*. Hum Reprod 19, 1287-1293.
- Aman, R.R., Parks, J.E., 1994. *Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of in vitro-matured bovine oocytes*. Biol Reprod 50, 103-110.
- Ambrosini, G., Andrisani, A., Porcu, E., Rebellato, E., Revelli, A., Caserta, D., Cosmi, E., Marci, R., Moscarini, M., 2006. *Oocytes cryopreservation: state of art*. Reprod Toxicol 22, 250-262.
- Andrieu, R., Courot, M., 1976. *Congélation du sperme de lapin en vue de l'insemination artificielle*, 1er Congrès International Cunicole, Dijon (France), p. communication n°67.
- Arav, A., Zeron, Y., 1997. *Vitrification of bovine oocytes using modified drop size techniques (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions*. Theriogenology 47, 341.
- Arregui, L., Rath, R., Zeng, W., Honaramooz, A., Gomendio, M., Roldan, E.R., Dobrinski, I., 2008. *Xenografting of adult mammalian testis tissue*. Anim Reprod Sci 106, 65-76.

- **Asakawa, T., Ishikawa, M., Shimizu, T., Dukelow, W.R.**, 1988. *The chromosomal normality of in vitro-fertilized rabbit oocytes*. Biol Reprod 38, 292-295.
- **Austin, C.R.**, 1955. *Acquisition de la capacité fertilisatrice des spermatozoïdes ("capacitation") dans les voies génitales femelles*, In: Cie, M.a. (Ed.), *La fonction tubaire et ses troubles*, Paris (France), pp. 22-27.

## B

- **Baker, R.D., Coggins, E.G.**, 1969. *Transport, survival and union of foreign gametes in the genital tract of the rabbit*. J Reprod Fertil 18, 161-162.
- **Bakker, J., Baum, M.J.**, 2000. *Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators*. Front Neuroendocrinol 21, 220-262.
- **Balasz, J., Miro, F., Burzaco, I., Casamitjana, R., Civico, S., Balleca, J.L., Puerto, B., Vanrell, J.A.**, 1995. *The role of luteinizing hormone in human follicle development and oocyte fertility: evidence from in-vitro fertilization in a woman with long-standing hypogonadotropic hypogonadism and using recombinant human follicle stimulating hormone*. Hum Reprod 10, 1678-1683.
- **Baril, G., Cognié, Y., Belloc, J.P., Briois, M., Poulin, N., Bouttier, A., Pougard, J.L., Vallet, J.C., Leboeuf, B., Rémy, B., Beckers, J.F., Mermillod, P.**, 2004. *Effet de prétraitements agoniste et antagoniste de GnRH sur la production d'embryons chez la brebis et la chèvre*, 11èmes Rencontre Recherche Ruminants, Paris, pp. 373-376.
- **Baylor, N.W., Egan, W., Richman, P.**, 2002. *Aluminium salts in vaccines-US perspective*. Vaccine 20, S18-23.
- **Beckers, J.F.**, 1987. *Isolation and use of a porcine FSH to improve the quality of superovulation in cattle*. Theriogenology 27, 213 [abstract].
- **Bedford, J.M., Chang, M.C.**, 1962. *Fertilization of rabbit ova in vitro*. Nature 193, 808-809.
- **Ben Jebara, M.K., Carriere, P.D., Price, C.A.**, 1994. *Decreased pulsatile LH secretion in heifers superovulated with eCG or FSH*. Theriogenology 42, 685-694.
- **Besenfelder, U., Brem, G.**, 1993. *Laparoscopic embryo transfer in rabbits*. J Reprod Fertil 99, 53-56.
- **Besenfelder, U., Strouhal, C., Brem, G.**, 1998. *A method for endoscopic embryo collection and transfer in the rabbit*. Zentralbl Veterinarmed A 45, 577-579.
- **Besenfelder, U., Raska, R., Egerbacher, M., Mossbacher, G., Brem, G.**, 2002. *Influence of progesterone synchronization on ovarian histology, ovulation capacity and embryo production in FSH or PMSG superovulated rabbits*. Theriogenology 57, 535 [abstract].
- **Bettegowda, A., Lee, K.B., Smith, G.W.**, 2008. *Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal-to-embryonic transition*. Reprod Fertil Dev 20, 45-53.
- **Bielanski, A., Nadin-Davis, S., Sapp, T., Lutze-Wallace, C.**, 2000. *Viral Contamination of Embryos Cryopreserved in Liquid Nitrogen*. Cryobiology 40, 110-116.
- **Bielanski, A., Bergeron, H., Lau, P.C.K., Devenish, J.**, 2003. *Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen*. Cryobiology 46, 146-152.
- **Blanc, M.R., Hulot, F.**, 1982. *Sécrétion des hormones gonadotropes au cours de la puberté chez des lapines de race californienne et néo-zélandaise*, 3èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris, pp. communication n°12, 18 pages.
- **Bogliolo, L., Ariu, F., Fois, S., Rosati, I., Zedda, M.T., Leoni, G., Succu, S., Pau, S., Ledda, S.**, 2007. *Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells*. Theriogenology 68, 1138-1149.
- **Boiso, I., Marti, M., Santalo, J., Ponsa, M., Barri, P.N., Veiga, A.**, 2002. *A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase II stage*. Hum Reprod 17, 1885-1891.
- **Boiti, C.**, 2004. *Underlying physiological mechanisms controlling the reproductive axis of rabbit does*, 8th World Rabbit Congress, Puebla (Mexico), pp. 186-206.

- **Boiti, C., Canali, C., Zerani, M., Gobetti, A.,** 1998. *Changes in refractoriness of rabbit corpora lutea to a prostaglandin F2 alpha analogue, alprostadil, during pseudopregnancy.* Prostaglandins Other Lipid Mediat 56, 255-264.
- **Boiti, C., Canali, C., Brechchia, G., Zanon, F., Facchin, E.,** 1999. *Effects of induced endometritis on the life-span of corpora lutea in pseudopregnant rabbits and incidence of spontaneous uterine infections related to fertility of breeding does.* Theriogenology 52, 1123-1132.
- **Boiti, C., Guelfi, G., Brechchia, G., Gobetti, A., Maranesi, M., Zerani, M.,** 2008. *The physiological dilemma of the high progesterone syndrome in rabbit does,* 9th World Rabbit Congress, Verona (Italie), pp. 291-295.
- **Bolet, G.,** 1984. *Contrôle de la sécrétion de FSH et de LH après l'accouplement chez la lapine : effets du blocage de l'ovulation, de l'inhibition de la synthèse de progestérone ou de l'immunisation passive contre l'oestradiol 17 $\beta$ ,* Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), p. 19 p.
- **Bolet, G., Garcia-Ximenez, F., Vicente, J.S.,** 1992. *Criteria and methodology used to characterize reproductive abilities of pure- and crossbred rabbits in comparative studies.* CIHEAM - Options Méditerranéennes 95, 104 [abstract].
- **Bolet, G., Brun, J.M., Monnerot, M., Abeni, F., Arnal, C., Arnold, J., Bell, D., Bergoglio, G., Besenfelder, U., Bozse, S., Boucher, S., Chanteloup, N., Ducourouble, M.C., Durand-Tardif, M., Esteves, P.J., Ferrand, N., Gautier, A., Haas, C., Hewitt, G., Jehl, N., Joly, T., Koehl, P.F., Laube, T., Lechevestrier, S., Lopez, M., Masoero, G., Menigoz, J.J., Piccinin, R., Queney, G., Saleil, G., SurrIDGE, A., van der Loo, W., Vicente, J.S., Viudes de Castro, M.P., Virag, J.S., Zimmermann, J.M.,** 2000. *Evaluation and conservation of European rabbit (Oryctolagus Cuniculus) genetic resources. First results and Interferences,* 7th World Rabbit Congress, Valencia (Espagne), pp. 281-315.
- **Boonkusol, D., Faisaikarm, T., Dinnyes, A., Kitiyanant, Y.,** 2007. *Effects of vitrification procedures on subsequent development and ultrastructure of in vitro-matured swamp buffalo (Bubalus bubalis) oocytes.* Reprod Fertil Dev 19, 383-391.
- **Bosze, Z., Houdebine, L.M.,** 2006. *Application of rabbits in biomedical research: a review.* World Rabbit Science 14, 1-14.
- **Bosze, Z., Hiripi, L., Carnwath, J.W., Niemann, H.,** 2003. *The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins.* Transgenic Res 12, 541-553.
- **Bourdage, R.J., Halbert, S.A.,** 1988. *Distribution of embryos and 500-microm microspheres in the rabbit oviduct: controls for acute motion analysis during transport.* Biol Reprod 38, 282-291.
- **Bourdillon, A., Chmitelin, F., Jarrin, D., Perez, V., Rouillere, H.,** 1992. *Effect of PMSG treatment on breeding result of artificial inseminated rabbits.* J Appl Rabbit Res 15, 530-537.
- **Boussit, D.,** 1989. *Reproduction et insémination artificielle en cuniculture.* Association Française de Cuniculture, 234 pages, Lempdes.
- **Brackett, B.G.,** 1969. *Effects of washing the gametes on fertilization in vitro.* Fertil Steril 20, 127-142.
- **Brackett, B.G.,** 1970. *In vitro fertilization of rabbit ova: time sequence of events.* Fertil Steril 21, 169-176.
- **Brackett, B.G., Williams, W.L.,** 1965. *In vitro fertilization of rabbit ova.* J Exp Zool 160, 271-281.
- **Brackett, B.G., Williams, W.L.,** 1968. *Fertilization of rabbit ova in a defined medium.* Fertil Steril 19, 144-155.
- **Brackett, B.G., Server, J.B.,** 1970. *Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus.* Fertil Steril 21, 687-695.
- **Brackett, B.G., Oliphant, G.,** 1975. *Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro.* Biol Reprod 12, 260-274.
- **Brackett, B.G., Killen, D.E., Peace, M.D.,** 1971. *Cleavage of rabbit ova inseminated in vitro after removal of follicular cells and zonae pellucidae.* Fertil Steril 22, 816-828.
- **Brackett, B.G., Mills, J.A., Jeitles, G.G., Jr.,** 1972a. *In vitro fertilization of rabbit ova recovered from ovarian follicles.* Fertil Steril 23, 898-909.
- **Brackett, B.G., Bousquet, D., Dressel, M.A.,** 1982. *In vitro sperm capacitation and in vitro fertilization with normal development in the rabbit.* J Androl 3, 402-411.

- Brackett, B.G., Mills, J.A., Oliphant, G., Seitz, H.M., Jr., Jeitles, G.G., Jr., Mastroianni, L., Jr., 1972b. *Preliminary efforts to capacitate rabbit sperm in vitro*. Int J Fertil 17, 89-92.
- Braun, J., Leidl, W., 1980. [The effect of superovulation on morphology, cultivation and deep-freeze preservation of rabbit embryos]. Zentralbl Veterinarmed A 27, 212-220.
- BRG, 1999. *Charte Nationale pour la gestion des ressources génétiques*, Bureau des Ressources Génétiques, Paris (France), p. 99.
- Bronneberg, R.G., Taverne, M.A., Dieleman, S.J., Decuypere, E., Bruggeman, V., Vernooij, J.C., Stegeman, J.A., 2007. *The relation between ultrasonographic observations in the oviduct and plasma progesterone, luteinizing hormone and estradiol during the egg laying cycle in ostriches*. Domest Anim Endocrinol 32, 15-28.
- Browning, J.Y., Wolf, R.C., 1981. *Maternal recognition of pregnancy in the rabbit: effect of conceptus removal*. Biol Reprod 24, 293-297.
- Browning, J.Y., Keyes, P.L., Wolf, R.C., 1980. *Comparison of serum progesterone, 20 alpha-dihydroprogesterone, and estradiol-17 beta in pregnant and pseudopregnant rabbits: evidence for postimplantation recognition of pregnancy*. Biol Reprod 23, 1014-1019.

## C

- Cai, X.Y., Chen, G.A., Lian, Y., Zheng, X.Y., Peng, H.M., 2005. *Cryoloop vitrification of rabbit oocytes*. Hum Reprod 20, 1969-1974.
- Callesen, H., Greve, T., Hyttel, P., 1986. *Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle*. Theriogenology 25, 71-86.
- Camus, A., Clairaz, P., Ersham, A., Van Kappel, A.L., Savic, G., Staub, C., 2006. *Principes de la vitrification: cinétiques comparatives*. Gynecol Obstet Fertil 34, 737-745.
- Canali, C., Boiti, C., Castellini, C., Zampini, D., 1991. *Riposta anticorpale delle coniglie trattate ripetutamente con PMSG nella pratica della sincronizzazione degli estri*, 2nd Meeting Nazionale Studio della efficienza riproduttiva degli animali di interesse zotecnico, Bergamo (Italie), pp. 103-108.
- Carney, E.W., Foote, R.H., 1990. *Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro*. J Reprod Fertil 89, 543-551.
- Challah-Jacques, M., Chesne, P., Renard, J.P., 2003. *Production of cloned rabbits by somatic nuclear transfer*. Cloning Stem Cells 5, 295-299.
- Chang, M.C., 1950. *Development and fate of transferred rabbit ova or blastocysts in relation to the ovulation time of recipients*. J Exp Zool 114, 351-381.
- Chang, M.C., 1955. *Développement de la capacité fertilisatrice des spermatozoïdes du lapin à l'intérieur du tractus génital femelle et fécondabilité des œufs de lapine*, In: Masson and Cie (Ed.), La fonction tubaire et ses troubles, Paris (France), pp. 40-52.
- Chang, M.C., 1959. *Fertilization of rabbit ova in vitro*. Nature 184 (Suppl 7), 466-467.
- Chen, C., 1986. *Pregnancy after human oocyte cryopreservation*. Lancet 1, 884-886.
- Chen, J., Yang, X., Chen, Y., Foote, R.H., 1988. *In vitro fertilization in rabbits with spermatozoa capacitated in defined medium with or without lysophosphatidyl choline*. Theriogenology 29, 237 [abstract].
- Chen, S.U., Lien, Y.R., Chen, H.F., Chao, K.H., Ho, H.N., Yang, Y.S., 2000. *Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws*. Hum Reprod 15, 2598-2603.
- Chen, S.U., Lien, Y.R., Cheng, Y.Y., Chen, H.F., Ho, H.N., Yang, Y.S., 2001. *Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids*. Hum Reprod 16, 2350-2356.
- Chen, S.U., Lien, Y.R., Chao, K.H., Ho, H.N., Yang, Y.S., Lee, T.Y., 2003. *Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing—a review article*. Mol Cell Endocrinol 202, 101-107.

- **Chen, Y., Yang, X., Foote, R.H.**, 1989. *Timed breeding of rabbit with fresh and frozen-thawed semen and evidence of acrosome alteration following freezing and thawing*. Anim Reprod Sci 18, 35-41.
- **Chiang, S.K., Chang, H.H., Ou, Y.W., Intawicha, P., Cheng, S.P., Chen, L.R., Lee, K.H., Giles, J., Ju, J.C.**, 2008. *Successful induction of antisera against rabbit embryos for isolation of the ICM and putative embryonic stem cells*. Reprod Domest Anim 43, 181-188.
- **Chrenek, P., Makarevich, A., Vasicek, D., Laurincik, J., Bulla, J., Gajarska, T., Rafay, J.**, 1998. *Effects of superovulation, culture and microinjection on development of rabbit embryos in vitro*. Theriogenology 50, 659-666.
- **Chretien, F.C.**, 1966. *[A study of the origin, migration and multiplication of the germ-cells of the rabbit embryo]*. J Embryol Exp Morphol 16, 591-607.
- **Chupin, D., Combarrous, Y., Procureur, R.**, 1984. *Antagonistic effect of LH on FSH-induced superovulation in cattle*. Theriogenology 21, 229 [abstract].
- **Cortell, C., Viudes de Castro, M.P.**, 2008. *Immune response to repeated rhFSH superovulation treatment in rabbit does*, 9th World Rabbit Congress, Verona (Italie), pp. 333-337.
- **Coticchio, G., Bonu, M.A., Borini, A., Flamigni, C.**, 2004. *Oocyte cryopreservation: a biological perspective*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 115 Suppl 1, S2-7.
- **Coticchio, G., Bonu, M.A., Bianchi, V., Flamigni, C., Borini, A.**, 2005. *Criteria to assess human oocyte quality after cryopreservation*. Reprod Biomed Online 11, 421-427.
- **Coticchio, G., De Santis, L., Rossi, G., Borini, A., Albertini, D., Scaravelli, G., Alecci, C., Bianchi, V., Nottola, S., Cecconi, S.**, 2006. *Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation*. Hum Reprod 21, 1771-1776.
- **Curry, M.R., Redding, B.J., Watson, P.F.**, 1995. *Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa*. Cryobiology 32, 175-181.
- **Curry, M.R., Kleinhans, F.W., Watson, P.F.**, 2000. *Measurement of the water permeability of the membranes of boar, ram, and rabbit spermatozoa using concentration-dependent self-quenching of an entrapped fluorophore*. Cryobiology 41, 167-173.

## D

- **D'Alessandro, A.G., Martemucci, G., Colonna, M.A., Borghese, A., Terzano, M.G., Bellitti, A.**, 2001. *Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment*. Anim Reprod Sci 65, 255-264.
- **Daniel, N., Chesné, P., Baratte, M., Renard, J.P.**, 2007. *Lapins produits par injection intracytoplasmique de spermatozoïdes (ICSI) stockés à température ambiante*, 12èmes Journées de la Recherche Cunicole. 26-27 novembre 2007., Le Mans (France), pp. 33-36.
- **Dattena, M., Vespignani, S., Branca, A., Gallus, M., Ledda, S., Naitana, S., Cappai, P.**, 1994. *Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone*. Theriogenology 42, 235-239.
- **Davies, J., Hesseldahl, H.**, 1971. *Comparative embryology of mammalian blastocysts*, In: RJ, B. (Ed.), The biology of the blastocyst, The University of Chicago Press Ltd., London UK, pp. 27-48.
- **Davoust, C., Saleil, G., Theau-Clement, M., Roustan, A.**, 1994. *Influence de l'association PMSG-hCG sur la productivité numérique de lapines allaitantes conduites en bande unique à 35 jours (en insémination artificielle)*, 6èmes Journées de la Recherche Cunicole. 6-7 décembre 1994, La Rochelle, pp. 145-152.
- **de Matos, D.G., Gasparrini, B., Pasqualini, S.R., Thompson, J.G.**, 2002. *Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content*. Theriogenology 57, 1443-1451.
- **Delaveau, L.**, 1978. *Chez la lapine, difficultés d'obtenir des saillies fécondantes*. Cuniculture 5, 159-160.

- DeMayo, F.J., Rawlins, R.G., Dukelow, W.R., 1985. *Xenogenous and in vitro fertilization of frozen/thawed primate oocytes and blastomere separation of embryos*. *Fertil Steril* 43, 295-300.
- Demoustier, M.M., Beckers, J.F., Van Der Zwalmen, P., Closset, J., Gillard, J.-L., Ectors, F., 1988. *Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows*. *Theriogenology* 30, 379-386.
- Deng, M., Yang, X.J., 2001. *Full term development of rabbit oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection*. *Mol Reprod Dev* 59, 38-43.
- Desai, P., 1947. *Contribution à l'étude du mécanisme de l'évolution et de l'involution folliculaire dans l'ovaire de lapine adulte*. *Arch Biol* 58, 332-446.
- Diaz, P., Rodriguez, J.M., Gosalvez, L.F., Roman, M.R., 1987. *Cyclic ovarian activity in postpartum rabbits*. *J Appl Rabbit Res* 10, 122-125.
- Diedrich, K., al-Hasani, S., van der Ven, H., Krebs, D., 1988. *Successful in vitro fertilization of frozen-thawed rabbit and human oocytes*. *Ann N Y Acad Sci* 541, 562-570.
- Donaldson, L.E., Ward, D.N., 1986. *Effects of luteinising hormone on embryo production in superovulated cows*. *Vet Rec* 119, 625-626.
- Driancourt, M.-A., Gougeon, A., Monniaux, D., Royère, D., Thibault, C., 2001. *Folliculogenèse et ovulation*, In: Marketing, E.E. (Ed.), *La reproduction chez les mammifères et l'homme*, Paris, pp. 316-347.
- Driancourt, M.A., 2001. *Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction*. *Theriogenology* 55, 1211-1239.
- Du, Y., Pribenszky, C.S., Molnar, M., Zhang, X., Yang, H., Kuwayama, M., Pedersen, A.M., Villemoes, K., Bolund, L., Vajta, G., 2008. *High hydrostatic pressure: a new way to improve in vitro developmental competence of porcine matured oocytes after vitrification*. *Reproduction* 135, 13-17.
- Ducibella, T., 1996. *The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes*. *Hum Reprod Update* 2, 29-42.
- Dufy-Barbe, L., Franchimont, P., Faure, J.M., 1973. *Time-courses of LH and FSH release after mating in the female rabbit*. *Endocrinology* 92, 1318-1321.
- Dunbar, B.S., 1983. *Morphological, biological, and immunochemical characterization of the mammalian zona pellucida*, In: Press, A. (Ed.), *Mechanism and control of animal fertilization*, New York, pp. 140-177.

## E

- Elsaesser, F., 1980. *Effects of active immunization against oestradiol-17 beta, testosterone or progesterone on receptivity in the female rabbit and evaluation of specificity*. *J Reprod Fertil* 58, 213-218.
- Eroglu, A., Toth, T.L., Toner, M., 1998. *Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase II mouse oocytes*. *Fertil Steril* 69, 944-957.
- Escriba, M.J., Garcia-Ximenez, F., 1999. *Electroactivation of rabbit oocytes in an hypotonic pulsing medium and parthenogenetic in vitro development without cytochalasin B-diploidizing pretreatment*. *Theriogenology* 51, 963-973.
- Escriba, M.J., Garcia-Ximenez, F., 2000. *Influence of sequence duration and number of electrical pulses upon rabbit oocyte activation and parthenogenetic in vitro development*. *Anim Reprod Sci* 59, 99-107.
- Escriba, M.J., Garcia-Ximenez, F., 2001. *Reconstruction of the heteroparental diploid condition in rabbit zygotes by nuclear transfer*. *Theriogenology* 55, 771-784.

**F**

- **Fabrizi, R., Porcu, E., Marsella, T., Primavera, M.R., Rocchetta, G., Ciotti, P.M., Magrini, O., Seracchioli, R., Venturoli, S., Flamigni, C., 2000.** *Technical aspects of oocyte cryopreservation.* Mol Cell Endocrinol 169, 39-42.
- **Fahy, G.M., Wowk, B., Wu, J., Paynter, S., 2004.** *Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity.* Cryobiology 48, 22-35.
- **Fang, Z.F., Gai, H., Huang, Y.Z., Li, S.G., Chen, X.J., Shi, J.J., Wu, L., Liu, A., Xu, P., Sheng, H.Z., 2006.** *Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos.* Exp Cell Res 312, 3669-3682.
- **FAO, 2007.** [Ressource électronique]. Disponible sur: <http://faostat.fao.org/site/526/default.aspx>, Food and Agriculture Organization of the United Nations, page consultée le 29 septembre 2008.
- **Fechheimer, N.S., Beatty, R.A., 1974.** *Chromosomal abnormalities and sex ratio in rabbit blastocysts.* J Reprod Fertil 37, 331-341.
- **Fédération Française de Cuniculture, 2000.** *Les lapins de race: spécificités zoologiques, standards officiels.* Commission technique de la Fédération Française de Cuniculture, Paris, 288 p.
- **Fee, A.R., Parkes, A.S., 1930.** *Studies on ovulation: III. Effect of vaginal anaesthesia on ovulation in the rabbit.* J Physiol 70, 385-388.
- **Fischer, B., 1989.** *Effects of asynchrony on rabbit blastocyst development.* J Reprod Fertil 86, 479-491.
- **Fleming, R., Lloyd, F., Herbert, M., Fenwick, J., Griffiths, T., Murdoch, A., 1998.** *Effects of profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation on follicular activity, oocyte and embryo function in cycles stimulated with purified follicle stimulating hormone.* Hum Reprod 13, 1788-1792.
- **Foote, R.H., Ellington, J.E., 1988.** *Is a superovulated oocyte normal ?* Theriogenology 29, 111-123.
- **Foote, R.H., Carney, E.W., 2000.** *The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies.* Reproductive Toxicology 14, 477-493.
- **Forcada, F., Lopez, M., 2000.** *Repeated surgical embryo recovery and embryo production in rabbits.* Animal Reproduction Science 64, 121-126.
- **Fortun-Lamothe, L., 1998.** *Effets de la lactation, du bilan énergétique et du rythme de reproduction sur les performances de reproduction chez la lapine primipare,* 7èmes Journées de la Recherche Cunicole. 13 et 14 mai 1998., Lyon, pp. 257-260.
- **Fortun-Lamothe, L., Bolet, G., 1995.** *Les effets de la lactation sur les performances de reproduction chez la lapine.* INRA Prod Anim 8, 49-56.
- **Fortun-Lamothe, L., Mariana, J.C., 1998.** *Effets de la simultanéité de la gestation et de la lactation chez la lapine sur le développement folliculaire chez les filles futures reproductrices,* 7èmes Journées de la Recherche Cunicole. 13 et 14 mai 1998., Lyon, pp. 261-264.
- **Fox, R.R., Laird, C.W., 1970.** *Sexual cycles,* In: Hafez, E.S.E. (Ed.), Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 107-122.
- **Fuchinoue, K., Fukunaga, N., Chiba, S., Nakajo, Y., Yagi, A., Kyono, K., 2004.** *Freezing of human immature oocytes using cryoloops with Taxol in the vitrification solution.* J Assist Reprod Genet 21, 307-309.
- **Fujihira, T., Kishida, R., Fukui, Y., 2004.** *Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: effects of cytochalasin B and cryoprotectants.* Cryobiology 49, 286-290.
- **Fujihira, T., Nagai, H., Fukui, Y., 2005.** *Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of taxol treatment for vitrification of in vitro matured porcine oocytes.* Cryobiology 51, 339-343.
- **Fujimoto, S., Pahlavan, N., Dukelow, W.R., 1974.** *Chromosome abnormalities in rabbit preimplantation blastocysts induced by superovulation.* J Reprod Fertil 40, 177-181.
- **Fuku, E., Xia, L., Downey, B.R., 1995.** *Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification.* Cryobiology 32, 139-156.



**G**

- Gajda, B., Jura, J., Smorag, Z., 1988. *Nonsurgical embryo collection in rabbits*. Zuchtygiene (Berlin) 23, 149-153.
- Gallouin, F., 1981. *Mécanismes physiologiques de la reproduction. L'ovulation*. Cuniculture 41, 294-297.
- Garcia-Ximenez, F., Vicente, J.S., 1990. *Effect of PMSG treatment-mating interval in the superovulatory response of primiparous rabbit*. J Appl Rabbit Res 17, 71-73.
- Garcia-Ximenez, F., Vicente, J.S., 1992. *Effect of ovarian cystic or haemorrhagic follicles on embryo recovery and survival after transfer in hCG-ovulated rabbits*. Reprod Nutr Dev 32, 143-149.
- Garcia-Ximenez, F., Escriba, M.J., 2002. *Viable offspring derived from cryopreserved haploid rabbit parthenotes*. Theriogenology 57, 1319-1325.
- Garcia-Ximenez, F., Vicente, J.S., Santacreu, M.A., 1991. *Embryo transfer in lactating rabbit does by laparoscopy*. Anim Reprod Sci 24, 343-346.
- Gardner, D.K., Sheehan, C.B., Rienzi, L., Katz-Jaffe, M., Larman, M.G., 2007. *Analysis of oocyte physiology to improve cryopreservation procedures*. Theriogenology 67, 64-72.
- Garnier, V., Renard, J.P., Menezo, Y., 1986. *Collecte vaginale d'embryons chez la lapine après traitement à la prostaglandine*, 4èmes Journées de la Recherche Cunicole. 10-11 décembre 1986., Paris (France).
- Gasparrini, B., Attanasio, L., De Rosa, A., Monaco, E., Di Palo, R., Campanile, G., 2006. *Cryopreservation of in vitro matured buffalo (Bubalus bubalis) oocytes by minimum volumes vitrification methods*. Anim Reprod Sci.
- Ghetler, Y., Skutelsky, E., Ben Nun, I., Ben Dor, L., Amihai, D., Shalgi, R., 2006. *Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules*. Fertil Steril 86, 210-216.
- Gilchrist, R.B., Thompson, J.G., 2007. *Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro*. Theriogenology 67, 6-15.
- Gook, D.A., Osborn, S.M., Johnston, W.I., 1993. *Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1,2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle*. Hum Reprod 8, 1101-1109.
- Gook, D.A., Schiewe, M.C., Osborn, S.M., Asch, R.H., Jansen, R.P., Johnston, W.I., 1995. *Intracytoplasmic sperm injection and embryo development of human oocytes cryopreserved using 1,2-propanediol*. Hum Reprod 10, 2637-2641.
- Gosálvez, L.F., Rodríguez, J.M., Díaz, P., 1985. *Comportamiento sexual de la coneja en post parto*, X Symposium Cunicultura, Barcelona (Spain), pp. 29-43.
- Gosden, R.G., 2005. *Prospects for oocyte banking and in vitro maturation*. J Natl Cancer Inst Monogr 34, 60-63.
- Gosselin, N., Price, C.A., Roy, R., Carriere, P.D., 2000. *Decreased lh pulsatility during initiation of gonadotropin superovulation treatment in the cow: Evidence for negative feedback other than estradiol and progesterone*. Theriogenology 54, 507-521.
- Goud, A., Goud, P., Qian, C., Van der Elst, J., Van Maele, G., Dhont, M., 2000. *Cryopreservation of human germinal vesicle stage and in vitro matured M II oocytes: influence of cryopreservation media on the survival, fertilization, and early cleavage divisions*. Fertil Steril 74, 487-494.
- Gupta, M.K., Uhm, S.J., Lee, H.T., 2007. *Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification*. Theriogenology 67, 238-248.
- Guthrie, H.D., Woods, L.C., 3rd, Long, J.A., Welch, G.R., 2008. *Effects of osmolality on inner mitochondrial transmembrane potential and ATP content in spermatozoa recovered from the testes of striped bass (Morone saxatilis)*. Theriogenology 69, 1007-1012.

**H**

- Ha, R.J., Yin, X.J., Kang, D.W., Park, J.K., Song, S.Y., Kong, I.K., Lee, H.J., Park, C.S., 1998. *Parthenogenetic activation and development of rabbit oocytes following electric stimulation or ionomycin plus 6-dimethylaminopurine*. Theriogenology 49, 153.
- Hafez, E.S., 1965. *Quantitative aspects of implantation, embryonic survival, and fetal development*. Int J Fertil 10, 235-251.
- Hafez, E.S., 1969. *Superovulation and preservation of mammalian egg*. Acta Endocrinol Suppl (Copenh) 140, 5-44.
- Hahn, J., 1990. *Embryo transfer techniques*. Rev Sci Tech 9, 239-244.
- Hahn, J., Al-Hasani, S., Schneider, U., 1980. *In vitro fertilization of preovulatory rabbit oocytes*. World Conference for instrumental insemination, in vitro fertilization, and embryo transfer. Arch Androl 5, 63-64.
- Hammond, J., Marshall, F.H.A., 1925. *Reproduction in the rabbit*, In: Boyd, O. (Ed.), Edinburgh, p. 210 pages.
- Harper, M.J., 1961. *The time of ovulation in the rabbit following the injection of luteinizing hormone*. J Endocrinol 22, 147-152.
- Harper, M.J., 1973. *Relationship between sperm transport and penetration of eggs in the rabbit oviduct*. Biol Reprod 8, 441-450.
- Hashimoto, S., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Takahashi, R., Ueda, M., Hirao, M., Kamei, M., Kitada, K., Hirasawa, K., 2004. *Refined porcine follicle stimulating hormone promotes the responsiveness of rabbits to multiple-ovulation treatment*. Exp Anim 53, 395-397.
- Hashimoto, S., Kimura, K., Kuramochi, T., Aoyagi, K., Hirako, M., Kawaguchi, M., Iwata, H., Hirao, M., Kitada, K., Hirasawa, K., Ueda, M., 2007. *Responsiveness of rabbits to superovulation treatment by a single injection of follicle-stimulating hormone with aluminum hydroxide gel*. Mol Reprod Dev 74, 1208-1212.
- Hatton, J.B., Kelus, A.S., Leibo, S.P., 1985. *Transfer of fresh and frozen-thawed rabbit embryos to produce live young*. Experientia 41, 755-756.
- He, X., Park, E.Y., Fowler, A., Yarmush, M.L., Toner, M., 2008. *Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: a study using murine embryonic stem cells*. Cryobiology 56, 223-232.
- Heape, W., 1890. *Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster mother*. Proc R Soc London 48, 457-458.
- Heng, B., 2007. *Oocyte cryopreservation as alternative to embryo cryopreservation - some pertinent ethical concerns*. Reproductive Biomedicine Online 14, 402-403.
- Herrick, J.R., Brad, A.M., Krisher, R.L., Pope, W.F., 2003. *Intracellular adenosine triphosphate and glutathione concentrations in oocytes from first estrous, multi-estrous, and testosterone-treated gilts*. Anim Reprod Sci 78, 123-131.
- Herrler, A., Elsaesser, F., Parvizi, N., Niemann, H., 1991. *Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH*. Theriogenology 35, 633-643.
- Hildebrandt, T.B., Hermes, R., Jewgenow, K., Goritz, F., 2000. *Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species*. Theriogenology 53, 73-84.
- Hill, M., 1933. *The growth and regression of follicles in the oestrous rabbit*. J Physiol 80, 174-178.
- Hill, R.T., Allen, E., Kramer, T.C., 1935. *Cinmicrographic studies of rabbit ovulation*. Anat Rec 63, 239-245.
- Hirabayashi, M., Hirao, M., Hochi, S., Kimura, K., Hirasawa, K., Ueda, M., 2000a. *Effects of superovulatory protocols on the recovery and subsequent developmental potential (in Japanese)*. J Exp Anim Technol 35, 23-28.
- Hirabayashi, M., Hirao, M., Takahashi, R., Kimura, K., Hirasawa, K., Ueda, M., Hochi, S., 2000b. *Production of transgenic rabbits using centrifuged pronuclear zygotes*. J Vet Med Sci 62, 1047-1052.

- **Hirst, P.J., Demayo, F.J., Dukelow, W.R.**, 1981. *Xenogenous fertilization of laboratory and domestic animals in the oviduct of the pseudopregnant rabbit*. Theriogenology 15, 67-75.
- **Hosoi, Y., Niwa, K., Hatanaka, S., Iritani, A.**, 1981. *Fertilization in vitro of rabbit eggs by epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium*. Biol Reprod 24, 637-642.
- **Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K., Iritani, A.**, 1988. *Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa*, 11th International Congress on Animal Reproduction. 26-30 juin 1988., Dublin (Irlande), p. 331 [abstract].
- **Howles, C.M.**, 2000. *Role of LH and FSH in ovarian function*. Mol Cell Endocrinol 161, 25-30.
- **Hulot, F., Poujardieu, B.**, 1976. *Induction of ovulation and fertility in the lactating and non-lactating rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)*. Ann Biol Anim Bioch Biophys 16, 635-643.
- **Hulot, F., Mariana, J.C.**, 1985. *Effet du génotype, de l'âge et de la saison sur les follicules préovulatoires de la lapine 8 heures après la saillie*. Reprod Nutr Dev 25, 17-32.
- **Hulot, F., Mariana, J.C., Lebas, F.**, 1982. *L'établissement de la puberté chez la lapine (folliculogénèse et ovulation). Effet du rationnement alimentaire*. Reprod Nutr Dev 22, 439-453.
- **Hunter, A.G., Nornes, H.O.**, 1969. *Characterization and isolation of a sperm-coating antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertilization*. J Reprod Fertil 20, 419-427.
- **Hunter, R.H.F., Leglise, P.C.**, 1971. *Tubal surgery in the rabbit: fertilization and polyspermy after resection of the isthmus*. Am J Anat 132, 45-52.
- **Hurt, A.E., Landim-Alvarenga, F., Seidel, G.E., Jr., Squires, E.L.**, 2000. *Vitrification of immature and mature equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose solution using open-pulled straws*. Theriogenology 54, 119-128.
- **Hyttel, P., Vajta, G., Callesen, H.**, 2000. *Vitrification of bovine oocytes with the open pulled straw method: ultrastructural consequences*. Mol Reprod Dev 56, 80-88.

## I

- **Illera, M.J., Rodriguez de Sadia, C., Munoz, I., Illera, M.**, 1990. *The effect of PMSG antiPMSG on the performance of rabbit embryos*. Theriogenology 33, 253.
- **Im, K.S., Kang, J.K., Kim, H.S.**, 1997. *Effects of cumulus cells, different cryoprotectants, various maturation stages and preincubation before insemination on developmental capacity of frozen-thawed bovine oocytes*. Theriogenology 47, 881-891.
- **Imoedemhe, D.G., Sigue, A.B.**, 1992. *Survival of human oocytes cryopreserved with or without the cumulus in 1,2-propanediol*. J Assist Reprod Genet 9, 323-327.
- **Isachenko, V., Soler, C., Isachenko, E., Perez-Sanchez, F., Grishchenko, V.**, 1998. *Vitrification of immature porcine oocytes: effects of lipid droplets, temperature, cytoskeleton, and addition and removal of cryoprotectant*. Cryobiology 36, 250-253.
- **IUCN**, 2007. *IUCN Red List*, International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources.

## J

- **Jain, J.K., Paulson, R.J.**, 2006. *Oocyte cryopreservation*. Fertil Steril 86 Suppl 4, 1037-1046.
- **Jiao, A., Han, X., Critser, J.K., Ma, H.**, 2006. *Numerical investigations of transient heat transfer characteristics and vitrification tendencies in ultra-fast cell cooling processes*. Cryobiology 52, 386-392.
- **Johnson, M.H., Pickering, S.J.**, 1987. *The effect of dimethylsulphoxide on the microtubular system of the mouse oocyte*. Development 100, 313-324.
- **Joly, T.**, 1997. *Etablissement d'une cryobanque de semence ou d'embryons pour la conservation ex situ de la diversité génétique chez les mammifères domestiques: l'exemple du lapin (*Oryctolagus**

- cuniculus*), Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon (France), p. 143.
- Joly, T., Renard, J.P., 1998. *Coûts des techniques de cryoconservation de la semence et des embryons pour la mise en oeuvre d'une cryobanque chez le lapin*, 7èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris (France), pp. 37-39.
  - Joly, T., de Rochambeau, H., Renard, J.P., 1998. *Etablissement d'une cryobanque d'embryons pour la conservation ex situ de la diversité génétique chez le lapin: aspects pratiques*. Genet Sel Evol 30, S259-269.
  - Joly, T., Bolet, G., Theau-Clement, M., Falieres, J., De Rochambeau, H., Renard, J.P., 2003. *La Cryobanque Nationale: une mise en oeuvre adaptée pour l'espèce lapin*, 10èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris (France), pp. 39-42.
  - Jones, A., Van Blerkom, J., Davis, P., Toledo, A.A., 2004. *Cryopreservation of metaphase II human oocytes effects mitochondrial membrane potential: implications for developmental competence*. Hum Reprod 19, 1861-1866.
  - Jones, E.E., Bain, J.B., Odell, W.D., 1976. *Postcoital luteinizing hormone release in male and female rabbits as determined by radioimmunoassay*. Fertil Steril 27, 848-852.
  - Joseph, S.M., Buchakjian, M.R., Dubyak, G.R., 2003. *Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes*. J Biol Chem 278, 23331-23342.
  - Jung, T., Fischer, B., 1988. *Correlation between blastocyst diameter and DNA or protein synthetic activity in rabbit blastocysts*. Biol Reprod 39, 1111-1116.

## K

- Kanayama, K., Endo, T., Sakuma, Y., 1992. *Simplification of superovulation induction in rabbits by means of human menopausal gonadotrophin dissolved in polyvinylpyrrolidone*. Zentralbl Veterinarmed A 39, 798-800.
- Kanayama, K., Nariai, K., Sankai, T., Endo, T., 1995. *Superovulation induction by human menopausal gonadotrophin in rabbits*. J Vet Med Sci 57, 543-544.
- Kasai, M., Hiraishi, M., Nureki, I., Zhu, S.E., Sakurai, T., Machida, T., 1993. *Influence of the mucin coat on the survival of rabbit and mouse embryos stored at 0°C*. J Exp Zool 267, 344-349.
- Kauffman, R.D., Schmidt, P.M., Rall, W.F., Hoeg, J.M., 1998. *Superovulation of rabbits with FSH alters in vivo development of vitrified morulae*. Theriogenology 50, 1081-1092.
- Kazem, R., Thompson, L.A., Srikantharajah, A., Laing, M.A., Hamilton, M.P., Templeton, A., 1995. *Cryopreservation of human oocytes and fertilization by two techniques: in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. Hum Reprod 10, 2650-2654.
- Keefe, D., Liu, L., Wang, W., Silva, C., 2003. *Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF*. Reprod Biomed Online 7, 24-29.
- Keefer, C.L., Bennett, K.A., Brackett, B.G., 1985. *In vitro fertilization in the rabbit after delayed ovum recovery*. Biol Reprod 33, 388-392.
- Kennelly, J.J., Foote, R.H., 1965. *Superovulatory Response of Pre- and Post-Pubertal Rabbits to Commercially Available Gonadotrophins*. J Reprod Fertil 9, 177-188.
- Kennelly, J.J., Foote, R.H., Jones, R.C., 1970. *Duration of premeiotic deoxyribonucleic acid synthesis and the stages of prophase I in rabbit oocytes*. J Cell Biol 47, 577-584.
- Kermabon, A.Y., Belair, L., Theau-Clement, M., Salesse, R., Djiane, J., 1994. *Effects of anoestrus and bromocryptine treatment on the expression of prolactin and LH receptors in the rabbit ovary during lactation*. J Reprod Fertil 102, 131-138.
- Khalifa, R.M., El-Alamy, M.A., Beshir, M.A., 2000. *Vasectomized buck gave better reproductive results in artificial insemination techniques in rabbit than GnRH or hCG*, 7th World Rabbit Congress. 4-7 juillet 2000., Valencia (Espagne).

- **Kidder, J.D., Roberts, P.J., Simkin, M.E., Foote, R.H., Richmond, M.E.**, 1999. *Nonsurgical collection and nonsurgical transfer of preimplantation embryos in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and domestic ferret (*Mustela putorius furo*)*. J Reprod Fertil 116, 235-242.
- **Kim, C.K., Im, K.S., Zheng, X., Foote, R.H.**, 1989. *In vitro capacitation and fertilizing ability of ejaculated rabbit sperm treated with lysophosphatidylcholine*. Gamete Res 22, 131-141.
- **Kimura, K., Hirako, M., Iwata, H., Aoki, M., Kawaguchi, M., Seki, M.**, 2007. *Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel*. Theriogenology 68, 633-639.
- **Klein, M., Mayer, G.**, 1942. *Réactions ovariennes à la stimulation localisée des follicules de De Graaf*. Arch Phys Biol 16, 57-59.
- **Knobil, E., Neil, J.**, 1988. *The physiology of reproduction*, In: Press, R. (Ed.), New York, p. 2414.
- **Ko, C.S., Ding, D.C., Chu, T.W., Chu, Y.N., Chen, I.C., Chen, W.H., Wu, G.J.**, 2008. *Changes to the meiotic spindle and zona pellucida of mature mouse oocytes following different cryopreservation methods*. Anim Reprod Sci 105, 272-282.
- **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, 611-620.
- **Krisher, R.L.**, 2004. *The effect of oocyte quality on development*. J Anim Sci 82 E-Suppl, E14-23.
- **Kubota, C., Yang, X., Dinnyes, A., Todoroki, J., Yamakuchi, H., Mizoshita, K., Inohae, S., Tabara, N.**, 1998. *In vitro and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation*. Mol Reprod Dev 51, 281-286.
- **Kuwayama, M.**, 2007. *Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method*. Theriogenology 67, 73-80.
- **Kuwayama, M., Vajta, G., Ieda, S., Kato, O.**, 2005. *Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination*. Reprod Biomed Online 11, 608-614.

## L

- **Laborda, P., Santacreu, M.A., Garcia, E., Mocé, E., Mocé, M.L.**, 2008. *Oocyte glutathione concentration in a rabbit line selected for ovulation rate*, 9th World Rabbit Congress, Verona (Italy), pp. 375-380.
- **Laborde, N.P., Wolfsen, A.R., Odell, W.D.**, 1981. *Short loop feedback system for the control of follicle-stimulating hormone in the rabbit*. Endocrinology 108, 72-75.
- **Lambert, R.D., Blanchette, L.G., Tourigny, M.**, 1978. *The relationship between sperm concentration and fertilization in vitro of rabbit ova*. Anim Reprod Sci 1, 43-47.
- **Lambertsen, C.J., Jr., Greenbaum, D.F., Wright, K.H., Wallach, E.E.**, 1976. *In vitro studies of ovulation in the perfused rabbit ovary*. Fertil Steril 27, 178-187.
- **Larman, M.G., Sheehan, C.B., Gardner, D.K.**, 2006. *Calcium-free vitrification reduces cryoprotectant-induced zona pellucida hardening and increases fertilization rates in mouse oocytes*. Reproduction 131, 53-61.
- **Larman, M.G., Katz-Jaffe, M.G., Sheehan, C.B., Gardner, D.K.**, 2007. *1,2-propanediol and the type of cryopreservation procedure adversely affect mouse oocyte physiology*. Hum Reprod 22, 250-259.
- **Lazarowski, E.R., Boucher, R.C., Harden, T.K.**, 2003. *Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules*. Mol Pharmacol 64, 785-795.
- **Lebas, F.**, 1972. *Effet de la simultanéité de la lactation et de la gestation sur les performances laitières chez la lapine*. Annales de Zootechnie 21, 129-131.
- **Lebas, F., Coudert, P., De Rochambeau, H., Thébault, R.G.**, 1997. *Chapter 8 - Production of rabbit skins and hair for textiles*, In: FAO (Ed.), The rabbit: husbandry, health and production, FAO Animal Production and Health, Rome.

- **Ledda, S., Bogliolo, L., Succu, S., Ariu, F., Bebbere, D., Leoni, G.G., Naitana, S., 2007.** *Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival.* *Reprod Fertil Dev* 19, 13-23.
- **Lee, S.T., Oh, S.J., Lee, E.J., Han, H.J., Lim, J.M., 2006.** *Adenosine triphosphate synthesis, mitochondrial number and activity, and pyruvate uptake in oocytes after gonadotropin injections.* *Fertil Steril* 86 Suppl 4, 1164-1169.
- **Lefèvre, B., Caillol, M., 1978.** *Relationship of oestrous behaviour with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit.* *Ann Biol anim Biochim Biophys* 18, 695-698.
- **Lerner, S.P., Thayne, W.V., Baker, R.D., Henschen, T., Meredith, S., Inskoop, E.K., Dailey, R.A., Lewis, P.E., Butcher, R.L., 1986.** *Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows.* *J Anim Sci* 63, 176-183.
- **Levi-Setti, P.E., Cavagna, M., Bulletti, C., 2006.** *Recombinant gonadotrophins associated with GnRH antagonist (cetorelix) in ovarian stimulation for ICSI: Comparison of r-FSH alone and in combination with r-LH.* *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 126, 212-216.
- **Li, G.P., Chen, D.Y., Lian, L., Sun, Q.Y., Wang, M.K., Liu, J.L., Li, J.S., Han, Z.M., 2001.** *Viable rabbits derived from reconstructed oocytes by germinal vesicle transfer after intracytoplasmic sperm injection (ICSI).* *Mol Reprod Dev* 58, 180-185.
- **Lim, J.M., Fukui, Y., Ono, H., 1992.** *Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization.* *Theriogenology* 37, 351-361.
- **Lindsell, C.E., Ratkumar, K., Manning, A.W., Emery, S.K., Mapletoft, R.J., Murphy, B.D., 1986.** *Variability in FSH:LH ratios among batches of commercially available gonadotrophins.* *Theriogenology* 25, 167 [abstract].
- **Liu, C.T., Chen, C.H., Cheng, S.P., Ju, J.C., 2002.** *Parthenogenesis of rabbit oocytes activated by different stimuli.* *Anim Reprod Sci* 70, 267-276.
- **Liu, J.L., Kusakabe, H., Chang, C.C., Suzuki, H., Schmidt, D.W., Julian, M., Pfeffer, R., Bormann, C.L., Tian, X.C., Yanagimachi, R., Yang, X., 2004.** *Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits.* *Biol Reprod* 70, 1776-1781.
- **Liu, L., Trimarchi, J.R., Oldenbourg, R., Keefe, D.L., 2000.** *Increased birefringence in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living oocytes.* *Biol Reprod* 63, 251-258.
- **Lonergan, P., Fair, T., 2008.** *In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts.* *Theriogenology* 69, 17-22.
- **Lopez-Bejar, M., 1995.** *Evaluacion de la viabilidad de embriones de conejo de diversos estadios preimplantaciones crioconservados mediante procedimientos de la congelacion rapida,* PhD, Universidad autonoma de Barcelona, Barcelona.
- **Lopez-Bejar, M., Lopez-Gatius, F., 2002.** *Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure.* *Theriogenology* 58, 1541-1552.
- **Luvoni, G.C., Pellizzari, P., 2000.** *Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages.* *Theriogenology* 53, 1529-1540.

## M

- **Mac Donald, P., Vidal, N., Beyer, C., 1970.** *Sexual behaviour in the ovariectomized rabbit after treatment with different amounts of gonadal hormones.* *Horm Behav* 1, 161-172.
- **Maertens, L., Luzzi, F., 1995.** *Note concerning the effect of PMSG stimulation on the mortality rate at birth and the distribution of litter size in artificially inseminated does.* *World Rabbit Science* 3, 57-61.
- **Mager, J., Schultz, R.M., Brunk, B.P., Bartolomei, M.S., 2006.** *Identification of candidate maternal-effect genes through comparison of multiple microarray data sets.* *Mamm Genome* 17, 941-949.
- **Magistrini, M., Szollosi, D., 1980.** *Effects of cold and of isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes.* *Eur J Cell Biol* 22, 699-707.

- **Mandelbaum, J., Anastasiou, O., Levy, R., Guérin, J.F., de Larouzière, V., Antoine, J.M.**, 2004. *Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 113 Suppl 1, S17-23.
- **Manna, C., Rienzi, L., Greco, E., Sbracia, M., Rahman, A., Poverini, R., Siracusa, G., De Felici, M.**, 2001. *Zona pellucida solubility and cortical granule complements in human oocytes following assisted reproductive techniques*. Zygote 9, 201-210.
- **Mariana, J.C., Solari, A.**, 1993. *Proliferation of follicular cells and the effect of FSH on the onset of follicular growth in the ovary of 30-day old rabbits studied by continuous labelling with 3H-thymidine*. Reprod Nutr Dev 33, 63-67.
- **Mariana, J.C., Hulot, F., Poujardieu, B.**, 1986. *Croissance comparée des follicules ovariens dans deux souches de lapin*, 4èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris (France), pp. Communication n°20, 12p.
- **Mariana, J.C., Hulot, F., Poujardieu, B.**, 1989a. *Paramètres de la croissance du follicule ovarien chez la lapine adulte de 20 semaines dans deux souches*. Arch. Biol. (Bruxelles) 100, 65-82.
- **Mariana, J.C., Hulot, F., Dervin, C., Tomassone, R., Poujardieu, B.**, 1989b. *Estimation de la durée moyenne de croissance d'un follicule d'ovaire de lapine âgée de 20 semaines, dans deux souches*. Arch. Biol. (Bruxelles) 100, 47-63.
- **Marongiu, M.L., Gulinati, A.**, 2008. *Ultrasound evaluation of ovarian follicular dynamics during early pseudopregnancy as a tool to inquire into the high progesterone (P+) syndrome of rabbit does*, 9th World Rabbit Congress, Verona (Italie), pp. 393-397.
- **Martino, A., Songsasen, N., Leibo, S.P.**, 1996. *Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling*. Biol Reprod 54, 1059-1069.
- **Matson, P.L., Graefling, J., Junk, S.M., Yovich, J.L., Edirisinghe, W.R.**, 1997. *Cryopreservation of oocytes and embryos: use of a mouse model to investigate effects upon zona hardness and formulate treatment strategies in an in-vitro fertilization programme*. Hum Reprod 12, 1550-1553.
- **Matsumoto, H., Jiang, J.Y., Tanaka, T., Sasada, H., Sato, E.**, 2001. *Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh*. Cryobiology 42, 139-144.
- **Mauleon, P.**, 1967. *[Kinetics of oogenesis in mammals]*. Arch Anat Microsc Morphol Exp 56, 125-150.
- **Maurer, R.R., Foote, R.H.**, 1971. *Maternal ageing and embryonic mortality in the rabbit. I. Repeated superovulation, embryo culture and transfer*. J Reprod Fertil 25, 329-341.
- **Maurer, R.R., Hunt, W.L., Foote, R.H.**, 1968a. *Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in Dutch-belted rabbits*. J Reprod Fertil 15, 93-103.
- **Maurer, R.R., Hunt, W.L., Van Vleck, L.D., Foote, R.H.**, 1968b. *Developmental potential of superovulated rabbit ova*. J Reprod Fertil 15, 171-175.
- **Mayan, M.D., Vicente, J.S., Santacreu, M.A., Viudes de Castro, M.P.**, 1989. *Superovulacion con PMSG en conejas primiparas para la obtencion de embriones*, ITEA. III Jornadas de Produccion Animal, Zaragoza (Espagne), pp. 231-233.
- **McCorkell, R., Woodbury, M., Adams, G.P.**, 2006. *Ovarian follicular and luteal dynamics in wapiti during the estrous cycle*. Theriogenology 65, 540-556.
- **McCulloh, D.H., Wall, R.J., Levitan, H.**, 1987. *Fertilization of rabbit ova and the role of ovum investments in the block to polyspermy*. Dev Biol 120, 385-391.
- **Mehaisen, G.M., Vicente, J.S., Lavara, R.**, 2004. *In vivo embryo recovery rate by laparoscopic technique from rabbit does selected for growth rate*. Reprod Domest Anim 39, 347-351.
- **Mehaisen, G.M., Vicente, J.S., Lavara, R., Viudes-de-Castro, M.P.**, 2005. *Effect of eCG dose and ovulation induction treatments on embryo recovery and in vitro development post-vitrification in two selected lines of rabbit does*. Anim Reprod Sci 90, 175-184.
- **Mehaisen, G.M., Viudes-de-Castro, M.P., Vicente, J.S., Lavara, R.**, 2006. *In vitro and in vivo viability of vitrified and non-vitrified embryos derived from eCG and FSH treatment in rabbit does*. Theriogenology 65, 1279-1291.

- **Meunier, M., Hulot, F., Poirier, J.C., Torres, S.**, 1983. *A comparison of ovulatory gonadotropic surge in two rabbit strains: no evidence for a relationship between LH or FSH surge and factors of prolificacy.* *Reprod Nutr Dev* 23, 709-715.
- **Mills, J.A., Jeitles, G.G., Jr., Brackett, B.G.**, 1973. *Embryo transfer following in vitro and in vivo fertilization of rabbit ova.* *Fertil Steril* 24, 602-608.
- **Mills, T.M., Stopper, V.S.**, 1989. *The intraovarian progesterone modulation of follicle development in the rabbit ovary.* *Steroids* 54, 471-480.
- **Mirabito, L., Galliot, P., Souchet, C.**, 1994. *Effet de l'utilisation de la PMSG et de la modification de la photopériode sur les performances de reproduction de la lapine*, 6èmes Journées de la Recherche Cunicole. 6-7 décembre 1994., La Rochelle (France), pp. 169-178.
- **Mitalipov, S.M., White, K.L., Farrar, V.R., Morrey, J., Reed, W.A.**, 1999. *Development of nuclear transfer and parthenogenetic rabbit embryos activated with inositol 1,4,5-trisphosphate.* *Biol Reprod* 60, 821-827.
- **Moce, E., Vicente, J.S., Lavara, R.**, 2003. *Effect of freezing-thawing protocols on the performance of semen from three rabbit lines after artificial insemination.* *Theriogenology* 60, 115-123.
- **Modina, S., Beretta, M., Lodde, V., Lauria, A., Luciano, A.M.**, 2004. *Cytoplasmic changes and developmental competence of bovine oocytes cryopreserved without cumulus cells.* *Eur J Histochem* 48, 337-346.
- **Moon, J.-H., Hyun, C.-S., Lee, S.-W., Son, W.-Y., Yoon, S.-H., Lim, J.-H.**, 2003. *Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI.* *Hum Reprod* 18, 817-820.
- **Moor, R.M., Kruip, A.M., Green, D.**, 1984. *Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation ?* *Theriogenology* 21, 103-116.
- **Moret, B., Baratte, M.**, 1980. *Comportement d'oestrus chez la lapine.* *Cuniculture* 7, 159-161.
- **Morris, G.J.**, 1981. *Cryopreservation: An introduction to cryopreservation in culture collections*, Institute of Terrestrial Ecology, Cambridge, p. 27.
- **Motta, P.M., Makabe, S., Naguro, T., Correr, S.**, 1994. *Oocyte follicle cells association during development of human ovarian follicle. A study by high resolution scanning and transmission electron microscopy.* *Arch Histol Cytol* 57, 369-394.
- **Murakami, H., Imai, H.**, 1996. *Successful implantation of in vitro cultured rabbit embryos after uterine transfer: a role for mucin.* *Mol Reprod Dev* 43, 167-170.
- **Murphy, B.D., Mapletoft, R.J., Manns, J., Humphrey, W.D.**, 1984. *Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response.* *Theriogenology* 21, 117-125.
- **Myers, K., Poole, W.E.**, 1962. *Oestrous behaviour cycles in the rabbit.* *Nature (Lond.)* 195, 358-359.

## N

- **Naik, B.R., Rao, B.S., Vagdevi, R., Gnanprakash, M., Amarnath, D., Rao, V.H.**, 2005. *Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos.* *Anim Reprod Sci* 86, 329-338.
- **Neto, V., Buff, S., Lornage, J., Bottollier, B., Guerin, P., Joly, T.**, 2008. *Effects of different freezing parameters on the morphology and viability of preantral follicles after cryopreservation of doe rabbit ovarian tissue.* *Fertil Steril* 89, 1348-1356.
- **Nicosia, S.V., Evangelista, I., Batta, S.K.**, 1975. *Rabbit ovarian follicles. I. Isolation technique and characterization at different stages of development.* *Biol Reprod* 13, 423-447.
- **Niwa, K., Hosoi, Y., Ohara, K., Iritani, A.**, 1983. *Fertilization in vitro of rabbit eggs with or without follicular cells by epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium* *Anim Reprod Sci* 6, 143-149.
- **Nottola, S., Macchiarelli, G., Coticchio, G., Bianchi, S., Cecconi, S., De Santis, L., Scaravelli, G., Flamigni, C., Borini, A.**, 2007. *Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations.* *Hum Reprod* 22, 1123-1133.



## O

- **Ollivier, L., Renard, J.P.**, 1995. *The costs of cryopreservation of animal genetic resources*, 46th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Wageningen (Pays-Bas), p. 57.
- **Osteen, K.G., Mills, T.M.**, 1979. *Serum LH and FSH levels in the pregnant rabbit*. Proc Soc Exp Biol Med 162, 454-457.
- **Ozil, J.P.**, 1990. *The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation*. Development 109, 117-127.
- **Ozil, J.P., Huneau, D.**, 2001. *Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca<sup>2+</sup> signal regime on development*. Development 128, 917-928.

## P

- **Park, S.E., Chung, H.M., Cha, K.Y., Hwang, W.S., Lee, E.S., Lim, J.M.**, 2001. *Cryopreservation of ICR mouse oocytes: improved post-thawed preimplantation development after vitrification using Taxol, a cytoskeleton stabilizer*. Fertil Steril 75, 1177-1184.
- **Parkening, T.A., Chang, M.C.**, 1977. *Effects of cooling rates and maturity of the animal on the recovery and fertilization of frozen-thawed rodent eggs*. Biol Reprod 17, 527-531.
- **Perreaud, J.**, 1978. *Le lapin en tétatologie, bilan de huit années d'expériences en recherches pharmaceutiques*, Journées d'études sur le lapin: animal de laboratoire, Orléans (France), pp. 80-104.
- **Peters, H.**, 1978. *Folliculogenesis in Mammals*, In: RE, J. (Ed.), The Vertebrate ovary. Comparative biology and evolution, Plenum Press, New York, pp. 121-144.
- **Peters, H., Levy, E., Crone, M.**, 1965. *Oogenesis in Rabbits*. J Exp Zool 158, 169-179.
- **Pickering, S.J., Johnson, M.H.**, 1987. *The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte*. Hum Reprod 2, 207-216.
- **Pincus, G.**, 1940. *Superovulation in Rabbits*. Anat Rec 77, 1-8.
- **Pincus, G., Shapiro, H.**, 1940. *Further Studies on the Parthenogenetic Activation of Rabbit Eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A 26, 163-165.
- **Polgar, Z., Dinnyes, A.**, 2008. *Transfert nucléaire et cellules souches embryonnaires chez le lapin*. Biofutur 287, 32-35.
- **Pomar, F.J., Teerds, K.J., Kidson, A., Colenbrander, B., Tharasanit, T., Aguilar, B., Roelen, B.A.**, 2005. *Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study*. Theriogenology 63, 2254-2268.
- **Pribenszky, C., Molnar, M., Cseh, S., Solti, L.**, 2004. *Survival of mouse blastocysts after low-temperature preservation under high pressure*. Acta Vet Hung 52, 479-487.
- **Pribenszky, C., Molnar, M., Cseh, S., Solti, L.**, 2005. *Improving post-thaw survival of cryopreserved mouse blastocysts by hydrostatic pressure challenge*. Anim Reprod Sci 87, 143-150.
- **Pribenszky, C.S., Du, Y., Molnar, M., Harnos, A., Vajta, G.**, 2008. *Increased stress tolerance of matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment*. Anim Reprod Sci 106, 200-207.

## Q

- **Quintans, C.J., Donaldson, M.J., Bertolino, M.V., Pasqualini, R.S.**, 2002. *Birth of two babies using oocytes that were cryopreserved in a choline-based freezing medium*. Hum Reprod 17, 3149-3152.
- **Quintela, L.A., Pena, A.I., Vega, M.D., Gullon, J., Prieto, C., Barrio, M., Becerra, J.J., Herradon, P.G.**, 2007. *Inducción de la ovulación en conejas mediante la administración intravaginal de [des-Gly10, D-Ala6]-LHRH ethylamide: Estudio preliminar*, II Congresso Ibérico de Cunicultura. 5-6 Juin 2007., Vila Real, Trás-os-Montes (Portugal), pp. 37-39.

- Quintela, L.A., Pena, A.I., Vega, M.D., Gullon, J., Prieto, M.C., Barrio, M., Becerra, J.J., Maseda, F., Herradon, P.G., 2004. *Ovulation induction in rabbit does submitted to artificial insemination by adding buserelin to the seminal dose*. *Reprod Nutr Dev* 44, 79-88.

## R

- Rall, W.F., 1987. *Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification*. *Cryobiology* 24, 387-402.
- Ramirez, V.D., Beyer, C., 1998. *The ovarian cycle of the rabbit: its neuroendocrine control*, In: Editors, E.K.a.J.D.N. (Ed.), *The physiology of reproduction*, Raven Press, New York, pp. 3-106.
- Rao, V.H., Sarmah, B.C., Bhattacharyya, N.K., 1984. *Xenogenous fertilization of goat ova in the rabbit oviduct*. *J Reprod Fertil* 71, 377-379.
- Ratto, M.H., Huanca, W., Singh, J., Adams, G.P., 2005. *Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas*. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 29 [abstract].
- Rebollar, P.G., Rodriguez, J.M., Diaz, P., Ubilla, E., 1989. *Efecto de la estimulación con PMSG sobre la repuesta ovarica y resultados de la inseminación artificial en conejas de baja receptividad sexual*, ITEA. III Jornadas de Produccion Animal, Zaragoza (Espagne), pp. 262-264.
- Rebollar, P.G., Ubilla, E., Alvarino, J.M.R., Illera, J.C., Silvan, G., 1992. *Effect of degree of sexual receptivity on post-partum plasma oestradiol and ovulatory response in rabbits*. *Revista Espanola de Fisiologia* 48, 13-18.
- Rebollar, P.G., Ubilla, E., Lorenzo, P.L., Sánchez-Dávil, M., Sánchez, J., Tucker, L., Alvarino, J.M.R., 2000. *Ovulation and embryo implantation rate in synchronized artificial inseminated multiparous lactating does*, 7th World Rabbit Congress, Valencia (Espagne), pp. 239-244.
- Renard, J.P., Garnier, V., Parvex, R., 1982. *Production et congélation de l'embryon de lapin*, 3èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris (France), p. communication n°18.
- Rho, G.J., Kim, S., Yoo, J.G., Balasubramanian, S., Lee, H.J., Choe, S.Y., 2002. *Microtubulin configuration and mitochondrial distribution after ultra-rapid cooling of bovine oocytes*. *Mol Reprod Dev* 63, 464-470.
- Rieger, D., 1997. *Batch analysis of the ATP content of bovine sperm, oocytes, and early embryos using a scintillation counter to measure the chemiluminescence produced by the luciferin-luciferase reaction*. *Anal Biochem* 246, 67-70.
- Rienzi, L., Martinez, F., Ubaldi, F., Minasi, M.G., Iacobelli, M., Tesarik, J., Greco, E., 2004. *Polyscope analysis of meiotic spindle changes in living metaphase II human oocytes during the freezing and thawing procedures*. *Hum Reprod* 19, 655-659.
- Risco, R., Elmoazzen, H., Doughty, M., He, X., Toner, M., 2007. *Thermal performance of quartz capillaries for vitrification*. *Cryobiology* 55, 222-229.
- Rodriguez de Lara, R., Fallas, L.M., 1999. *Environmental factors and physiological factors influencing kindling rates and litter size at birth in artificially inseminated doe rabbits*. *World Rabbit Science* 7, 191-196.
- Rodriguez, J.M., Sanz, J., Alonso, F., Acosta, M., 1985. *Factores que influyen en la duración de la gestación de la coneja*. *Archivos de Zootecnia* 34, 183 [abstract].
- Rodriguez, J.M., Gosalvez, L.F., Diaz, P., Gomez, S., 1987. *Evolución de la población de folículos antrales de la coneja en torno al parto*. *Inv Agrar: Prod Sanid Anim* 2, 65-76.
- Rojas, C., Palomo, M.J., Albarracín, J.L., Mogas, T., 2004. *Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments*. *Cryobiology* 49, 211-220.
- Rosas, C.A., Alberio, R.H., Baranao, J.L., Agüero, A., Chaves, M.G., 1998. *Evaluation of two treatments in superovulation of mares*. *Theriogenology* 49, 1257-1264.
- Roudebush, W.E., Fukuda, A.I., Minhas, B.S., 1993. *Enhanced embryo development of rabbit oocytes fertilized in vitro with platelet activating factor (PAF)-treated spermatozoa*. *J Assist Reprod Genet* 10, 91-94.

- **Roudebush, W.E., Minhas, B.S., Ricker, D.D., Palmer, T.V., Dodson, M.G.**, 1990. *Platelet activating factor enhances in vitro fertilization of rabbit oocytes*. Am J Obstet Gynecol 163, 1670-1673.
- **Roy, F., Maurel, M.C., Combarous, Y., Briois, J.P., Pobel, T., Delestang, F.**, 1995. *Etude de la réponse immunitaire observée chez les ovins et les caprins traités avec PMSG dans le cadre de l'insémination artificielle*, 2èmes Rencontres Recherches Ruminants, pp. 395-398.
- **Rozell, M.D., Williams, J.E., Butler, J.E.**, 1992. *Changes in concentration of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate in individual preimplantation sheep embryos*. Biol Reprod 47, 866-870.
- **Ruppert-Lingham, C.J., Paynter, S.J., Godfrey, J., Fuller, B.J., Shaw, R.W.**, 2003. *Developmental potential of murine germinal vesicle stage cumulus-oocyte complexes following exposure to dimethylsulphoxide or cryopreservation: loss of membrane integrity of cumulus cells after thawing*. Hum Reprod 18, 392-398.

## S

- **Salveti, P.**, 2004. *Comparaison de deux méthodes de congélation de la semence de lapin*, Mémoire de fin d'études, ISARA-Lyon, Lyon, p. 97.
- **Salveti, P., Joly, T., Renard, J.P.**, 2007. *Viability of rabbit embryos after 14 years storage in liquid nitrogen*, CRYO 2007: The 44th Annual Meeting of The Society for Cryobiology Lake Louise (Canada), p. 55.
- **Salveti, P., Allain, D., Bolet, G., Hurtaud, J., Boucher, S., Joly, T.**, 2008. *La Cryobanque Nationale Lapin: un outil de gestion dynamique des ressources génétiques cunicoles*, 7ème colloque national "Ressources Génétiques", Strasbourg (France), pp. 391-404.
- **Sandford, J.C.**, 1992. *Notes on the history of the rabbit*. J Appl Rabbit Res 15, 1-28.
- **Santacreu, M.A., Viudes de Castro, P., Blasco, A.**, 1990. *Evaluation par cœlioscopie des corps jaunes et des embryons. Influence sur la taille de portée chez la lapine*. Reprod Nutr Dev 30, 583-588.
- **Sathananthan, A.H., Kirby, C., Trounson, A., Philipatos, D., Shaw, J.**, 1992. *The effects of cooling mouse oocytes*. J Assist Reprod Genet 9, 139-148.
- **Satoh, H., Numabe, T., Takada, T., Oikawa, T., Kifune, A., Watanabe, G., Taya, K.**, 1996. *Superovulation in Japanese beef cows using polyvinylpyrrolidone(PVP) as the vehicle for porcine FSH(pFSH)*. Theriogenology 45, 332 [abstract].
- **Saunders, K.M., Parks, J.E.**, 1999. *Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes*. Biol Reprod 61, 178-187.
- **Schatten, G., Simerly, C., Schatten, H.**, 1985. *Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization*. Proc Natl Acad Sci U S A 82, 4152-4156.
- **Schmidt, P.M., Hollifield, V.M., Lin, X., Wildt, D.E.**, 1992. *Induced ovulation and adequate embryo recoveries in new zealand white rabbits treated with a low PMSG/HCG dose or single, daily injections of FSH-P*. Theriogenology 37, 292 [abstract].
- **Schwiebert, E.M., Zsembery, A.**, 2003. *Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells*. Biochim Biophys Acta 1615, 7-32.
- **Scott, R.S., Rennie, P.I.**, 1970. *Factors controlling the life-span of the corpora lutea in the pseudopregnant rabbit*. J Reprod Fertil 23, 415-422.
- **Seitz, H.M., Jr., Brackett, B.G., Mastroianni, L., Jr.**, 1970. *In vitro fertilization of ovulated rabbit ova recovered from the ovary*. Biol Reprod 2, 262-267.
- **Setty, S.L., Mills, T.M.**, 1987. *The effects of progesterone on follicular growth in the rabbit ovary*. Biol Reprod 36, 1247-1252.
- **Shaw, J.M., Oranratnachai, A., Trounson, A.O.**, 2000. *Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue*. Theriogenology 53, 59-72.
- **Shi, L.Y., Jin, H.F., Kim, J.G., Mohana Kumar, B., Balasubramanian, S., Choe, S.Y., Rho, G.J.**, 2007. *Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification*. Anim Reprod Sci 100, 128-140.

- Shi, W.Q., Zhu, S.E., Zhang, D., Wang, W.H., Tang, G.L., Hou, Y.P., Tian, S.J., 2006. *Improved development by Taxol pretreatment after vitrification of in vitro matured porcine oocytes*. *Reproduction* 131, 795-804.
- Shinohara, T., Inoue, K., Ogonuki, N., Kanatsu-Shinohara, M., Miki, H., Nakata, K., Kurome, M., Nagashima, H., Toyokuni, S., Kogishi, K., Honjo, T., Ogura, A., 2002. *Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination*. *Hum Reprod* 17, 3039-3045.
- Siebzehruebl, E.R., Todorow, S., van Uem, J., Koch, R., Wildt, L., Lang, N., 1989. *Cryopreservation of human and rabbit oocytes and one-cell embryos: a comparison of DMSO and propanediol*. *Hum Reprod* 4, 312-317.
- **Signataires de la convention sur la diversité biologique**, 1992. *Convention sur la diversité biologique*, Conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement. Rio de Janeiro (3-14 juin 1992).
- Silvestre, M.A., Yaniz, J., Salvador, I., Santolaria, P., Lopez-Gatius, F., 2006. *Vitrification of pre-pubertal ovine cumulus-oocyte complexes: effect of cytochalasin B pre-treatment*. *Anim Reprod Sci* 93, 176-182.
- Singh, R., Sinclair, K.D., 2007. *Metabolomics: approaches to assessing oocyte and embryo quality*. *Theriogenology* 68 Suppl 1, S56-62.
- Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C., 2006. *Contribution of the oocyte to embryo quality*. *Theriogenology* 65, 126-136.
- Slotte, H., Gustafson, O., Nylund, L., Pousette, A., 1990. *ATP and ADP in human pre-embryos*. *Hum Reprod* 5, 319-322.
- Smelser, G.K., Walton, A., Whetham, E.O., 1934. *The effect of light on ovarian activity in the rabbit*. *J Exp Biol* 11, 352-363.
- Songsasen, N., Yu, I.J., Ratterree, M.S., VandeVoort, C.A., Leibo, S.P., 2002. *Effect of chilling on the organization of tubulin and chromosomes in rhesus monkey oocytes*. *Fertil Steril* 77, 818-825.
- Spielmann, H., Jacob-Mueller, U., Schulz, P., Schimmel, A., 1984. *Changes of the adenine ribonucleotide content during preimplantation development of mouse embryos in vivo and in vitro*. *J Reprod Fertil* 71, 467-473.
- Spies, H.G., Pau, K.Y., Yang, S.P., 1997. *Coital and estrogen signals: a contrast in the preovulatory neuroendocrine networks of rabbits and rhesus monkeys*. *Biol Reprod* 56, 310-319.
- Stachecki, J.J., Cohen, J., Willadsen, S.M., 1998a. *Cryopreservation of unfertilized mouse oocytes: the effect of replacing sodium with choline in the freezing medium*. *Cryobiology* 37, 346-354.
- Stachecki, J.J., Cohen, J., Willadsen, S., 1998b. *Detrimental effects of sodium during mouse oocyte cryopreservation*. *Biol Reprod* 59, 395-400.
- Stambaugh, R., Brackett, B.G., Mastroianni, L., 1969. *Inhibition of in vitro fertilization of rabbit ova by trypsin inhibitors*. *Biol Reprod* 1, 223-227.
- Steptoe, P.C., Edwards, R.G., 1978. *Birth after the reimplantation of a human embryo*. *Lancet* 2, 366 [abstract].
- Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Goncalves, P.B., Wolf, E., 2001. *Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture*. *Biol Reprod* 64, 904-909.
- Stoufflet, I., Caillol, M., 1988. *Relation between circulating sex steroid concentrations and sexual behaviour during pregnancy and post partum in the domestic rabbit*. *J Reprod Fertil* 82, 209-218.
- Succu, S., Leoni, G.G., Bebbere, D., Berlinguer, F., Mossa, F., Bogliolo, L., Madeddu, M., Ledda, S., Naitana, S., 2007a. *Vitrification devices affect structural and molecular status of in vitro matured ovine oocytes*. *Mol Reprod Dev* 74, 1337-1344.
- Succu, S., Leoni, G.G., Berlinguer, F., Madeddu, M., Bebbere, D., Mossa, F., Bogliolo, L., Ledda, S., Naitana, S., 2007b. *Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes*. *Theriogenology* 68, 107-114.

- Sugano, M., Shinogi, T., 1999. *Superovulation induction in Japanese Black cattle by a single intramuscular injection of hMG or FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone*. Anim Reprod Sci 55, 175-181.

## T

- Takeda, T., Tsutsumi, Y., Tanabe, Y., Yamamoto, K., 1977. *Administration of prostaglandin F2alpha for the recovery of fertilized eggs from the vaginas of rabbits*. Fertil Steril 28, 759-761.

- Takeda, T., Tsutsumi, Y., Hara, S., Ida, M., 1978. *Effects of prostaglandin F2alpha on egg transport and in vivo egg recovery from the vaginas of rabbits*. Fertil Steril 30, 79-85.

- Takeda, T., Suzuki, H., Terami, Y., Tsutsumi, Y., 1979. *Egg recovery from the vagina of the rabbit treated with prostaglandin F2alpha*. Jap J Anim Reprod 25, 23-30.

- Takedomi, T., Aoyagi, Y., Konishi, M., Kishi, H., Taya, K., Watanabe, G., Sasamoto, S., 1995. *Superovulation of Holstein heifers by a single subcutaneous injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone*. Theriogenology 43, 1259-1268.

- Talevi, R., Gualtieri, R., 2004. *In vivo versus in vitro fertilization*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 115 Suppl 1, S68-71.

- Tamassia, M., Nuttinck, F., May-Panloup, P., Reynier, P., Heyman, Y., Charpigny, G., Stojkovic, M., Hiendleder, S., Renard, J.P., Chastant-Maillard, S., 2004. *In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup*. Biol Reprod 71, 697-704.

- Tandle, M.K., Bakshi, S.A., Pargaonkar, M.D., Salunke, V.M., Mane, K.S., 1993. *Embryo transfer in rabbits*. Indian J Exp Biol 31, 383 [abstract].

- Taneja, M., Pareek, P.K., Jatkar, P.R., 1990. *Superovulation and embryo recovery in rabbits (Oryctolagus cuniculus) using different doses of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG)*. Indian J Exp Biol 28, 1031-1033.

- Techakumphu, M., Winterberger-Torres, S., Sevellec, C., 1987. *Survival of rabbit embryos after synchronous or asynchronous transfer*. Anim Reprod Sci 12, 297-304.

- Teplitz, R., Ohno, S., 1963. *Postnatal induction of oogenesis in the rabbit (Oryctolagus cuniculus)*. Exp Cell Res 31, 183-189.

- Testart, J., 1969. *Comparaison de différentes techniques de transplantation des blastocystes chez la lapine*. Ann Biol Anim Bioch Biophys 9, 351-360.

- Tharasanit, T., Colenbrander, B., Bevers, M.M., Stout, T.A., 2006. *Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on follicle development and ovulation in the mare*. Theriogenology 65, 1071-1081.

- Theau-Clement, M., 1996. *Antagonismo tra lattazione e riproduzione sulla produttività di coniglie inseminate artificialmente*, Atti della giornata scientifica sulla riproduzione del coniglio: dalla ricerca alla applicazione pratica, Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche, Brescia (Italia).

- Theau-Clement, M., 2000. *Advances in biostimulation methods applied to rabbit reproduction*, 7th World Rabbit Congress. 4-7 Juillet 2000., Valencia (Espagne), pp. 61-79.

- Theau-Clement, M., 2001. *Etude de quelques facteurs de contrôle de l'interaction entre la lactation et la reproduction chez la lapine conduite en insémination artificielle*, Thèse de doctorat, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse, Toulouse, p. 103.

- Theau-Clement, M., 2005. *Advances in the control of rabbit reproduction: the doe*, 9th annual conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. 1-3 september 2005., Murcia (Spain).

- Theau-Clement, M., 2007. *Preparation of the rabbit doe to insemination: a review*. World Rabbit Science 15, 61-80.

- Theau-Clement, M., Bolet, G., 1987. *Mesure du taux d'ovulation par coelioscopie chez la lapine*. Reprod Nutr Dev 27, 701-705.

- **Theau-Clement, M., Poujardieu, B.**, 1994. *Influence du mode de reproduction, de la receptivité et du stade physiologique sur les composantes de la taille de portée des lapines*, 6èmes Journées de la Recherche Cunicole, La Rochelle, pp. 187-194.
- **Theau-Clement, M., Lebas, F.**, 1996. *Effect of a systematic PMSG treatment 48 hours before artificial insemination on the productive performance of rabbit does*. World Rabbit Science 4, 47-56.
- **Theau-Clement, M., Bolet, G., Roustan, A., Mercier, P.**, 1990. *Comparaison de différents modes d'induction de l'ovulation chez les lapines multipares en relation avec leur stade physiologique et la receptivité au moment de la mise à la reproduction*, 5èmes Journées de la Recherche Cunicole. 12-12 décembre 1990., Paris (France), p. Tome I: communication n° 7.
- **Theau-Clement, M., Castellini, C., Maertens, L., Boiti, C.**, 1998. *Biostimulations applied to rabbit reproduction: theory and practice*. World Rabbit Science 6, 179-184.
- **Theau-Clement, M., Boiti, C., Mercier, P., Falieres, J.**, 2000. *Description of the ovarian status and fertilising ability of primiparous rabbit does at different lactation stage*, 7th World Rabbit Congress, Valencia (Espagne), pp. 259-266.
- **Theau-Clement, M., Salvetti, P., Bolet, G., Bodin, L., Garreau, H., Falieres, J., Joly, T.**, 2007. *Influence de l'intervalle entre le sevrage et le début d'un traitement de superovulation sur la production d'embryons et leur qualité chez la lapine*, 12èmes Journées de la Recherche Cunicole. 27-28 Novembre 2007., Le Mans (France), pp. 37-39.
- **Thibault, C.**, 1967. *Analyse comparée de la fécondation et de ses anomalies chez la brebis, la vache et la lapine*. Ann Biol Anim Bioch Biophys 7, 5-23.
- **Thibault, C., Dautier, L., Winterberger, S.**, 1954. *Etude cytologique de la fécondation in vitro de l'oeuf de lapine*. Comptes Rendue de la Société de Biologie (Paris) 148, 789-790.
- **Torres, S.**, 1982. *Etude de la mortalité embryonnaire chez la lapine*, 3èmes Journées de la Recherche Cunicole, Paris (France), p. communication n°15.
- **Torres, S., Sevellec, C.**, 1987. *Repeated superovulation and surgical recovery of embryos in the ewe*. Reprod Nutr Dev 27, 859-863.
- **Torres, S., Hulot, F., Sevellec, C.**, 1987a. *Early stages of embryonic development in two rabbit genotypes*. Reprod Nutr Dev 27, 715-719.
- **Torres, S., Hulot, F., Meunier, M., Sevellec, C.**, 1987b. *Comparative study of preimplantation development and embryonic loss in two rabbit strains*. Reprod Nutr Dev 27, 707-714.
- **Touraine, P., Goffin, V.**, 2005. *Physiologie de la prolactine*. EMC - Endocrinologie 2, 50-76.
- **Treloar, A.F., Schabdach, D.G., Sansing, S., Keller, L.S.**, 1997. *Superovulation of New Zealand white rabbits by continuous infusion of follicle-stimulating hormone, using a micro-osmotic pump*. Lab Anim Sci 47, 313-316.
- **Trotnow, S., Al-Hasani, S., Sadtler, C.**, 1981. *Experience with in vitro fertilization of follicular rabbit oocytes and embryo transfer*. Arch Gynecol 231, 41-50.
- **Trounson, A.O., Willadsen, S.M., Rowson, L.E.**, 1977. *Fertilization and development capability of bovine follicular oocytes matured in vitro and in vivo and transferred to the oviducts of rabbits and cows*. J Reprod Fertil 51, 321-327.
- **Tsiligianni, T., Saratsi, A., Besenfelder, U., Anastasiadis, A., Vainas, E., Saratsis, P., Brem, G.**, 2004. *The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation*. Theriogenology 61, 989-995.
- **Tsutsumi, Y., Takeda, T., Yamamoto, K., Tanabe, Y.**, 1976. *Nonsurgical recovery of fertilized eggs from the vagina of oestrogen-treated rabbits*. J Reprod Fertil 48, 393-395.
- **Tsutsumi, Y., Terami, Y., Suzuki, H., Saito, S.**, 1979. *Effects of prostaglandin F2 $\alpha$  on egg recovery from the vagina and egg transport in superovulated rabbits*. Journal of the Faculty of Agriculture Hokkaido University 59, 312-321.
- **Tsutsumi, Y., Takada, T., Suzuki, H., Iwasaky, Y., Inada, K., Minami, T.**, 1980. *Peripheral serum levels of progesterone and prostaglandin F2 $\alpha$  during egg transport in superovulated rabbits*. Jap J Anim Reprod 26, 15-33.

**V**

- **Vajta, G.**, 2000. *Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals*. Anim Reprod Sci 60-61, 357-364.
- **Valojerdi, M.R., Salehnia, M.**, 2005. *Developmental potential and ultrastructural injuries of metaphase II (MII) mouse oocytes after slow freezing or vitrification*. J Assist Reprod Genet 22, 119-127.
- **Van Blerkom, J., Davis, P.W., Lee, J.**, 1995. *ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer*. Hum Reprod 10, 415-424.
- **Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Debauche, C., Standaert, V., Bollen, N., van Roosendaal, E., Vandervorst, M., Schoysman, R., Zech, N.**, 2003. *Vitrification of human blastocysts with the Hemi-Straw carrier: application of assisted hatching after thawing*. Hum Reprod 18, 1504-1511.
- **Varian, N.B., Maurer, R.R., Foote, R.H.**, 1967. *Ovarian response and cleavage rate of ova in control and FSH-primed rabbits receiving varying levels of luteinizing hormone*. J Reprod Fertil 13, 67-73.
- **Vicente, J.S., Garcia-Ximenez, F.**, 1993a. *Effect of recipient doe genotype on survival rate at birth of frozen rabbit embryos*. Reprod Nutr Dev 33, 229-234.
- **Vicente, J.S., Garcia-Ximenez, F.**, 1993b. *Effects of strain and embryo transfer model (embryos from one versus two donor does/recipient) on results of cryopreservation in rabbit*. Reprod Nutr Dev 33, 5-13.
- **Vicente, J.S., Garcia-Ximenez, F.**, 1994. *Osmotic and cryoprotective effects of a mixture of DMSO and ethylene glycol on rabbit morulae*. Theriogenology 42, 1205-1215.
- **Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P., Garcia, M.L.**, 1999. *In vivo survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein*. Reprod Nutr Dev 39, 657-662.
- **Vicente, J.S., Viudes-De-Castro, M.P., Garcia Mde, L., Baselga, M.**, 2003. *Effect of rabbit line on a program of cryopreserved embryos by vitrification*. Reprod Nutr Dev 43, 137-143.
- **Vieira, A.D., Mezzalira, A., Barbieri, D.P., Lehmkuhl, R.C., Rubin, M.I., Vajta, G.**, 2002. *Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes*. Cryobiology 45, 91-94.
- **Vincent, C., Pickering, S.J., Johnson, M.H.**, 1990. *The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocyte and is associated with a reduction in the number of cortical granules present*. J Reprod Fertil 89, 253-259.
- **Vincent, C., Garnier, V., Heyman, Y., Renard, J.P.**, 1989. *Solvent effects on cytoskeletal organization and in-vivo survival after freezing of rabbit oocytes*. J Reprod Fertil 87, 809-820.
- **Viudes-de-Castro, M.P., Garcia-Ximenez, F., Vicente, J.S.**, 1995. *Embryo recovery from eliminating does of the three selected rabbit strains for an embryo bank*. Inv Agrar: Prod Sanid Anim 10, 145-152.
- **Viudes-de-Castro, M.P., Moce, E., Vicente, J.S., Marco-Jimenez, F., Lavara, R.**, 2005. *In vitro evaluation of in vivo fertilizing ability of frozen rabbit semen*. Reprod Domest Anim 40, 136-140.
- **Viudes-de-Castro, M.P., Lavara, R., Marco-Jimenez, F., Cortell, C., Vicente, J.S.**, 2007. *Ovulation induced by mucosa vaginal absorption of buserelin and triptorelin in rabbit*. Theriogenology 68, 1031-1036.

**W**

- **Wang, Q., Sun, Q.Y.**, 2007. *Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors*. Reprod Fertil Dev 19, 1-12.
- **Wang, S., Tang, X., Niu, Y., Chen, H., Li, B., Li, T., Zhang, X., Hu, Z., Zhou, Q., Ji, W.**, 2007. *Generation and characterization of rabbit embryonic stem cells*. Stem Cells 25, 481-489.
- **Wang, W.H., Day, B.N.**, 2002. *Development of porcine embryos produced by IVM/IVF in a medium with or without protein supplementation: effects of extracellular glutathione*. Zygote 10, 109-115.
- **Wang, W.H., Keefe, D.L.**, 2002. *Spindle observation in living mammalian oocytes with the polarization microscope and its practical use*. Cloning Stem Cells 4, 269-276.

- Wang, W.H., Meng, L., Hackett, R.J., Keefe, D.L., 2001a. *Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination*. Hum Reprod 16, 1464-1468.
- Wang, W.H., Meng, L., Hackett, R.J., Odenbourg, R., Keefe, D.L., 2001b. *Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy*. Hum Reprod 16, 2374-2378.
- Wang, W.H., Meng, L., Hackett, R.J., Odenbourg, R., Keefe, D.L., 2001c. *The spindle observation and its relationship with fertilization after intracytoplasmic sperm injection in living human oocytes*. Fertil Steril 75, 348-353.
- Welch, S.A., Denniston, D.J., Hudson, J.J., Bruemmer, J.C., McCue, P.M., Squires, E.L., 2006. *Exogenous eFSH, Follicle Coasting, and hCG as a novel superovulation regimen in Mares*. J Equine Vet Sci 26, 262-270.
- Wessel, G.M., Brooks, J.M., Green, E., Haley, S., Vororina, E., Wong, J., Zaydfudim, V., Conner, S., 2001. *The biology of cortical granules*. Int Rev Cytol 209, 117-206.
- Whittingham, D.G., 1977. *Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at --196 degrees C*. J Reprod Fertil 49, 89-94.
- Wu, C., Rui, R., Dai, J., Zhang, C., Ju, S., Xie, B., Lu, X., Zheng, X., 2006. *Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes*. Mol Reprod Dev 73, 1454-1462.
- Wynn, P., Picton, H.M., Krapez, J.A., Rutherford, A.J., Balen, A.H., Gosden, R.G., 1998. *Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation*. Hum Reprod 13, 3132-3138.

## X

- Xu Jun, Qian Jufen, Zhang Yong, Wang Jianchen, 1990. *Experiments on in vitro capacitation of ejaculated sperm and in vitro fertilization in the rabbit*. Theriogenology 33, 260 [abstract].

## Y

- Yamamoto, M., Ooe, M., Kawaguchi, M., Suzuki, T., 1994. *Superovulation in the cow with a single intramuscular injection of FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone*. Theriogenology 41, 747-755.
- Yang, M.Y., Rajamahendran, R., 2002. *Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro*. Anim Reprod Sci 70, 159-169.
- Yaschine, T., Mena, F., Beyer, C., 1967. *Gonadal hormones and mounting behavior in the female rabbit*. Am J Physiol 213, 867-872.
- Yavin, S., Arav, A., 2007. *Measurement of essential physical properties of vitrification solutions*. Theriogenology 67, 81-89.
- Yin, X.J., Tani, T., Kato, Y., Tsunoda, Y., 2000. *Development of rabbit parthenogenetic oocytes and nuclear-transferred oocytes receiving cultured cumulus cells*. Theriogenology 54, 1469-1476.
- Yoshimura, Y., Nakamura, Y., Yamada, H., Ando, M., Ubukata, Y., Oda, T., Suzuki, M., 1991. *Possible contribution of prolactin in the process of ovulation and oocyte maturation*. Horm Res 35 Suppl 1, 22-32.

## Z

- Zenzes, M.T., Bielecki, R., Casper, R.F., Leibo, S.P., 2001. *Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes*. Fertil Steril 75, 769-777.



- 
- **Zheng, Y.L., Jiang, M.X., Zhang, Y.L., Sun, Q.Y., Chen, D.Y.**, 2004. *Effects of oocyte age, cumulus cells and injection methods on in vitro development of intracytoplasmic sperm injection rabbit embryos.* Zygote 12, 75-80.
  - **Zhou, J., Shu, H.B., Joshi, H.C.**, 2002. *Regulation of tubulin synthesis and cell cycle progression in mammalian cells by gamma-tubulin-mediated microtubule nucleation.* J Cell Biochem 84, 472-483.

# **Annexes**

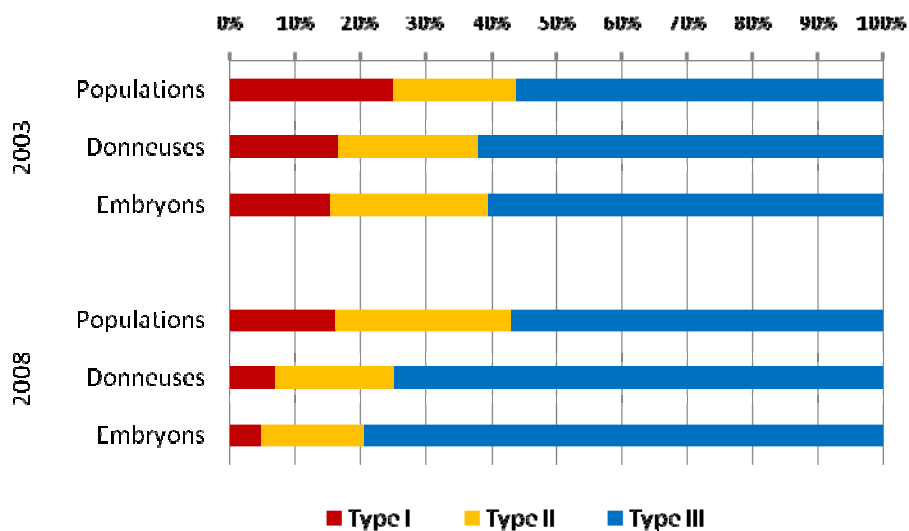
## **Annexe 1. Etats des collections de la Cryobanque Nationale cunicole au 1<sup>er</sup> mai 2008 et importance des différents types de populations cryoconservées**

Au 1<sup>er</sup> mai 2008, 56 populations de lapins étaient cryoconservées et stockées sur les différents sites de la Cryobanque Nationale représentant près de 20 000 embryons congelés :

Type de population	Génotype	Code	Nb paillettes	Nb femelles	Nb embryons		
I	Race standard	Argenté de Champagne	ARG	4	4	38	
		Blanc de Vienne	BDV	15	14	94	
		Chamois de Thuringe	CDT	7	4	38	
		Chinchilla	CHC	17	14	110	
		Fauve de Bourgogne	FDB	2	2	9	
		Russe	HYM	22	16	149	
		Lièvre belge	LB	1	1	15	
		Papillon Anglais	PAP	29	19	248	
	Race menacée	Brun Marron de Lorraine	BML	22	17	169	
II	Un génotype particulier	Albinos Rex	ALB Rex	16	16	101	
		INRA 1077 PRP	ALF	38	27	627	
		Angora	ANG	41	24	409	
		Orylag noir	CEO	9	9	59	
		Lapins allotypés (Wynn <i>et al.</i> ) K	CH-K	8	6	72	
		Lapins allotypés (Wynn <i>et al.</i> ) L	CH-L	2	2	10	
		Lapins allotypés (Wynn <i>et al.</i> ) M	CH-M	23	21	166	
		Chinchilla Rex	CH Rex	21	21	128	
		Lignées HYPER	HYP	80	78	758	
		Lapines histocompatibles	HFR	1	1	13	
		Lapins histocompatibles SPF/EOPS	HIS	17	10	171	
		Lapines histocompatibles	∅	12	10	97	
		Russe (Typage mitochondrie)	RUS	3	3	20	
		Un gène	Lapins sauteurs d'Alfort	SAM	17	7	165
			Lapins verts GFP – INRA Jouy	VIG	18	13	297
	III	Lignée ♀	INRA 1601	1601	18	14	188
Souche INRA A1077			A1	18	14	162	
INRA 2066			CAL	46	46	509	
INRA 4089 Dutch Petit Russe			DPR	31	31	239	
Lignée femelle GRIMAUD AGP11			GDF	40	24	445	
INRA 9077			HDR	54	54	368	
GD22 (3 <sup>ème</sup> génération de sélection)			HOM	39	30	432	
AGP 22 GRIMAUD			HUR	55	32	657	
INRA 2666			JMB	35	33	365	
Lignée femelle GRIMAUD 77x59			JOL	39	26	471	
AGP 07 GRIMAUD			LUC	101	57	1636	
INRA 3889			PF	36	36	330	
INRA 1001			RET	94	70	1138	
INRA 2066			SAN	50	48	526	
AGP 77 GRIMAUD			SOP	57	36	860	
INRA 9077			TEM	1	1	8	

Type de population	Génotype	Code	Nb paillettes	Nb femelles	Nb embryons	
	INRA 1077 (33 <sup>ème</sup> gén. de sélection)	UNV	62	62	646	
	Lignée ♂	AGP 59 GRIMAUD	EMA	16	10	237
		AGP 49 GRIMAUD	JAN	21	14	277
		AGP 38 GRIMAUD	PRO	77	47	1051
		AGP 40 GRIMAUD	SAP	58	41	834
		AGP 79 GRIMAUD	VNS	71	43	935
	Lignée Phanère	Orylag chinchilla 1259	AUV	28	21	331
		Orylag castor 1995	CAR	41	33	388
		Orylag castor 5555	CAS	46	45	316
		Orylag chinchilla 1257	CHN	26	26	212
		Orylag chinchilla 1229	CLA	45	32	451
		Orylag castor 2005	CTR	48	36	448
		Orysatine Chinchilla	GRI	13	10	188
		Laghamere 9577	LAG	14	13	104
		Orysatine Castor	SAT	23	18	306
Orylag chinchilla 1257		VIN	31	19	492	
<b>TOTAL</b>	<b>56 populations</b>	-	<b>1759</b>	<b>1361</b>	<b>19513</b>	

Figure 25. Evolution des proportions de type I, II et III entre 2003 et 2008 par rapport au nombre de populations, de donneuses et d'embryons stockés à la Cryobanque Nationale



Dès la mise en place de la Cryobanque Nationale lapin, les collections regroupaient principalement des populations de type III et cette tendance s'est accentuée après 5 ans d'actions de cryoconservation.

## Annexe 2. Tableau comparatif des différentes méthodes de cryoconservation de l'ovocyte MII de lapin

	Al Hasani <i>et al.</i> (1986b)	Diedrich <i>et al.</i> (1988)	Vincent <i>et al.</i> (1989)	Siebzehruebl <i>et al.</i> (1989)	Al Hasani <i>et al.</i> (1989)	Cai <i>et al.</i> (2005)
<b>Méthode</b>	congélation lente	congélation lente	congélation lente	congélation lente	congélation lente	vitrification par cryoloop
<b>Objectif(s)</b>	Congélation d'ovocytes collectés à 6, 9 ou 12h après induction d'ovulation	Congélation d'ovocytes collectés à 6, 9 ou 13h après induction d'ovulation	Congélation d'ovocytes avec du 1,2-PROH ou du DMSO et effet sur l'ultrastructure et la survie <i>in vivo</i>	Congélation d'ovocytes en 1 vs. 6 étapes et selon différentes cinétiques	Congélation, FIV et transfert sur ♀ receveuses à: 6h, 12h et 18h d'asynchronisation	Vitrification dans DMSO (40%), DMSO+EG (20% + 20%) ou DMSO+EG ac VitMaster
<b>Collecte des ovocytes</b>	6, 9 (ponction) ou 12 (perfusion) heures post LH	6, 9 (ponction) ou 13 (perfusion) heures post LH	12h p.c. sur ♀ superovulées	Ovocytes folliculaires... VG ou MII ?	13h post hCG	14 à 15h post hCG sur ♀ superovulées
<b>Hyaluronidase</b>	Non	Non	Oui (0.5%)	Non renseigné	Non (denudage mécanique)	Oui (300 UI/ml)
<b>Cryoprotecteur(s)</b>	DMSO	DMSO	Propylène glycol (PG) ou DMSO	DMSO / sucrose ou PG / sucrose	Propylène glycol (PG)	EG / DMSO / Tréhalose
<b>Milieu de base</b>	Ham's F10 + 10% FCS	Non renseigné	PBS + 10% FCS	DPBS + 10% FCS	PBS	HTCM199 + 20% FCS
<b>Ajout des cryoprotecteurs</b>	<u>Congélation (à T<sub>amb</sub>):</u> - 15' ds 0.5M DMSO - 15' ds 1.0M DMSO - 30' ds 1.5M DMSO	<u>Congélation (à T<sub>amb</sub>):</u> 10' ds DMSO en 3 étapes jusqu'à une concentration de 1,5M	<u>Congélation (à T<sub>amb</sub>):</u> - 30' ds 1.5M cryo - 5' ds 2.0M cryo + 0,5M sucrose	(1) <u>1<sup>er</sup> protocole congél. (à 37°C):</u> - 5' ds 0.25M cryo - 5' ds 0.50M cryo - 5' ds 0.75M cryo - 5' ds 1.0M cryo - 5' ds 1.25M cryo - 20' ds 1.5M cryo (2) <u>2<sup>ème</sup> protocole congél. (à 37°C):</u> - 15' ds 1.5M cryo - 5' ds 1.5M cryo + 0.1M sucrose	<u>Congélation (à T<sub>amb</sub>):</u> - 10' ds 1.5M PG - 10' ds 1.5M PG + 0,1M sucrose	<u>Vitrification (à 37°C):</u> - 2' ds 10% DMSO + 10% EG - 35 s ds 20% DMSO + 20% EG + 10mg/ml Ficoll70 + 0,65M Tréhalose
<b>Cinétique de refroidissement</b>	1°C/min (T <sub>amb</sub> à -3°C), 0,3°C/min (-3 à -7°C), seeding, 5min équilibration, 0,3°C/min (jusqu'à -30°C), LN <sub>2</sub> .	1°C/min (T <sub>amb</sub> à -3°C), 0,3°C/min (-3 à -7°C), seeding, 0,3°C/min (jusqu'à -33°C), LN <sub>2</sub> .	Ovocytes à T <sub>amb</sub> directement congelés à -25°C pendant 90min avant plongée dans LN <sub>2</sub> .	0.1°C/min jusqu'au seeding puis 0.3°C/min jusqu'à -35, -70 ou -80°C. Eventuellement, dernière étape jusqu'à -110°C à 10°C/min avant plongée dans LN <sub>2</sub> .	1°C/min (T <sub>amb</sub> à -3°C), 0,3°C/min (-3 à -7°C), seeding, 5min équilibration, 0,3°C/min (jusqu'à -33°C), LN <sub>2</sub> .	Plongée directement dans LN <sub>2</sub>

	<b>Al Hasani et al. (1986b)</b>	<b>Diedrich et al. (1988)</b>	<b>Vincent et al. (1989)</b>	<b>Siebzehruebl et al. (1989)</b>	<b>Al Hasani et al. (1989)</b>	<b>Cai et al. (2005)</b>
<b>Cinétique de réchauffement</b>	Bain marie à 15°C jusqu'à dissolution des cristaux	bain marie à 20°C	Immersion dans bain marie à 37°C	Décongélation à 8 (congélateur), 50 (Stambaugh et al.) ou 500°C/min (bain à 37°C)	40 s ds air ambiant puis 30 s dans bain marie à 30°C	Dévitricification directement ds milieu à 37°C
<b>Retrait des cryoprotecteurs</b>	- 10' ds 1.25M DMSO - 10' ds 1.0M DMSO - 10' ds 0.75M DMSO - 10' ds 0.5M DMSO - 10' ds 0.25M DMSO	Retrait progressif	- 10' ds 0.5M sucrose - 5' ds 0.25M sucrose - 5' ds 0.05M sucrose	(1) <u>Décongélation en 6 étapes (à 37°C)</u> : 6 bains de 5' ds [ cryo] décroissantes (2) <u>Décongélation en 3 étapes</u> : - 5' ds 1.0M PG + 0.2M sucrose - 5' ds 0.5M PG + 0.2M sucrose - 5' ds 0.2M sucrose	- 5' ds 1.0M PG + 0.2M sucrose - 5' ds 0.5M PG + 0.2M sucrose - 5' ds 0.2M sucrose	- 5' ds 0.5M Tréhalose - 5' ds 0.3M Tréhalose - 5' ds 0.1M Tréhalose
<b>Durée de culture avant évaluation</b>	Tps de culture ≠ en fct collecte (14, 7 ou 4h)	≠ tps de culture non précisés	1h maximum	1h30 CIV	Non renseigné	2h CIV
<b>Evaluation ovocytaire</b>	- <u>Morphologie</u> : 5, 20 et 29% - <u>Marquage chromosomes</u> : 100, 53 et 97% - <u>Viabilité ovocytaire</u> : 96% - <u>Tx fécondation après FIV</u> : 60% - <u>Tx blastocyste à J5 après FIV</u> : 6%	- <u>Morphologie</u> : 5, 20 et 29% - <u>Marquage chromosomes</u> : 14, 53 et 96% - <u>Viabilité ovocytaire</u> : 100, 100 et 91% - <u>Tx fécondation après FIV</u> : 60% - <u>Tx blastocyste à J5</u> : 16%	- <u>Morphologie</u> : 83%. - <u>Ultrastructure (actine, microtubules, Xmes)</u> : pas de chiffres mais DMSO>1,2-PROH - <u>Tx de dvpt après transfert ds ♀ receveuses accouplées 9h avant (PROH seulement)</u> : 39% fécondés à 24h (vs. 81% en frais), 31% de morula après CIV (vs. 75%), 9% de foetus au 25 <sup>ème</sup> j. de gest. (vs. 32%)	- <u>Morphologie</u> : 90% au mieux avec PROH ajouté en une seule étape et congélation contrôlée jusqu'à -110°C.  - <u>Tx de dvpt après FIV (37°C, 90% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>)</u> : 75% au mieux avec DMSO ajouté en 6 étapes et congélation contrôlée jusqu'à -70°C.	- <u>Morphologie</u> : 32% - <u>Tx fécondation après FIV</u> : 74% - <u>Tx de clivage</u> : 61% - <u>Tx d'implantation à J15</u> : 18, 0, 11% - <u>Tx de foetus à J15</u> : 12, 0, 11% - <u>Nb de lapereaux nés</u> : 2 (12%), 0, 2 (11%).	- <u>Morphologie</u> : 79, 83 et 82% - <u>Confocal (microtubules et Xmes)</u> : 30, 27 et 63% fuseaux normaux (vs.77% en frais) - <u>ICSI</u> : 6, 15 et 10% (vs.79%) - <u>Tx fécondation</u> : 0, 47 et 75% (vs. 83%) - <u>Tx clivage (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)</u> : 0, 19 et 37% (vs 64%)

### **Annexe 3. Détails des calculs des coûts de production et de transfert d'embryons selon différentes techniques**

Toutes les montants présentés sont exprimés en euro (€) hors-taxes à partir des tarifs 2008.

(1) *Coûts de préparation d'une femelle superovulée, hors coûts d'entretien (alimentation, hébergement...)* : **5,86€**

Coût du traitement hormonal :	4,63€
Coût de l'induction d'ovulation :	0,33€
Coût de l'insémination artificielle :	0,90€

(2) *Coûts de collecte des embryons sur une femelle superovulée (20 embryons par lapine)* :

**Euthanasie : 0,33€ par femelle soit 0,02€ par embryon**

**Cœlioscopie : 8,88€ par femelle soit 0,44€ par embryon**

<b>Euthanasie</b>		<b>Cœlioscopie</b>	
1 boîte de pétri	0,08€	Anesthésiques	2,53€
Seringue 10ml	0,07€	Aiguille injection	0,02€
20ml d'Euroflush	0,18€	Seringue 2ml	0,02€
		Hexanios	0,50€
		Vétédine/alcool	0,34€
		2 boîtes de pétri	0,16€
		Seringue 10ml	0,07€
		40ml d'Euroflush	0,36€
		Catheter Introcan	1,90€
		Aiguille à épidurale	2,91€
		2 agrafes de michel	0,07€

(3) *Coûts techniques pour la collecte d'embryons [= (1) + (2)]* :

**Euthanasie : 6,18€ par femelle soit 0,3€ par embryon**

**Cœlioscopie : 14,74€ par femelle soit 0,7€ par embryon**

(4) Coûts techniques pour le transfert des embryons (10 embryons transférés par lapine receveuse) :

**Euthanasie : 7,77€ par femelle receveuse soit 0,78€ par embryon**

**Cœlioscopie : 5,69€ par femelle soit 0,57€ par embryon**

<b>Laparotomie</b>		<b>Cœlioscopie</b>	
Anesthésiques	2,53€	Anesthésiques	2,53€
Vétédine/alcool	0,34€	Vétédine/alcool	0,02€
Aiguille injection	0,04€	Aiguille injection	0,04€
Seringue 2ml	0,02€	Seringue 2ml	0,02€
Lame de scalpel	0,06€	Hexanios	0,50€
Gants stériles	0,50€	Lame de scalpel	0,06€
Capillaire de transfert	0,28€	Catheter Introcan	1,90€
Fil de suture	4,00€	Capillaire de transfert	0,28€
		Agraphe de Michel	0,04€



## Liste des illustrations

### TABLEAUX

Tableau 1.	Localisation des sites de stockage secondaires pour les espèces domestiques impliquées dans la Cryobanque Nationale.....	16
Tableau 2.	Essais de superovulation avec des traitements à base de FSH .....	45
Tableau 3.	Essais de superovulation avec des traitements à base d'hMG .....	46
Tableau 4.	Essais de superovulation avec des traitements à base d'eCG/PMSG .....	46
Tableau 5.	Essais de fécondation in vitro chez le lapin * .....	77
Tableau 6.	Influence du traitement de synchronisation sur la réponse ovarienne des lapines des lots T, pFSH+pLH et pFSH. ....	85
Tableau 7.	Influence du traitement de superovulation (3 niveaux) et du génotype (5 niveaux) sur différents paramètres de production d'embryons. ....	87
Tableau 8.	Evaluation in vivo de la viabilité des embryons congelés/décongelés et après transfert dans des femelles receveuses synchronisées pour chaque traitement étudié. ....	89
Tableau 9.	Influence du mode d'administration de la pFSH (5 niveaux) sur la réponse ovarienne des lapines .....	95
Tableau 10.	Influence du mode d'administration de la pFSH (5 niveaux) sur différents paramètres de production d'embryons. ....	97
Tableau 11.	Influence du traitement de synchronisation sur la réponse ovarienne des lapines superovulées. ....	102
Tableau 12.	Influence du traitement de synchronisation (2 niveaux) et du génotype (4 niveaux) sur différents paramètres de production d'embryons. (Mean ± Standard error) .....	103
Tableau 13.	Influence du moment de l'IA par rapport au sevrage sur la réponse ovarienne des lapines des lots « j-3 », « J 0 » et « J + 10 ». ....	108
Tableau 14.	Influence du moment de l'IA par rapport au sevrage (3 niveaux) sur différents paramètres de production d'embryons. ....	109
Tableau 15.	Comparaison des coûts de production et de transfert hors taxes d'un embryon de lapin par coelioscopie et par les méthodes traditionnelles.....	113
Tableau 16.	Taux de parturition et de survie embryonnaire après transfert par laparotomie ou coelioscopie d'embryons frais ou congelés.....	114
Tableau 17.	Développement parthénogénétique à 24 et 102 h des ovocytes incubés frais, exposés aux milieux de vitrification et exposés aux milieux de congélation après 2 h de CIV .....	128

Tableau 18.	Développement parthénogénétique à 24 et 102 h des ovocytes frais, vitirifiés et congelés après 2 h de CIV.....	130
Tableau 19.	Configuration du réseau de filaments d'actine des ovocytes vitirifiés et congelés après 2 h de CIV et des ovocytes frais.....	135
Tableau 20.	Configuration du fuseau de microtubules et de la plaque métaphasique des ovocytes vitirifiés et congelés après 2 h de CIV et des ovocytes frais .....	137

## FIGURES

Figure 1.	Exemples de populations de types I, II et III chez le lapin. ....	18
Figure 2.	Comparaison du déroulement de l'ovogenèse chez les mammifères .....	24
Figure 3.	Schématisation de la dynamique des vagues folliculaires chez la lapine .....	28
Figure 4.	Schématisation du déroulement de la folliculogenèse chez la lapine .....	29
Figure 5.	Comportement sexuel et durée d'œstrus chez des lapines nullipares .....	32
Figure 6.	Schématisation du développement embryonnaire chez le lapin.....	38
Figure 7.	Évolution de la production laitière de lapines simplement allaitantes ou simultanément gestantes et allaitantes .....	41
Figure 8.	Les différentes voies de cryoconservation des ressources génétiques animales .....	57
Figure 9.	Protocole de superovulation des femelles donneuses d'embryons .....	81
Figure 10.	Schématisation du montage des embryons en paillettes avant congélation .....	83
Figure 11.	Effet du génotype sur le nombre d'embryons de mauvaise qualité produits par femelle donneuse pour chaque traitement étudié.....	88
Figure 12.	Effet de la parité sur le nombre d'embryons de bonne qualité collecté par femelle donneuse pour chaque traitement étudié.....	88
Figure 13.	Schématisation des protocoles de superovulation utilisant différents excipients et modes d'administration .....	94
Figure 14.	Protocole de synchronisation préalable au traitement de superovulation des lapines ... .....	101
Figure 15.	Variation du nombre d'embryons de bonne qualité produits par les lapines témoins et synchronisées .....	104
Figure 16.	Schématisation de la préparation des femelles des groupes J-3, J0 et J+10 par rapport au jour du sevrage.....	107
Figure 17.	Réaction bioluminescente permettant le dosage de l'ATP intraovocytaire .....	117

Figure 18.	Courbe étalon expérimentale entre le signal lumineux mesuré et la quantité d'ATP présente .....	118
Figure 19.	Quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais après 0, 1, 2 et 3h d'incubation sur platine chauffante équilibrée à 37°C. ....	121
Figure 20.	Quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais et après 2h d'incubation à 7 et 23°C sous atmosphère non contrôlée et à 38°C, 5 % de CO <sub>2</sub> et atmosphère humidifiée. ....	121
Figure 21.	Quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais, congelés et vitrifiés après 0, 1, 2 et 3 h d'incubation à 38°C, 5 % de CO <sub>2</sub> et sous atmosphère humide.....	122
Figure 22.	Quantité d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais et après exposition aux milieux de congélation/décongélation et vitrification/dévitrication .....	127
Figure 23.	Comparaison des quantités d'ATP intracellulaire des ovocytes MII de lapines frais et congelés et vitrifiés après 2 h d'incubation à 38°C, 5 % de CO <sub>2</sub> et sous atmosphère humide .....	129
Figure 24.	Photographies d'ovocytes MII de lapin observés en microscopie confocale (X75) après immunomarquage des filaments d'actine (bleu), des chromosomes (rouge) et du fuseau de microtubules (vert).....	136
Figure 25.	Evolution des proportions de type I, II et III entre 2003 et 2008 par rapport au nombre de populations, de donneuses et d'embryons stockés à la Cryobanque Nationale .....	171

## PHOTOS

Photo 1.	Collecte d'embryons post-mortem .....	51
Photo 2.	Collecte d'embryons sous coelioscopie .....	51
Photo 3.	Transfert d'embryons par laparotomie.....	53
Photo 4.	Transfert d'embryons sous coelioscopie .....	53
Photo 5.	Structures ovariennes d'une lapine superovulée ayant ovulée .....	82
Photo 6.	Appréciation morphologique de la qualité des ovocytes collectés et isolés .....	116

# Liste des publications

## ARTICLES DANS DES REVUES INTERNATIONALES

- **Salvetti, P., Theau-Clément, M., Beckers, J.-F., Hurtaud, J., Guérin, P., Neto, V., Falières, J., Joly, T., 2007c.** *Effect of the luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does.* Theriogenology 67, 1185-1193.
- **Salvetti, P., Buff, S., Daniel, N., Guérin, P., Joly, T., 2008b.** *Structural, metabolic and developmental evaluation of ovulated rabbit oocytes before and after cryopreservation by vitrification and slow freezing.* Fertility and Sterility (soumis).

## ARTICLES DE VULGARISATION

- **Joly, T., Salvetti, P., Neto, V., Daniel, N., Renard, J.P., 2008a.** *La cryoconservation des ressources génétiques chez le lapin.* Biofutur 287, 24-27.

## COMMUNICATIONS ORALES AVEC ACTES

- **Boucher, S., Menigoz, J.J., Salvetti, P., Joly, T., Arnold, J., Hurtaud, J., 2007.** *Comparaison phénotypique de lapins de race Brun Marron de Lorraine issus d'embryons congelés en 1992 avec des lapins de la même population vivant en 2007,* 12èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans (France), pp. 137-140.
- **Neto, V., Guérin, P., Salvetti, P., Lefranc, A.C., Buff, S., Joly, T., 2007a.** *Autogreffe de tissu ovarien cryoconservé: bilan et perspectives d'utilisations,* 12èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans (France), pp. 27-28 novembre 2007.
- **Neto, V., Joly, T., Salvetti, P., Lefranc, A.C., Corrao, N., Guérin, P., Buff, S., 2007b.** *Ovarian tissue cryopreservation in the doe rabbit: from freezing to birth,* CRYO 2007: The 44th Annual Meeting of The Society for Cryobiology Lake Louise (Canada), p. 46.
- **Salvetti, P., Allain, D., Bolet, G., Hurtaud, J., Boucher, S., Joly, T., 2008a.** *La Cryobanque Nationale Lapin: un outil de gestion dynamique des ressources génétiques cunicoles,* 7ème colloque national "Ressources Génétiques", Strasbourg (France) (sous presse).
- **Salvetti, P., Guérin, P., Joly, T., 2008b.** *Effect of cryopreservation on ATP content of ovulated rabbit oocytes,* 9th World Rabbit Congress, Verona (Italie), pp. 449-453.
- **Salvetti, P., Guérin, P., Theau-Clément, M., Hurtaud, J., Beckers, J.F., Joly, T., 2007a.** *Essais d'amélioration de la production d'embryons chez la lapine,* 12èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans (France), pp. 41-44.
- **Theau-Clément, M., Salvetti, P., Bolet, G., Bodin, L., Garreau, H., Falières, J., Joly, T., 2007.** *Influence de l'intervalle entre le sevrage et le début d'un traitement de superovulation sur la production d'embryons et leur qualité chez la lapine,* 12èmes Journées de la Recherche Cunicole, Le Mans (France), pp. 37-39.

## POSTERS

- **Salvetti, P., Joly, T., Renard, J.P., 2007b.** *Viability of rabbit embryos after 14 years storage in liquid nitrogen,* CRYO 2007: The 44th Annual Meeting of The Society for Cryobiology Lake Louise (Canada), p. 55.

**TITRE** : Production des embryons et cryoconservation des ovocytes chez la lapine : Application à la gestion des ressources génétiques.

**RESUME** : Aujourd'hui, la congélation de l'embryon est la voie privilégiée pour la cryoconservation des ressources génétiques lapin au sein de la Cryobanque Nationale. Les objectifs de notre travail étaient d'optimiser la production des embryons et de développer une nouvelle voie de cryoconservation des ovocytes MII de lapin par congélation lente et par vitrification. Les expériences menées sur les traitements de superovulation et de synchronisation ainsi que sur le moment d'insémination par rapport au sevrage montrent que les conditions d'environnement des lapines sont plus importantes que la nature des traitements administrés. De plus, l'évaluation du métabolisme, de la structure et de la capacité de développement ovocytaire après réchauffement suggère que la vitrification et la congélation lente altèrent fortement les ovocytes par des lésions associées respectivement à leur importante sensibilité aux cryoprotecteurs et à la cristallisation intracellulaire.

**MOTS-CLES** : Cryoconservation, ressources génétiques, Cryobanque Nationale, lapin, embryon, ovocyte, cœlioscopie.

**TITLE**: Production of embryos and cryopreservation of oocytes in rabbit species: Application to the management of genetic resources.

**ABSTRACT**: Nowadays, embryos' freezing is the main way to cryopreserve the rabbit genetic resources in the National Cryobank. The objectives of our work were to improve the embryos production and to develop the cryopreservation of MII rabbit oocytes by slow freezing and vitrification. Experiments performed on superovulation and synchronization treatments and also on timing between weaning and insemination show that the breeding conditions of the does are more important than the administrated treatments themselves. Moreover, the evaluation of the metabolism, the structure and the capacity of development of thawed oocytes suggest that vitrification and slow freezing strongly impair the oocytes by injuries associated respectively with their high sensitivity to the cryoprotectants and to the intracellular crystallization.

**KEY-WORDS**: Cryopreservation, genetic resources, National Cryobank, rabbit, embryo, oocyte, cœlioscopy.

**DISCIPLINE**: Biotechnologies de la reproduction

**ADRESSE DU LABORATOIRE**: Université de Lyon, France ; Unité CRYOBIO, UPSP ENVL/ISARA-Lyon ; 1 avenue Bourgelat ; 69280 Marcy l'Etoile – France.