

Sécrétion d'oestrogènes par l'embryon porcine avant l'implantation

Marie-Thérèse HOCHEREAU-DE REVIERS (1), Christine PERREAU (1), Agnès NICOLLE (1), J.M. GOGUÉ (2), P. DESPRÉS (1), E. VENTURI (1)

Institut National de la Recherche Agronomique

(1) Laboratoire de Physiologie de la Reproduction des Mammifères Domestiques - 37380 Nouzilly.

(2) Amélioration Génétique Porcine - Domaine de Galle - 18390 Osmoy

Sécrétion d'oestrogènes par l'embryon porcine avant l'implantation

Des truies Large White (29) et Meishan (3) nullipares ayant eu deux saillies successives à 17h ou 24 h d'intervalle, ont été abattues de 10, 5 à 11,7 jours après la première saillie. Après abattage et lavage des cornes utérines par du milieu tampon, les embryons d'une même corne ont été dénombrés, mesurés et incubés ensemble pendant une heure à 38°C dans une étuve air + CO₂ dans du milieu DMEM additionné d'antibiotiques, à raison d'un embryon par 100 µl de milieu. Les milieux d'incubation et les milieux de lavage des cornes utérines ont été congelés et le dosage radioimmunologique de 17β-oestradiol a été effectué. La sécrétion de 17β-oestradiol par l'embryon est détectable quand son diamètre apparent est supérieur à 3,5 mm et son bouton embryonnaire de diamètre supérieur à 0,3 mm; elle est corrélée à la taille de l'embryon ($r=0,68$; $P<0,05$) et à celle de son bouton embryonnaire ($r=0,58$; $P<0,05$) plus qu'à l'âge présumé des embryons ($r=0,42$; $P=0,05$). L'aspect morphologique du trophoctoderme n'a pas d'effet sur sa capacité de synthèse de 17β-oestradiol. Les "pertes embryonnaires" correspondant à la différence entre les nombres d'ovulations et d'embryons ne sont pas reliées à la sécrétion de 17β-oestradiol par les embryons restants. Les petits embryons ont une sécrétion d'oestrogènes très faible qui aboutit à une concentration d'oestrogènes dans l'utérus indétectable. La concentration d'oestrogènes, observée dans le milieu utérin est fonction de la taille ($r=0,58$; $P<0,05$) et du nombre d'embryons ($r=0,44$; $P=0,05$). On a observé une sécrétion d'oestrogènes par embryon quatre fois plus élevée en race Meishan qu'en race Large White.

Oestrogen secretion by porcine embryo before implantation

Large White (29) and Meishan (3) nulliparous gilts were sired twice 17 or 24 h apart and were slaughtered 10, 5 to 11,7 days after the first service. After slaughter, uterine horns were rapidly dissected and flushed out with phosphate buffer saline. Embryos were numbered; embryo and embryonic disc diameters were measured and their appearances were noted. Embryos of the same horn were incubated for one hour at 38°C in an incubator (air +CO₂) in DMEM + antibiotics (one embryo/100 µl). Incubation and flushing media were deep-frozen until RIA of 17β-oestradiol. Secretion of 17β-oestradiol was first detected for embryos diameter of which were equal to 3,5 mm with an 0,3 mm embryonic disc diameter; it was correlated to the embryo diameter ($r=0,68$; $P<0,05$) and to the embryonic disc diameter ($r=0,58$; $P<0,05$) more than to the age of embryos ($r=0,42$; $P=0,05$). The trophoctoderm morphological normalcy was not related to its ability to synthesise 17β-oestradiol. The embryonic losses, defined as the difference between ovulation rate and number of embryos were not related to 17β-oestradiol secretion by remaining embryos. The small embryos evidenced a very low oestrogen synthesis which resulted in an undetectable estrogen concentration in the uterine fluid. The oestrogen concentration in the uterine fluid was related to the diameter ($r=0,58$; $P<0,05$) and the total number of embryos ($r=0,44$; $P=0,05$). We have recorded a 4 fold higher oestrogen synthesis per embryo in Meishan than in Large White gilts.

INTRODUCTION

La prolificité a augmenté de façon spectaculaire, ces dernières années, dans l'espèce porcine en particulier en race Large White (DAGORN et al, 1998); cependant les pertes embryonnaires limitent l'efficacité de l'augmentation du nombre d'ovulations. Ces pertes sont généralement estimées par la différence entre le nombre d'ovulations mesuré par le nombre de corps jaunes et le nombre de porcelets nés ou de fœtus comptés à 30 jours de gestation. Ces différences peuvent provenir d'une absence de fécondation d'un ou plusieurs ovocytes, d'un défaut de développement des œufs fécondés ou de défaut d'implantation. Cette période qui précède l'implantation semble particulièrement cruciale et correspond à des modifications de la taille des embryons au moment où l'embryon sécrète des quantités importantes d'oestrogènes (PERRY et al, 1976, BAZER & THATCHER, 1977).

Le but de notre travail a été d'évaluer la capacité de synthèse des oestrogènes par les embryons d'un âge correspondant à cette période critique. Cette capacité a été analysée en fonction de leur taille et de leur âge par rapport à la saillie.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Vingt neuf truies Large White (LW) nullipares ont été utilisées dans cette étude; elles ont reçu un traitement de Régumate®, (HRVet, SA) pendant 18 jours et ont eu deux saillies successives à 17h ou 24 h d'intervalle. Les animaux ont été abattus de 10,5 à 11,7 jours après la première saillie. De plus, trois truies nullipares de race Meishan (MS) ont été comparées aux truies LW; elles sont inséminées plus tardivement après l'apparition de l'oestrus que les truies LW, en raison du délai oestrus-ovulation plus long dans la race MS que dans la race LW.

Le tractus génital a été récupéré moins de 10 minutes après abattage et transporté au laboratoire en boîte isotherme. Les nombres d'ovulation ont été déterminés par dissection des corps jaunes sur chacun des ovaires. Après dissection, chaque corne utérine a été lavée avec 20 ml de tampon phosphate (PBS) à 37-38°C. Les embryons ont été dénombrés. Le diamètre apparent de chaque embryon et de son bouton embryonnaire ont été mesurés sous loupe binoculaire (grossissement x 10 à 20 fois). De plus, la présence de déchirure ou de protubérance sur le trophoctoderme ou celle de restes de trophoctoderme (membrane de Reichert) au dessus du bouton embryonnaire ont été notées pour chaque embryon. Nous avons ensuite calculé par corne ou par truie, la proportion d'embryons jugés bons, de taille homogène, ayant un bouton embryonnaire visible et n'ayant pas d'anomalie majeure.

Les embryons d'une même corne utérine ont été incubés ensemble dans une boîte de culture pendant une heure à 38°C dans une étuve air +CO₂. Le milieu DMEM a été additionné d'antibiotiques (penicilline 100 IU/ml ; streptomycine : 100µg/ml, et tylosine : 8 µg/ml) et le volume de milieu de culture a été proportionnel au nombre d'embryons, à raison de 100 µl/embryon. Les milieux d'incubation et les milieux de lavage des cornes utérines ont été congelés à -20°C puis

le 17b-oestradiol a été dosé dans ces milieux (SAUMANDE, 1981). L'anticorps utilisé reconnaît principalement le 17b-oestradiol ; il présente une réaction croisée avec le 6-kétoestradiol (12,3%), avec le 16-épiestriol (5%), le 16-kétoestradiol (1,3%) et moins de 1% avec les autres stéroïdes. La limite inférieure de détection est de 60 pg/ml et les coefficients de variation intra dosage sont de 8,6 pour une concentration de 2 ng/ml et de 9,4 pour 0,125 ng/ml. Les résultats ont été analysés par analyse des coefficients de corrélation soit de Pearson (r) soit après classement de rang, selon Spearman (ρ) individuellement par corne utérine ou par truie. (SYSTAT). Les comparaisons des sécrétions d'oestrogènes entre races ont été analysées à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis, étant données les différences d'effectif et l'hétérogénéité des valeurs (SYSTAT).

2. RÉSULTATS

2.1. Caractéristiques des tractus génitaux et des embryons dans la race LW

Parmi les 29 truies utilisées, 28 ont été gravides. Une a présenté une forte contamination bactérienne et les embryons n'ont pas pu être incubés. Enfin une n'a présenté qu'une seule corne utérine et deux ovaires. Les nombres moyens d'ovulations et d'embryons par truie ont été respectivement de 17,8 et 14,0 (tableau 1). Pour un âge moyen de 11,1 jours, les diamètres moyens des embryons et des boutons embryonnaires ont été respectivement de 3,8 et 0,3 mm. Le diamètre moyen des embryons d'une corne utérine est corrélé à l'âge des embryons, calculé à partir de la 1ère saillie ($r=0,5$; $P=0,05$) alors que le diamètre du bouton embryonnaire n'est pas corrélé à l'âge mais seulement au diamètre de l'embryon ($r=0,85$; $P<0,01$). Aucun des embryons analysés n'a été observé au stade filamenteux mais certains au stade légèrement ovoïde.

La sécrétion de 17β-oestradiol par un embryon dans le milieu d'incubation est très élevée et supérieure à 500 pg/ml/heure en race LW; elle est très variable d'une truie à l'autre. Cette sécrétion de 17β-oestradiol/embryon est corrélée au diamètre de l'embryon ($r=0,8$; $P<0,05$; figure 1), au diamètre du bouton embryonnaire ($r=0,58$; $P<0,05$;

Figure 1 - Variations de la sécrétion de 17β-oestradiol par embryon (pg/ml/heure) en fonction du diamètre apparent de l'embryon (exprimé en mm).

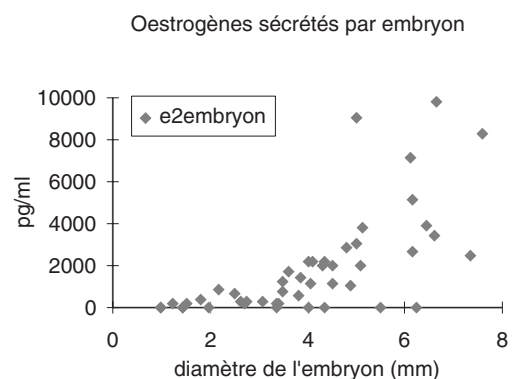


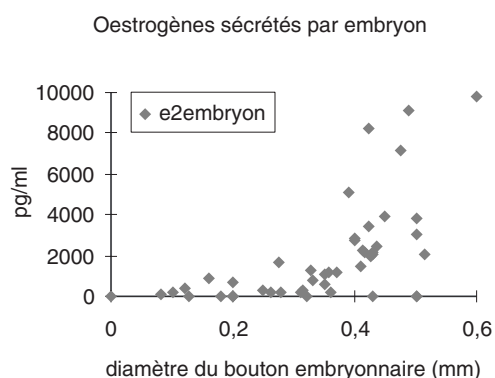
Tableau 1 - Nombre d'ovulations et d'embryons et taille moyenne des embryons, concentrations en 17 β -oestradiol dans les milieux d'incubations ou dans les lavages utérins chez des truies nullipares Large White ou Meishan au 11^{ème} jour du cycle (m \pm sd).

Paramètres	Large White	Meishan
Nb de truies	29	3
Nb truies gravides	28	3
Nb ovulations/truie	17,8 \pm 2,4	15,0 \pm 1,7
Nb embryons /truie gravide	14,0 \pm 4,7	11,7 \pm 4,0
Âge par rapport lère saillie (j)	11,1 \pm 0,3	10,7 \pm 0,3
Diamètre embryon (mm)	3,8 \pm 1,7	5,1 \pm 1,8
Diamètre du bouton embryonnaire (mm)	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
E2 par embryon (pg/ml)	1692 \pm 2350	6232 \pm 4959
E2 dans l'utérus/corne (pg/ml)	62	287
E2 dans l'utérus/embryon (pg/ml)	7,0	46,5
Embryons de bonne qualité (%)	70%	80%

figure 2) et à l'âge des embryons ($r=0,42$; $P=0,05$). La variable explicative principale est alors le diamètre de l'embryon. Les très petits embryons (< 2 mm de diamètre) avec des boutons embryonnaires peu développés ($< 0,2$ mm) sécrètent peu ou pas de 17 β -oestradiol et nous n'avons pas détecté de 17 β -oestradiol dans 11 milieux d'incubation parmi les 51 analysés.

Nous n'avons pas détecté de 17 β -oestradiol dans les milieux utérins dans lesquels il n'y avait pas d'embryons. Quand tous les embryons présents dans une corne utérine ont présenté un diamètre inférieur à 3,5 mm nous n'avons pas détecté d'oestrogènes; cette situation a été observée dans 29 des 51 milieux utérins analysés (57%). La concentration en 17 β -oestradiol dans les milieux utérins, exprimée par embryon, est cependant, à taille embryonnaire égale, très variable d'une corne à l'autre et d'une truie à l'autre chez les LW. La concentration d'oestrogènes, observée dans le milieu utérin est fonction de la taille ($\rho = 0,58$; $P<0,05$) et du nombre d'embryons ($\rho=0,44$; $P=0,05$). La sécrétion d'oestrogènes par embryon en incubation in vitro et leur concentration dans le milieu utérin ne sont corrélées ni à

Figure 2 - Variations de la sécrétion de 17 β -oestradiol par embryon (pg/ml/heure) en fonction du diamètre du bouton embryonnaire (exprimé en mm).



l'aspect morphologique du trophoctoderme ni à la présence de membrane de Reichert sur le bouton embryonnaire.

Nous avons observé une différence de l'ordre de 20% entre le nombre d'ovulations et le nombre d'embryons, que nous avons appelée arbitrairement "perte embryonnaire" car il peut s'agir d'une absence de fécondation. Cependant cette différence n'est reliée ni au diamètre ni à l'âge des embryons ni à leur sécrétion de 17 β -oestradiol.

2.2. Comparaison entre truies nullipares LW et MS : résultats préliminaires (tableau 1)

Les nombres d'ovulations (15,0) et d'embryons (11,7) observés dans cet échantillon de truies MS nullipares sont plus faibles qu'en race LW. Malgré l'âge un peu plus faible (10,7j) des embryons MS par rapport aux embryons LW (11,1j) analysés dans cette expérience, les sécrétions de 17 β -oestradiol dans le milieu d'incubation par embryon et par heure sont environ 4 fois plus élevées dans la race MS que dans la race LW. Les concentrations de 17 β -oestradiol dans le milieu utérin, exprimées par corne ou par embryon présent sont significativement plus élevées que les valeurs observées en race LW (test non paramétrique ; $P = 0,03$).

3. DISCUSSION ET CONCLUSION

Les sécrétions d'oestrogènes que nous rapportons pour les embryons LW sont du même ordre que celles observées précédemment mais elles sont détectées pour un diamètre embryonnaire plus faible que celui mentionné (5 mm ; GEISERT et al, 1990; PUSATERI et al, 1990). Par ailleurs, les sécrétions exprimées par embryon/ml/heure que nous avons observées sont plus élevées que celles enregistrées précédemment par GEISERT et al (1990) qui ont pratiqué des durées d'incubations de 6 heures. Nous avons constaté qu'au delà d'une heure d'incubation les embryons mis en culture sans sérum deviennent très fragiles et il est probable

que pour des temps prolongés d'incubation l'intégrité des embryons peut être altérée et limiter la capacité de synthèse des embryons.

Nos observations confirment et précisent que c'est la taille d'un embryon plus que son âge théorique par rapport à la saillie qui contrôle sa sécrétion d'oestrogènes. Il en découle que les très petits embryons présents dans une corne et qui synthétisent peu ou pas d'oestrogènes ont peu de possibilité de s'implanter, ainsi que cela avait été dit par POPE (1988). L'absence de relation entre les " pertes embryonnaires " et la capacité de synthèse d'oestrogènes semblerait indiquer que ces pertes en début de vie embryonnaire bien avant l'implantation, ne sont pas dépendantes des processus contrôlant la croissance ultérieure de l'embryon et sa capacité de synthèse des oestrogènes.

L'aspect morphologique du trophoctoderme n'est apparemment pas lié à sa capacité de synthèse de 17β -oestradiol et c'est la taille du bouton embryonnaire qui est importante, à taille embryonnaire équivalente. La concentration d'oestrogènes observée dans le liquide de lavage utérin est faible et à la limite du seuil de détection. Le liquide présent dans l'utérus a été dilué 20 fois par l'apport de tampon phosphate (20 ml/corne utérine); il aurait fallu perfuser avec un volume plus faible de milieu mais le risque aurait été alors de ne pas retrouver tous les embryons, en particulier les plus petits. Après cette correction pour la dilution (x20), les valeurs obtenues sont alors comparables à celles observées par FORD & YOUNGS (1993) pour la race Yorkshire.

Les nombres d'ovulations (15,0) et d'embryons (11,7) observés dans le petit échantillon de truies MS nullipares de cette expérience sont équivalents à ceux enregistrés à la même période dans notre élevage sur un plus grand nombre de truies MS (respectivement 14,9 et 11,8); ils sont plus faibles qu'en race LW. La comparaison faite entre embryons MS et LW porte sur un très petit nombre de truies. L'âge des embryons MS par rapport à la saillie (10,7 j) est un peu plus jeune que celui des embryons LW (11,1 j). On peut remarquer cependant que les embryons MS ont un diamètre légèrement plus grand que les embryons LW, à âge égal comme cela a été observé par BAZER et al (1988). Cependant les sécrétions observées par embryon et les

concentrations dans l'utérus rapportées par embryon sont beaucoup plus élevées dans notre échantillon de truies MS que dans les truies LW. Ces résultats sont en contradiction avec les résultats de FORD & YOUNGS (1993) qui observent des concentrations plus faibles d'oestrogènes dans l'utérus des truies MS. Cependant leurs observations sont faites au 12ème jour de gestation à un moment où les embryons MS sont tous au stade filamenteux et les embryons LW, en partie ronds et en partie ovoïdes ou filamenteux. On peut se demander si leurs résultats reflètent des différences de capacité de synthèse ou seulement des différences de cinétique de développement embryonnaire, liées à l'élongation des embryons. L'analyse d'un plus grand nombre d'embryons MS d'âge et de taille différents seront nécessaires pour éclaircir cette question.

On peut remarquer qu'on retrouve dans la race MS une capacité de synthèse des stéroïdes élevée. Nous avons observé au cours de la phase lutéale des concentrations plasmatiques plus élevées de progestérone chez les truies MS que chez les truies LW. Au cours de la phase folliculaire, les sécrétions d'oestrogènes par cellule de granulosa sont plus importantes dans la race MS que dans la race LW (HUNTER et al, 1993).

En conclusion, la sécrétion de 17β oestradiol est détectable dans l'embryon quand son diamètre apparent est supérieur à 3,5 mm et son bouton embryonnaire de diamètre supérieur à 0,3 mm ; elle est beaucoup plus dépendante de la taille que de l'âge présumé des embryons. Les petits embryons ont une sécrétion très faible qui aboutit à une concentration dans l'utérus négligeable et un signal de gestation inexistant et très probablement un défaut d'implantation.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le personnel du Domaine de Galle et de l'Unité Expérimentale de Nouzilly pour les soins donnés aux animaux et le personnel de l'abattoir pour la collecte rapide et efficace des tractus génitaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAZER F.W., THATCHER W.W., 1977. Prostaglandins, 14, 397-401.
- BAZER F.W., THATCHER W.W., MARTINAT-BOTTÉ F., TERQUI M., 1988. J. Reprod. Fert. 84, 37-42.
- DAGORN J, BOULOT S, AUMAÎTRE A, LE COZLER Y., 1998. INRA Prod. Anim, 11, 211-213.
- FORD S.P., YOUNGS C.R., 1993. J Reprod. Fert. Suppl. 48, 271-278.
- GEISERT R.D., ZAVY MT., MOFFATT RJ, BLAIR RM., YELLIN T., 1990. J. Reprod. Fert. Suppl. 40, 293-305.
- HUNTER M.G., BIGGS C., FAILLACE L.S., 1993. J Reprod. Fert. Suppl. 48, 261-270. (1993).
- PERRY J.S., HEAP R.B., BURTON R.D., GADSBY J.E., 1976. J. Reprod. Fert. Suppl. 25, 85-104.
- POPE W.F., 1988. Biol. Reprod. 39, 999-1003.
- PUSATERI A.E., ROTHSCHILD M.F., WARNER C.M., FORD S.P., 1990. J. Anim. Sci. 68, 3727-3735.
- SAUMANDE J., 1981. Steroids, 38, 425-437.