



institut français  
du **cheval**  
et de l'**équitation**



40<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Équine  
Mardi 18 mars 2014

## Production de jeunes embryons équins par maturation, fécondation et culture *in vitro*

Par

C. Douet<sup>1</sup>, B. Ambruosi<sup>1</sup>, F. Reigner<sup>1</sup>, G. Goudet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> INRA UMR85, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, CNRS UMR6175, Université de Tours, IFCE, 37380 Nouzilly, France

### Résumé

Notre objectif est de développer une technique efficace et répétable pour produire *in vitro* de jeunes embryons équins. Cette technique a plusieurs applications pratiques : production de plusieurs embryons au cours d'un cycle, production d'embryons à partir de reproducteurs peu ou pas fertiles, production puis cryoconservation de très jeunes embryons pour la préservation de la biodiversité des équidés et la sauvegarde des races en voie d'extinction, test de qualité de la semence plus fiable que les tests actuellement disponibles. Des ovocytes équins ont été collectés sur des juments abattues dans des abattoirs commerciaux ou sur des juments vivantes par ponction folliculaire sous échographie. Ils ont été cultivés dans un milieu de maturation *in vitro* semi-synthétique ou dans du liquide folliculaire, pré-incubés dans du fluide d'oviducte, puis co-incubés avec des spermatozoïdes. Après fécondation, les embryons ont été cultivés *in vitro* pendant 24 heures dans du milieu SOF ou DMEM-F12. Dans nos conditions, nous avons pu obtenir 70 à 100% des ovocytes fécondés avec décondensation des pronoyaux, signe de début du développement embryonnaire.

**Mots clés : fécondation, *in vitro*, embryon, équin, ovocyte**

### Summary

Our objective is to develop an efficient and repeatable technique for the *in vitro* production of early equine embryos. This technique has several practical applications: production of several embryos during one reproduction cycle, production of embryos from subfertile or infertile animals, production and cryopreservation of early embryos for the preservation of biodiversity and conservation of endangered species, test of the quality of semen more reliable than the ones available. Equine oocytes were collected on slaughtered mares in commercial slaughterhouses or on standing mares by ovum pick up. They were *in vitro* matured in a semi-synthetic medium or in follicular fluid, pre-incubated in oviductal fluid, and co-incubated with spermatozoa. After fertilization, embryos were *in vitro* cultured during 24 hours in SOF or DMEM-F12 medium. In our conditions, we were able to obtain 70 to 100% of fertilized oocytes with pronuclei decondensation, which is a sign of the beginning of embryo development.

**Key-words : fertilization, *in vitro*, embryo, equine, oocyte**



## Introduction

L'objectif de notre laboratoire est de développer une technique efficace et répétable pour produire de jeunes embryons équins, puis de mettre cette technique à la disposition de l'élevage équin. Pour cela, nous avons développé une technique *in vitro* de maturation et fécondation des ovocytes équins, et nous mettons en place actuellement une technique de culture *in vitro* des embryons obtenus.

Le développement d'une technique *in vitro* de production de jeunes embryons équins a plusieurs applications pratiques.

D'abord cette technique permet la production de plusieurs embryons au cours d'un cycle. Actuellement, la production de plusieurs embryons par cycle n'est pas envisageable par l'administration d'un traitement de superovulation, car ces traitements sont peu efficaces dans l'espèce équine et le nombre d'embryons collectés reste limité à 2-3 embryons par jument traitée avec des hormones recombinantes. Par contre, la production de plusieurs embryons par cycle est possible par une technique de maturation, fécondation et développement *in vitro*. Les ovocytes immatures présents sur l'ovaire sont collectés par ponction folliculaire sous contrôle échographique, puis placés dans un milieu de maturation *in vitro*, fécondés *in vitro*, et les embryons obtenus sont cultivés *in vitro* jusqu'à un stade où ils peuvent être transférés dans une jument receveuse. La production de plusieurs embryons par cycle présente un intérêt notamment pour la gestion de la carrière sportive des juments : une jument qui produit plusieurs embryons sur un cycle est ensuite disponible pour une carrière sportive.

Ensuite cette technique permet la production de jeunes embryons. En effet, il n'est pas possible de collecter de jeunes embryons par la technique classique de lavage utérin puisque les embryons équins ne descendent dans l'utérus que 6,5 jours après l'ovulation. Or les embryons âgés de plus de 6,5 jours sont pour la plupart des embryons de diamètre supérieur à 300µm qui ont un faible taux de survie après congélation. Par contre, les jeunes embryons de diamètre inférieur à 300µm ont un meilleur taux de survie après congélation, et des taux de gestation plus élevés après congélation-décongélation et transfert dans une receveuse. Par la technique de maturation, fécondation et développement *in vitro* tous les stades embryonnaires sont accessibles, puisque le développement a lieu *in vitro*, dans un incubateur. Les embryons produits *in vitro* peuvent donc être congelés à un diamètre inférieur à 300µm, avec des taux de survie après congélation plus élevés.

De plus, cette technique permet la production d'embryons à partir de reproducteurs peu ou pas fertiles. C'est le cas pour des juments ayant des problèmes d'ovulation (le follicule se lutéinise sans libérer l'ovocyte) ou de tractus génital (oviducte ou utérus) empêchant la remontée des spermatozoïdes vers l'ovocyte, le transport de l'embryon vers l'utérus ou son implantation. C'est aussi le cas pour des étalons ayant une faible production en spermatozoïdes et/ou un pourcentage élevé de spermatozoïdes anormaux. Dans ces cas, la production d'embryons est envisageable *in vitro*, avec collecte des ovocytes par ponction folliculaire sous contrôle échographique et collecte du sperme puis fécondation *in vitro* et culture *in vitro* des embryons. Les embryons peuvent ensuite être transférés dans une jument receveuse.

D'autre part, le maintien de la biodiversité des équidés nécessite d'une part la préservation du patrimoine génétique existant et d'autre part la sauvegarde des races en cours d'extinction. La préservation du patrimoine génétique existant fait l'objet de plusieurs programmes de conservation des gamètes et embryons par congélation. Toutefois, dans l'espèce équine, la préservation de la lignée mâle par conservation du sperme est largement utilisée, mais la préservation de la lignée femelle par congélation des ovocytes ou des embryons n'est pas encore maîtrisée. La production d'embryons *in vitro* permet d'obtenir de jeunes embryons qui ont un meilleur taux de survie après congélation que les embryons collectés *in vivo* dans l'utérus à partir de 6,5 jours post-ovulation. D'autre part, la sauvegarde des races en cours d'extinction nécessite la production de nombreux embryons à partir des animaux restants. Si le nombre de femelles est limité, il est alors urgent de produire un grand nombre d'embryons dans un temps court. La production *in vitro* d'embryons équins permet la production de plusieurs embryons sur un cycle par collecte de plusieurs ovocytes immatures par ponction folliculaire, maturation *in vitro* puis fécondation *in vitro* et culture *in vitro* des embryons. Les embryons peuvent ensuite être transférés dans une femelle receveuse qui portera l'embryon. La femelle receveuse peut être issue de la race en cours d'extinction ou d'une autre race.

Enfin, cette technique permet d'ajouter un test de qualité de la semence des étalons plus fiable que les tests actuellement disponibles, en particulier l'analyse de la mobilité, qui sont peu corrélés à la fertilité de l'étalon. La semence est soumise à une fécondation *in vitro* afin d'évaluer la capacité des spermatozoïdes à féconder un ovocyte *in vitro*, ce qui est un critère plus proche de la fertilité (capacité à féconder *in vivo*).

Cette technique permet par ailleurs de fournir en grande quantité les embryons nécessaires pour la recherche appliquée, notamment pour l'amélioration des techniques de congélation des embryons et pour l'étude du développement précoce afin d'identifier les causes des pertes embryonnaires précoces et de les limiter.



La production de jeunes embryons équins *in vitro* présente donc un intérêt important.

Toutefois, les techniques de fécondation *in vitro* (FIV) qui ont été publiées jusqu'à maintenant avaient un taux de succès faible et/ou n'étaient pas répétables. Des techniques de production d'embryons *in vitro* par injection de spermatozoïde dans l'ovocyte (ICSI : intra-cytoplasmique sperm injection) ont été développées. Elles permettent d'obtenir de manière assez répétable des taux de fécondation élevés mais présentent plusieurs inconvénients :

la technique de microinjection crée des dommages importants sur les ovocytes, et beaucoup d'ovocytes dégénèrent après ICSI ;

la microinjection nécessite un matériel spécifique couteux et un personnel formé et expérimenté ;

elle ne peut être réalisée que sur un ovocyte à la fois, c'est donc une technique lourde et qui demande beaucoup de temps.

Donc il est nécessaire de développer une technique efficace permettant la production de plusieurs jeunes embryons équins à partir d'une jument et d'un étalon fertiles ou subfertiles, dans un temps limité et avec un coût limité. C'est ce que nous proposons en développant une technique de production de jeunes embryons équins par maturation, fécondation et développement *in vitro*.

## 1 Matériel et méthodes

La technique de production *in vitro* de jeunes embryons équins comporte plusieurs étapes :

- la collecte des ovocytes équins,
- leur maturation *in vitro* et leur pré-incubation dans du fluide d'oviducte,
- la collecte et la préparation du sperme équin,
- la fécondation *in vitro* et la culture *in vitro* des embryons.

### 1.1 Collecte des ovocytes équins

Les ovocytes équins immatures ont été collectés soit sur des juments abattues dans des abattoirs commerciaux, soit sur des juments vivantes par ponction folliculaire transvaginale sous échographie.

Pour les collectes dans les abattoirs, les ovaires ont été collectés juste après abattage des femelles et transportés au laboratoire dans du sérum physiologique à 32-38°C. Le liquide folliculaire de chaque follicule a été aspiré à l'aide d'une aiguille reliée à une pompe et analysé sous loupe binoculaire afin de rechercher les ovocytes. Cette technique de collecte permet d'obtenir plusieurs ovocytes en peu de temps et à moindre coût, mais la population d'ovocytes est hétérogène.

Pour les collectes par ponction folliculaire transvaginale sous échographie, des ponettes du troupeau expérimental de l'INRA de Nouzilly ont été soumises à des échographies transrectales régulières afin de suivre la croissance folliculaire. Les ovocytes ont été collectés par ponction transvaginale sous contrôle échographique de tous les follicules de plus de 10mm (nous avons montré précédemment que les follicules de moins de 10mm contenaient une forte proportion d'ovocytes incompetents pour la maturation, *Goudet et al., 1997*). Le liquide folliculaire a été aspiré, puis le follicule a été rincé plusieurs fois avec une solution tampon (PBS, Phosphate Buffer Saline). Les liquides collectés ont été observés sous loupe binoculaire afin de rechercher les ovocytes. La technique de ponction folliculaire transvaginale sous échographie permet de collecter une population homogène d'ovocytes de bonne qualité. Elle a été validée par le comité d'éthique en expérimentation animale Val de Loire (CEEAVDL).

### 1.2 Maturation *in vitro* des ovocytes équins

Afin de reproduire *in vitro* l'étape de maturation des ovocytes qui a lieu dans le follicule préovulatoire, les ovocytes équins immatures ont été cultivés pendant 27 heures dans un incubateur à 38,5°C et 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu de maturation *in vitro*. Nous avons comparé deux milieux de maturation : un milieu semi-synthétique (TCM199 additionné de 20% de sérum de veau fœtal et de 50ng/ml d'Epidermal Growth Factor) mis au point dans notre laboratoire (*Goudet et al., 2000; Ambruosi et al., 2013*) et du liquide folliculaire collecté au stade préovulatoire par ponction folliculaire transvaginale, qui constitue le milieu physiologique dans lequel a lieu la maturation dans le follicule.

### 1.3 Préincubation des ovocytes équins dans du fluide d'oviducte

Afin de reproduire *in vitro* les modifications que l'ovocyte subit dans l'oviducte après l'ovulation, les ovocytes après maturation *in vitro* ont été pré-incubés pendant 30 minutes dans du fluide d'oviducte porcin dans un incubateur à 38,5°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Nous avons montré précédemment qu'une pré-incubation des ovocytes avec du fluide d'oviducte équin ou porcin améliore les taux de fécondation *in vitro* (*Mugnier et al., 2009*).



Les oviductes porcins ont été collectés dans des abattoirs commerciaux sur des femelles en fin de croissance folliculaire et transportés jusqu'au laboratoire à 32-38°C. L'oviducte a été séparé des ligaments et vaisseaux afin qu'il soit propre et rectiligne, puis sa paroi interne a été grattée à l'aide d'une lame stérile de la jonction utéro-tubaire vers le pavillon. Le fluide extrait a été centrifugé à 10 000g pendant 15 minutes, le surnageant a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

#### 1.4 Collecte et préparation du sperme équin

Le sperme équin a été collecté sur les étalons du troupeau expérimental de l'INRA de Nouzilly à l'aide d'un vagin artificiel. Il a été filtré sur gaze, dilué à  $10 \cdot 10^6$  de spermatozoïdes/ml et incubé pendant 5 heures dans un milieu capacitant (Modified Whitten's Medium additionné de 1mg/ml de glucose, 25mM de sodium bicarbonate et 7mg/ml d'albumine bovine, *McPartlin et al., 2009*). Il a ensuite été dilué à  $1 \cdot 10^6$  de spermatozoïdes/ml et incubé dans du milieu capacitant additionné de 5mM de procaine qui induit une hyperactivation des spermatozoïdes équins.

#### 1.5 Fécondation *in vitro* et culture *in vitro* des embryons équins

Les ovocytes ont été déposés dans des gouttes de 100µl de spermatozoïdes dilués dans du milieu capacitant additionné de 5mM de procaine et les gamètes ont été co-incubés pendant 18 à 24 heures dans un incubateur à 38,5°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

Après fécondation, les embryons ont été cultivés *in vitro* pendant 24 heures dans un incubateur à 38,5°C, 5% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub>. Nous avons comparé deux milieux de culture *in vitro* utilisés par les laboratoires qui réalisent des fécondations par ICSI dans l'espèce équine : DMEM-F12 additionné de 10% de sérum de veau fœtal et de 25µg/ml de gentamycine (*Smits et al., 2012 ; Choi et al., 2006*) ou SOF (synthetic oviductal fluid) additionné de 5% de sérum de veau fœtal et de 50µg/ml de gentamycine (*Tremoleda et al., 2003 ; Galli et al., 2002*).

#### 1.6 Analyse des ovocytes et des embryons équins

Les ovocytes ont été analysés après 27 heures de maturation *in vitro* ou après 24 heures de fécondation *in vitro*. Pour cela, ils ont été fixés dans du paraformaldéhyde 4% dans le PBS pendant 20 minutes à température ambiante, rincés dans du PBS 2 fois 10 minutes, puis déposés entre lame et lamelle dans une solution de Hoechst 33258 dans le glycérol afin de visualiser l'ADN.

Les embryons ont été analysés après 24 heures de culture *in vitro*. Pour cela, ils ont été fixés et rincés comme les ovocytes, puis soumis à un double marquage : un marquage au Hoechst 33258 afin de visualiser l'ADN et un marquage avec un anticorps anti-lamine et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome rouge afin de visualiser la membrane des pronoyaux.

Les ovocytes et les embryons ont été observés à l'aide d'un microscope à fluorescence.

## 2 Résultats et discussion

Nous avons analysé les résultats à différentes étapes de la technique de production *in vitro* d'embryons équins : après 27 heures de maturation *in vitro*, après 24 heures de fécondation *in vitro*, après 24 heures de culture *in vitro* des embryons.

### 2.1 Taux de maturation *in vitro*

Les ovocytes équins immatures ont été collectés sur des juments abattues dans des abattoirs commerciaux puis placés dans un milieu de maturation *in vitro* semi-synthétique ou dans du liquide folliculaire préovulatoire pendant 27 heures. Ils ont ensuite été fixés et analysés pour évaluer le pourcentage d'ovocytes matures (taux de maturation *in vitro*).

Un ovocyte mature est au stade de métaphase 2, avec la moitié des chromosomes alignés sur la plaque métaphasique et l'autre moitié des chromosomes dans le globule polaire expulsé dans l'espace périvitellin (photo I).



**Photo I** : ovocyte mature au stade de métaphase 2 après coloration de l'ADN au Hoechst  
**Photo I**: mature oocyte in metaphase 2 after DNA staining with Hoechst



Le tableau 1 présente les taux de maturation *in vitro* dans les deux milieux de maturation testés. L'expérience a été répétée 2 fois.

**Tableau 1** : Taux de maturation *in vitro* des ovocytes collectés sur des juments abattues dans des abattoirs  
**Table 1**: *In vitro* maturation rate of oocytes collected on slaughtered mares in slaughterhouses

	Nombre d'ovocytes matures (%)
Maturation dans le milieu semi-synthétique	8/11 (73%)
Maturation dans le liquide folliculaire	10/11 (91%)

Nombre d'ovocytes matures (%) par rapport au nombre d'ovocytes placés dans les milieux de maturation *in vitro*

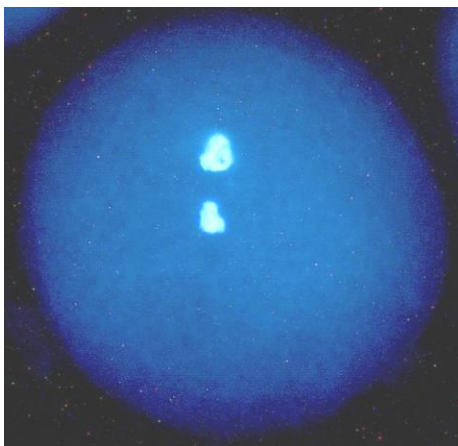
Aucune différence significative n'a été observée entre les deux milieux, toutefois le liquide folliculaire semble améliorer le taux de maturation des ovocytes équins.

## 2.2 Taux de fécondation *in vitro*

Les ovocytes équins immatures ont été collectés sur des juments abattues dans des abattoirs commerciaux ou sur des juments vivantes par ponction folliculaire transvaginale sous échographie. Ils ont été placés dans un milieu de maturation *in vitro* semi-synthétique ou dans du liquide folliculaire préovulatoire pendant 27 heures. Ils ont ensuite été pré-incubés pendant 30 minutes dans du fluide d'oviducte, puis co-incubés avec les spermatozoïdes pendant 24 heures. Ils ont été fixés et analysés pour évaluer le pourcentage d'ovocytes fécondés (taux de fécondation *in vitro*).

Un ovocyte fécondé contient 2 pronoyaux, le pronoyau femelle issu de l'ovocyte et le pronoyau mâle issu du spermatozoïde qui a pénétré (photo II).

**Photo II** : ovocyte fécondé avec 2 pronoyaux après coloration de l'ADN au Hoechst  
**Photo II**: fertilized oocyte with 2 pronuclei after DNA staining with Hoechst







Les tableaux 2 et 3 présentent les taux de fécondation *in vitro* dans les deux milieux de maturation testés, pour les ovocytes collectés dans des abattoirs commerciaux ou par ponction folliculaire. Les expériences ont été répétées 2 fois.

**Tableau 2** : Taux de fécondation *in vitro* des ovocytes collectés sur des juments abattues dans des abattoirs  
*Table 2: In vitro fertilization rate of oocytes collected on slaughtered mares in slaughterhouses*

	Nombre d'ovocytes fécondés (%)
Maturation dans le milieu semi-synthétique	13/18 (72%)
Maturation dans le liquide folliculaire	12/21 (57%)

Nombre d'ovocytes fécondés (%) par rapport au nombre d'ovocytes matures

**Tableau 3** : Taux de fécondation *in vitro* des ovocytes collectés par ponction folliculaire  
*Table 3: In vitro fertilization rate of oocytes collected by ovum pick up*

	Nombre d'ovocytes fécondés (%)
Maturation dans le milieu semi-synthétique	4/10 (40%)
Maturation dans le liquide folliculaire	4/9 (44%)

Nombre d'ovocytes fécondés (%) par rapport au nombre d'ovocytes matures

Aucune différence significative n'a été observée entre les deux milieux de maturation, toutefois le milieu synthétique semble améliorer le taux de fécondation des ovocytes équins collectés sur des juments abattues.

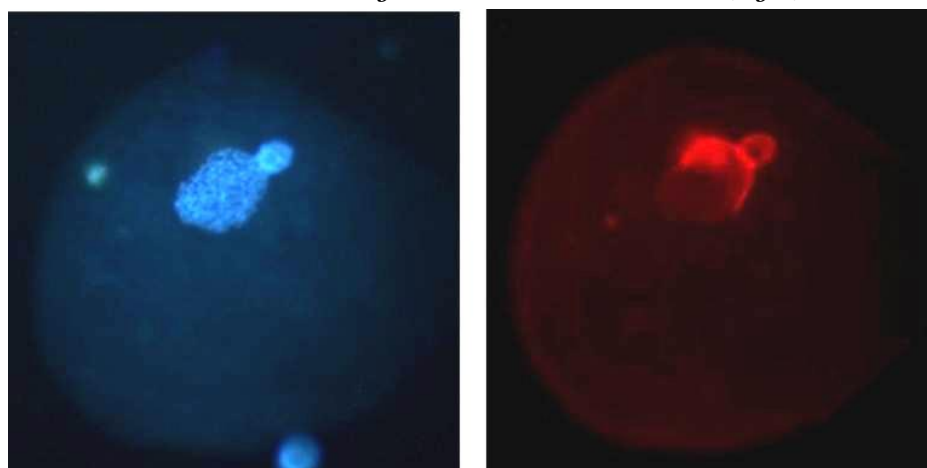
### 2.3 Taux de développement *in vitro*

Les ovocytes équins immatures ont été collectés sur des juments abattues dans des abattoirs commerciaux ou sur des juments vivantes par ponction folliculaire transvaginale sous échographie. Ils ont été placés dans un milieu de maturation *in vitro* semi-synthétique ou dans du liquide folliculaire préovulatoire pendant 27 heures. Ils ont ensuite été pré-incubés pendant 30 minutes dans du fluide d'oviducte, puis co-incubés avec les spermatozoïdes pendant 24 heures. Ils ont enfin été cultivés *in vitro* pendant 24 heures dans du DMEM-F12 additionné de sérum de veau fœtal et de gentamycine ou du SOF additionné de sérum de veau fœtal et de gentamycine. Ils ont été fixés et analysés pour évaluer le pourcentage d'ovocytes fécondés (taux de fécondation *in vitro*) et le stade de développement embryonnaire.

Les stades de développement embryonnaire observés n'ont pas dépassé le stade de 2 pronoyaux, mais après 24 heures de culture *in vitro* dans le milieu DMEM-F12, les pronoyaux étaient fortement décondensés, ce qui témoigne d'un début de développement embryonnaire (photo III).

**Photo III** : ovocyte fécondé avec 2 pronoyaux fortement décondensés après coloration de l'ADN au Hoechst (à gauche) et de la membrane des pronoyaux avec un anticorps anti-lamine (à droite)

*Photo III: fertilized oocyte with 2 pronuclei after DNA staining with Hoechst (left) and pronuclei membranes labelling with anti-lamin antibodies (right)*





Les tableaux 4 et 5 présentent les taux de fécondation *in vitro* dans les deux milieux de maturation testés, pour les ovocytes collectés dans des abattoirs commerciaux ou par ponction folliculaire, après culture *in vitro* dans du SOF additionné de sérum de veau foetal et de gentamycine. Les expériences ont été répétées 2 fois.

**Tableau 4 :** Taux de fécondation *in vitro* des ovocytes collectés sur des juments abattues dans des abattoirs après culture *in vitro* dans du milieu SOF

**Table 4:** *In vitro fertilization rate of oocytes collected on slaughtered mares in slaughterhouses after in vitro culture in SOF medium*

	Nombre d'ovocytes fécondés (%)
Maturation dans le milieu semi-synthétique	5/15 (33%)
Maturation dans le liquide folliculaire	5/12 (42%)

Nombre d'ovocytes fécondés (%) par rapport au nombre d'ovocytes matures

**Tableau 5 :** Taux de fécondation *in vitro* des ovocytes collectés par ponction folliculaire après culture *in vitro* dans du milieu SOF

**Table 5:** *In vitro fertilization rate of oocytes collected by ovum pick up after in vitro culture in SOF medium*

	Nombre d'ovocytes fécondés (%)
Maturation dans le milieu semi-synthétique	1/16 (6%)
Maturation dans le liquide folliculaire	1/16 (6%)

Nombre d'ovocytes fécondés (%) par rapport au nombre d'ovocytes matures

Les tableaux 6 et 7 présentent les taux de fécondation *in vitro* dans les deux milieux de maturation testés, pour les ovocytes collectés dans des abattoirs commerciaux ou par ponction folliculaire, après culture *in vitro* dans du DMEM-F12 additionné de sérum de veau foetal et de gentamycine. Les expériences ont été réalisées 1 fois.

**Tableau 6 :** Taux de fécondation *in vitro* des ovocytes collectés sur des juments abattues dans des abattoirs après culture *in vitro* dans du milieu DMEM-F12

**Table 6:** *In vitro fertilization rate of oocytes collected on slaughtered mares in slaughterhouses after in vitro culture in DMEM-F12 medium*

	Nombre d'ovocytes fécondés (%)
Maturation dans le milieu semi-synthétique	9/13 (69%) avec des pronoyaux fortement décondensés
Maturation dans le liquide folliculaire	9/13 (69%) avec des pronoyaux fortement décondensés

Nombre d'ovocytes fécondés (%) par rapport au nombre d'ovocytes matures

**Tableau 7 :** Taux de fécondation *in vitro* des ovocytes collectés par ponction folliculaire après culture *in vitro* dans du milieu DMEM-F12

**Table 7:** *In vitro fertilization rate of oocytes collected by ovum pick up after in vitro culture in DMEM-F12 medium*

	Nombre d'ovocytes fécondés (%)
Maturation dans le milieu semi-synthétique	5/5 (100%) avec des pronoyaux fortement décondensés
Maturation dans le liquide folliculaire	3/9 (33%) avec des pronoyaux fortement décondensés

Nombre d'ovocytes fécondés (%) par rapport au nombre d'ovocytes matures

Aucune différence significative n'a été observée entre les deux milieux de maturation, toutefois le milieu semi-synthétique semble améliorer le taux de fécondation des ovocytes équinés collectés par ponction folliculaire et cultivés *in vitro* dans le milieu DMEM-F12 (tableau 7).

Après fécondation, les ovocytes cultivés *in vitro* dans le milieu SOF ont présenté un fort taux de dégénérescence, quels que soient la technique de collecte et le milieu de maturation. Le milieu SOF ne semble donc pas adapté à la culture des embryons équinés obtenus par fécondation *in vitro*.

Par contre, après fécondation, les ovocytes cultivés *in vitro* dans le milieu DMEM-F12 ont un taux de fécondation élevé avec des pronoyaux fortement décondensés, ce qui témoigne d'un début de développement embryonnaire. Le milieu DMEM-F12 semble donc adapté à la culture des embryons équinés obtenus par fécondation *in vitro*. Des expérimentations sont en cours pour confirmer ces résultats.



## Conclusion et perspectives

Nous avons donc développé une technique de production *in vitro* de jeunes embryons équins.

La collecte des ovocytes peut être réalisée sur des juments abattues ou par ponction folliculaire transvaginale sous échographie sur jument tranquillisée.

La maturation *in vitro* des ovocytes peut être réalisée dans un milieu commercial semi-synthétique qui donne des résultats similaires au liquide folliculaire, milieu physiologique dans lequel la maturation a lieu dans l'ovaire.

Une pré-incubation des ovocytes dans du fluide d'oviducte améliore les taux de fécondation. Toutefois, l'utilisation de fluide d'oviducte est difficilement envisageable en élevage. C'est pourquoi nous avons identifié certains composants du fluide d'oviducte responsables de son effet positif (Mugnier *et al.*, 2009 ; Ambruosi *et al.*, 2013). Nous envisageons de tester leur influence sur les taux de fécondation *in vitro*, afin de remplacer le fluide d'oviducte par des composants purifiés ou synthétiques.

La fécondation *in vitro* est réalisée avec du sperme frais, mais nous envisageons de l'adapter au sperme congelé.

Enfin, la culture *in vitro* des embryons équins dans du milieu DMEM-F12 additionné de sérum de veau foetal et de gentamycine permet d'observer un début de développement embryonnaire. Nous envisageons maintenant de prolonger la culture *in vitro* des embryons pour obtenir des embryons à 2 cellules, puis des morulas et des blastocystes, qui pourront alors être congelés et/ou transférés dans des juments receveuses.

## Remerciements

Nous remercions toute l'équipe de l'Unité Expérimentale Equine au sein de l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière et l'équipe des Services Techniques d'Appui à la Recherche au sein de l'Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements à l'INRA de Nouzilly, ainsi que le personnel de l'abattoir de Vendôme. Nous remercions le conseil scientifique de l'IFCE pour le financement de ce travail.

## Références

- Ambruosi, B., Accogli, G., Douet, C., Canepa, S., Pascal, G., Monget, P., Moros Nicolas, C., Holmskov, U., Mollenhauer, J., Robbe-Masselot, C., Vidal, O., Desantis, S., Goudet, G. 2013. Deleted in Malignant Brain Tumor 1 (DMBT1) is secreted in the oviduct and involved in the mechanism of fertilization in equine and porcine species. *Reproduction* 146, 119-133.
- Choi, Y.H., Love, C.C., Varner, D.D., Hinrichs, K. 2006. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology* 65, 808-819.
- Galli, C., Crotti, G., Turini, P., Duchi, R., Mari, G., Zavaglia, G., Duchamp, G., Daels, P., Lazzari, G. 2002. Frozen-thawed embryos produced by ovum pick up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology* 58, 705-708.
- Goudet, G., Bézard, J., Duchamp, G., Gérard, N., Palmer, E. 1997. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicle size and hormonal environment *Biol Reprod* 57, 232-245.
- Goudet, G., Belin, F., Mlodawska, W., Bézard, J. 2000. Influence of epidermal growth factor on *in vitro* maturation of equine oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 56, 483-492.
- McPartlin, L.A., Suarez, S.S., Czaya, C.A., Hinrichs, K., Bedford-Guaus, S.J. 2009. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful *in vitro* fertilization of equine oocytes. *Biol Reprod* 81, 199-206.
- Mugnier, S., Kervella, M., Douet, C., Canepa, S., Pascal, G., Deleuze, S., Duchamp, G., Monget, P., Goudet, G. 2009. The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine *in vitro* fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reprod Biol Endocrinol* 7, 129. <http://www.rbej.com/content/7/1/129>
- Smits, K., Govaere, J., Hoogewijs, M., Piepers, S., Van Soom, A. 2012. A pilot comparison of laser-assisted vs Piezo Drill ICSI for the *in vitro* production of horse embryos. *Reprod Dom Anim* 47, e1-e3.
- Tremoleda, J.L., Stout, T.A.E., Lagutina, I., Lazzari, G., Bevers, M.M., Colenbrander, B., Galli, C. 2003. Effects of *in vitro* production on horse embryo morphology, cytoskeletal characteristics, and blastocyst capsule formation. *Biol Reprod* 69, 1895-1906.