

PROCRÉATION ASSISTÉE CHEZ LES CERVIDÉS : RÉSULTATS, LIMITES ET PERSPECTIVES

ASSISTED REPRODUCTION IN CERVIDS : RESULTS, LIMITS AND PROSPECTS

Par Xavier LEGENDRE et Yann LOCATELLI⁽¹⁾
(communication présentée le 7 février 2008)

RÉSUMÉ

Les biotechnologies de la reproduction pourraient permettre de faciliter la conservation *ex-situ* d'espèces de cervidés menacées d'extinction. La constitution de banques de semences ou d'embryons congelés a en effet été proposée pour conserver et permettre l'échange de matériel génétique entre les sites de conservation. Certaines méthodologies comme la congélation de la semence ont été facilement transposées des petits ruminants domestiques aux cervidés et pourraient être appliquées aux espèces rares. En revanche, la création de banque d'embryons congelés chez les cervidés s'est révélée plus délicate à développer. La stratégie basée sur la production d'embryons *in vitro* est potentiellement la plus efficace mais requiert encore d'importantes mises au point techniques.

Mots-clés : espèces menacées, biotechnologies, fécondation *in vitro*, semence, embryon.

SUMMARY

Reproductive biotechnologies may help ex-situ conservation programs for endangered cervid species. The creation of banks of frozen semen or frozen embryos was suggested to store and exchange genetic material between conservation sites. Some methods developed for domestic small ruminants, such as sperm freezing, were easily adapted to cervid species and may be applied to rare species. However, the transfer of technologies required to create banks of frozen embryos in cervids is not as straightforward. The strategy based on in vitro production of embryos is potentially the most effective, but there are still major technical hurdles to overcome.

Key words : endangered species, biotechnologies, in vitro fertilization, semen, embryo.

(1) Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), DPBZ, Réserve de la Haute Touche, 36290 Obterre. Contact : yloca@mnhn.fr

INTRODUCTION

Le taux d'extinction d'espèces animales et végétales a anormalement augmenté ces dernières années et nous traversons actuellement une sixième crise d'extinction d'espèces. Il est désormais clairement établi que cette extinction massive fragilisant les écosystèmes et notamment les zones de mégadiversité, résulte des activités humaines (Ceballos & Ehrlich, 2002). Les causes les plus évidentes de ces disparitions sont la destruction et la fragmentation de l'habitat, les conflits géopolitiques, l'introduction de compétiteurs exotiques, la surexploitation ou encore la pollution. La conservation *in-situ* d'espèces, fondée principalement sur la protection ou la restauration de l'habitat, constitue une solution idéale mais n'est souvent pas réalisable à court terme pour enrayer le déclin de populations. La conservation *ex-situ* présente une alternative pour préserver les espèces menacées dans les cas précis où les stratégies mises en place *in situ* ne sont pas envisageables à court terme. Généralement, les programmes conservatoires *ex-situ* concernant les mammifères consistent à élever en captivité des groupes d'individus jusqu'à obtenir une population stable. Cette population captive doit également présenter un maximum de la variabilité génétique de l'espèce concernée, en vue d'une hypothétique réintroduction dans le milieu naturel. Les différentes espèces que compte la famille des cervidés, reflètent une extraordinaire capacité d'adaptation à leur environnement (Whitehead 1993; Asher *et al.* 1999). Parmi plus de deux cent sous-espèces de cervidés, une quarantaine figure sur la liste rouge de l'IUCN (source IUCN). Nos travaux visent à développer des outils biotechnologiques permettant de faciliter la réalisation des programmes conservatoires *ex-situ* chez ces cervidés menacés d'extinction. Dans un premier temps, des cervidés communs, tels que le cerf sika du Japon (*Cervus nippon nippon*) ou le cerf élaphe (*Cervus elaphus*), ont été choisis comme modèles pour mettre au point les méthodologies (collecte de semence, d'ovocytes, fécondation *in vitro*...), qui pourront ensuite être transférées aux espèces menacées.

ASPECTS MÂLE : COLLECTE ET CONGÉLATION DE SEMENCE

La collecte de semence à l'aide du vagin artificiel, développée chez les ruminants domestiques, n'est pas applicable aux cervidés en raison de leur caractère sauvage. Cependant, des exceptions ont été observées, puisque de telles collectes ont été réalisées à condition d'utiliser des femelles en chaleur pour stimuler des rennes, élans, ou élaphe mâles (Dott & Utsi, 1971; Krzywinski 1976; 1985). Chez les cervidés, la technique préférentiellement utilisée est celle de l'électro-éjaculation après anesthésie. En fonction de l'espèce considérée, il convient de pratiquer les collectes durant la saison sexuelle, afin d'augmenter les chances de récolter des éjaculats de bonne qualité. L'électro-éjaculation appliquée au cerf sika pendant la période d'octobre à décembre, sous nos latitudes, permet d'obtenir de 0,5 à 1,1 ml de semence contenant 0,5 à 5 x 10⁹ spermatozoïdes/ml

(Locatelli & Mermillod, 2005). La plupart des éjaculats supportent bien la congélation en dépit de la variabilité de leur volume et de leur concentration. Il est également possible de collecter *post mortem* la semence épидидymaire, en procédant à la rétroperfusion de la région caudale de l'épididyme, très concentrée en spermatozoïdes. Le fluide épидидymaire assure une fonction de protection/préservation de la motilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes, qui rend cette semence particulièrement intéressante en vue de la cryopréservation.

Les méthodes de congélation de la semence de cervidés ne diffèrent pas de celles utilisées chez les petits ruminants domestiques. Elles consistent à diluer la semence dans des dilueurs composés majoritairement de tris, de citrate ou de lactose, supplémentés par du jaune d'œuf (20 %). La température de la semence, fraîchement collectée et diluée, peut ainsi être progressivement abaissée à 4 °C à la vitesse de 0,18 à 0,25 °C par minute. La seconde dilution, généralement à base de lait enrichi en glycérol (5 à 8 %), permet d'obtenir une concentration finale de 200 x 10⁶ spz/ml. La semence est ensuite conditionnée en paillettes de 0,25 ml, congelées dans les vapeurs d'azote. Ces méthodes ont été appliquées avec succès à de nombreuses espèces de cervidés telles que le cerf du père David, le cerf axis ou encore le cerf d'Eld (Asher *et al.* 2000).

ASPECTS FEMELLE : SYNCHRONISATION ET STIMULATION DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE ET COLLECTE D'OVOCYTES

Chez la plupart des espèces de cervidés, les femelles sont mono-ovulantes : un seul follicule, dit dominant, atteint le stade ovulatoire à chaque cycle ovarien. À l'instar des petits ruminants domestiques, la synchronisation de l'œstrus et de l'ovulation repose sur l'administration de traitements progestagènes (éponges intra-vaginales d'acétate de fluorogestone) pendant une douzaine de jours, associés à l'administration d'analogues de prostaglandines, afin de provoquer la lutéolyse d'un éventuel corps jaune. Le retrait de l'implant entraîne la chute rapide des progestagènes et, en l'absence de corps jaune fonctionnel, la rétroaction négative qu'imposaient les progestagènes ne s'exerce plus, ce qui autorise la libération de l'hormone hypophysaire folliculo-stimulante ou FSH. L'émergence d'un follicule dominant assure l'augmentation des concentrations plasmatiques d'oestradiol et par rétroaction positive, la décharge ovulante de l'hormone lutéinisante (LH). Il est aussi possible d'augmenter artificiellement le nombre de follicules de grande taille en croissance, ainsi que le nombre d'ovulations en administrant des hormones gonadotropes purifiées comme la FSH ovine.

Chez les cervidés, les méthodes de « production *in vivo* » d'embryons faisant appel à la superovulation, l'insémination et la collecte chirurgicale se sont révélées décevantes. Les réponses ovulatoires et les taux de fécondation obtenus sont très inconstants, plutôt de type tout ou rien. Ces collectes requièrent une laparotomie et sont, de fait, difficilement répétables sans nuire à la



Figure 1 : Vue de l'ovaire, par endoscopie, au cours de la ponction de follicules chez la biche sika du Japon (Cliché Locatelli/MNHN).

capacité de reproduction de la femelle. Aussi, est-il préférable de collecter les ovocytes immatures par aspiration des follicules ovariens et de procéder à la production *in vitro* des embryons (voir infra). Les aspirations folliculaires sont réalisées après synchronisation et stimulation des vagues de croissance folliculaire sous anesthésie générale et sous contrôle endoscopique ou LOPU (Laparoscopic Ovum Pick-Up). Une pince atraumatique de préhension permet de mobiliser le tractus génital ainsi que les ovaires, tandis qu'une aiguille de ponction permet d'aspirer les follicules contenant les ovocytes (**figure 1**). Chez la biche sika, après synchronisation et administration de 0,5 UI de FSH (Ovagen, Bodinco), il est possible de ponctionner en

moyenne entre 5 et 10 follicules par femelle et par séance durant la saison sexuelle. La technique de LOPU permet un taux de collecte des complexes cumulus-ovocytes, supérieur à 50 % et offre l'avantage de pouvoir être répétée car elle est peu invasive (Locatelli *et al.* 2006).

PRODUCTION *IN VITRO* ET TRANSFERT D'EMBRYONS

La technique de production d'embryons *in vitro* (PIV, **figure 2**) comprend trois étapes. La première est la maturation *in vitro* (MIV) des complexes cumulus-ovocyte, durant laquelle, l'ovocyte, sorti de son contexte folliculaire et placé dans un milieu approprié, va reprendre sa méiose (maturation nucléaire) pour atteindre le stade de métaphase II. Au cours de cette étape, de nombreux transcrits essentiels au développement embryonnaire (ou transcrits maternels) vont être accumulés dans le cytoplasme ovocytaire. Les ovocytes matures peuvent alors être soumis à l'étape de fécondation *in vitro* (FIV) réalisée dans un milieu dont la composition est proche de celle du fluide tubaire, supplémenté par du sérum de brebis en chaleur. Cette seconde étape met en présence les ovocytes avec des spermatozoïdes capables une paille de semence (environ 50×10^6 spermatozoïdes) pouvant servir à la fécondation de nombreux ovocytes. Les embryons qui en résultent sont cultivés *in vitro* (DIV) pendant sept jours, jusqu'au stade de blastocyste, propice à leur réimplantation dans l'utérus d'une mère porteuse. Si le milieu SOF (Synthetic Oviduct Fluid) est classiquement utilisé avec succès chez les ruminants pour assurer le développement *in vitro*, son

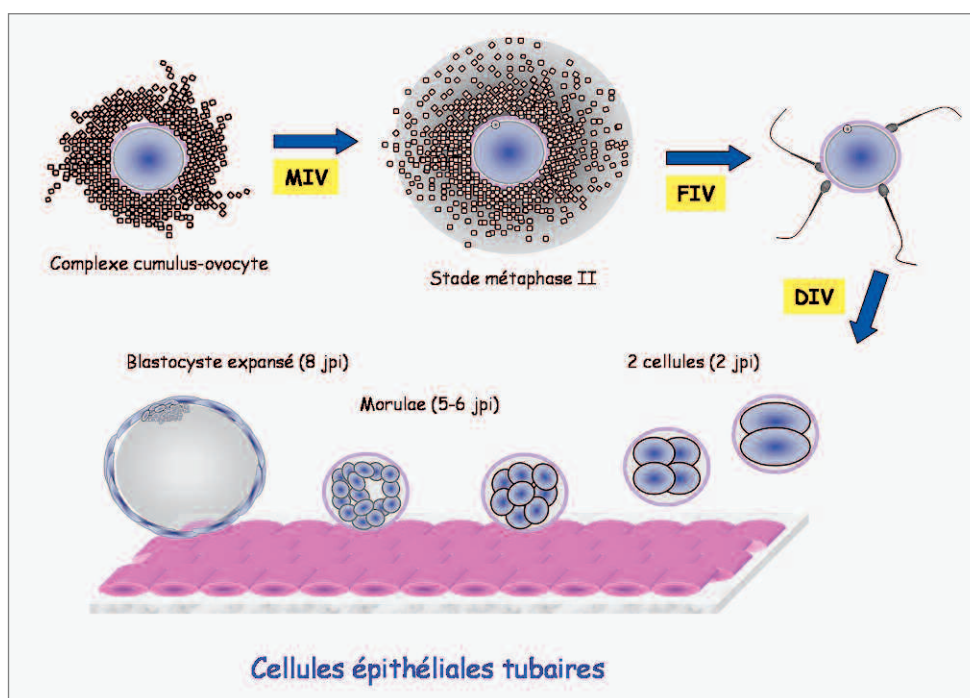


Figure 2 : Illustration des différentes étapes de la production d'embryons *in vitro*. Les complexes cumulus-ovocytes immatures sont soumis à maturation, fécondation, puis développement *in vitro* (MIV, FIV et DIV, respectivement, jpi = jours post insémination).



Figure 3: Faons élaphe nés après que des embryons produits in vitro aient été transférés chez des mères porteuses (biches élaphe), 2004. (Cliché Locatelli/MNHN)

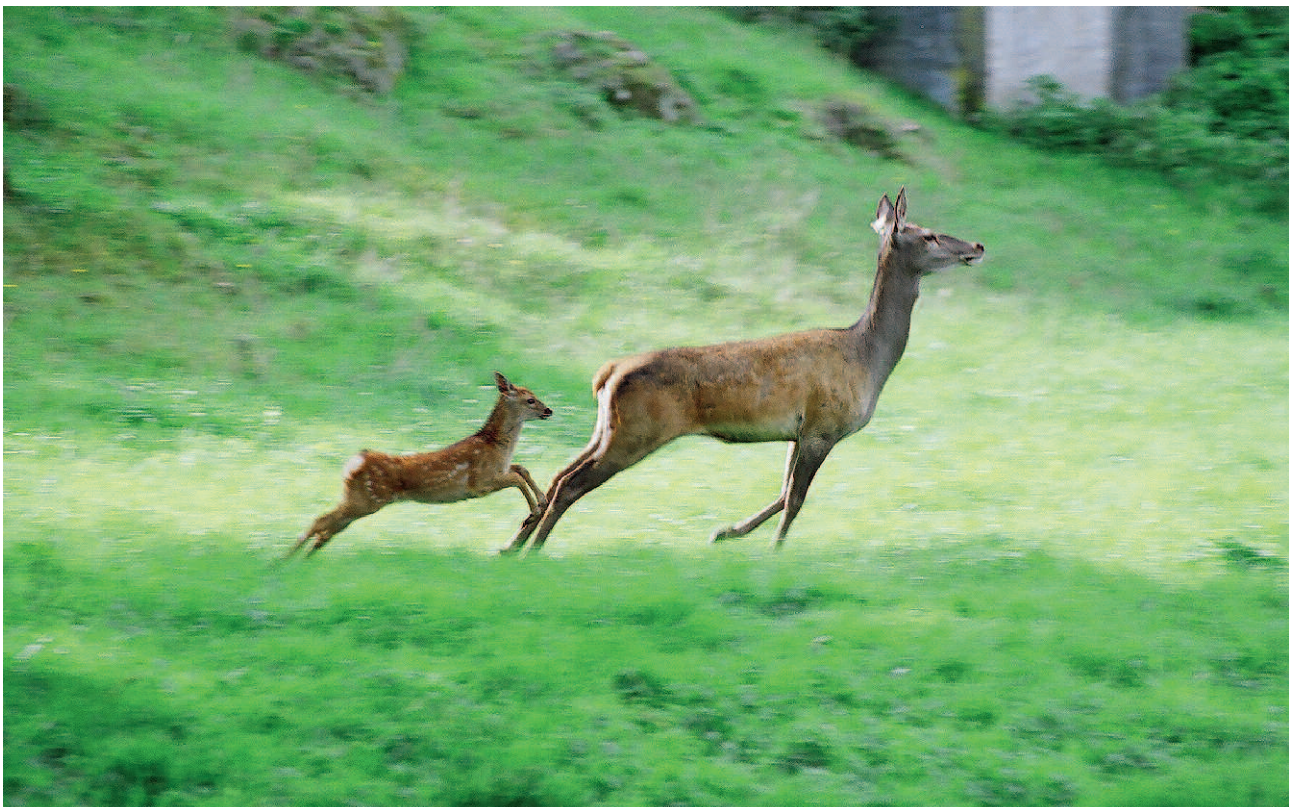


Figure 4: Faon sika du Japon et sa mère porteuse élaphe, 2006. (Cliché G.Paillard/INRA)

utilisation chez les cervidés s'est avérée décevante. (Comizzoli *et al.* 2001). Au cours de nos travaux, nous avons constaté que la co-culture de cellules épithéliales de l'oviducte dans le milieu SOF était bénéfique pour le développement de l'embryon d'élaphe et indispensable pour l'embryon de sika (Locatelli *et al.* 2005; Locatelli *et al.* 2006). Ces observations suggèrent que les embryons de ces deux espèces présentent des besoins spécifiques par rapport à ceux des embryons de ruminants domestiques. Chez l'élaphe et le sika, environ 30 % des embryons produits atteignent ainsi le stade blastocyste après co-culture sur un tapis de cellules tubaires.

Les embryons produits au laboratoire ont été cryoconservés dans l'azote liquide après congélation lente (élaphe et sika) ou vitrification (élaphe). Décongelés, ils ont été transférés dans l'utérus de biches élaphe synchronisées (J7). Pour cette manipulation, les femelles sont anesthésiées afin de réaliser un examen endoscopique du stade ovarien (contrôle de la présence d'un corps jaune fonctionnel). La corne utérine ipsilatérale à l'ovaire présentant le corps jaune est extériorisée à l'aide d'une pince atraumatique, après incision de la paroi abdominale sur une longueur inférieure à 2 cm. Une ponction est réalisée dans la corne utérine pour introduire un capillaire de verre contenant le(s) embryon(s). Dans un premier temps, la naissance de trois faons de cerf élaphe, issus du transfert d'embryons produits *in vitro* et congelés ou vitrifiés, a permis de démontrer la faisabilité des techniques utilisées (**figure 3**). Une seconde étape a été franchie plus récemment, objectivée par la naissance d'un faon de cerf sika (**figure 4**), issu du transfert d'un embryon sika produit *in vitro*, congelé, puis réimplanté dans l'utérus d'une mère

porteuse de l'espèce élaphe (Locatelli *et al.* 2008). Elle démontre la possibilité d'un transfert interspécifique, à savoir la possibilité d'utiliser des mères porteuses d'une espèce pour donner naissance à des faons d'une autre espèce.

PERSPECTIVES

Dans un premier temps, l'optimisation de l'ensemble des techniques évoquées demeure un axe prioritaire notamment en ce qui concerne la PIV. Les spécificités des besoins de l'embryon de cerf au cours des premières étapes du développement font actuellement l'objet d'études plus approfondies. De même, le transfert interspécifique soulève des questions fondamentales intéressantes quant à ses conséquences sur le comportement des jeunes (inné ou acquis). Ces recherches devraient nous permettre, dans un second temps, son application aux espèces menacées proprement dites comme le cerf d'Eld du Siam (*Cervus eldi siamensis*), le daim de mésopotamie (*Dama mesopotamica*), cerf du Viet-Nam (*Cervus nippon pseudaxis*) ou le cerf de Formose (*Cervus nippon taiouanus*). Pour ces cervidés, il sera nécessaire d'identifier l'espèce receveuse commune la plus compatible. Ces stratégies pourraient ainsi être utilisées pour faciliter le brassage génétique entre populations captives ou pour augmenter artificiellement le nombre de descendants destinés à la réintroduction en milieu naturel. Elles pourraient également permettre le stockage d'embryons d'espèces vouées à une extinction certaine.

BIBLIOGRAPHIE

- Asher, G.W., Berg, D.K., Evans, G. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim Reprod Sci.* 62: 195 – 211.
- Asher, G.W., Monfort, S.L., Wemmer, C. 1999. Comparative reproductive function in cervids: implications for management of farm and zoo populations. *J Reprod Fertil Suppl.* 54: 143 – 156.
- Ceballos, G., Ehrlich, P.R. 2002. Mammal population losses and the extinction crisis. *Science* 296: 904 – 907.
- Comizzoli, P., Mermillod, P., Cognie, Y., Chai, N., Legendre, X., Mauge, R. 2001. Successful *in vitro* production of embryos in the red deer (*Cervus elaphus*) and the sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* 55: 649 – 659.
- Dott, H.M., Utsi, M.N.P. 1971. The collection and examination of semen of the reindeer (*Rangifer tarandus*). *J Zool.* 164: 419 – 424.
- Krzywinski, A. 1976. Collection of red deer semen with the artificial vagina. In *Proceedings of the 8th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*, July 12-16-1976, Krakow, Poland, M. Tischner, J. Pilch Vol 4 pp. 1002 – 1005.
- Krzywinski, A. 1985. A study in artificial breeding in deer for practical application, *British Deer Society Magazine* 6 pp. 211 – 213.
- Locatelli, Y., Cognie, Y., Vallet, J.-C., Baril, G., Verdier, M., Poulin, N., Legendre, X., Mermillod, P. 2005. Successful use of oviduct epithelial cell coculture for *in vitro* production of viable red deer (*Cervus elaphus*) embryos. *Theriogenology* 64: 1729 – 1739.
- Locatelli, Y. & Mermillod, P. 2005. Caractéristiques et maîtrise de la fonction de reproduction chez les cervidés. *Productions animales* 18: 3 – 25.
- Locatelli, Y., Vallet, J.-C., Baril, G., Touz, L., J., Hendricks, A., Legendre, X., Verdier, M., Mermillod, P. 2008. Successful interspecific pregnancy after transfer of *in vitro*-produced sika deer (*cervus nippon nippon*) embryo in red deer (*cervus elaphus hippelaphus*) surrogate hind. *Reproduction, Fertility and Development* 20: 160 – 161.
- Locatelli, Y., Vallet, J.-C., Huyghe, F.P., Cognie, Y., Legendre, X., Mermillod, P. 2006. Laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* production of sika deer embryos: effect of season and culture conditions. *Theriogenology* 66: 1334 – 1342.
- Whitehead, G.K. 1993. *Deer of the world*. Constable, London. 194 pp.

