



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

## Premières naissances en France après transfert d'embryons équins génotypés et cryoconservés

Par

F. Guignot<sup>1</sup>, F. Reigner<sup>2</sup>, G. Duchamp<sup>2</sup>, T. Blard<sup>2</sup>, P. Barrière<sup>2</sup>, J.M. Yvon<sup>2</sup>, J.M. Allamelou<sup>3</sup>, S. Danvy<sup>4</sup>, P. Mermillod<sup>1</sup>, M. Caillaud<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Inra, UMR85 PRC, F-37380 Nouzilly, France

<sup>2</sup> Inra, UE1297 PAO, F-37380 Nouzilly, France

<sup>3</sup> Labogena, F-78353 Jouy en Josas, France

<sup>4</sup> Ifce, la Jumenterie du Pin, F-61310 Exmes, France

### Résumé

La cryoconservation des embryons et leur génotypage avant transfert dans une femelle receveuse ont de multiples intérêts, économiques, sanitaires, génétiques ..., et le maintien de la biodiversité. Dans ce travail, nous avons testé en conditions de terrain une technique de cryoconservation des embryons équins après biopsie et microaspiration du fluide blastocoelique, avec transfert immédiatement après réchauffement. Les embryons ont été collectés à l'Unité Expérimentale de Physiologie Animal de l'Inra de Nouzilly sur des ponettes Welsh B 7 jours après ovulation. Après biopsie et aspiration de 70% du fluide blastocoelique, les embryons ont été vitrifiés. Les paillettes d'embryons ont ensuite été transportées jusqu'à la Jumenterie du Pin dans un container d'azote liquide. Les embryons ont été réchauffés puis transférés, un par un, par voie cervicale sur des juments receveuses. Sexe, couleur de robe, myotonie, EBJ (épidermolyse bulleuse jonctionnelle) et marqueurs de parenté ont été prédéterminés à partir des cellules biopsiées. Sur 7 embryons transférés avec leur capsule, 4 poulains sont nés (57,1%), de sexe prédit (100% d'exactitude). Pour les autres génotypages réalisés, 21 à 100% des allèles ont pu être prédéterminés en fonction de l'embryon ; cette prédétermination des allèles sur cellules biopsiées s'est avérée exacte à 99% en moyenne pour les 4 embryons après comparaison avec les poulains à la naissance.

**Mots clés : Equin, embryon, biopsie, diagnostic préimplantatoire DPI, vitrification, transfert**

### Summary

Embryo cryopreservation and genotyping before transfer to recipients have different interests, economical, health, genetic importances ..., and biodiversity maintain. In this study, we have tested in field condition a cryopreservation technique for equine embryo after biopsy and blastocoel fluid microaspiration, with transfer to recipient immediately after warming. The embryos were collected at Nouzilly in Inra on Welsh B pony mares, 7 days after ovulation. After biopsy and microaspiration of about 70% of blastocoel fluid, embryos were vitrified. The straws containing the embryos were then transported to la Jumenterie du Pin in liquid nitrogen container. Embryos were warmed and transcervically transferred, one per recipient, to mare recipient. Sex diagnosis, coat color, myotony, JEB (junctional epidermolysis Bullosa) genotyping and genetic identification markers were predetermined on biopsied cells. On 7 encapsuled transferred embryos, 4 gave pregnancy (57.1%) with right diagnosed sex (100% accuracy). The predetermination of the other genotypings varied between 21 and 100% for the 4 embryos. The accuracy rate was 99% on average for the 4 embryos after comparison with the foal genotyping at birth.

**Key-words: Equine, embryo, biopsy, PGD, vitrification, transfer**



## Introduction

La cryoconservation des embryons et leur génotypage avant transfert dans une femelle receveuse sont des biotechnologies de la reproduction à multiples intérêts. Le premier est de pouvoir maintenir la biodiversité des races, notamment celles à petits effectifs ou celles en voie de disparition. Dans l'espèce équine, poney landais ou cheval de trait Poitevin mulassier sont entre autre concernés. Certes, actuellement, il existe une cryobanque de semence d'étalons, mais en plus du fait que tous les étalons n'ont pas une semence congelable, il sera difficile de reconstituer une race pure à partir de semence seulement. Le second intérêt est lié au coût actuellement élevé pour les centres de transfert pour entretenir un troupeau de juments receveuses, puisque celles-ci doivent être au même stade physiologique le jour du transfert que les juments donneuses. Cette contrainte limite fortement l'essor du transfert d'embryons. La cryoconservation des embryons apporte une souplesse de gestion des femelles dans le temps et dans l'espace. Le troisième intérêt pour cryoconserver des embryons est de pouvoir régénérer très vite des troupeaux qui auraient subi des pertes suite à des problèmes sanitaires ou autres, et ce sans avoir recours à un croisement avec une autre race. Cet intérêt est couplé avec la possibilité d'accroître les échanges internationaux. Actuellement, seul un échange/transport sur maximum 24h des embryons à l'état frais est possible, ce qui est très limitant. Le génotypage sur embryon (diagnostic préimplantatoire, DPI), quant à lui, est un avantage indéniable puisqu'il permet de sélectionner les animaux à naître sur des critères de recherche donnés et ce avant le transfert de l'embryon dans la receveuse. Il est possible à partir d'analyses d'ADN embryonnaire de déterminer le sexe du futur poulain, mais également certaines maladies génétiques comme le SCID (severe combined immunodeficiency) ou l'EBJ (épidermolyse bulleuse jonctionnelle) qui sont létales. Dans le futur, d'autres caractères comme ceux liés à des traits de comportements, tels que l'émotivité ou la sociabilité, pourraient être recherchés. Prévoir les caractéristiques d'un poulain à naître et notamment pouvoir éviter de transférer des embryons qui pourraient ne pas être viables s'ils sont porteurs de gènes létaux constituent un atout important pour la filière équine et pour la conservation du patrimoine dans cette espèce.

Contrairement aux espèces bovines, ovines, caprines et même chez l'homme où la cryoconservation est maîtrisée depuis longtemps, dans l'espèce équine, elle était jusqu'à présent assez mal maîtrisée. En cause, deux caractéristiques bien particulières à l'embryon équin : 1/la capsule, couche acellulaire de glycoprotéines, entre l'embryon et la zone pellucide qui est présente du 7<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de gestation et qui gênerait le passage des cryoprotecteurs et 2/une large cavité blastocœlique qui diminuerait la viabilité des embryons après cryoconservation (Barfield *et al.*, 2009 ; Choi *et al.*, 2011), comme c'est le cas pour l'embryon humain au stade blastocyste (Vanderzwalmen *et al.*, 1999). Lors d'une collecte réalisée 7 jours après ovulation, le diamètre des embryons peut osciller entre 200 et 700  $\mu\text{m}$  : plus le diamètre de l'embryon est gros, plus il est difficile à cryoconserver car plus la quantité de liquide blastocœlique à se transformer en cristaux déléteurs pour la survie de l'embryon sera grande. Récemment, une biopsie cellulaire de l'embryon réalisée par micro-aspiration suivie d'une aspiration de plus de 70% du volume blastocœlique a permis de s'affranchir de ce problème (Choi *et al.*, 2011). En appliquant cette technique avant vitrification, ces auteurs ont obtenu des gestations jusqu'à jour 30 (battements cardiaques décelés) à partir d'embryons de 400 à 560  $\mu\text{m}$  (5/7 ; 71%). Nos propres résultats de transfert à l'INRA de Nouzilly sur ponettes Welsh B avec des embryons biopsiés, micro-aspirés, vitrifiés, dégelés et mis 3 à 4 h en culture *in vitro* avant transfert le confirment (Reigner *et al.*, Cryo 2013).

Le but de notre travail est de valider cette technique de cryoconservation des embryons après biopsie, microaspiration du fluide blastocœlique en conditions de terrain avec un transfert immédiat des embryons après réchauffement dans des juments receveuses.

## 1. Matériel et méthodes

### 1.1. Animaux

**Donneuses** : les embryons ont été produits à partir de ponettes Welsh B cycliques de l'UEPAO (Unité Expérimentale Physiologie Animale de l'Orfrasière) à l'INRA de Nouzilly suivant la méthode décrite par Moussa *et al* (2005). Brièvement, la croissance folliculaire des ponettes donneuses a été suivie par échographie et dès qu'un follicule préovulatoire atteignait un diamètre supérieur ou égal à 33 mm, l'ovulation était induite. Le lendemain de l'induction de l'ovulation, la donneuse était inséminée avec du sperme frais d'étalon fertile. Les embryons ont été collectés par les voies naturelles 7 jours après ovulation au stade blastocyste.



Receveuses : les transferts d'embryons ont été réalisés par voie cervicale sur des juments de la Jumenterie du Pin de moins de 10 ans, à raison d'un embryon par receveuse, comme fait classiquement sur le terrain. Suivi folliculaire et induction d'ovulation ont été effectués de la même façon que pour les donneuses. Le transfert a été fait 6 jours après l'ovulation.

### **1.2. Collecte des embryons**

Les embryons ont été collectés par lavage de l'utérus avec du ringer lactate (3 x 500 mL) maintenu à 37°C. Après filtration du milieu de collecte, les embryons ont été recherchés sous loupe binoculaire, lavés 10 fois dans un milieu tamponné (embryo holding solution) suivant les règles sanitaires de l'IETS, leur diamètre a été mesuré et leur qualité morphologique évaluée selon la grille de notation élaborée par McKinnon et Squires (1988).

### **1.3. Biopsie des embryons**

Les embryons ont été déposés un par un dans des gouttes de 70 µL de milieu tamponné. Les embryons ont été maintenus à 9h par une pipette de maintien, bouton embryonnaire orienté à midi ou 6h. Une pipette d'aspiration reliée à un système Piezo a alors été introduite dans l'embryon à 3h. Le passage à travers la capsule est rendu possible grâce aux vibrations électriques générées par le système Piezo. Les embryons ont été vidés de 70% de leur fluide blastocœlique puis des cellules du trophectoderme ont été aspirées. Elles ont ensuite été déposées dans un tube de 0,5 mL avec 0,2 µL de milieu tamponné et conservées à -80°C en attendant la réalisation du multigénotypage.

### **1.4. Vitriification des embryons**

Les embryons ont été cryoconservés par vitrification ultra rapide dans des paillettes OPS (open pulled straw) très fines. Ils ont été mis un par un dans du milieu mSOF enrichi avec 20 % de SVF et 19 mM de glucose 2 fois 5 min. Ensuite, ils ont été mis 5 minutes dans ce même milieu avec ajout en plus de 1,5 M d'éthylène glycol, puis 40 sec avec ajout de 7 M d'éthylène glycol et 0,6 M de galactose. Pendant ce temps de 40 secondes, les embryons ont été montés dans la paillette et plongés dans l'azote liquide. Les milieux ont été mis à gazer et à chauffer au moins 1h avant dépôt des embryons.

### **1.5. Dégel, transfert et suivi des gestations**

Les embryons ont été transportés depuis l'Inra de Nouzilly jusqu'à la Jumenterie du Pin dans un container d'azote liquide. Lors du réchauffement, les paillettes ont été vidées dans le milieu mSOF enrichi de 20% de sérum et de sucrose à hauteur de 0,22, puis 0,13, puis 0,0 M. Ces milieux ont été mis à gazer la veille au soir, puis amenés à la Jumenterie du Pin le jour du transfert dans des tubes pleins, sans air. Là, les tubes ont été mis à chauffer (38°5), puis leur contenu a été vidé dans des boîtes 4 puits juste avant le réchauffement des paillettes. Après réchauffement, les embryons ont été montés individuellement dans une paillette de transfert, puis la paillette dans un pistolet de transfert. Cinq jours après transfert, les juments ont été échographiées pour vérifier la présence d'une vésicule embryonnaire. Après 25 jours, les juments ont de nouveau été échographiées pour déceler la présence de battements cardiaques confirmant la viabilité de l'embryon. Une dernière échographie de contrôle a été réalisée à 5 mois de gestation.

### **1.6. Multigénotypage des embryons**

L'ADN des biopsies cellulaires déposées dans les tubes de 0,5 mL a été préamplifié sur kit. La prédétermination du sexe du futur poulain a été réalisée par PCR duplex avec amplification de deux fragments génomiques, l'un spécifique du chromosome Y et l'autre se trouvant à la fois sur le chromosome X et le chromosome Y. Trois marqueurs de la couleur de robe (extension, agouti et crème), deux marqueurs en rapport avec des maladies génétiques (la myotonie et l'épidermolyse bulleuse jonctionnelle H-EBJ) et 14 marqueurs microsatellites de parenté ont également été amplifiés par PCR multiplex. Les résultats ont été confrontés à ceux obtenus à partir du sang des poulains à la naissance et du sang des parents.

## **2. Résultats**

### **2.1. Résultats de transfert**

Les résultats de transfert se trouvent dans le tableau 1. Au total, 11 paillettes d'embryon ont été décongelées sur 3 jours de transfert. A chaque transfert, 3 juments avaient ovulé 6 jours auparavant et ont pu être utilisées comme receveuses. Le jour de la première série de transferts, 3 embryons ont été décongelés. Deux



avaient leur capsule fendue, mais tous ont été transférés. Le jour de la deuxième série de transfert, une paillette a été retrouvée cassée dans la cuve d'azote et l'embryon a été perdu. Une quatrième paillette a dû être décongelée. Tous avaient une capsule intacte. Pour la troisième et dernière série de transfert, 4 embryons ont dû être décongelés, car l'un d'entre eux avait sa capsule fendue et s'est cassé avant montage dans la paillette. Au final, sur onze paillettes décongelées, neuf embryons ont été transférés.

A partir des 2 embryons transférés sans capsule, aucune gestation à 14 jours (DG14) n'a été obtenue. Par contre, sur les 7 autres embryons transférés avec leur capsule, 5 DG14 positifs ont été obtenus (71,4%). A jour 16, une gestation a coulé. A DG25, 4 gestations étaient toujours en cours (57,1%) : toutes ont continué jusqu'à la mise-bas. Des embryons témoins ont été produits à la Jumenterie du Pin en parallèle et transférés en frais dans des juments. Sur les 3 embryons collectés et transférés, tous ont donné une gestation à 25 jours (présence d'une vésicule cardiaque active) (100%). Les gestations ont été volontairement stoppées.

Les deux premiers poulains issus de transfert d'embryon biopsiés et cryoconservés sont nés le 18 mai, deux mâles. Le premier est né 15 jours après le terme et le second 15 jours avant terme. Les deux autres juments ont mis bas le 26 mai, avec 8 jours d'avance sur le terme : deux femelles sont nées. Les 4 poulains étaient tous vigoureux et en bonne santé, et ont été bien acceptés par leur mère porteuse respective (Figure 1).

**Tableau 1 : Résultats de transfert**  
*Table 1: Transfer results*

Série de transfert	Mère	Père	Grade	Diamètre (µm)	Receveuse	Survie après transfert	Mise bas
1	W617	MW478	1	322	Vanana Vanana	DG 14 -	/
31 mai 2013	W594 *	MW478	1	422	Rainfield Warrior	DG 14 -	/
	W606 *	MW483	1	422	Rhapsodie	DG 14 -	/
2	W 582	MW638	1,5	288	Titgeisha	DG 14 -	/
	W538	MW483	1,5	266	Visite	DG 25 +	E freeze, 18 mai 2014
5 juin 2013	W625	MW638	1	655	/		
	W602	MW638	1	333	There in the Valley	DG 14 +, DG 16 -	/
3	W608	MW329	1,5	244	Vanana Vanana	DG 25 +	Edolia, 26 mai 2014
	W560	MW478	2	166	Ascot	DG 25 +	E bernatus, 18 mai 2014
10 juillet 2013	W595 *	MW483	1,5	555	/	/	/
	W543	MW483	1,5	233	There in the Valley	DG 25 +	Expérience, 27 mai 2014

\* : capsule fendue au dégel ; DG : diagnostic de gestation

**Figure I** : Photo des 4 poulains à la naissance  
*Figure I: Photo of the 4 foals at birth*



## 2.2. Résultats de génotypage

Le sexage des embryons à partir des cellules embryonnaires biopsiées a donné comme résultat 2 embryons femelles (donneuses W 608 et W 543) et deux embryons mâles (donneuses W 538 et W 560). A la naissance, la prédiction s'est avérée exacte à 100%.

Les résultats de l'analyse des 19 autres marqueurs génétiques testés se trouvent dans le tableau 2.

**Tableau 2** : Résultats de multigénotypage  
*Table 2: Multigenotyping results*

	Sur le sang		sur cellules embryonnaires biopsiées			
	des 4 poulains	des parents (4 mères, 3 pères)	W538	W608	W560	W543
% d'allèles déterminés (N)	98,1 (152)	100 (266)	94,7 (38)	21,1 (38)	100 (38)	36,8 (38)
% d'allèles exacts (N)	99,3 (144)	/	100 (36)	100 (8)	100 (38)	92,3 (14)

Le pourcentage d'allèles déterminés à partir du sang des poulains et des parents est égal à 98,1 et 100% respectivement. Le pourcentage d'allèles déterminés à partir des cellules embryonnaires biopsiées est variable, il est égal à 21, 37, 95 et 100% en fonction de l'embryon considéré.

Après comparaison avec les parents, 99,3% des allèles déterminés à partir du sang des poulains se sont révélés exacts. En moyenne, 98,9% des allèles déterminés à partir des cellules embryonnaires biopsiées se sont révélés exacts après comparaison avec les poulains.



### 3. Discussion

Les résultats de transfert sur juments obtenus dans cette étude, juste après réchauffement d'embryons biopsiés et vitrifiés, sont très encourageants. Ils sont comparables à ceux obtenus par Choi *et al.* (2011). Ils démontrent qu'à présent il est tout à fait envisageable de proposer cette biotechnologie à la filière professionnelle équine. Une remarque est à apporter concernant les deux embryons transférés sans capsule. Au stade de développement auquel étaient les embryons lors de la biopsie (stade blastocyste), il est très difficile pour l'embryon de refaire une capsule si celle-ci vient à disparaître. Or sans capsule, la viabilité de l'embryon est quasi nulle. Les embryons à capsule endommagée ne doivent donc pas être transférés pour ne pas bloquer une receveuse alors qu'ils ont une chance infime de donner une gestation.

Nos résultats de prédiction du sexe à partir de l'ADN de quelques cellules embryonnaires sont excellents, 100% d'exactitude. Les deux fragments génomiques désignés pour l'amplification PCR sont tout à fait pertinents. Concernant les autres marqueurs génomiques étudiés, en fonction de l'embryon biopsié, donc de la quantité de cellules embryonnaires déposées au fond du tube pour réaliser l'amplification génomique, la prédétermination des allèles a été très variable, de très faible (21%) à excellente (100%). Cette variabilité peut être due au nombre plus ou moins important de cellules présentes dans les différentes biopsies réalisées, mais également à la sensibilité des tests en fonction du génotype recherché. Par contre, une fois les allèles déterminés, la prédiction annoncée à partir des quelques cellules embryonnaires biopsiées est excellente, 99% d'exactitude en moyenne. Elle est aussi bonne que celle obtenue à partir des cellules sanguines.

### Conclusions

A l'heure d'aujourd'hui, nous disposons dans l'espèce équine de techniques de cryoconservation et génotypage des embryons permettant d'obtenir une bonne viabilité après transfert et une prédiction très bonne des caractéristiques génétiques du futur poulain avant transfert de l'embryon dans la receveuse. L'ensemble de ces techniques est actuellement en voie d'appropriation par les acteurs de la filière équine. Reste à essayer de simplifier l'ensemble du processus pour rendre cette biotechnologie de la reproduction encore plus accessible dans l'intérêt de tous.

### Remerciements

A l'ensemble du personnel de la jumenterie de l'UEPAO de Nouzilly et de la Jumenterie du Pin.  
A l'Ifce qui a financé une grande partie de ces expériences.

### Références

- Barfield, J.P., McCue, P.M., Squires, E.L., Seidel Jr, G.E., 2009. Effect of dehydration prior to cryopreservation of large equine embryos. *Cryobiology* 59, 36-41.
- Choi, Y.H., Velez, I.C., Riera, F.L., Roldán, J.E., Hartman, D.L., Bliss, S.B., Blanchard, T.L., Hayden, S.S., Hinrichs, K., 2011. Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology* 76, 143-152.
- McKinnon, A.O., Squires, E.L., 1988. Morphological assessment of the equine embryo. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192, 401-406.
- Moussa, M., Bersinger, I., Doligez, P., Guignot, F., Duchamp, G., Vidament, M., Mermillod, M., Bruyas, J.F. 2005. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology* 64, 1619-1632.
- Reigner, F., Perreau C., Blard, Barrière, P., Gascogne T., Yvon, J.M., Gaude, Y., Mermillod, P., Duchamp, G., Guignot, F. 2013. First pregnancy after transfer of biopsied and vitrified embryos in Welsh pony mare. 3ème Congrès CRYO, Berlin, A-3.
- Vanderzwalmen, P., Bertin, G., Debauche, C., Standaert, V., van Roosendaal, E., Vandervorst, M., Bollen, N., Zech, H., Mukaida, T., Takahashi, K., Schoysman, R., 2002. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Human reproduction* 17, 744-751.