



41<sup>ème</sup> Journée de la Recherche Équine  
Jeudi 12 mars 2015

## Développement d'une technique efficace et répétable pour la production *in vitro* de jeunes embryons équins

Par

C. Douet<sup>1</sup>, O. Parodi<sup>1</sup>, F. Reigner<sup>2</sup>, P. Barrière<sup>2</sup>, T. Blard<sup>2</sup>, S. Deleuze<sup>3</sup>, G. Goudet<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UMR de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, F-37380 Nouzilly

<sup>2</sup> UEPAO, INRA, F-37380 Nouzilly

<sup>3</sup> Faculté de médecine vétérinaire, Clinique équine, Université de Liège, B-4000 Liège, Belgique

### Résumé

Notre objectif est de développer une technique efficace et répétable pour produire *in vitro* de jeunes embryons équins, puis de la mettre à la disposition de l'élevage équin. Cette technique permettra de produire plusieurs embryons par cycle et des embryons de petite taille qui ont un bon taux de survie après congélation classique. 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 fluide folliculaire préovulatoire pendant 27 heures, pré-incubés dans du fluide d'oviducte, puis co-incubés avec des spermatozoïdes pendant 18 heures. Après fécondation, les embryons ont été cultivés *in vitro* pendant 30 heures dans du milieu SOF ou DMEM-F12. Nous avons obtenu 67 à 76% de maturation *in vitro*, 40 à 67% de fécondation *in vitro*, et 40 à 80% de zygotes ayant initié les premières étapes du développement embryonnaire. Des expériences sont en cours pour améliorer la qualité des embryons afin de les transférer dans une jument receveuse.

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

### Summary

Our objective is to develop an efficient and repeatable technique for *in vitro* production of early equine embryos and transfer it to breeders. This technique will allow the production of several embryos per cycle and small embryos which have a good survival rate after classical freezing. Equine oocytes were collected either from slaughtered mares in a commercial slaughterhouse or from our experimental mares by ovum pick up. They were *in vitro* matured for 27 hours in a semi-synthetic maturation medium or in preovulatory follicular fluid, pre-incubated in oviductal fluid, co-incubated for 18 hours with spermatozoa and *in vitro* cultured in SOF or DMEM-F12 medium for 30 hours. The *in vitro* maturation rate ranged from 67 to 76%, the *in vitro* fertilization rate ranged from 40 to 67%, and the percentage of zygotes which had initiated the first steps of embryo development ranged from 40 to 80%. Further experiments are in progress to improve the quality of embryos in order to transfer them into recipient mares.

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



## Introduction

La plupart des équidés sauvages sont actuellement menacés de disparition, c'est le cas par exemple du zèbre de Grevy ou de l'âne sauvage d'Asie. De plus, plusieurs races d'équidés domestiques sont en voie d'extinction, avec moins de 100 juments en activité en 2013. C'est le cas par exemple pour le poney Landais, l'âne Bourbonnais, l'âne de Provence, le Grand Noir du Berry, l'âne Normand, etc. Plusieurs actions pour la sauvegarde des races en cours d'extinction et la préservation du patrimoine génétique ont été mises en place, dont la conservation des gamètes et des embryons par congélation. 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 totalement maîtrisée.

Dans ce cadre, la production d'embryons *in vitro* présente deux avantages. D'abord elle permet d'obtenir de jeunes embryons, de diamètre inférieur à 300µm, qui ont un meilleur taux de survie après congélation classique que les embryons collectés *in vivo* dans l'utérus à partir de 6,5 jours post-ovulation. Ensuite elle permet de produire plusieurs embryons par cycle en collectant par ponction folliculaire plusieurs ovocytes immatures qui seront maturés et fécondés *in vitro*. Les embryons produits seront cultivés *in vitro*, ils pourront ensuite être congelés et/ou transférés dans une femelle receveuse issue de la race en cours d'extinction ou d'une autre race.

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

### 1. Matériel et méthode

#### 1.1. Collecte, maturation et pré-incubation des ovocytes équins

Les ovocytes ont été collectés soit sur des juments abattues dans un abattoir commercial (n=234), soit sur les juments de notre troupeau expérimental par ponction folliculaire transvaginale sous échographie (n=70). Les ovocytes ont été placés pendant 27 heures dans un incubateur avec 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu de maturation *in vitro* composé soit de milieu semi-synthétique (TCM199 + sérum de veau fœtal + Epidermal Growth Factor ; Ambruosi *et al.*, 2013) soit de fluide folliculaire préovulatoire dans lequel la maturation a lieu naturellement. Le fluide folliculaire préovulatoire a été collecté précédemment par ponction folliculaire d'un follicule préovulatoire 34 heures après induction de l'ovulation par injection d'hCG (Chorulon). Les ovocytes ont ensuite été pré-incubés dans du fluide d'oviducte afin de reproduire la maturation finale de l'ovocyte qui a lieu naturellement dans l'oviducte (Ambruosi *et al.*, 2013). Un effet bénéfique des sécrétions d'oviductes équins ou porcins ayant été montré (Mugnier *et al.*, 2009), le fluide d'oviducte a été collecté sur des truies abattues dans un abattoir commercial et ayant des ovaires avec plusieurs follicules préovulatoires.

#### 1.2. Collecte et préparation du sperme équin

Le sperme équin a été collecté sur les étalons de notre troupeau expérimental à l'aide d'un vagin artificiel. Il a été centrifugé et incubé 5 heures à la concentration de  $10 \times 10^6$  spermatozoïdes/ml dans un milieu capacitant puis incubé en présence de procaine pour induire une hyperactivation (Ambruosi *et al.*, 2013).

#### 1.3. Fécondation *in vitro* et culture *in vitro* des embryons

Les ovocytes maturés dans les 2 milieux ont été tous incubés avec les spermatozoïdes ( $1 \times 10^6$  spermatozoïdes/ml) pendant 18 heures dans un incubateur avec 5% de CO<sub>2</sub>. Ils ont ensuite été répartis en 4 lots pour être cultivés *in vitro* pendant 30 heures dans un incubateur avec 5% de CO<sub>2</sub> et 5% d'O<sub>2</sub> dans 30µl de l'un des 4 milieux de culture testés : SOF, DMEM-F12-51445C, DMEM-F12-D8437, DMEM-F12-D8900 supplémentés avec du sérum de veau fœtal et de la gentamycine.

#### 1.4. Analyse du stade nucléaire

Les ovocytes et embryons ont été fixés dans du paraformaldéhyde pendant 20 minutes. L'ADN a été marqué par incubation dans du Hoechst 33342. La membrane des pronoyaux a été marquée par incubation avec un anticorps primaire anti-lamine A/C et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Les ovocytes et embryons ont été observés sous microscope à fluorescence.

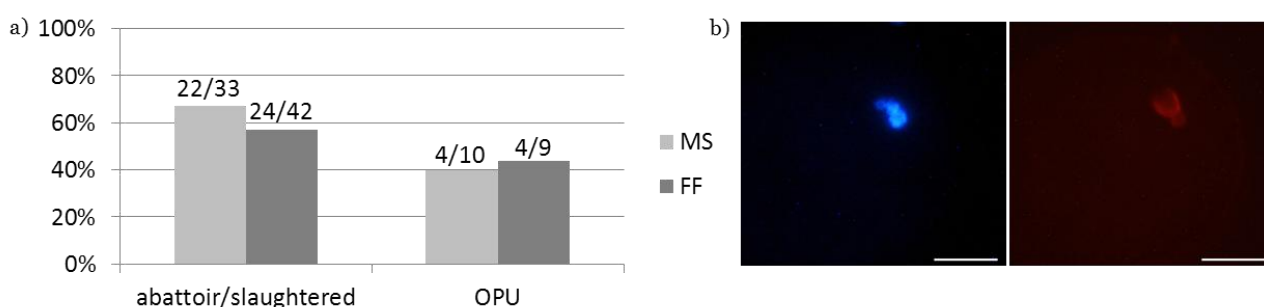
## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Taux de maturation après maturation *in vitro* (MIV)

Après 27 heures de MIV, les pourcentages d'ovocytes matures ont été évalués pour les ovocytes collectés sur des juments abattues. Ils n'étaient pas significativement différents entre le milieu semi-synthétique (76%, 16/21) et le fluide folliculaire préovulatoire (67%, 14/21).

### 2.2. Taux de fécondation après maturation et fécondation *in vitro* (FIV)

Après 27 heures de MIV et 18 heures de FIV, les pourcentages d'ovocytes fécondés (contenant un pronoyau issu de l'ovocyte et un pronoyau issu du spermatozoïde) n'étaient pas significativement différents entre le milieu semi-synthétique et le fluide folliculaire préovulatoire pour les ovocytes collectés sur des juments abattues ou par ponction folliculaire (figure Ia). Pour tous les ovocytes fécondés, les deux pronoyaux étaient très condensés avec une masse compacte de chromatine à l'intérieur de l'enveloppe nucléaire (figure Ib).



**Figure I:** a) Taux de fécondation des ovocytes collectés à l'abattoir ou par ponction (OPU) après maturation *in vitro* dans un milieu semi-synthétique (MS) ou du fluide folliculaire préovulatoire (FF). b) Un ovocyte fécondé ayant 2 pronoyaux condensés avec une masse compacte de chromatine en bleu à l'intérieur de l'enveloppe nucléaire en rouge. La barre d'échelle représente 60µm.

**Figure I:** a) Fertilization rate after collection from slaughtered mares or by ovum pick up (OPU), *in vitro* maturation in semi-synthetic medium (MS) or preovulatory follicular fluid (FF). b) A fertilized oocyte showing two condensed pronuclei with a compact mass of chromatin in blue within the nuclear envelope in red. Scale bar represents 60µm.

### 2.3. Taux de développement après maturation, fécondation et culture *in vitro*

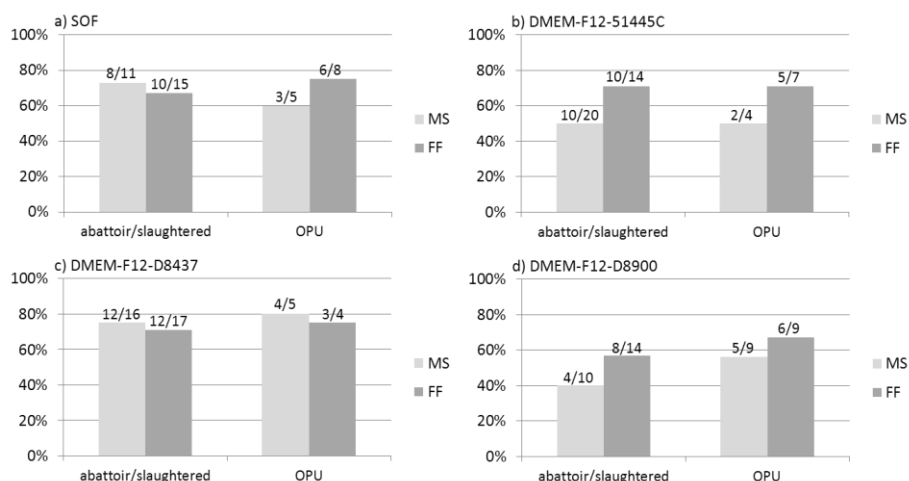
Après 27 heures de MIV, 18 heures de FIV, et 30 heures de culture *in vitro*, les pourcentages de zygotes (ovocytes fécondés ayant commencé les premières étapes du développement embryonnaire) n'étaient pas significativement différents entre le milieu semi-synthétique et le fluide folliculaire préovulatoire pour les ovocytes collectés sur des juments abattues ou par ponction folliculaire (figure II).

De plus, parmi les zygotes obtenus, 82% (89/108) contenaient deux pronoyaux côte à côte et complètement décondensés avec des filaments de chromatine diffus (figure IIIa) et 18% (19/108) avaient initié la première étape de clivage embryonnaire (2 à 6 cellules) mais présentaient des anomalies (figure IIIb). Le rapprochement des pronoyaux pour leur fusion, la décondensation de la chromatine dans les pronoyaux et le clivage sont les premières étapes du développement embryonnaire.

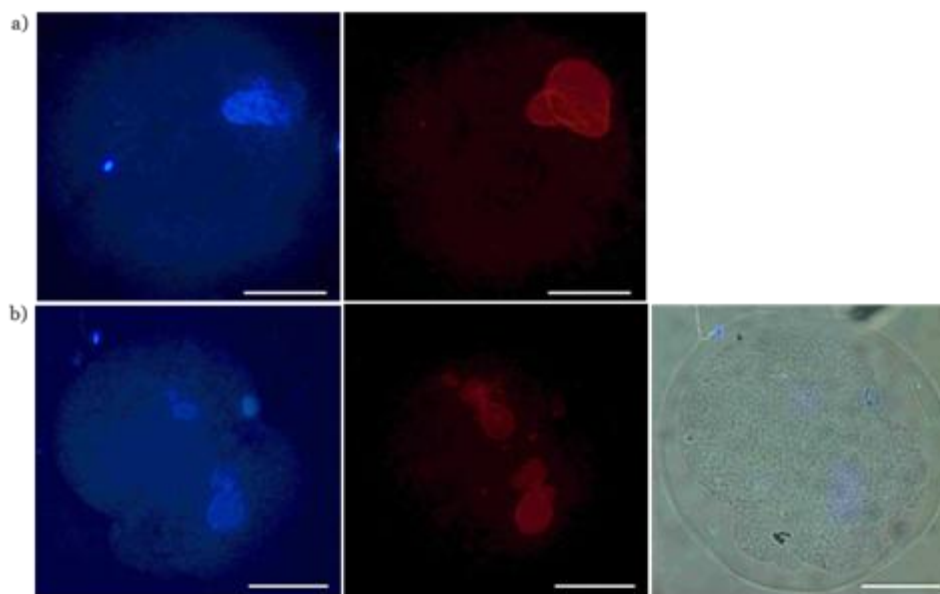
Nous avons donc développé une technique efficace de maturation et fécondation *in vitro* qui permet d'obtenir de forts taux de pénétration des spermatozoïdes et les premières étapes du développement embryonnaire. Comme nous obtenons des résultats similaires depuis 4 ans, nous considérons que cette technique est répétable. Des expériences sont en cours pour améliorer la qualité et la compétence au développement des embryons afin de les cultiver *in vitro* jusqu'au stade où ils pourront être transférés dans une jument receveuse.

## Remerciements

Nous remercions le personnel de l'UEPAO et de l'UMR PRC qui a participé à la collecte des ovocytes et du sperme et le personnel de l'abattoir de Vendôme. Nous remercions l'Ifce pour le financement de ce travail.



**Figure II :** Pourcentages de zygotes après collecte à l'abattoir ou par ponction (OPU), maturation *in vitro* dans un milieu semi-synthétique (MS) ou du fluide folliculaire préovulatoire (FF), fécondation *in vitro*, culture *in vitro* dans du a) SOF, b) DMEM-F12-51445C, c) DMEM-F12-D8437, d) DMEM-F12-D8900.  
**Figure II:** Percentage of zygotes after collection from slaughtered mares or by ovum pick up (OPU), *in vitro* maturation in semi-synthetic medium (MS) or preovulatory follicular fluid (FF), *in vitro* fertilization and *in vitro* culture in a) SOF, b) DMEM-F12-51445C, c) DMEM-F12-D8437, d) DMEM-F12-D8900.



**Figure III :** a) Un zygote avec 2 pronoyaux complètement décondensés après culture *in vitro* dans le milieu SOF, b) un embryon anormalement clivé avec 2 cellules et 4 noyaux après culture *in vitro* dans le milieu SOF, la chromatine est colorée en bleue, les membranes nucléaires en rouge.

**Figure III:** a) A zygote with 2 pronuclei fully decondensed after *in vitro* culture in SOF medium, b) an abnormally cleaved embryo with 2 cells and 4 nuclei after *in vitro* culture in SOF medium, chromatin is stained in blue, nuclear envelopes in red.

## Références

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? *Reproductive Biology and Endocrinology* 7: 129.

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 is secreted in the oviduct and involved in the mechanism of fertilization in equine and porcine species. *Reproduction* 146: 119-133.