

1540

16ème Journée d'Etude



7 Mars 1990

PREMIERES FECONDATIONS IN VITRO CHEZ LE CHEVAL

par E. PALMER, Jacqueline BEZARD,
Michèle MAGISTRINI et G. DUCHAMP
Station de Physiologie de la Reproduction
I.N.R.A.
37380 - NOUZILLY

Résumé

La séquence ayant permis la première gestation chez la jument après fécondation *in vitro* est présentée : induction de maturation folliculaire finale, ponction et rinçages du follicule, préincubation de l'ovocyte, insémination par du sperme capacité par l'ionophore A23187, culture pendant 60 heures et transfert chirurgical dans l'oviducte. Les rendements sont encore faibles : 0,7 ovocyte par ponction folliculaire, 0,2 fécondation par ovocyte inséminé, 1 gestation pour 8 tentatives de transfert. Des applications de ces travaux apparaissent déjà : nouveau dilueur pour le sperme, mise en évidence d'ovocytes anormaux.

MOTS CLES : MATURATION OVOCYTAIRE - CAPACITATION DU SPERME - FECONDATION - EMBRYON - EQUIN.

Summary

The sequence which allowed the first pregnancy in the mare after *in vitro* fertilization is described: induction of final follicular maturation, puncture and flushing of the follicle, preincubation of the oocyte, insemination with semen capacitated by ionophore A23187, culture of the embryo for 60 hours and surgical transfer into the oviduct. The efficiency of the different steps is still low: 0,7 oocyte per punctured follicle, 0,2 fertilization per inseminated oocyte, 1 pregnancy out of 8 attempts of transfer. Some applications of this research are already in progress: new diluent for stallion semen, description of abnormal oocytes.

KEY WORDS : OOCYTE MATURATION - SPERM CAPACITATION - FERTILIZATION - EMBRYO - EQUINE.

© - CEREOPA 1990

OBJECTIFS

La fécondation in vitro, c'est :

- 1 - un objectif de recherche mobilisant toutes nos connaissances dans le but de démontrer la maîtrise de chacune des étapes de la fécondation.
- 2 - un moyen d'obtenir des jeunes embryons pour des programmes futurs (clonage, transfert de gènes), à des stades que l'on ne peut collecter que par chirurgie.
- 3 - un moyen de faire produire des embryons à certaines juments stériles.
- 4 - comme toute recherche fondamentale, l'occasion d'observations ou d'applications imprévues.

ETAPES A FRANCHIR ET OPTIONS CHOISIES

Réaliser la fécondation in vitro consiste à prélever des ovules chez la femelle, des spermatozoïdes chez le mâle, à les mettre en contact en tube. Si la fécondation est obtenue, il faut encore réaliser un début de développement avant de remettre l'embryon produit en place dans le tractus génital d'une femelle porteuse (la donneuse elle même ou une receveuse).

Nous allons examiner rapidement chacune des étapes.

1 - La collecte des ovocytes

La superovulation étant peu efficace chez la jument et en l'attente de progrès dans ce domaine, le choix se fait entre la collecte d'un ovocyte par cycle au stade préovulatoire ou l'utilisation d'ovocytes prélevés dans des petits follicules d'ovaires de juments abattues.

Nous avons mis au point (PALMER et al., 1987) une méthode de collecte non chirurgicale de l'ovocyte préovulatoire de jument. L'étude histologique (KING et al., 1987) de ces ovocytes a démontré l'homogénéité de maturité de ces ovocytes.

Le rendement est de 0,7 ovocytes par jument prélevée. Bien que produisant un petit nombre d'ovocytes, cette technique nous assure le meilleur matériel possible.

D'autres équipes (OKOLSKI et al., 1987, ZHANG et al., 1989) ont choisi une autre voie consistant à prélever les ovocytes sur des ovaires d'abattoir. Le rendement est bien plus élevé: 10 à 15 ovocytes par ovaire lors d'essais que nous avons faits. Cependant ces ovocytes sont à des stades variables et nécessitent une maturation finale que l'on essaie de réaliser en tube. Cette technique, lorsqu'elle sera au point, constituera la méthode de choix pour produire des embryons en grand nombre.

2 - La préparation du sperme

Au moment de l'éjaculation le spermatozoïde n'est pas prêt pour pénétrer un ovocyte. Il lui faut une ultime maturation, appelée capacitation, qui le préparera à son approche finale de l'ovocyte et à sa pénétration. Cette approche finale (traversée de la zone pellucide de l'ovocyte) et la pénétration se font en se frayant un passage grâce à la libération d'enzymes contenus dans l'acrosome, portion antérieure de la tête du spermatozoïde. La libération de ces enzymes se fait par ouverture de canaux dans la membrane externe de l'acrosome et la membrane cellulaire. Une image caractéristique en microscopie électronique de cette "réaction acrosomique" est présentée dans la figure 1 c.

La capacitation du sperme se fait habituellement par incubation du sperme à 37°C pendant plusieurs heures. Cela a été l'occasion pour nous de mettre au point un nouveau dilueur de sperme dans lequel la survie est augmentée. Cependant cela n'a pas suffi pour obtenir la réaction acrosomique d'un grand nombre de spermatozoïdes.

L'activation des cellules et en particulier la fusion des membranes est en général obtenue en réponse à un signal spécifique, mais selon un mécanisme très général de pénétration du calcium dans la cellule. Nous avons choisi de court-circuiter le signal spécifique et de réaliser l'activation des spermatozoïdes en forçant l'entrée du calcium par de l'Ionophore A23187.

Afin de vérifier la capacité des spermatozoïdes à pénétrer l'ovocyte, il est possible de les faire pénétrer des ovocytes de hamster débarrassés de leur zone pellucide. C'est ce que nous avons réalisé lors d'expériences préliminaires (figure 1 d). La présence de plusieurs noyaux dans ces ovocytes de hamster est la preuve de la pénétration des spermatozoïdes et de la décondensation de leur noyau; ce n'est malheureusement pas la preuve de la capacitation ou du pouvoir fécondant d'un sperme.

3 - La fécondation proprement dite

Les conditions de matériel et de milieu employées en France en médecine humaine ont été utilisées. La France est en effet un des pays où cette technique est la plus développée actuellement et certains matériels (le milieu B2 INRA, MENEZO 1985) font autorité. L'addition de 15% de sérum de veau foetal, une température un peu élevée de 38,5°C et une incubation sous 5% de CO₂ sont des conditions classiques bien que l'utilité de chaque élément ne soit pas toujours prouvée.

C'est l'utilisation de sperme capacité par l'Ionophore A23187 et de ces conditions de culture qui nous ont permis d'obtenir le 05/10/1988 le premier embryon équin issu de fécondation *in vitro* présenté en figure 1 e. Depuis cette date, nous avons essayé de féconder 113 ovocytes selon ce protocole ou des protocoles peu différents. Dans 23 cas (20%) l'ovocyte a été pénétré par les spermatozoïdes et 16 fois (14%) il s'est segmenté et a commencé son développement. La preuve que ces segmentations ne sont pas artéfactuelles est apportée par la microscopie électronique qui a permis de retrouver le flagelle d'un spermatozoïde à l'intérieur des cellules d'un de ces embryons (figure 1 f). Le rendement est donc encore faible. A ce jour aucune autre équipe ne semble avoir obtenu d'embryons par fécondation *in vitro* et malgré son faible rendement notre technique constitue actuellement la référence.

4 - Culture du jeune embryon

On considère que pour pouvoir être transféré dans l'utérus un embryon doit avoir atteint le stade morula (J5 ou J6). Le choix doit donc être fait entre le transfert dans l'oviducte (lieu de séjour de l'embryon pendant ses 5 premiers jours) ou la culture pour une durée de 5 jours.

Nos premiers essais de culture, bien que positifs (voir communication BEZARD et al.), sont encore trop partiels et ne portent pas sur des durées suffisantes pour être appliqués.

Aussi, avons nous décidé de transférer quelques embryons après seulement 48 heures de culture au stade 4 à 6 cellules.

5 - Mise en place de l'embryon

La méthode employée est dérivée de la technique de transfert d'embryon par chirurgie sur la jument debout, développée au Colorado (SQUIRES et al., 1982). La sédation obtenue par le DOMOSEDAN et une large anesthésie locale permettent d'extérioriser la corne utérine (dans le cas de la méthode de Squires) ou l'ovaire et l'oviducte (dans notre cas) sans douleur apparente et sans agitation chez la jument receveuse. A titre d'apprentissage nous avons retransféré des ovocytes dans l'oviducte de 3 juments inséminées, le transfert a semblé satisfaisant, mais aucune gestation n'a été obtenue. Ensuite, 8 embryons obtenus par fécondation *in vitro* ont été transférés. Une seule gestation (à la 6ème tentative) a été obtenue le 27/07/89.

L'embryon utilisé est présenté figure 1 g et sa première image échographique positive à J14 figure 1 h. Le dernier examen à 6 mois de gestation est parfaitement normal et la naissance est attendue pour la fin Juin 1990.

CONCLUSION

Obtenir le premier embryon et la première gestation après fécondation *in vitro* était un objectif ambitieux qui a été atteint au prix de beaucoup d'efforts. Obtenir le succès de façon régulière en demandera tout autant. Souvenons nous qu'il s'est écoulé plus de 10 ans entre le premier transfert d'embryon réussi et l'utilisation commerciale de la méthode. Cependant ces travaux ont dès à présent généré des applications pratiques: un nouveau dilueur pour le sperme d'étalon dérivé des milieux d'incubation des spermatozoïdes est en cours de testage; des observations originales sur la fréquence des ovocytes anormaux permettront d'interpréter la faible fertilité de la jument dans certaines circonstances.

BIBLIOGRAPHIE

KING W.A., BEZARD J., BOUSQUET D., PALMER E. et BETTERIDGE K.J., 1987. The meiotic stage of preovulatory oocytes in the mares. *Genome*, 29, 679-682.

MENEZO Y., 1985. Milieux de culture pour la fécondation in vitro. *Ann. Biol. Clin.* 43, 27-31.

OKOLSKI A., BABUSIK P., TISCHNER M. et LIETZ N., 1987. Evaluation of mare oocyte collection methods and stallion sperm penetration of zona-free hamster ova. *J. Reprod. Fert.* 35, 191-196.

PALMER E., DUCHAMP G., BEZARD J., MAGISTRINI M., KING W.A., BOUSQUET D. et BETTERIDGE K.J., 1987. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. *J. Reprod. Fert.* 35, 689-690.

SQUIRES E.L., IULIANO M.F. et SHIDELER R.K., 1982. Factors affecting the success of surgical and non-surgical equine embryo transfer. *Therio.* 17, 35-41.

ZHANG J.J., BOYLE M.S. et ALLEN W.R., 1989. Recent studies on in vivo fertilization of in vitro matured horse oocytes. *Eq. Vet. J.* 8, 101-104.

Figure 1 : Etapes successives pour l'obtention de la première gestation après fécondation in vitro.

Successive steps in order to obtain the first pregnancy after in vitro fertilization.

- a: Ponction non chirurgicale de follicule de jument.
- b: Ovocyte trouvé dans le liquide de ponction d'un follicule préovulatoire(x20).
- c: Spermatozoïdes après réaction acrosomique vus au microscope électronique :les restes de la membrane de la portion antérieure de la tête forment un chapelet de vésicules(x9000).
- d: Ovocytes de hamster débarrassés de leur zone pellucide et pénétrés par des spermatozoïdes d'étalon. Le noyau des spermatozoïdes se décondense (flèche) comme lors d'une fécondation normale(x350).
- e: Premier embryon obtenu par fécondation in vitro présentant 4 cellules 42 heures après l'insémination(x200).
- f: Flagelle de spermatozoïde (flèche) dans l'ooplasmе d'un embryon FIV ,preuve de la fécondation (vu au microscope électronique x32000).
- g: Embryon FIV qui donnera la première gestation, photographié 60 heures après insémination, juste avant son transfert(x200).
- h: Echographie à J15 de la première vésicule embryonnaire après fécondation in vitro et transfert de l'embryon.

Figure 1

