

Naissance de 4 poulains issus de transferts d'embryons génotypés et cryoconservés : une première européenne

Par : **Maud Caillaud** (Ifce), **Florence Guignot** (Inra)

Quatre poulains issus d'une collaboration de recherche entre l'Inra de Nouzilly et la Jumenterie du Pin sont nés ce printemps. L'originalité de ces poulains réside dans le fait que les embryons ont été au préalable génotypés et cryoconservés.

Les objectifs de ces travaux de recherche sont multiples pour la filière équine.

Pourquoi vouloir génotyper et cryoconservé des embryons équins ?

La possibilité de cryoconservé des embryons équins présente plusieurs intérêts.

- Le premier est le **maintien de la biodiversité** des races, notamment celles à petits effectifs ou celles en voie de disparition. Actuellement, il existe une cryobanque de semence d'étalons, mais tous n'ont pas de la semence congelable. D'autre part, il faut en congeler et stocker beaucoup pour pouvoir régénérer une race en cas de disparition, ce qui est très coûteux. De plus, il serait difficile de reconstituer une race pure à partir de semence seulement.
- Le deuxième intérêt de cryoconservé les embryons équins est l'**augmentation des échanges internationaux** qui en découlerait. Actuellement, seule la réfrigération de l'embryon est possible, et ce, pour une durée maximum de 24 h ce qui limite donc considérablement les échanges de «bonne génétique» partout dans le monde.
- Un autre intérêt à la cryoconservation des embryons équins concerne la **gestion des troupeaux de receveuses**. Cette gestion est très coûteuse pour les centres de transfert puisque juments donneuse et receveuse doivent être au même stade physiologique le jour J pour pouvoir réaliser collecte et transfert, ce qui nécessite de suivre les cycles de plusieurs juments receveuses pour une seule donneuse. Cette contrainte limite actuellement l'essor du transfert d'embryon. La cryoconservation des embryons permettrait donc de différer, dans le temps et dans l'espace, la collecte du transfert. Ce dernier ne pouvant être effectué que lorsqu'une receveuse est disponible au bon stade de son cycle.
- Enfin, génotyper les embryons permet de les **sélectionner sur des critères recherchés**. Il est possible, à partir des analyses ADN, de déterminer le sexe du futur poulain mais également, de détecter certaines maladies génétiques incompatible avec la vie d'un poulain (comme par exemple le SCID - Severe combined immunodeficiency, ou l'EBJ-épidermolyse bulleuse jonctionnelle). Ou pourquoi pas envisager dans le futur une recherche sur des caractères comportementaux (émotivité, sociabilité...) si des gènes pour ces caractères sont identifiés ! Prévoir les caractéristiques d'un poulain à naître constitue un atout important pour la filière équine.

Pourquoi cette technique est difficile à mettre en œuvre dans l'espèce équine ?

La cryoconservation des embryons est maîtrisée depuis longtemps chez les bovins, les petits ruminants et même chez l'homme. Dans l'espèce équine, les recherches sur la congélation de l'embryon à l'Inra de Nouzilly ont débuté à la fin des années 90. Elles ont été initiées par Guy Duchamp, responsable des installations équinnes à l'époque, et collaborateurs.

L'embryon équin présente plusieurs caractéristiques qui en font un embryon difficile à cryoconserver :

La capsule :

A son arrivée dans l'utérus, se forme dans l'embryon une couche acellulaire de glycoprotéines appelée capsule. Son rôle dans le maintien de la gestation n'est pas très bien connu, mais elle est indispensable au début de la gestation. Elle disparaît naturellement aux alentours du 20ème jour de gestation. Cette capsule rend les embryons quasiment imperméables aux cryoprotecteurs. Or, sans cryoprotecteurs, il est impossible de cryoconserver un embryon à -196°C !

Une taille très hétérogène :

Lors d'une collecte 7 jours après ovulation, le diamètre de l'embryon peut osciller entre 200 et 700 µm ! Plus l'embryon sera gros, plus il sera difficile à cryoconserver, car il va contenir beaucoup de liquide. Or ce liquide va cristalliser lors de la descente en température ce qui a des conséquences dramatiques non négligeables sur la survie de l'embryon. L'idéal serait donc d'avoir à cryoconserver des embryons d'un petit diamètre. Pour cela, il faudrait les récolter avant 7 jours. C'est possible car l'arrivée de l'embryon dans l'utérus se fait environ 144h après la fécondation soit environ 6,75 jours. Cependant, la chance de réellement collecter l'embryon à 6,75 jours est moindre par rapport à une collecte à 7 jours.

Sur le terrain, il y a même une tendance à collecter les juments plus tard, à 7,5 jours voire 8 jours, pour être certain de vraiment collecter l'embryon.

C'est pourquoi les protocoles de recherche visent à mettre au point une technique fiable de cryoconservation des embryons d'une certaine taille pour se rapprocher au plus des pratiques courantes du terrain.

Quelles ont été les étapes qui ont conduit à la naissance de ces poulains ?

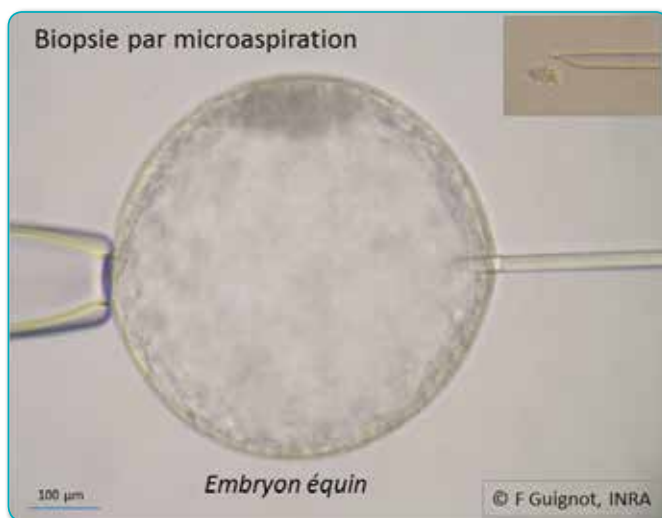
Obtention des embryons :

C'est à l'Inra (UEPAO Inra Nouzilly) qu'a eu lieu cette étape sur le troupeau de poneys Welsh B de l'unité expérimentale. Les femelles ont été inséminées avec de la semence fraîche d'étalons. Sept jours après ovulation, une collecte a été réalisée par les voies naturelles. Une fois collecté, l'embryon a été lavé 10 fois suivant les règles sanitaires de l'IETS ([International Embryo Transfer Society](#)).

Naissance de 4 poulains issus de transferts d'embryons génotypés et cryoconservés : une première Européenne ■

Préparation et cryoconservation des embryons :

Cette étape a également été réalisée à l'Inra de Nouzilly. Après les lavages, quelques cellules ont été prélevées sur l'embryon, puis ce dernier a été vidé d'une grande partie de son liquide par micro-aspiration. Après ajout de cryoprotecteurs, l'embryon est prêt à être cryoconservé dans l'azote liquide à -196°C. Une technique de vitrification, permettant le passage d'un état liquide à un état amorphe sans formation de cristaux, a été appliquée.



Préparation des juments receveuses :

Cette étape a été réalisée à la Jumenterie du Haras national du Pin sur des juments du troupeau de formation de moins de 10 ans. Les chaleurs ont été suivies par échographie quotidiennement. L'ovulation a été induite. Les transferts ont été réalisés 6 jours après l'ovulation des juments. Sept juments ont été transférées, à raison d'un embryon par receveuse.

Décongélation des embryons :

Les embryons ont été transportés depuis l'Inra de Nouzilly jusqu'à la Jumenterie du Pin dans un container d'azote liquide. Après réchauffement de l'embryon et élimination des cryoprotecteurs, l'embryon a été monté dans une paillette de transfert, puis la paillette montée dans un pistolet de transfert.

Transfert des embryons et suivi des gestations :

Cette étape s'est déroulée à la Jumenterie du Pin. Un transfert cervical a été réalisé, à raison d'un embryon par jument receveuse, comme classiquement réalisé sur le terrain avec des embryons de 7 jours. Cinq jours après transfert, les juments ont été échographiées pour vérifier la présence d'une vésicule embryonnaire et mesurer son diamètre. A ce stade, elle était âgée de 12 jours. De nouvelles échographies ont été réalisées à 21 jours (5 juments étaient gestantes), puis à 25 jours. A ce stade de développement, la détection de battements cardiaques confirme la viabilité de l'embryon : 4 juments étaient gestantes. Les embryons qu'elles portaient avaient été diagnostiqués, femelles pour deux d'entre eux, et mâles pour les deux autres. Sur les 4 juments gestantes (2 juments SF, 1 jument TF et la dernière AA), seule l'AA a déjà pouliné une fois, les 3 autres étaient maiden.

Naissance de 4 poulains issus de transferts d'embryons génotypés et cryoconservés : une première Européenne ■

Par la suite, les échographies ont été un peu plus espacées. Une échographie de contrôle à 4 et 5 mois de gestation a été réalisée avant que les juments soient isolées pour l'hiver. Les premières naissances ont eu lieu le 18 mai : deux mâles comme prévu par le génotypage. Les deux autres naissances ont suivi de près et le sexe des poulains s'est révélé exact de nouveau. Une femelle est née le 26 mai et la deuxième est née le lendemain soir. Les quatre poulains se portent bien.



© M Renault, Ifce

Quelles perspectives ouvre cette première Européenne ?

Cette première Européenne ouvre donc des perspectives multiples pour la filière équine. C'est un bel exemple de réussite d'une recherche appliquée menée à l'Inra dont les découvertes ont été validées sur le terrain à la Jumenterie du Pin : les aboutissements de ce travail collaboratif vont contribuer à valoriser la filière équine.

Les prochaines étapes à franchir concernent la simplification du processus, pour rendre cette technologie plus facilement accessible et utilisable par les acteurs de la filière.