



Les techniques de reproduction assistée en élevage équin

Par J. Bézard et F. Guignot
INRA-Reproduction Equine, PRMD
37380 Nouzilly

Résumé

Les techniques de procréation assistée ont été testées dans l'espèce équine afin de (1) maîtriser la fécondation et de (2) produire un nombre important de jeunes embryons. Elles se décomposent en plusieurs étapes, qui vont de la collecte des gamètes (ovocytes matures / immatures, spermatozoïdes), jusqu'au transfert d'embryons, en passant par la maturation des ovocytes *in vitro*, la fécondation des gamètes *in vitro* (technique conventionnelle ou assistée), et par le développement embryonnaire précoce *in vitro*. Des techniques de transfert d'ovocytes dans l'oviducte ou dans le follicule d'une jument receveuse, inséminée, ont également été testées. Les résultats de l'ensemble de ces techniques permettent d'être optimiste. Toutefois, certaines de ces technologies doivent être améliorées avant leur utilisation sur le terrain.

Mots-clés : équins, ovocytes, maturation, fécondation, reproduction assistée.

Summary

Assisted fertilization techniques have been tested in equine in order to control fertilization and to produce a lot of early embryos. There are several steps, from the collection of the gametes (matured or immature oocytes / spermatozoa) to embryo transfers, with *in vitro* oocytes maturation, *in vitro* gametes fertilization (conventional or assisted technique) and *in vitro* embryonic development. Techniques of oocyte transfer into the oviduct or into the follicle of a recipient inseminated mare have been tested too. Results of all these techniques are encouraging. However, some work is required before using these techniques routinely in equine species.

Key-words : horse, oocytes, maturation, fertilization, assisted reproduction.

INTRODUCTION

Si le transfert d'embryons est une technique couramment utilisée chez la jument (Lagneaux *et al.*, 1988) pour obtenir des gestations de haute valeur génétique, le développement de nouvelles technologies est nécessaire pour optimiser la production d'embryons. En effet, certaines juments sont incapables de concevoir pour des raisons diverses et de donner de jeunes embryons. Il en est de même pour certains étalons subfertiles. Existe-t-il un espoir pour ces animaux d'obtenir une descendance ? La fécondation est la fusion des gamètes haploïdes femelle (ovule) et mâle (spermatozoïde) pour donner un embryon. *In vivo*, leur rencontre s'opère dans la partie supérieure de l'oviducte de la femelle. Pour qu'il y ait fécondation, il faut que les gamètes soient féconds, c'est-à-dire que l'ovocyte soit mature et que le spermatozoïde soit capacité. A l'ovulation, l'ovocyte est normalement mature alors qu'à la récolte, les spermatozoïdes ne sont pas capités : ils acquièrent leur pouvoir fécondant dans les voies génitales de la femelle. *In vitro*, la maturation nucléaire et cytoplasmique des gamètes est indispensable pour aboutir à une fécondation normale et assurer un développement embryonnaire normal (Driancourt *et al.*, 1998).

Il existe à ce jour plusieurs possibilités de procréation "assistée" où certaines étapes, qui vont de la production d'ovocytes au transfert de l'embryon, peuvent se dérouler *in vivo* et/ou *in vitro*. Ces différentes étapes, développées ici, comprennent : 1/ la collecte des ovocytes matures et immatures, 2/ la maturation *in vitro* (MIV), 3/ la fécondation *in vitro* (FIV) conventionnelle et assistée et 4/ le développement *in vitro* (DIV) des embryons. Des alternatives à la FIV sont proposées en utilisant le transfert d'ovocytes soit dans l'oviducte soit dans le follicule d'une jument receveuse.

COLLECTE DES OVOCYTES

Après la collecte d'ovocytes réalisée par le flanc "en aveugle" sur animal vivant (Palmer *et al.*, 1987), la mise au point de la technique de ponction de follicules par échographie transvaginale (Brück *et al.*, 1992 ; Duchamp *et al.*, 1995) a permis d'augmenter le nombre d'ovocytes collectés par jument et d'obtenir une population d'ovocytes parfaitement caractérisée. Grâce à cette technique, il est possible de ponctionner individuellement un follicule, soit préovulatoire (collecte d'un ovocyte mature), soit de petite taille (collecte d'un ovocyte immature). La ponction des follicules d'une jument peut être programmée en fonction du stade du cycle et du diamètre des follicules dont la croissance est contrôlée par échographie. De plus, il est possible de réaliser des ponctions répétées sur un même animal sans risque ovarien (adhérences) et utérin et sans affecter la santé de l'animal.

Technique de ponction folliculaire sous échographie transvaginale (ovum pick-up)

L'échographe est équipé d'un ordinateur et d'une sonde sectorielle à balayage mécanique de 7,5Mhz qui est introduite dans un guide, spécialement adapté à la jument, et qui maintient une aiguille de ponction. Deux types d'aiguille de longueur et de diamètre différents sont utilisés en fonction de la taille du follicule. L'aiguille est reliée à un robinet 3 voies qui permet l'aspiration du liquide folliculaire et l'injection sous pression constante (500mm Hg) d'une solution tampon phosphate stérile héparinée maintenue à 37°C pour rincer le follicule. Plusieurs rinçages sont réalisés afin de décrocher l'ovocyte de la paroi folliculaire.

La jument est placée dans une barre de contention et soumise à une tranquillisation (Détomidine, 0,8mg/100kg). Afin de relâcher la musculature du rectum pour faciliter le maintien de l'ovaire, une injection intraveineuse de Prifinial (45mg/100kg) ou d'Atropine (4mg/100kg), est effectuée.

Pour effectuer une ponction, un opérateur maintient la sonde échographique dans le vagin et positionne par voie rectale l'ovaire devant la sonde, afin de visualiser le follicule et l'aiguille de ponction sur l'écran de l'échographe. Un deuxième opérateur introduit l'aiguille dans le follicule, aspire le liquide folliculaire puis effectue plusieurs rinçages. Pendant l'aspiration, une rotation complète de l'aiguille permet de gratter la paroi folliculaire pour détacher l'ovocyte.

Taux de collecte et rendement

a/ Ponction des follicules *in vivo*

La ponction du follicule préovulatoire, 35h après induction de l'ovulation (Duchamp *et al.*, 1987), permet d'obtenir une moyenne de 0,8 ovocyte par cycle. Un traitement de superovulation augmente ce nombre d'ovocytes : 1,6 par cycle superovulé (Bézar *et al.*, 1995).

Le taux de collecte des ovocytes est influencé par la taille des follicules aspirés et par les systèmes utilisés. Pour la ponction de petits follicules, ce taux est passé de 14% à plus de 50% obtenu couramment dans notre laboratoire (Bézar et al., 1997 ; Goudet *et al.*, 1997).

Une ponction en fin de phase préovulatoire chez une ponette (35h après induction de l'ovulation) donne une moyenne de 3,2 ovocytes par ponette (0,7 ovocyte mature préovulatoire + 2,5 ovocytes immatures ; Bézar et al., 1997).

Deux ponctions successives, au cours d'un même cycle de jument, une en fin de phase folliculaire et une en phase lutéale, permet d'obtenir une moyenne de 8,9 ovocytes / jument / cycle (0,9 ovocyte mature préovulatoire + 4 ovocytes immatures de la phase folliculaire + 4 ovocytes immatures de la phase lutéale (Goudet *et al.*, 1997). Les juments gestantes sont utilisables comme donneuses d'ovocytes sans affecter la gestation après des ponctions successives réalisées entre 40 et 75 jours de gestation. Le taux de collecte d'ovocytes n'est pas significativement différent entre la jument gestante et la jument contrôle (54% vs 47%). Le nombre total d'ovocytes collectés au cours de 4 ponctions est proche de 15 par jument (Goudet *et al.*, 1998b).

b/ Ponction des follicules sur ovaires d'abattoir

Les ovaires d'abattoir sont également une source potentielle d'ovocytes utilisés essentiellement pour la mise au point des techniques. Le taux de collecte varie selon les techniques de récupération des ovocytes et selon les équipes, il va de 23% (Shabpareh *et al.*, 1993) à 80% (Del Campo *et al.*, 1995). Le nombre d'ovocytes par animal est de 3 (Okolski *et al.*, 1987) à 12 (Bézar et Palmer, 1992 ; Hinrichs *et al.*, 1993). La population des ovocytes ainsi récupérés est très hétérogène avec aucune information sur la période du cycle à l'abattage.

En conclusion, la technique de ponction folliculaire sous échographie a permis de multiplier par 10 environ le nombre d'ovocytes collectés par jument et par cycle : ovocytes « matures » aspirés du follicule préovulatoire juste avant l'ovulation et ovocytes « immatures » aspirés des autres follicules, augmentant ainsi les chances de procréation pour un même animal.

MATURATION DES OVOCYTES

Maturation *in vivo*

Comme chez la plupart des Mammifères, l'ovulation chez la jument se produit sous l'action d'une hormone hypophysaire, la LH, sécrétée en réponse à l'élévation du taux d'oestrogènes qui atteint son maximum 1 à 2 jours avant l'ovulation (Palmer et Terqui, 1977). Contrairement aux autres espèces, cette décharge de LH est progressive chez les équins, elle atteint son maximum 24h après l'ovulation (Irvine et Alexander, 1994). A l'ovulation, l'ovocyte est mature.

La maturation nécessite à la fois la maturation nucléaire et la maturation cytoplasmique. Pour être considéré comme mature, le noyau de l'ovocyte doit atteindre le stade de métaphase II et le cytoplasme doit avoir acquis un certain nombre de protéines indispensables au développement ultérieur du jeune embryon. Ces mécanismes liés à la maturation finale des ovocytes chez la jument, par l'étude des modifications morphologiques et biochimiques, sont rapportés par Goudet (1998).

Les études réalisées au laboratoire sur l'induction d'ovulation (Bézar *et al.*, 1989, 1995, 1997) ont permis de préciser que 24 h après induction, la maturation des ovocytes était incomplète (stade nucléaire : métaphase I) alors que 35 h après induction, la maturation était complète (stade métaphase II). Ce stade est celui atteint lors de l'ovulation (King *et al.*, 1987). Ainsi, après induction de l'ovulation, les ovocytes collectés dans des follicules préovulatoires juste avant l'ovulation présumée, sont matures et prêts à être fécondés. En revanche, les ovocytes collectés dans des petits follicules sont immatures. A ce stade, ils ne sont pas fécondables et doivent être préalablement soumis à une maturation *in vitro*.

Maturation *in vitro* (MIV)

Comparé aux autres espèces de Mammifères, le taux de maturation nucléaire *in vitro* chez la jument est faible, de l'ordre de 45% à 80% pour des ovocytes collectés principalement à partir d'ovaires d'abattoir, après 24 à 48heures de culture (Hinrichs *et al.*, 1993 ; Grondahl *et al.*, 1995 ; Dell'Aquila *et al.*, 1996). La majorité des

études en MIV utilise le milieu TC199 additionné de FSH, de LH et d'oestradiol (E2). Le type de sérum utilisé, sérum de veau fœtal ou sérum de jument en chaleur, n'a pas montré de différence sur le taux de métaphase II (M II) (Willis *et al.*, 1991).

Pour nos propres études de MIV, les ovocytes immatures collectés *in vivo* sont cultivés dans un milieu composé de TC199 + 20% de sérum de veau foetal + eFSH (9.5µg/ml) + eLH (15µg/ml) + E2 (1µg/ml) + antibiotiques. Les hormones FSH et LH proviennent d'extraits d'hypophyses de jument préparés au laboratoire (CEG : Crude Equine Gonadotropin, Duchamp *et al.*, 1987). Les ovocytes sont cultivés dans 500µl de milieu pendant 30 heures dans un incubateur à 38°C et sous 5% de CO₂.

Le stade du cycle à la collecte affecte la "compétence" des ovocytes à maturer. Le taux de maturation tend à être plus haut en fin de phase folliculaire que pendant la phase lutéale (44% vs 28% : Goudet *et al.*, 1997), conséquence probable d'un environnement hormonal différent des follicules pendant ces deux périodes du cycle.

La taille des follicules ponctionnés affecte également la compétence des ovocytes à maturer *in vitro*. Le taux de métaphase II est plus bas pour les ovocytes, provenant d'ovaires d'abattoir, de follicules <10mm que de follicules de 11 à 30mm de diamètre (27% vs 45% : Brück *et al.*, 1996). Il en est de même pour les ovocytes collectés *in vivo* (Bézar *et al.*, 1997 ; Goudet *et al.*, 1997).

L'utilisation d'hormones de croissance (EGF : Epidermal Growth Factor), comme substitut aux hormones gonadotropes (CEG) dans le milieu de culture, est bénéfique pour la MIV des ovocytes équins. Le taux de Métaphase II est passé de 43% à 64% (Goudet *et al.*, 1998a).

L'atrésie des follicules influence la compétence des ovocytes à maturer ainsi, la proportion d'ovocytes qui atteint le stade Métaphase II passe de 47% pour les follicules sains à 76% pour les follicules atrétiques (Bézar *et al.*, 1997). A ce jour, nous ne savons pas, chez la jument, si de tels ovocytes sont capables de donner des embryons. Chez les bovins, l'effet de l'atrésie est contradictoire, elle a été montrée bénéfique par Blondin *et al.* (1995) et néfaste par Driancourt *et al.* (1998).

Le taux MIV des ovocytes ponctionnés sur des juments gestantes est supérieur à celui obtenu sur des juments témoins (54% vs 42% : Goudet *et al.*, 1998b).

En conclusion les résultats obtenus après maturation *in vitro* des ovocytes chez la jument montrent que: 1/ il ne faut pas collecter les ovocytes de follicules inférieurs à 10mm de diamètre, 2/ un temps de culture de 30 heures permet d'obtenir de 50% à 82% d'ovocytes en fin de maturation nucléaire (métaphase II) dans un milieu de TCM199 supplémenté par du sérum de veau fœtal, d'estradiol et d'hormones (CEG ou EGF), 3/ la jument gestante est une source potentielle d'ovocytes compétents à la MIV. Il reste à confirmer la qualité de ces ovocytes par leur capacité à produire des embryons viables.

FECONDATION IN VITRO

Il y a exactement 10 ans que les premiers embryons équins issus de FIV ont été obtenus (Bézar *et al.*, 1989), suivis de la naissance de 2 poulains en 1990 et en 1991 (Palmer *et al.*, 1991). C'est en 1996 que le premier poulain conçu après injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme d'un ovocyte (ICSI) est né aux USA (Squires *et al.*, 1996). La naissance de 2 autres poulains issus d'ICSI vient d'être rapportée (Mc Kinnon *et al.*, 1998) et 3 gestations ont été signalées dernièrement (Cochran *et al.*, 1998), deux semblent se poursuivre au delà de 250 jours.

Technique de FIV conventionnelle

Les résultats de la FIV équine entrepris depuis 10 ans sont encore très variables à ce jour. Les taux de fécondation restent très faibles dans l'espèce équine (23 à 30% : Bézar *et al.*, 1989, Palmer *et al.*, 1991, Bézar *et al.*, 1992) comparés aux autres espèces (bovins : 80% Trounson *et al.*, 1994). Le principe consiste à incuber, ovocytes matures et spermatozoïdes capités, dans un tube ou une boîte de culture. Les premières tentatives ont été réalisées à partir d'ovocytes maturés *in vivo* collectés dans des follicules préovulatoires après induction d'ovu-

lation, et de sperme d'étalon traité par un agent calcique (ionophore A23187) pour induire la capacitation (Bézar *et al.*, 1989 ; Blue *et al.*, 1989 ; Magistrini et Palmer, 1991 ; Palmer *et al.*, 1991). Quatorze transferts chirurgicaux ont été réalisés dans notre laboratoire. Les jeunes embryons de 36 à 72h post FIV ont été placés dans l'oviducte de ponettes receveuses sous anesthésie locale. Deux gestations ont donné naissance à 2 poulains qui sont encore les seuls dans le monde issus de FIV conventionnelle.

Les meilleurs résultats (taux de fécondation) après FIV, à partir d'ovocytes maturés *in vitro*, ont été obtenus également après capacitation des spermatozoïdes par l'ionophore (26% : Grondahl *et al.*, 1995 ; 33% : Zhang *et al.*, 1990). L'utilisation de caféine ou d'héparine, comme traitement de capacitation, n'a pas amélioré les résultats (<17% Del Campo *et al.*, 1990 ; Grondahl *et al.*, 1995 ; Dell'Aquila *et al.*, 1996). Aucune gestation n'a été obtenue après transfert de ces embryons FIV.

Techniques de procréation assistée

Les succès limités en FIV conventionnelle chez les équins semblent pouvoir être attribués 1/ à une dureté de la zone pellucide de l'ovocyte (probablement induite par la maturation *in vitro*) empêchant le spermatozoïde de pénétrer dans l'ovocyte (Grondahl *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 1995) et 2/ à la nécessité d'avoir une méthode de capacitation des spermatozoïdes efficace pour qu'ils puissent pénétrer dans l'ovocyte (Blue *et al.*, 1989). Pour contourner ces 2 problèmes, des techniques dites de «procréation assistée» ont été testées chez le cheval. Elles répondent aux noms de «PZD», «ZD», «SUZI» et «ICSI». Toutes ont pour objectif d'aider le spermatozoïde à pénétrer dans l'ovocyte. Lors de la fécondation, le spermatozoïde doit franchir 2 barrières ovocytaires qui sont, la zone pellucide, puis la membrane plasmique : les techniques de PZD, ZD et de SUZI l'aident à franchir la zone pellucide, alors que la technique d'ICSI l'aide à franchir les 2 barrières.

a/ définitions

PZD - ZD (partial zona dissection - zona drilling) : ces 2 techniques consistent à faire un trou dans la zone pellucide, soit mécaniquement (PZD), soit chimiquement (ZD). Les ovocytes sont ensuite mis à incuber avec des spermatozoïdes dans un tube : le spermatozoïde ou les spermatozoïdes qui trouvent le trou ont leurs chances ! Les spermatozoïdes doivent être traités par un agent capacitant.

SUZI (subzonal sperm injection) : cette technique consiste à déposer un ou plusieurs spermatozoïdes mobiles à l'aide d'une pipette dans l'espace situé entre la zone pellucide et la membrane plasmique de l'ovocyte (espace périvitellin). Le ou les spermatozoïdes choisis par l'opérateur n'ont plus que la membrane plasmique à franchir. Comme pour les 2 techniques précédentes, le sperme doit être capacité.

Les techniques PZD, ZD et SUZI nécessitent d'avoir des spermatozoïdes mobiles et féconds (capables de fusionner avec l'ovocyte). Un des problèmes rencontrés dans ces méthodes est le taux élevé de polyspermie (pénétration de plus d'un spermatozoïde dans l'ovocyte) qui bloque le développement (PZD et SUZI : 15 à 40% ; ZD : 40 à 60%, Payne, 1995).

ICSI (intracytoplasmic sperm injection) : cette technique consiste à déposer un spermatozoïde directement dans le cytoplasme de l'ovocyte. Elle a été utilisée avec succès en médecine humaine dans des cas de stérilité masculine (Palermo *et al.*, 1992, 1993 ; Van Steirteghem *et al.*, 1993a, 1993b). Dans les espèces domestiques, les premières naissances d'animaux issus d'ICSI ont été obtenues chez le bovin (Goto *et al.*, 1991), ainsi que chez le mouton (Catt *et al.*, 1996). Dans l'espèce équine, le premier poulain issu d'ICSI est né en 1996, après transfert chirurgical dans l'oviducte d'un oeuf clivé, 3 jours post ICSI, résultat de la microinjection de 4 ovocytes collectés sur des ovaires d'abattoir et maturés *in vitro* (Squires *et al.*, 1996).

Cette technique n'implique apparemment aucun traitement particulier des spermatozoïdes avant microinjection. De plus, il n'y a aucun risque de polyspermie.

b/ méthodes

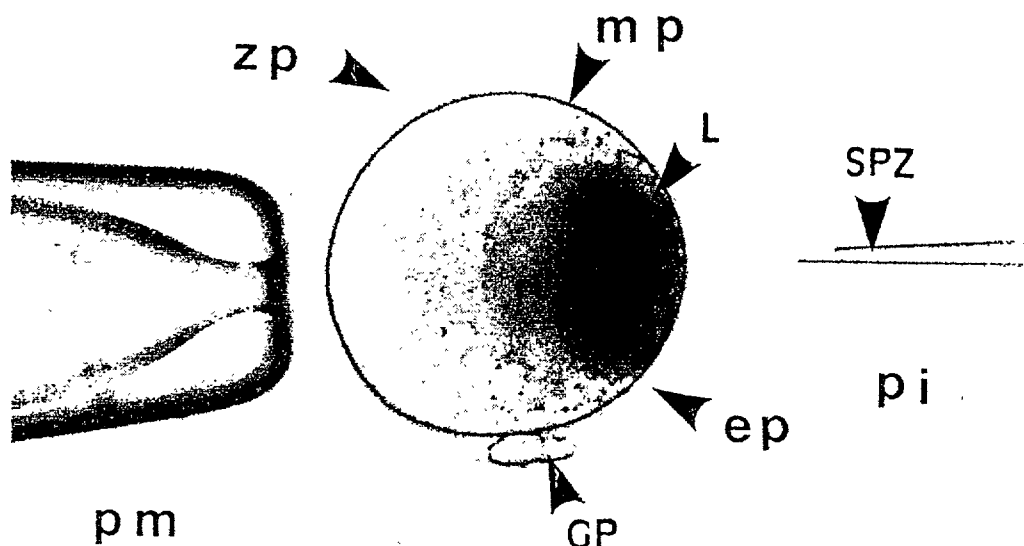
Ces techniques nécessitent un appareillage spécifique. Le microscope doit être équipé de micromanipulateurs permettant de réduire tous les mouvements de l'opérateur. Des micropipettes spécifiques pour chaque technique sont également nécessaires : il faut une pipette de maintien au bout arrondi et de diamètre équivalent à celui d'un ovocyte (environ 100 µM), au bout de laquelle l'ovocyte sera maintenu par aspiration, et une pipette

beaucoup plus fine, pointue, de diamètre inférieur à 10 μM , pour injecter le spermatozoïde (SUZI, ICSI) ou traverser la zone pellucide (PZD). Seule la technique d'ICSI va être plus amplement détaillée dans cet article.

La technique d'ICSI, réalisée dans l'espèce équine, est largement inspirée de celle décrite par Van Steirteghem *et al.* (1993b) en médecine humaine. Une goutte de sperme est déposée dans une goutte de polyvinylpyrrolidone (PVP) à 8% pour ralentir le mouvement des spermatozoïdes. A l'aide de la pipette d'injection, le mouvement du spermatozoïde choisi par l'opérateur est arrêté définitivement. Ensuite, le spermatozoïde est aspiré, flagelle le premier, dans la pipette d'injection : il est alors prêt à être microinjecté dans l'ovocyte. Après avoir placé l'ovocyte contre la pipette de maintien, la pipette d'injection, biseautée pour bien pénétrer dans l'ovocyte, est introduite dans celui-ci à l'opposé de la pipette de maintien, et le spermatozoïde est refoulé dans le cytoplasme de l'ovocyte (figure I). L'ovocyte microinjecté est ensuite mis en culture.

Figure I

Technique de micro-injection dans le cytoplasme (ICSI)



ep : espace perivitellin - *gp* : globule polaire - *l* : lipides - *mp* : membrane plasmique - *pi* : pipette d'injection - *pm* : pipette de maintien - *spz* : spermatozoïde - *zp* : zone pellucide - Technique of ICSI (intracytoplasmic sperm injection) - *ep* : perivitelline space - *gp* : polar body - *l* : lipid droplets - *mp* : cytoplasmic membrane - *pi* : injection pipette - *pm* : holding pipette - *spz* : spermatozoön - *zp* : zona pellucida

Ces 4 techniques de procréation assistée nécessitent un temps d'apprentissage non négligeable, notamment l'ICSI qui est la plus délicate de toutes, mais qui donne à l'heure actuelle les résultats les plus intéressants.

c/ résultats

PZD, ZD, SUZI : après PZD, le taux de pénétration des ovocytes est amélioré, 12% (n = 58) contre 4% (n = 57) si la zone pellucide est intacte (Choi *et al.*, 1994). Un taux de clivage relativement élevé, de 30 à 80%, en fonction du traitement de capacitation appliqué, a été obtenu après ZD (Li *et al.*, 1995). Ces 2 techniques ont permis l'obtention de jeunes embryons (morulae) de plus de 50 cellules : 5 morulae après PZD (n = 123, Azuma *et al.*, 1995) et 5 morulae après ZD (n = 14, Li *et al.*, 1995). Après SUZI, Meintjes *et al.* (1996) ont obtenu un taux de clivage de 6% et une seule morula (> 16 cellules, n = 32). Dans notre laboratoire, nous avons essayé cette technique, mais sans succès : aucun signe de fécondation n'a été obtenu.

ICSI : cette technique permet d'augmenter significativement le taux de fécondation après maturation *in vitro*, par rapport à la FIV classique (44.7% vs 22.3%, Dell'Aquila *et al.*, 1995). Elle permet également d'augmenter le taux de clivage des oeufs microinjectés si ceux-ci sont maturés *in vitro* avec du liquide folliculaire (48.4% vs 4.2% avec du sérum de jument en chaleur, Dell'Aquila *et al.*, 1997). Un taux de clivage identique a pu être obtenu dans notre laboratoire après activation des oeufs microinjectés avec un agent calcique, l'ionophore A23187 (46%, n = 76, Guignot *et al.*, 1998). Cette technique a permis d'obtenir : 1/ à partir d'ovocytes ponctionnés sur des juments gestantes et de sperme capacité, 3 morulae (> 16 cellules, n = 36, Meintjes *et al.*, 1996), et 2/ à partir d'ovocytes d'abattoir et de sperme capacité ou non, 6 morulae (> 16 cellules) et 1 blastocyste (n = 31, Dell'Aquila *et al.*, 1997) et 3 morulae (23, 50 et > 80 cellules, n = 76, Guignot *et al.*, 1998).

développement *in vitro* des embryons : dans l'espèce équine, le taux de développement *in vitro* des jeunes embryons obtenus après procréation assistée est encore faible, malgré l'amélioration du taux de clivage obtenue après ICSI. Des travaux de recherche s'orientent vers les différents milieux de culture à utiliser pour améliorer ce taux de développement. Il a également été montré que des concentrations croissantes en glucose dans le milieu de culture (0.5 mM de 1 à 4 jours, puis 5.5 mM de 5 à 8 jours de culture) semblent avoir un effet positif sur le taux de développement embryonnaire après PZD (Azuma *et al.*, 1995). Dans d'autres espèces, des systèmes de co-culture ont été utilisés avec succès dans différentes espèces pour augmenter ce taux de développement, notamment en co-cultivant les oeufs clivés sur des tapis de cellules Véro (cellules de rein de singe) (chez l'homme : Ménézou *et al.*, 1990 ; Schillaci *et al.*, 1994 ; Turner *et al.*, 1996 ; chez les bovins : Menck *et al.*, 1997 ; chez la souris : Chen *et al.*, 1996). Ces cellules sécrèteraient des substances bénéfiques pour la croissance de l'embryon et pourraient également jouer le rôle de détoxifiant du milieu de culture.

Chez le cheval, après ICSI, les stades de développement embryonnaire les plus avancés ont été obtenus après 5.5 jours de co-culture sur tapis de cellules d'oviductes bovins (Meintjes *et al.*, 1996 : morulae, > 16 cellules) et après une semaine de co-culture sur tapis de cellules Véro (Dell'Aquila *et al.*, 1997 : morulae et 1 blastocyste ; Guignot *et al.*, 1998 : morula > 80 cellules). Les transferts intrautérins de ces embryons n'ont à ce jour donné aucune gestation. Les seuls poulains obtenus après procréation assistée proviennent de transfert d'oeufs clivés après ICSI, cultivés au maximum 3 jours *in vitro*, et transférés à un stade de développement très précoce (< 16 cellules), par voie chirurgicale, dans l'oviducte d'une jument receveuse (Squires *et al.*, 1996 : un poulain sur un transfert ; McKinnon *et al.*, 1998 : 2 poulains sur 14 transferts). Les seuls transferts intrautérins d'embryons cultivés *in vitro*, et qui ont donné des naissances, ont été réalisés à partir d'embryons issus de fécondation *in vivo* et collectés dans les oviductes, 2 jours après l'ovulation, au stade 4-8 cellules, puis mis en culture *in vitro* pendant 5 jours (Ball et Miller, 1992).

ALTERNATIVES A LA FECONDATION *IN VITRO*

Suite aux échecs de la FIV conventionnelle et des résultats encore limités en procréation assistée (taux d'embryons produits), des techniques alternatives ont été tentées chez la jument. Il s'agit de collecter les ovocytes qui, après transfert dans une jument receveuse inséminée, sont fécondés *in vivo*. Plusieurs possibilités de transfert ont été testées.

Transfert d'ovocyte dans l'oviducte

Utilisé actuellement en clinique vétérinaire aux USA, le transfert d'ovocytes matures ponctionnés *in vivo* est réalisé, par voie chirurgicale, dans l'oviducte d'une jument receveuse inséminée. Les premières tentatives de transfert d'ovocytes maturés *in vivo* (35h après hCG) ont donné un faible taux de gestation : 13% (n = 15, McKinnon *et al.*, 1988) et 8% (n = 26, Ray *et al.*, 1994). Plus récemment, une très nette amélioration de cette technique a permis d'obtenir 83% de gestation (n = 12, Carnevale et Ginther, 1995) et 75% (n = 8, Hinrichs *et al.*, 1998) à partir d'ovocytes collectés 24h après hCG et maturés *in vitro* 12 à 20h avant le transfert. Ces taux de gestation sont comparables à ceux obtenus après transfert traditionnel d'embryons. L'âge de la donneuse d'ovocytes a une influence sur le taux de gestation après transfert, il est de 92% pour des juments de 6 à 10 ans et de 31% pour des juments âgées de plus de 20 ans (Carnevale et Ginther, 1995).

Le transfert d'ovocytes dans l'oviducte peut être une alternative au transfert d'embryons pour certaines juments. Cependant, il reste limité à cause des contraintes liées à l'intervention chirurgicale indispensable à cette méthode.

ERRATUM

Pour la bonne compréhension du texte de Mmes Bézard et Guignot, nous vous serions obligés de bien vouloir intégrer ce feuillet après la page 57 (et avant la conclusion) du compte-rendu de la 25^{ème} journée de la recherche équine du 3 mars 1999, ces paragraphes n'ayant pas été intégrés au texte, ce dont nous vous prions de bien vouloir nous excuser.

Transfert d'ovocyte intra-folliculaire (TOIF)

Le transfert d'ovocytes dans un follicule receveur est possible chez la jument grâce à la grande taille du follicule préovulatoire (30 à 50mm), et à l'épaisse tunique albuginée qui entoure l'ovaire et qui limite les fuites de liquide folliculaire après retrait de l'aiguille de transfert. Les premières tentatives de collecte et de transfert ont été faites "en aveugle" par le flanc de l'animal selon la technique utilisée par Palmer *et al.* (1987). Ainsi des gestations ont été obtenues après transfert additionnel dans le follicule receveur, d'ovocytes immatures (2/8 : 1 multiple + 1 simple, Bézard *et al.*, 1991 non publié ; 7/15 : 4 multiples + 3 simples, Hinrichs *et al.*, 1991) ou d'ovocytes maturés *in vivo* (4/9 : 2 multiples + 2 simples, Bézard *et al.*, 1991 non publié). Le transfert d'un seul ovocyte mûré *in vivo*, dans un follicule receveur dont le propre ovocyte a été ponctionné juste avant le transfert, a permis l'obtention de 2 gestations sur 14 essais (Bézard *et al.*, 1992 non publié).

La technique de ponction folliculaire sous échographie transvaginale, qui permet de visualiser l'aiguille dans le follicule à ponctionner, a été utilisée pour effectuer collecte et transfert des ovocytes. C'est ainsi que le transfert additionnel d'un ovocyte mature dans le follicule d'une jument receveuse a donné des gestations double (2/7, Carnevale *et al.*, 1993) et 1 gestation simple utilisant une mule comme receveuse dont le propre ovocyte est infécondable (Palmer *et al.*, 1997). Ces résultats prometteurs nécessitent toutefois une amélioration de cette technologie pour augmenter les taux de succès.

Pour répondre à cet objectif, nous avons testé différentes conditions de collecte d'ovocytes et de transfert, chez des ponettes inséminées, en fonction : du stade de maturation folliculaire (pour collecte et transfert) 24h ou 35h post CEG et de la technique de transfert (Bézard *et al.*, 1998). Après transfert, 57% des ponettes (n = 28) ont été gestantes 10j après ovulation et 31% de ces ponettes avaient 2 embryons. Aucune gestation n'a volontairement été poursuivie car il était important de connaître l'origine maternelle des embryons collectés "donneur ou receveur". Parmi les 16 ponettes gestantes, 50% des ovocytes "donneurs" ont donné 1 embryon et 81% des ovocytes "receveurs" ont donné 1 embryon. Des 11 gestations simples, 8 embryons étaient originaires de la receveuse et 3 de la donneuse. Par ailleurs, notre technique de TOIF a permis la maturation finale des ovocytes, spécialement pour ceux collectés et transférés 24h post CEG, en les rendant aptes à la fécondation *in vivo*.

La technique de TOIF est non chirurgicale et peut-être répétée chez un même animal. C'est un outil utilisable pour augmenter le nombre d'embryons indispensables pour les besoins de la recherche mais aussi pour répondre à la demande de production d'embryons, voire de poulains, à partir de juments d'intérêt.

CONCLUSION

Les techniques de procréation assistée peuvent permettre à des juments ou des étalons ayant des problèmes de fertilité d'obtenir une descendance. Bien que 2 poulains soient nés par FIV, cette méthode n'est pas, pour le moment, envisageable en routine. Quelques naissances ont été rapportées avec d'autres techniques utilisant des juments commerciales : l'ICSI en Australie et aux USA et le transfert d'ovocyte dans l'oviducte aux USA. Le transfert d'ovocyte dans un follicule pourrait être prochainement envisagé en France. Par ailleurs, les résultats obtenus avec la mule comme receveuse d'ovocytes ouvrent de nouvelles perspectives. Cependant le développement de telles méthodes implique des investissements importants en matériel et en formation des personnels. Il reste également beaucoup d'amélioration à apporter et de recherches à entreprendre avant que ces techniques puissent être plus largement utilisables sur le terrain.

BIBLIOGRAPHIE

- Azuma T, Choi YH, Hochi S, Oguri N (1995) Effect of glucose in the culture medium on development of horse oocytes matured and microfertilized *in vitro* *Reprod. Fert. Dev.* **7** 1067-1071
- Ball BA, Miller PG (1992) Survival of equine embryos co-cultured with equine oviductal epithelium from the four- to eight-cell to the blastocyst stage after transfer to synchronous recipient mares *Therio.* **37** 979-991
- Bézar J., Magistrini M., Battut I., Duchamp G., Palerm E., 1992. La fécondation *in vitro* chez les équidés. *Rec. Méd. Vét.*, **168** : 993-1003.
- Bézar J, Magistrini M, Duchamp G, Palmer E. 1989. Chronology of equine fertilisation and embryonic development *in vivo* and *in vitro*. *Equine Vet J Suppl* **8**: 105-110.
- Bézar J, Palmer E. 1992. *In vitro* maturation of horse oocytes from slaughtered ovaries. In: Proc 12th Int Cong Anim Reprod; The Hague, The Netherlands. **1**: 315-317.
- Bézar J, Goudet G, Duchamp G, Palmer E. 1995. Preovulatory maturation of ovarian follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. *Biol Reprod mono* **1**: 261-271.
- Bézar J, Mekarska A, Goudet G, Duchamp G, Palmer E. 1997. Timing of *in vivo* maturation of equine preovulatory oocytes and competence for *in vitro* maturation of immature oocytes collected simultaneously. *Equine Vet. J. Suppl.* **25** : 33-37.
- Bézar J. Morais N., Duchamp G. 1998. Production d'embryons chez la Jument après transfert d'ovocyte dans un follicule préovulatoire. 3èmes Journées de la Fédération Française de la Reproduction (FFER).
- Blondin P., Sirard MA. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* **41**: 54-62.
- Blue BJ, McKinnon AO, Squires EL, Seidel GE, Muscari KT (1989) Capacitation of stallion spermatozoa and fertilization of equine oocytes *in vitro* *Equine Vet. J. Suppl.* **8** 111-116.
- Brück I, Raun K, Synnestved T B, Greve T. 1992. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. *Equine Vet J* **24**: 58-59.
- Brück I., Grondhal C., Host T., Greeve T., 1996. *In vitro* Maturation of equine oocytes : effect of follicular size, cyclic stage and seasons *Theriogenology* **46** : 75-84.
- Carnevale EM, Ginther OJ. 1993. Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. *J Equine Vet Sci* **13** : 331-333.
- Carnevale EM, Ginther OJ. 1995. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol Reprod mono* **1**, 209-214.
- Catt SL, Catt JW, Gomez MC, Maxwell WMC, Evans G (1996) Birth of male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm *Vet. Rec.* **16** 494-495
- Chen HF, Ho HN, Chen SU, Cha KH, Lin HR, Huang SC, Lee TY, Yang YS (1994) Peptides extracted from Vero cell cultures overcome the blastocyst block of mouse embryos in a serum-free medium *J. Assist. Reprod. Genet.* **11** 165-171
- Choi YH, Okada Y, Hochi S, Braun J, Sato K, Oguri N (1994) *In vitro* fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae *Theriogenology* **42** 795-802
- Cochran R, Meintjes M, Reggio B, Hylan D, Pinto C, Carter J, Paccamonti D, Golke Ra (1998) *In vitro* development and transfert of *in vitro*-derived embryos produced from sperm-injected oocytes harvested from pregnant mares *7th Int. Symp. Equine Reprod.* 135-136 (abstr.)
- Del Campo MR, Donoso MX, Parrish JJ, Ginther OJ. 1990. *In vitro* fertilization of *in vitro* matured equine oocytes *Equine Vet Sci* **10**: 18-22.

- Del Campo MR, Donoso MX, Parrish JJ, Ginther OJ. 1995. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for *in vitro* maturation of equine oocytes. *Theriogenology* **43**: 1141-1153.
- Dell'Aquila ME, Cho YS, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F, Minoia P, Traina V (1995) Fertilization rates of *in vitro* matured equine oocytes : *in vitro* fertilization vs intracytoplasmic sperm injection. *XXX Simp. Int. Zootech.* 365-366
- Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F. 1996. *In vitro* maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology* **45**:547-560.
- Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, Traina V, Lacalandra GM, Maritato F (1997) Effects of follicular fluid supplement of *in-vitro* maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after *in-vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection *Hum. Reprod.* **12** 2766-2772
- Driancourt MA, Thuel B., Mermillod P., Lonergan P. 1998. Relationship between oocyte quality and follicle function in cattle. *Theriogenology* **49**:345
- Duchamp G, Bour B, Combarnous Y, Palmer E. 1987. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* **35**: 221-228.
- Duchamp G, Bézard J, Palmer E. 1995. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. *Biol Reprod mono* **1**: 233-241.
- Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K (1991) Birth of calves after the transfers of oocytes fertilized by sperm injection *Theriogenology* **35** 205
- Goudet G, Bézard J, Duchamp, 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., 1998. Resumption and completion of meiosis in equine oocytes. In *Gametes : development and Function*. A.Lauria et al., EDS. Serono Symposia Rome.
- Goudet G., Belin F., Mlodawska W., Bézard J., 1998a. Influence of Epidermal Growth Factor on *in vitro* maturation of equine oocytes. 7th International Symposium on Equine Reproduction. Pretoria, South Africa.
- Goudet G., Leclercq L., Bézard J., Duchamp G., Guillaume D., Palmer E. 1998b. Chorionic gonadotropin secretion is associated with an inhibition of follicular growth and an improvement in oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. *Biol Reprod* **58** : 760-768.
- Grondahl C, Host T, Bruck I, Viuff D, Bezard J, Fair T, Greve T, Hyttel P (1995) *In vitro* production of equine embryos *Biol. Reprod. Mono.* **1** 299-307
- Guignot F, Ottogalli M, Yvon JM, Magistrini M (1998) Preliminary observations in *in vitro* development of equine embryo after ICSI *Reprod. Nutr. Dev.* **38** sous presse
- Hinrichs K, DiGiorgio LM. 1991. Embryonic development after intra-follicular transfer of horse oocytes *J Reprod Fert Suppl* **44**: 369-374.
- Hinrichs K, Schmidt AL, Friedman PP, Selgrath JP, Martin MG. 1993. *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol Reprod* **48**:363-370.
- Hinrichs K., Betschart RW., Mc Cue PM., Squires EL. 1998. Effect of time follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in the mare. 7th International Symposium on Equine Reproduction. Pretoria, South Africa.
- Irvine CHG., Alexander SL. 1994. The dynamics of gonadotrophin-releasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. *J Endocrinol* **140** : 283-295.
- King WA, Bézard J, Bousquet D, Palmer E, Betteridge KJ. 1987. The meiotic stage of preovulatory oocytes in mares. *Genome* **29**: 679-682.
- Lagneaux D., Duchamp G., Palmer E. 1988. La transplantation embryonnaire chez la Jument. CEREOPA, 14^{ème} journée d'études, 9 Mars 1988.
- Li LY, Meintjes M, Graff KJ, Paul JB, Denniston RS, Godke RA (1995) *In vitro* fertilization and development of *in vitro*-matured oocytes aspirated from pregnant mares *Biol. Reprod. Mono.* **1** 309-317.
- Magistrini M., Palmer E. 1991. Motility, triple stain and electron microscopic analysis of spermatozoa treated with ionophore A23187 for *in vitro* fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* **44**: 661-663.
- Mc Cue PM., Fleury JJ., Denniston DJ., Graham JK., Squires EL. 1998. Oviductal insemination in the mare. 7th International Symposium on Equine Reproduction. Pretoria, South Africa.
- Mc Kinnon AO., Carnevale EM., Squires EL., Voss JL., Seidel GE. 1988. Heterogenous and xenogenous fertilization of equine oocytes. *Equine Vet Sci* **8** : 143-147.
- McKinnon AO, Lacham-Kaplan O, Trounson AO (1998) Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen / thawed spermatozoa into *in vivo* matured mare oocytes *7th Int. Symp. Equine Reprod.* 137 (abstr.)

- Meintjes M, Graff KJ, Paccamonti D, Eilts BE, Cochran R, Sullivan M, Fall H, Godke RA (1996) *In vitro* development and embryo transfer of sperm-injected oocytes derived from pregnant mares *Therio.* **45** 304
- Menck MC, Guyader-Joly C, Peynot N, Le Bourhis D, Lobo RB, Renard JP, Heyman Y (1997) Beneficial effects of Vero cells for developing IVF bovine eggs in two different coculture systems *Reprod. Nut. Dev.* **97** 141 - 150
- Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC (1990) Improvement of human early development *in vitro* by coculture on monolayers of Vero cells *Biol. Reprod.* **42** 301-306
- Okolski A, Babusik P, Tischner M, Lietz W. 1987. Evaluation of mare oocyte collection methods and stallion sperm penetration of zona-free hamster ova. *J Reprod Fert Suppl* **34**: 191-196.
- Palermo GD, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte *The Lancet* **340** 17-18
- Palermo GD, Camus M, Joris H, Devroey P, Derde MP, Van Steirteghem AC (1993) Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection *Fertil. Steril.* **59** 826-835
- Palmer E., Terqui M. 1977. The measurement of total plasma oestrogens during the follicular phase of the mare's oestrus cycle. *Theriogenology* **7** : 331-338.
- Palmer E, Duchamp G, Bézard J, Magistrini M, King WA, Bousquet D, Betteridge KJ. 1987. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. *J Reprod Fert Suppl* **35**: 689-690
- Palmer E, Bézard J, Magistrini M, Duchamp G. 1991. *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fert Suppl* **44**: 375-384.
- Palmer E., Duchamp G., Cribiu EP., Mahla R., Boyazoglu S., Bézard J. 1997. Follicular fluid is not a compulsory carrier of the oocyte at ovulation in the mare. *Equine Vet. J. Suppl.* **25** : 22-24.
- Payne D (1995) Micro-assisted fertilization *Reprod. Fertil. Dev.* **7** 831-839
- Ray BS., Squires EL., Cook NL., Tarr SF., Jasko DJ., Hossnet KL. 1994. Pregnancy following gamete intrafallopian transfer in the mare. *J Equine Vet Sci* **14**: 27-30.
- Schillaci R, Ciriminna R, Cefalu E (1994) Vero cell effect on *in vitro* human blastocyst development : preliminary results *Hum. Reprod.* **9** 1131-1135
- Shabpareh V, Squires EL, Seidel GE JR, Jasko DJ. 1993. Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*. *Theriogenology* **40**: 1161-1175.
- Squires EL, Wilson JM, Kato H, Blaszczyk A (1996) A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured *in vitro* *Therio.* **45** 306
- Turner K, Lenton EA (1996) The influence of Vero cell culture on human embryo development and chorionic gonadotrophin production *in vitro* *Hum. Reprod.* **11** 1966-1974
- Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, Nagy Z, Janssenswillen C, Tournaye H, Derde MP, Van Assche E, Devroey P (1993a) Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles *Hum. Reprod.* **8** 1055-1060
- Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P (1993b) High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection *Hum. Reprod.* **8** 1061-1066
- Willis P, Caudle AB, Fayrer-Hosken RA. 1991. Equine oocyte *in vitro* maturation: influences of sera, time, and hormones. *Mol Reprod Dev* **30**: 360-368
- Zhang JJ, Muzs LZ, Boyle MS. 1990. *In vitro* fertilization of horse follicular oocytes matured *in vitro*. *Mol Reprod Dev* **26**: 361-365.