

## De la collecte des ovocytes à la production d'embryons

C'est en 1989, à l'INRA de Nouzilly, que les premiers embryons équins issus de fécondation *in vitro* (FIV) ont été obtenus chez la jument. Depuis 10 ans, seuls 2 poulains sont nés après FIV (dans notre laboratoire) et 3 après injection intracytoplasmique de spermatozoïde (aux USA et en Australie). La production *in vitro* d'embryons dans l'espèce équine est encore bien loin d'être maîtrisée à ce jour, les taux de fécondation restent faibles comparés à ceux obtenus chez les autres espèces de mammifères. Les principaux facteurs responsables de ce lent développement sont : le petit nombre d'ovocytes disponibles à partir de juments d'abattoir ou d'animaux vivants, la qualité des ovocytes à la collecte et après maturation *in vitro*, encore non contrôlable à ce jour, et la grande difficulté à capaciter *in vitro* les spermatozoïdes d'étalon. 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.

### Optimisation de la production d'ovocytes

Ces dernières années, l'optimisation de la production d'ovocytes par jument a été l'un des objectifs prioritaires pour la plupart des équipes de chercheurs. Face à la difficulté d'obtention de matériel d'abattoir, il a fallu se tourner vers la collecte des ovocytes sur animal vivant réalisée par ponctions des follicules. La ponction faite en aveugle à travers le flanc de l'animal ne permet de collecter que des ovocytes de follicules préovulatoires. Le développement et la maîtrise de la technique de ponction sous échographie transvaginale (Duchamp *et al* 1995), couramment utilisée dans l'espèce humaine, qui rend possible l'aspiration de gros et de petits follicules, a permis d'augmenter le nombre d'ovocytes collectés par jument.

La ponction des follicules peut être programmée en fonction du stade du cycle, du développement folliculaire et permet ainsi d'obtenir des populations d'ovocytes parfaitement caractérisées. Il est possible de réaliser des ponctions répétées chez un même animal sans risque d'adhérences et sans affecter aucunement la santé de l'animal ni la fertilité.

Le taux de collecte des ovocytes est influencé par la taille des follicules aspirés et par les systèmes utilisés. De 14 % à plus de 50 % d'ovocytes immatures sont collectés par petit follicule non préovulatoire et de 55 % à 80 % d'ovocytes matures sont aspirés par follicule préovulatoire de juments induites pour l'ovulation.

En moyenne, 3,2 ovocytes peuvent être collectés par ponction chez une jument en oestrus. La ponction du follicule préovulatoire,

35 heures après induction de l'ovulation, permet d'obtenir une moyenne de 0,8 ovocyte mature par cycle normal et 1,6 par cycle stimulé après traitement des juments aux hormones gonadotropes. Deux ponctions successives, au cours d'un même cycle, l'une en fin de phase folliculaire (oestrus) et l'autre en phase lutéale (dioestrus), donnent une moyenne de 8,9 ovocytes par jument : 0,9 ovocyte mature préovulatoire + 4 ovocytes immatures de la phase folliculaire + 4 ovocytes immatures de la phase lutéale.

Les juments gestantes peuvent être donneuses d'ovocytes sans que la gestation soit affectée. Une moyenne de 15 ovocytes par jument gestante est obtenue après 4 ponctions successives entre 40 et 75 jours de gestation.

### Aptitude des ovocytes à la maturation

A la collecte, les ovocytes sont entourés de cellules formant un cumulus soit compact, soit expansé, en proportions variables selon l'origine et le moment du cycle à la ponction : plus de 90 % d'ovocytes à cumulus compact sont collectés sur animal vivant en oestrus ou en dioestrus alors qu'ils ne sont que de 50 à 80 % à partir d'ovaires d'abattoir. La plupart des ovocytes à cumulus compact sont immatures et présentent différents aspects de structure de chromatine : diffuse, filamenteuse ou regroupée en une masse dense. Cette dernière structure semblerait être associée avec la capacité des ovocytes à mûrir, mais aucune preuve n'a été apportée jusqu'à ce jour.

La maturation *in vivo* des ovocytes de jument a été suivie après ponction de follicules préovulatoires à différentes périodes après l'induction de l'ovulation. L'étude de la chronologie des événements de maturation a montré que le cumulus des ovocytes, encore compact au moment de l'induction, devient expansé entre 6 et 12 h après induction. La reprise de la méiose se fait progressivement : 24 h après induction tous les ovocytes sont en métaphase I, 35 h après induction (juste avant l'ovulation) ils sont en métaphase II, stade nucléaire indispensable pour une fécondation ultérieure (Bézar *et al* 1997).

La maturation *in vitro* des ovocytes collectés immatures est influencée par l'aspect du cumulus, la taille du follicule, le stade physiologique à la collecte, l'atrésie folliculaire, les milieux de culture utilisés et la durée de culture. Le taux de maturation *in vitro* est de 45 à 75 % après 30 h de culture dans un milieu simple avec sérum et hormones. L'addition seule d'EGF (Epidermal Growth Factor) au milieu TC199 n'induit pas la maturation nucléaire comme chez les bovins (6 % vs 80 %,

J. BÉZARD

INRA-Haras  
Nationaux, PRMD,  
Equipe Reproduction  
Equine, 37380 Nouzilly

e-mail :  
jacqueline.bezard@  
tours.inra.fr

respectivement). Toutefois, il a été montré que l'EGF peut être utilisé comme substitut aux hormones gonadotrophines couramment utilisées dans les milieux de maturation (Goudet *et al* 1998) et que le sérum de veau foetal reste indispensable pour maturer les ovocytes chez la jument. Plus de la moitié des ovocytes aspirés de follicules de diamètre inférieur à 10 mm sont incapables de maturer *in vitro*. Les ovocytes de follicules atrétiqes sont plus aptes à maturer *in vitro* que ceux provenant de follicules sains, mais leur aptitude à la fécondation n'a pas été démontrée.

La maturation cytoplasmique est indispensable au développement ultérieur du jeune embryon. Cette maturation n'est pas maîtrisée à ce jour, seule l'étude de modifications morphologiques et biochimiques liées à la maturation finale des ovocytes chez la jument a été abordée. Au cours de la maturation, la zone pellucide subit des transformations de structure. L'interaction entre la zone pellucide et les spermatozoïdes a été montrée comme pouvant refléter l'état fonctionnel des ovocytes. Ainsi, les ovocytes immatures fixent moins de spermatozoïdes que les ovocytes maturés *in vivo* ou *in vitro*.

### Aptitude des ovocytes à produire des embryons

La fécondation *in vitro* (FIV) n'est pas utilisable à ce jour pour évaluer la qualité des ovocytes maturés *in vitro* à produire des embryons viables. Malgré la naissance de deux poulains FIV, issus d'ovocytes maturés *in vivo* et inséminés avec du sperme capacité au ionophore, le taux de segmentation reste faible (23 à 30 %) et il en est de même des ovocytes maturés *in vitro*. L'utilisation de caféine ou d'héparine comme traitement de capacitation n'a pas amélioré les résultats. Aucune gestation n'a été obtenue après transfert d'embryons issus d'ovocytes maturés *in vitro*.

La méthode de FIV conventionnelle chez la jument ne semble plus à l'étude ces dernières années. De nouvelles techniques de procréation assistée sont en cours de mise au point.

### Alternatives à la fécondation *in vitro*

Suite aux échecs de la FIV, des transferts d'ovocytes d'une donneuse dans l'oviducte (GIFT : gamete intrafallopian transfer) ou dans le follicule (TOIF : transfert d'ovocyte intrafolliculaire) d'une jument receveuse inséminée ont été tentés pour fécondation *in vivo*.

Le transfert d'ovocyte dans l'oviducte est actuellement utilisé dans certains centres spécialisés pour fécondation *in vivo* aux USA. Le transfert dans l'oviducte de la receveuse d'ovocytes matures ponctionnés *in vivo* est réalisé par voie chirurgicale. Les taux de gestation sont comparables à ceux obtenus après transfert classique d'embryons. L'âge de la donneuse d'ovocytes a une influence sur la formation de vésicules embryon-

naires : 92 % et 31 % de vésicules embryonnaires ont été obtenus à partir d'ovocytes de juments âgées respectivement de moins de 10 ans et de plus de 20 ans. Récemment, il a été montré que des ovocytes collectés *in vivo* (24h après hCG) à un stade de pré-maturation (métaphase I) et mis en culture (de 12 à 20 h) pour atteindre une maturation finale (métaphase II) avant leur transfert dans l'oviducte, étaient capables de produire des embryons (Hinrichs *et al* 1998).

Le transfert d'ovocyte intrafolliculaire est possible à réaliser en aveugle à travers le flanc de l'animal. Des gestations multiples ont été obtenues après transfert de plusieurs ovocytes soit matures, soit immatures dans un follicule receveur. Des gestations simples ont résulté de transfert d'un ovocyte mature d'une jument donneuse dans un follicule pré-ovulatoire d'une jument receveuse dont le propre ovocyte avait été enlevé. La ponction folliculaire effectuée sous échographie transvaginale, qui permet de visualiser l'aiguille dans le follicule, améliore cette méthode. L'analyse de la filiation des embryons, obtenus après transfert d'un ovocyte dans un follicule qui garde son propre ovocyte, a permis de contrôler les origines maternelles. Ainsi, 50 % des ovocytes transférés sont capables de produire un embryon et 81 % des propres ovocytes du follicule receveur donnent un embryon. La mule est un bon modèle pour le transfert intrafolliculaire d'un ovocyte de donneuse car son propre ovocyte est infécond : la gestation obtenue ne peut donc provenir que de l'ovocyte transféré. Une gestation a déjà été obtenue en 1997 dans notre laboratoire, gestation interrompue volontairement afin de confirmer l'origine maternelle de l'embryon (Palmer *et al* 1997).

Cette méthode, non chirurgicale, semble prometteuse pour augmenter le nombre d'embryons nécessaires à la recherche mais aussi pour obtenir des embryons de juments ayant des problèmes de reproduction.

### Pour en savoir plus

Bézar J., Magistrini M., Battut I., Duchamp G., Palmer E., 1992. Fécondation *in vitro* chez les Equidés. Recueil de Médecine Vétérinaire, Spécial reproduction des Equidés, 168, 11/12, 993-1003.

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.

Duchamp G., Bézar 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.

Goudet G., Belin F., Mlodawska W., Bézar J., 1998. Influence of Epidermal Growth Factor on *in vitro* maturation of equine oocytes. 7th International Symposium on Equine Reproduction. University of Pretoria, South Africa.

Hinrichs K., Betschart R.W., McCue P.M., Squires E.L., 1998. Effect of time of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in the mare. 7th International Symposium on Equine Reproduction. University of Pretoria, South Africa.

Palmer E., Magistrini M., Bézard J., Duchamp G., 1991. Gestation après fécondation *in vitro* dans l'espèce équine. C. R. Acad. Sci., 310, 71.

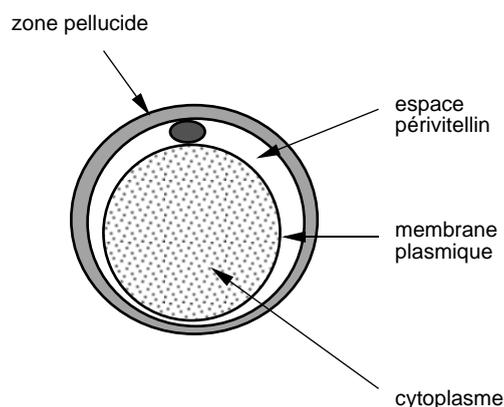
Palmer E., Duchamp G., Cribiu E.P., Mahla R., Boyazoglu S., Bézard J., 1997. Follicular fluid is not a compulsory carrier of the oocyte at ovulation in the mare. Equine Vet. J., Suppl. 25, 22-24.

## Micromanipulation des gamètes

Les succès limités en fécondation *in vitro* (FIV) conventionnelle chez les équins ont incité à développer d'autres techniques de reproduction assistée, basées sur la micromanipulation des gamètes. Les échecs en FIV conventionnelle seraient dus à une dureté de la zone pellucide de l'ovocyte, probablement induite par la maturation *in vitro* et empêchant le spermatozoïde de pénétrer dans l'ovocyte, et à la nécessité d'avoir une méthode de capacitation des spermatozoïdes efficace pour qu'ils puissent pénétrer dans l'ovocyte. Les techniques dites de procréation assistée permettent de contourner ces deux problèmes.

Toutes ont pour objectif d'aider le spermatozoïde à pénétrer dans l'ovocyte. Lors de la fécondation, le spermatozoïde doit franchir deux barrières ovocytaires : la zone pellucide puis la membrane plasmique (figure 1). Plusieurs techniques l'aident à franchir la zone pellucide, une autre technique l'aide à franchir les deux barrières.

Figure 1. Ovocyte.



### Principes

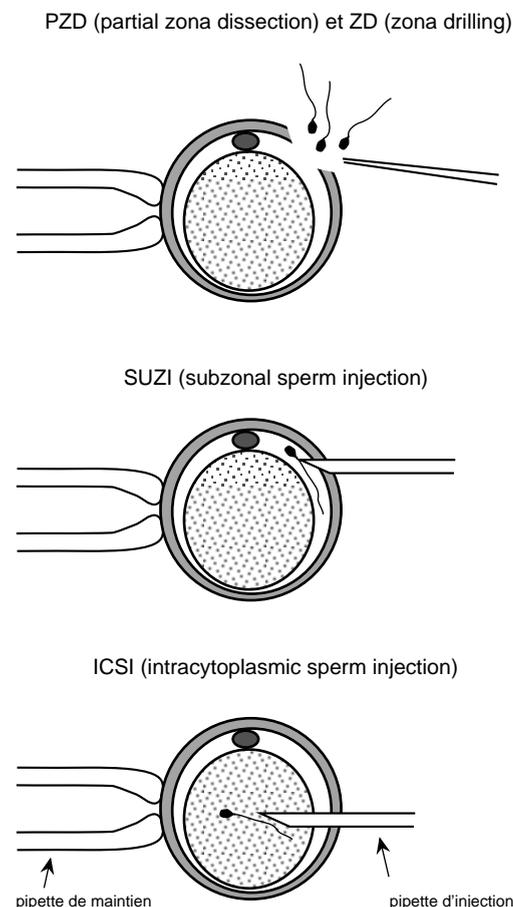
Deux des techniques, PZD (partial zona dissection) et ZD (zona drilling), consistent à faire une brèche dans la zone pellucide, soit mécaniquement (PZD), soit chimiquement (ZD). Les ovocytes sont ensuite mis à incuber avec des spermatozoïdes dans un tube : un ou des spermatozoïde(s) peuvent alors entrer dans l'espace périvitellin (figure 2).

Auparavant, les spermatozoïdes doivent tout de même être traités par un agent capacitant.

La technique appelée SUZI (subzonal sperm injection) consiste à déposer un ou plusieurs spermatozoïdes mobiles à l'aide d'une pipette dans l'espace périvitellin. Le ou les spermatozoïdes choisis par l'opérateur n'ont plus que la membrane plasmique à franchir (figure 2). Comme pour les deux techniques précédentes, les spermatozoïdes doivent être capités.

Ces trois techniques, PZD, ZD et SUZI, nécessitent de disposer de spermatozoïdes mobiles et féconds (capables de fusionner avec l'ovocyte). Un des problèmes rencontrés

Figure 2. Principes des différentes techniques.



F. GUIGNOT

INRA-Haras Nationaux, PRMD, Equipe Reproduction Equine, 37380 Nouzilly

e-mail : florence.guignot@tours.inra.fr