

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

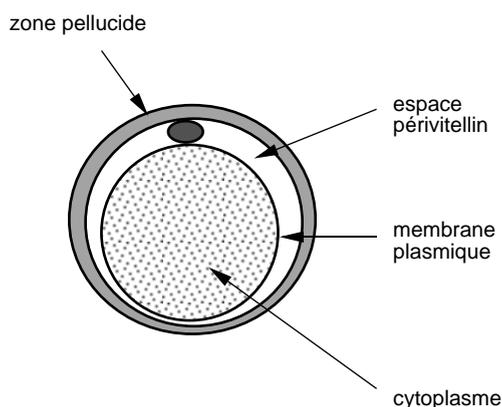
Palmer E., Duchamp G., Cribiu E.P., Mahla R., Boyazoglu S., Bézard J., 1997. Follicular fluid is not a compulsory carrier of the oocyte at ovulation in the mare. Equine Vet. J., Suppl. 25, 22-24.

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

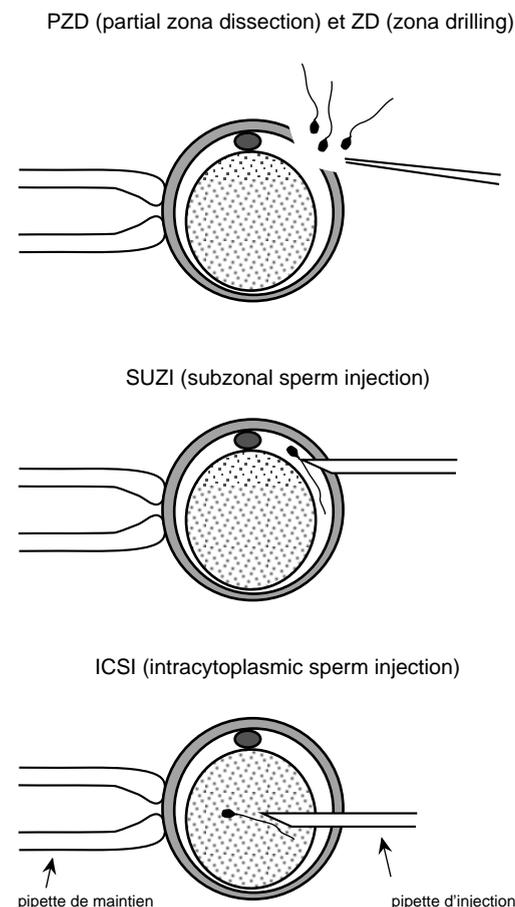
Deux des techniques, PZD (partial zona dissection) et ZD (zona drilling), consistent à faire une brèche dans la zone pellucide, soit mécaniquement (PZD), soit chimiquement (ZD). Les ovocytes sont ensuite mis à incuber avec des spermatozoïdes dans un tube : un ou des spermatozoïde(s) peuvent alors entrer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

Ces trois techniques, PZD, ZD et SUZI, nécessitent de disposer de spermatozoïdes mobiles et fécondants (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

est le taux élevé de polyspermie (pénétration de plus d'un spermatozoïde dans l'ovocyte), qui bloque ensuite le développement (PZD et SUZI : 15 à 40 % de polyspermie ; ZD : 40 à 60 %).

La technique ICSI (intracytoplasmic sperm injection) consiste à déposer un spermatozoïde directement dans le cytoplasme de l'ovocyte (figure 2). Elle a été utilisée avec succès en médecine humaine dans des cas de stérilité masculine (Palermo *et al* 1992 et 1993, Van Steirteghem *et al* 1993). Dans les espèces domestiques, les premières naissances d'animaux issus d'ICSI ont été obtenues chez le bovin en 1991, et chez le mouton en 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.

Réalisation

Les différentes techniques nécessitent un appareillage spécifique. Le microscope doit être équipé de micromanipulateurs permettant de réduire tous les mouvements de l'opérateur. Des micropipettes spécifiques à 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 trouser la zone pellucide (PZD).

La technique d'ICSI, actuellement majoritairement utilisée, est, pour l'espèce équine, largement inspirée de celle utilisée 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, en lésant le flagelle au niveau de la pièce intermédiaire. 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. L'ovocyte microinjecté est ensuite mis en culture. Si tout s'est bien passé, les premiers clivages doivent survenir deux jours après microinjection. Apparaissent ensuite, 5 à 6 jours après microinjection, de jeunes embryons au stade morula (plus de 16 cellules) qui correspondent au stade de développement trouvé dans l'oviducte, voire même, 7 à 8 jours après microinjection, des blastocystes (embryon un peu plus âgé, plus de 180 à 200

cellules) qui correspondent à des stades trouvés dans l'utérus.

Les 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.

Résultats

PZD, ZD, SUZI

Le taux de pénétration des spermatozoïdes dans les ovocytes est plus élevé après PZD (12 %, n = 58) que si la zone pellucide est intacte (4 %, n = 57). Un taux de clivage relativement élevé, de 30 à 80 % en fonction du traitement de capacitation appliqué, a été obtenu après ZD. Ces deux techniques ont permis l'obtention de jeunes embryons (morulae) de plus de 50 cellules : 5 après PZD (n = 55 tentatives, Azuma *et al* 1995) et 5 après ZD (n = 11, 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).

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 %). Après ICSI, il y a augmentation du taux de clivage des oeufs microinjectés si ceux-ci sont maturés *in vitro* avec du liquide folliculaire (48,4 %) plutôt qu'avec du sérum de jument en chaleur (4,2 %). Un taux de clivage identique (46 %, n = 76) a pu être obtenu après activation des oeufs microinjectés avec un agent calcique, l'ionophore A23187. L'ICSI a permis d'obtenir : 1/ à partir d'ovocytes ponctionnés sur des juments gestantes et de sperme capacité, 3 morulae (> 16 cellules, sur 36 essais, Meintjes *et al* 1996), 2/ à partir d'ovocytes d'abattoir et de sperme capacité ou non, 6 morulae (> 16 cellules) et 1 blastocyste (sur 31 essais, Dell'Aquila *et al* 1997) et 3 morulae (23, 50 et > 80 cellules, sur 76 essais, 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 l'améliorer. Des concentrations croissantes de 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. Dans d'autres espèces (humaine, bovine, souris), des systèmes de co-culture ont été utilisés avec succès pour augmenter ce taux de développe-

ment, notamment en cultivant les oeufs clivés sur des tapis de cellules Véro (cellules de rein de singe). 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 (morulae, > 16 cellules, Meintjes *et al* 1996) et après une semaine de co-culture sur tapis de cellules Véro (morulae et 1 blastocyste, Dell'Aquila *et al* 1997 ; 1 morula, > 80 cellules, Guignot *et al* 1998). Les transferts intra-utérins de ces embryons n'ont à ce jour conduit à 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'oviduc-

te d'une jument receveuse (un poulain sur un transfert, Squires *et al* 1996 ; 2 poulains sur 14 transferts, McKinnon *et al* 1998 ; 2 poulains sur 12 transferts, Cochran *et al* 1998). Les seuls transferts intra-utérins d'embryons cultivés *in vitro* 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.

Conclusion

Les techniques de procréation assistée, notamment l'ICSI, semblent prometteuses, mais des recherches sont encore à poursuivre sur le développement des embryons jusqu'à 6 jours, stade auquel on peut transférer l'embryon directement dans l'utérus. Ce n'est qu'ensuite que l'on pourra envisager son application sur le terrain.

Références

- Azuma T., Choi Y.H., 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.
- Cochran R., Meintjes M., Reggio B., Hylan D., Carter J., Pinto C., Paccamonti D., Golke R.A., 1998. Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *J. Equine Vet. Sci.*, 18, 736-740.
- Dell'Aquila M.E., Cho Y.S., Minoia P., Traina V., Lacalandra G.M., 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.
- Guignot F., Ottogalli M., Yvon J.M., Magistrini M., 1998. Preliminary observations in *in vitro* development of equine embryo after ICSI. *Reprod. Nutr. Dev.*, 38, 653-663.
- Li L.Y., Meintjes M., Graff K.J., Paul J.B., Denniston R.S., Godke R.A., 1995. *In vitro* fertilization and development of *in vitro*-matured oocytes aspirated from pregnant mares. *Biol. Reprod. Mono.* 1, 309-317.
- McKinnon A.O., Lacham-Kaplan O., Trounson A.O., 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 K.J., Paccamonti D., Eilts B.E., Cochran R., Sullivan M., Fall H., Godke R.A., 1996. *In vitro* development and embryo transfer of sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *Therio.*, 45, 304.
- Palermo G.D., Joris H., Devroey P., Van Steirteghem A.C., 1992. Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*, 340, 17-18.
- Palermo G.D., Camus M., Joris H., Devroey P., Derde M.P., Van Steirteghem A.C., 1993. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 59, 826-835.
- Squires E.L., Wilson J.M., Kato H., Blaszczyk A., 1996. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured *in vitro*. *Therio.*, 45, 306.
- Van Steirteghem A.C., Nagy Z., Joris H., Liu J., Staessen C., Smitz J., Wisanto A., Devroey P., 1993. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 8, 1061-1066.