



GIFT (GAMETE INTRAFALLOPIAN TRANSFER) : IMPORTANCE DE LA MATURATION FINALE DE L'OVOCYTE TRANSFÉRÉ

M. Saint-Dizier, G. Duchamp, G. Goudet, A. Martoriati, N. Gérard, P. Daels.

I.N.R.A.-Haras Nationaux, Unité Reproduction Equine, Station PRC, 37 380 Nouzilly, France.

Résumé

Le transfert d'ovocyte dans l'oviducte, ou GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer), consiste à placer l'ovocyte d'une jument donneuse dans l'oviducte d'une jument receveuse. Le but de cette étude est d'évaluer si la maturation finale de l'ovocyte transféré peut influencer le taux de gestation obtenu. Deux lots de juments de type Welsh ont reçu une injection d'extraits hypophysaires équin (Crude Equine Gonadotrophin, CEG) lorsque le plus gros follicule ovarien atteignait 35 mm afin d'induire l'ovulation. Dans le lot 1, l'ovocyte de la jument donneuse a été collecté et transféré 35h post-CEG, c'est-à-dire juste avant l'ovulation. Dans le lot 2, l'ovocyte de la jument donneuse a été collecté 24h post-CEG, mis en culture *in vitro* pendant 20 h, puis transféré dans l'oviducte de la jument receveuse. L'ovocyte de la jument receveuse a été collecté lors du transfert dans le lot 1, et 24h post-CEG dans le lot 2. La collecte d'ovocytes a été réalisée par ponction folliculaire transvaginale échoguidée (sauf receveuses du lot 1), et le transfert d'ovocyte par laparotomie. La jument receveuse a été inséminée en semence fraîche 24h avant, puis juste après le transfert. Un diagnostic de gestation a été effectué 12 jours après le transfert par échographie transrectale. Les taux de gestation obtenus sont de 38% (n=16) dans le lot 1 et de 10% (n=10) dans le lot 2. Le transfert d'ovocytes matures semble donc améliorer les résultats du GIFT.

Mots-clés : jument - GIFT - ovocyte - transfert - maturation

Summary

The GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer) consists in surgically transferring a donor mare oocyte to a recipient mare oviduct. The aim of this study was to evaluate whether finale maturation of the oocyte from the donor mare could influence the pregnancy rate. Welsh pony mares received one injection of Crude Equine Gonadotrophin (CEG) in order to induce ovulation. In group 1, the donor mare oocyte was recovered and transferred 35h post-CEG, i.e. just before ovulation. In group 2, the donor mare oocyte was recovered 24h post-CEG, *in vitro* cultured during 20h, and transferred into the oviduct of the recipient mare. The recipient mare oocyte was recovered at the time of oocyte transfer in group 1, and 24h post-CEG in group 2. Oocyte recovery was performed by ovum pick-up (except for recipient mares in group 1), and oocyte transfer by a flank laparotomy. The recipient mare was inseminated with fresh semen 24h before, and just after oocyte transfer. Pregnancy was diagnosed using transrectal ultrasonography on Day 12 following oocyte transfer. Pregnancy rates were 38% (n=16) in group 1, and 10% (n=10) in group 2. In conclusion, transfer of mature oocytes seems to improve the GIFT results.

Key-words : mare - GIFT - oocyte - transfer - maturation

INTRODUCTION

Le transfert d'embryon est actuellement largement utilisé pour les juments ne pouvant conduire une gestation à terme. Cependant, le taux de collecte des embryons est souvent faible chez les juments subfertiles. De nombreux facteurs peuvent être mis en cause : problèmes liés à l'ovulation, au transport des gamètes, à la fécondation, au transport de l'embryon et à son développement dans les voies génitales. Pour ces juments, la collecte de l'ovocyte avant l'ovulation pourrait permettre d'augmenter leur fertilité. Le transfert d'ovocyte dans l'oviducte, ou GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer), consiste à placer l'ovocyte d'une jument donneuse dans l'oviducte d'une jument receveuse inséminée (Ray *et al.*, 1994). La fécondation et le développement embryonnaire ont donc lieu *in vivo*, dans le tractus génital de la jument receveuse. Dans le domaine de la recherche, le transfert d'ovocyte représente également un outil très intéressant pour l'étude de la maturation ovocytaire chez la jument. Utilisé avec succès chez les bovins, les porcins et l'homme, le GIFT demeure très peu utilisé pour l'espèce équine en Europe. Son utilisation à plus large échelle passe par le développement préalable et l'amélioration de sa technique.

Deux techniques de GIFT sont actuellement décrites. La première consiste à transférer des ovocytes collectés juste avant l'ovulation, c'est-à-dire 35 heures après l'induction d'ovulation par des gonadotropines (McKinnon *et al.*, 1988 ; Ray *et al.*, 1994 ; Hinrichs *et al.*, 1998b). Les taux de gestation reportés varient selon les auteurs : inférieurs à 15% (2/15 [13%], McKinnon *et al.*, 1988 ; 2/26 [8%], Ray *et al.*, 1994), ou récemment plus élevés sur un effectif faible (4/9, Hinrichs *et al.*, 1998b). La deuxième technique de GIFT consiste à transférer des ovocytes collectés 24 heures après l'induction de l'ovulation puis mis en culture *in vitro* pendant 12 à 20 heures (Carnevale *et al.*, 1995 ; Hinrichs *et al.*, 1998a). Dans ce cas, la maturation finale de l'ovocyte ne s'effectue plus dans le follicule préovulatoire de la jument, mais au cours de la culture *in vitro*. Les meilleurs résultats du GIFT ont été obtenus selon cette deuxième méthode : de 75% (6/8, Hinrichs *et al.*, 1998a) à 83% (10/12, Carnevale *et al.*, 1995) de gestation. Les manipulations liées à la collecte de l'ovocyte, et son passage en culture *in vitro*, peuvent altérer la qualité de l'ovocyte, facteur essentiel de la réussite du GIFT. Les résultats précédents, obtenus sur de faibles effectifs, semblent montrer que le stade de maturation de l'ovocyte au moment de sa collecte influence le taux de réussite du GIFT.

L'objectif de cette étude est d'évaluer si la maturation finale de l'ovocyte transféré influence le taux de gestation à la suite d'un GIFT. Les deux techniques décrites précédemment ont été réalisées sur deux lots de ponnettes, et les taux de gestation obtenus ont été comparés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Animaux

Les juments donneuses et receveuses ont été choisies parmi un troupeau de 80 ponnettes de type Welsh cyclées, âgées de 2 à 21 ans, pesant entre 200 et 300 kg, en bonne condition physique et sans problème gynécologiques connu. La croissance des follicules ovariens est suivie tous les deux jours ou quotidiennement par échographie transrectale pour détecter l'apparition d'un follicule préovulatoire. Pendant la phase folliculaire, la consistance et l'échogénicité de l'utérus sont suivies pour déterminer l'apparition de l'oestrus.

Induction de l'ovulation

Lorsque le plus gros follicule ovarien d'une jument en œstrus atteint 35 mm (follicule préovulatoire), une injection intraveineuse (iv) de 25 mg d'extraits hypophysaires équins (Crude Equine Gonadotrophin, CEG) est administrée aux juments donneuses et receveuses afin d'induire l'ovulation (Duchamp *et al.*, 1987).

Collecte des ovocytes

Les ovocytes ont été collectés par ponction transvaginale du follicule préovulatoire sous contrôle échographique selon la technique décrite par Duchamp *et al.*, 1995. Pendant la collecte d'ovocytes, les juments sont placées dans une barre de contention et tranquilisées par une injection iv de détomidine (Domosedan ND, 0.8 mg/100 kg PV, Pfizer, Orsay, France). Le liquide folliculaire est aspiré, puis du PBS (Phosphate Buffer Saline, Dulbecco A, Unipath, Dardilly, France) hépariné (Héparine sodique, 50 UI/ml, Léo, Saint-Quentin, France) à 37°C est injecté dans le follicule préovulatoire puis réaspiré (environ 10 fois) afin de rincer le follicule. Les liquides folliculaire et de rinçage sont collectés dans des tubes stériles de 50 ml

(type Falcon), puis transférés dans des boîtes de Pétri stériles pour la recherche des ovocytes sous une loupe binoculaire. Après la collecte, les juments reçoivent une injection intra-musculaire d'antibiotiques (benzylpénicilline procaïne, 2.10^6 UI/100 kg ; dihydrostreptomycine, 2g/100 kg, Intramicine ND, Sanofi, Libourne, France).

Les juments sont réparties en deux lots en fonction du moment de collecte de l'ovocyte à transférer. Dans le **lot 1**, l'ovocyte préovulatoire de la jument donneuse est collecté 35 heures après l'injection de CEG, et transféré dans l'oviducte de la jument receveuse moins de deux heures après. Le follicule préovulatoire de la jument receveuse est ponctionné pendant la chirurgie à l'aide d'une aiguille de 100 mm de long et de diamètre 15G, reliée à un tuyau souple de 20 cm. Le liquide folliculaire est aspiré dans une seringue de 50 ml puis le follicule est rincé à l'aide de cinq seringues de 20 ml de PBS hépariné. Cette collecte permet d'assurer l'origine maternelle (ovocyte de la jument donneuse) du futur embryon. Dans le **lot 2**, l'ovocyte préovulatoire de la jument donneuse et de la jument receveuse sont collectés 24 heures après l'injection de CEG par ponction folliculaire transvaginale échoguidée. L'ovocyte de la jument donneuse est transféré dans l'oviducte de la jument receveuse 20 heures après sa collecte.

Préparation de l'ovocyte de la jument donneuse

Une fois collecté, l'ensemble ovocyte-cumulus de la jument donneuse est observé sous une loupe binoculaire. L'ovocyte est transféré si l'ensemble ovocyte-cumulus a un aspect morphologique normal (Bézar *et al.*, 1995).

Dans le **lot 1**, l'ovocyte préovulatoire de la jument donneuse est lavé dans 3 puits contenant 500 μ l de Tissue Culture Medium 199 w/Earles salts (TCM 199 ; Gibco, Eragny, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF ; Gibco), puis conservé dans 500 μ l de TCM 199 + 10% SVF à 38,5°C sous atmosphère humide enrichie à 5% de CO₂ jusqu'à son transfert.

Dans le **lot 2**, l'ovocyte de la jument donneuse est lavé dans 3 puits contenant 500 μ l de TCM 199 + 10% SVF + 50 μ g/ml de gentamicine (Gentalline ND, Schering-Plough, Levallois-Perret, France), puis mis en culture dans 500 μ l de TCM 199 + 10% SVF + 50 μ g/ml de gentamicine à 38,5°C sous atmosphère humide enrichie à 5% de CO₂ pendant 20 heures.

Dans les deux lots, lorsque deux ovocytes sont collectés le même jour (deux follicules préovulatoires ou deux juments donneuses), ils sont tous deux transférés dans l'oviducte d'une seule jument receveuse.

Dans les deux lots, si l'ovocyte préovulatoire de la jument donneuse n'est pas collecté, l'ovocyte de la jument receveuse est transféré dans cette même receveuse. Dans ce cas, après sa collecte, l'ovocyte de receveuse est traité comme un ovocyte de jument donneuse.

Quelques minutes avant le transfert, l'ovocyte à transférer est monté dans du TCM 199 + 10% SVF entre deux bulles d'air dans une pipette Pasteur stérile rodée, et connectée à une seringue de 1 ml remplie d'air.

Transfert des ovocytes

La jument receveuse est mise à la diète 24 heures avant le transfert. Elle reçoit une injection intramusculaire d'antibiotiques (benzylpénicilline procaïne, 2.10^6 UI/100 kg ; dihydrostreptomycine, 2g/100 kg, Intramicine ND, Sanofi, Libourne, France) 24 heures avant et juste après le transfert. Dans les deux lots, le transfert a lieu du côté du follicule préovulatoire de la jument receveuse.

Avant le transfert, la jument receveuse est placée dans une barre de contention sous sédation (0.8 mg/100 kg PV de détomidine iv). Lors du transfert, elle reçoit une perfusion intraveineuse de 200 à 500 ml de solution sédative (Ringer Lactate contenant 2 mg de détomidine et 4 mg de butorphanol (Torbugesic ND) par litre) et reçoit une injection intraveineuse de 2g de phénylbutazone (Phénylarthrite ND, Vétoquinol, Lure, France). Le creux du flanc du côté du follicule préovulatoire est rasé, lavé, puis anesthésié localement par des injections intramusculaires et sous-cutanées de chlorhydrate de lidocaïne (50 ml de Lurocaine ND, Vétoquinol, Lure, France). Après une laparotomie par le flanc, l'ovaire (côté du follicule préovulatoire) est extériorisé. Dans le lot 1, le follicule préovulatoire sur l'ovaire est ponctionné et rincé selon la méthode décrite précédemment. Dans les deux lots, l'extrémité rodée de la pipette de transfert est ensuite introduite dans le pavillon de l'oviducte puis poussée délicatement aussi loin que possible dans l'oviducte (2 à 5 cm).

L'ovocyte contenu dans la pipette est ensuite injecté. La pipette est sortie de l'oviducte, puis rincée avec du milieu de culture pour s'assurer que l'ovocyte a bien été déposé. Dans le lot 1, l'ovocyte est transféré dans l'oviducte de la jument receveuse moins de deux heures après sa collecte. Dans le lot 2, l'ovocyte est transféré après 20 heures de culture *in vitro*.

Après le transfert, la plaie de laparotomie est suturée classiquement. La jument reçoit 20 mg d'altrenogest (Hoechst Roussel Vet, Romainville, France) par voie orale tous les jours, du lendemain du transfert jusqu'au diagnostic de gestation 12 jours après le transfert.

Insémination artificielle de la jument receveuse

Dans les deux lots, la jument receveuse est inséminée avec de la semence fraîche (dose inséminante = 600.10^6 de spermatozoïdes dans 10 ml de HGLL + 1% d'albumine sérique bovine (Sigma)) par voie transcervicale 24 heures avant, puis juste après le transfert d'ovocyte. Trois étalons de fertilité connue et normale ($> 200.10^6$ spz/ml de semence) ont été utilisés au cours de l'étude. Pour une jument receveuse donnée, l'étalon est choisi en fonction de ses origines et de celles de la jument donneuse de façon à permettre un éventuel test de filiation.

Diagnostic de gestation

Un diagnostic de gestation est effectué par échographie transrectale 12 jours après le transfert. Le diagnostic est positif si la présence d'une vésicule embryonnaire est constatée entre 12 et 15 jours après le transfert.

Dans les deux lots, si l'ovocyte de la jument receveuse n'a pas pu être collecté, l'embryon est collecté par un lavage utérin entre 12 et 15 jours après le transfert. Cet embryon est rincé plusieurs fois dans du sérum physiologique, puis congelé à sec et conservé à -20°C pour déterminer son origine maternelle (ovocyte de la jument donneuse ou receveuse) par typage ADN (Guérand *et al.*, 1997). Des prises de sang sont effectuées sur la donneuse, la receveuse et sur l'étalon pour permettre ce contrôle de filiation.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Collecte des ovocytes

Le taux de collecte global (nombre d'ovocytes collectés/nombre de follicules ponctionnés pour les juments receveuses et donneuses) est équivalent dans les deux lots : 74% dans le lot 1 (n=43) et 70% dans le lot 2 (n=33) (tableaux 1 et 2).

Tableau 1
Ponettes donneuses

	Nombre follicules ponctionnés	Nombre ovocytes collectés	Taux de collecte	Nombre ovocytes transférés
Lot 1 (35 h)	34	24	71%	18
Lot 2 (24 h)	23	15	65%	10
Total	57	39	68%	28

Tableau 2
Ponettes receveuses

	Nombre follicules ponctionnés	Nombre ovocytes collectés	Taux de collecte	Ovulations avant ponction
Lot 1 (35 h)	9	8	89%	8
Lot 2 (24 h)	10	8	80%	
Total	19	16	84%	

Parmi les juments donneuses du lot 1, un nombre important de juments ayant reçu l'injection de CEG a ovulé avant ou au moment de la ponction transvaginale, c'est-à-dire environ 35h après l'injection de CEG. De nombreux ovocytes de juments donneuses n'ont pu être collectés pour cette raison.

Dans le lot 2, aucune ovulation ne s'est produite avant le moment de la ponction folliculaire, 24 h après l'induction par le CEG. Cependant, pour 2 des 10 juments receveuses utilisées, l'ovocyte n'a pas été trouvé dans les liquides de ponction folliculaire. Un test de filiation a été effectué pour une de ces deux juments (diagnostic de gestation positif avec une seule vésicule embryonnaire).

Dans le lot 1, 16 juments receveuses ont été utilisées : 8 ont ovulé avant la collecte de l'ovocyte préovulatoire. Les ovocytes préovulatoires de ces receveuses n'ont donc pas été collectés. Un test de filiation a dû être effectué pour une de ces juments (diagnostic de gestation positif avec une seule vésicule embryonnaire).

Transfert des ovocytes

Dix-huit ovocytes ont été transférés dans le lot 1, et 14 ovocytes dans le lot 2 (tableau 3).

Six transferts de deux ovocytes dans la même receveuse ont été réalisés : 2 dans le lot 1 (16 GIFT pour 18 ovocytes transférés), et 4 dans le lot 2 (10 GIFT pour 14 ovocytes transférés). Un seul transfert de deux ovocytes a donné lieu à une gestation (lot 1). Les effectifs insuffisants ne permettent pas d'observer un éventuel effet du nombre d'ovocytes transférés sur le taux de gestation obtenu.

Dans le lot 1, pour 3 GIFT, l'ovocyte de la jument donneuse n'ayant pas été collecté, l'ovocyte de la receveuse a été transféré dans l'oviducte de la même jument receveuse. Ces trois autotransferts n'ont pas donné suite à une gestation.

Taux de gestation

Les taux de gestation obtenus sont de 38% (6/16) dans le lot 1 et de 10% (1/10) dans le lot 2 (tableau 3). Bien que la différence ne soit pas significative, le transfert d'un ovocyte dont la maturation s'effectue *in vivo*, c'est-à-dire collecté juste avant l'ovulation, semble donc favoriser les résultats du transfert.

Tableau 3
Résultats des GIFT

	Nombre ovocytes transférés	Nombre GIFT	Nombre DG12 positifs	Taux de réussite
Lot 1 (35 h)	18	16	6	38%
Lot 2 (24 h)	14	10	1	10%

Pour trois receveuses du lot 1 et une receveuse du lot 2, l'observation d'une unique vésicule embryonnaire, alors que leur ovocyte préovulatoire avait été collecté, a mis en évidence la fécondation de l'ovocyte transféré.

Dans le lot 1, trois juments receveuses ayant ovulé avant la collecte de leur ovocyte préovulatoire avaient un diagnostic de gestation positif. Pour deux de ces juments, deux vésicules embryonnaires ont été observées : l'ovocyte des juments donneuse et receveuse avait donc été fécondé. Pour la troisième jument, une seule vésicule embryonnaire était observée à J12. Un test de filiation a montré que cet embryon provenait de l'ovocyte de la jument donneuse : le résultat du GIFT était donc également positif.

Dans le lot 2, parmi les deux juments receveuses dont l'ovocyte n'avait pas été collecté, une vésicule embryonnaire unique a été observée. Un contrôle de filiation a montré que cet embryon provenait de l'ovocyte de la jument receveuse, et non de l'ovocyte transféré.

Le taux de gestation global observé lors de cette étude est peu satisfaisant (27%, n=26). La première hypothèse est que l'insertion de la pipette Pasteur dans l'oviducte demande un certain « savoir-faire » et, dans ce cas, plusieurs manipulateurs sont intervenus. En regard du très faible taux de gestation obtenu dans le lot 2, un effet du milieu de culture pourrait être suspecté, les ovocytes de ce lot y ayant séjourné le plus longtemps. Ce milieu contient des antibiotiques (gentamicine), dont l'effet sur les ovocytes n'est pas connu. D'autre part, la présence de l'ovocyte en atmosphère ambiante juste avant son transfert peut faire varier le pH du milieu dans lequel il est placé. Il serait donc souhaitable, comme le font d'autres équipes (Carnevale et Ginther, 1995), d'utiliser comme milieu de transfert une solution tamponnée.

CONCLUSION

Un certain nombre d'éléments dans la technique de GIFT reste encore à maîtriser, notamment la maturation des ovocytes transférés. Lorsque l'on se place trop près du moment l'ovulation, l'ovocyte à transférer est mature mais le risque d'ovulation avant sa collecte diminue l'efficacité de la technique. La collecte des ovocytes 24 heures après l'induction de l'ovulation et la mise en culture de ceux-ci rend la gestion du transfert plus aisée. Cependant, dans ce cas, la culture *in vitro* des ovocytes transférés tend à diminuer le taux de gestation obtenu selon notre protocole expérimental.

BIBLIOGRAPHIE

- Bézard J, Goudet G, Duchamp G, Palmer E (1995) Preovulatory maturation of ovarian follicles and oocytes in unstimulated and superovulated mares. In : Sharp DC, Bazer FW (eds.). Equine Reproduction VI. Madison, WI : Society for the Study of Reproduction ;1995 : 261-271.
- Carnevale EM, Ginther JM (1995) Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. Biol. Reprod. Mono 1 :209-214.
- Duchamp G, Bour B, Combarnous Y, Palmer E (1987) Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. J Reprod Fert Suppl 35:221-228.
- Duchamp G, Bézard J, Palmer E (1995) Oocytes yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. In : Sharp DC, Bazer FW (eds.). Equine Reproduction VI. Madison, WI : Society for the Study of Reproduction ;1995 : 233-241.
- Guérand M, Mahla R, Lagneaux D, Amigues Y, Palmer E, Bézard J (1997) Parentage testis of Day 10 equine embryos by amplified PCR analysis of microsatellites. Equine Vet J Suppl. 25 : 69-71.
- Hinrichs K, Matthews GL, Freeman DA, Torello EM (1998a) Oocyte transfer in mares. JAVMA, 212 : 982-986.
- Hinrichs K, Betschart RW, McCue PM, Squires EL (1998b) Effect of time of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in the mare. Proceedings of the 7th International Society for Equine Reproduction Congress, Pretoria, South Africa.
- McKinnon AO, Carnevale EM, Squires EL, Voss JL, Seidel GE (1988) Heterogenous and xenogenous fertilization of equine oocytes. J Equine Vet Sci, 8 : 143-147.
- Ray BS, Squires EL, Cook NL, Tarr SF, Jasko DJ, Hossner KL (1994) Pregnancy following gamete intrafallopian transfer in the mare. J Equine Vet Sci, 14 : 27-30.