

D. LAGNEAUX,
G. DUCHAMP

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

e-mail :
daniel.lagneaux@tours.
inra.fr

Le transfert d'embryons chez les équidés

Après les premiers transferts d'embryons équins réalisés par Oguri et Tsutsumi (1972), la mise au point d'une technique codifiée non chirurgicale de collecte et de transfert des embryons est disponible pour l'espèce équine (Lagneaux 1999). Il est possible d'obtenir des gestations par transfert d'embryons dont les mères sont des juments âgées mais de haute valeur génétique ou commerciale, et aussi des mères poursuivant leur carrière sportive. Le transfert d'embryon permet d'augmenter la production de juments d'élite par récoltes et transferts répétés.

Les transferts d'embryons frais

Les résultats varient selon les équipes et en fonction des techniques pratiquées (Bruyas et Lagneaux 1992) et des races utilisées (Lagneaux et Palmer 1989). Le taux de collecte dépend de la fertilité de la jument donneuse et de l'étalon utilisé. Le taux de gestation dépend de la qualité de la jument receveuse, de son degré de synchronisation avec la jument donneuse, mais aussi de la qualité intrinsèque de l'embryon. En France, depuis 1986, 490 juments différentes ont bénéficié de cette technique. Pour chaque jument donneuse ayant au moins une porteuse gestante, le nombre moyen de poulains obtenus par transfert est de 1,7 par an. Les résultats récents des Haras Nationaux donnent un taux de collecte de 40-50 % et un taux de gestation à 15 jours par embryon transféré de 65 % (Lagneaux 1999).

Le degré de synchronisation entre donneuse et receveuse est un facteur de réussite essentiel, des solutions palliatives permettent de contourner cette contrainte comme l'utilisation de receveuses ovariectomisées ou en anoestrus pour lesquels un traitement suppléatif à base de progestatifs est nécessaire.

Embryons réfrigérés

La réfrigération des embryons, encore très peu utilisée en France, permet (en particulier aux Etats-Unis) de transporter des embryons dans un milieu de culture (Ham F10) à l'aide d'un container thermostaté (à 4°C) du lieu de récolte au lieu de présence de la porteuse. La remise en place, ainsi différée de 24 à 48 heures, est réalisée avec un taux de réussite comparable à celui qui est obtenu lors de transferts des embryons frais.

La congélation des embryons

Cette technique permet de dissocier dans le temps et dans l'espace les récoltes et les transferts d'embryons. La première congélation réussie d'embryons équins a été réalisée par Yamamoto *et al* (1982). Des travaux préli-

minaires ont montré l'importance du diamètre de l'embryon à la congélation : seuls les petits embryons - stade morula ou jeune blastocystes - sont congelables.

Le protocole de congélation des embryons équins est d'inspiration bovine. Il nécessite l'emploi d'un cryoprotecteur (généralement du glycérol). Le refroidissement de l'embryon se fait par étapes : de 3 °C/min jusqu'à -7 °C, à -7 °C seeding (terme anglais signifiant "ensemencement" : il s'agit d'un acte technique permettant d'initier - ensemencer le premier cristal de glace dans un milieu liquide pour obtenir sa cristallisation) puis de 0,3 °C/min jusqu'à -30 °C, enfin stockage dans l'azote liquide à -196 °C. La décongélation est rapide dans un bain-marie à 37 °C, pendant 30 secondes. Le nécessaire retrait du cryoprotecteur s'effectue par lavages successifs dans différents bains à concentrations décroissantes. Le saccharose utilisé comme additif lors du retrait du cryoprotecteur prévient les risques d'éclatement cellulaire (Lagneaux *et al* 1997).

Les résultats obtenus après transfert d'embryons congelés-décongelés sont actuellement inférieurs à ceux obtenus lors du transfert d'embryons frais : moins de 40 % (synthèse de Squires *et al* 1999) vs 65-70 %, même si de tout récents résultats permettent d'espérer des progrès intéressants.

Les critères de qualité de l'embryon

Si la morphologie (Betteridge *et al* 1982) ou la physiologie (Wilson *et al* 1986) de l'embryon équin sont connues, l'appréciation de sa qualité, plus délicate, peut être abordée par plusieurs tests actuellement disponibles : l'analyse morphologique (Squires et Garcia 1985) trop subjective, l'analyse histologique, fiable mais irréversible... Une étude comparant deux méthodes d'analyse : mesure du métabolisme embryonnaire et fluorescence des cellules mortes marquées au DAPI (Huhtinen *et al* 1995) a permis de montrer la fiabilité de ces deux tests indépendants. Ainsi, le test de marquage au DAPI, fiable, efficace, n'est pas préjudiciable pour l'embryon, puisque des gestations, des poulinaiges et des poulains totalement sains ont été obtenus avec des embryons préalablement testés (Huhtinen *et al* 1997, Lagneaux *et al* 1997). Ce test est un outil indispensable pour tout progrès de recherche sur l'embryon.

Perspectives

Par une méthode expérimentale originale et récente, un taux de gestation de 60 % après décongélation d'embryons préalablement congelés avec 100 mm de glutamine a été obtenu.

Si la congélation est la préoccupation prin-

cipale des équipes travaillant dans le domaine de la transplantation embryonnaire équine, d'autres orientations existent : plus pratiques, telles que la qualité des milieux de collecte, les critères de choix des receveuses (Camillo *et al* 1997), ou plus fondamentales comme la différenciation des cellules embryonnaires, les mécanismes de descente embryonnaire, la reconnaissance materno-foetale ou encore l'expression génétique.

Depuis 1986, plus de 500 poulains sont nés en France grâce à la transplantation embryonnaire. Le développement de cette technique reste limité en raison de son coût élevé et des lourdes contraintes techniques. La mise au point d'une technique fiable de congélation des embryons associée à un traitement efficace de super-ovulation sont les objectifs principaux des thèmes de recherches. Le test d'appréciation de la qualité des embryons, un outil efficace, doit permettre d'accélérer l'obtention de progrès significatifs. Enfin il faudra savoir réserver cette technique à la production de qualité en évitant la course à l'augmentation de la quantité ; la transplantation embryonnaire restera alors ce qu'elle est dans les autres espèces animales : un outil de production pour reproducteurs "haut de gamme".

Pour en savoir plus

Betteridge K.J., Eaglesome M.D., Mitchell D., Flood P.F., Beriault T.R., 1982. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation : observations on fresh specimens. *J. Anat.*, 135, 191-209.

Bruyas J.F., Lagneaux D., 1992. Transplantation embryonnaire équine. *Rec. Méd. Vet.*, 168, 11-12, 937-946.

Camillo F., Cela M., Vannozi I., Romagnoli S., Aria G., 1997. Use of early pregnant mares as embryo recipients. *Equine Vet. J., Suppl.* 25, 77-79.

Colchen S., Battut I., Fieni F., Tainturier D., Bruyas J.F., 1998. Quantitative analysis and histological morphology of equine embryos at exactly 156 and 168 hours after ovulation. 7th I.S.E.R. Pretoria (abstract 141-142).

Hinrichs K., Sertich P.L., Palmer E., Kenney R.M., 1987. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. *J. Reprod. Fert.*, 80, 395-401.

Huhtinen M., Bredbacka P., Kotilainen T., 1995. Non surgical transfer of 4',6'-Diamidino-2-Phenylindole-stained Equine demi-embryos treated with cytocholasin B and Nocodazole. *Biol. Reprod. Mono* 1, 325-328. Huhtinen M., Lagneaux D., Koskinen E., Palmer E., 1997. The effect of sucrose in the thawing solution on the morphology and mobility of frozen equine embryos. *Equine Vet. J., Suppl.* 25, 94-97.

Lagneaux D., 1999. Transfert d'embryons - aspects techniques. 25e Journée d'étude de la Recherche Equine - 61-67, DEFI -Paris.

Lagneaux D., Palmer E., 1989. Are pony and larger mares similar as recipients for non-surgical transfer of Day 7 embryos ? *Equine Vet. J., Suppl.* 8, 64-67.

Lagneaux D., Palmer E., 1993. Embryo transfer in anoestrus recipient mares : attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. *Equine Vet. J., Suppl.* 15, 107-110.

Lagneaux D., Huhtinen M., Koskinen E., Palmer E., 1997. Effect of anti-freeze protein (AFP) on the cooling and freezing of equine embryos as measured by DAPI-staining. *Equine Vet. J., Suppl.* 25, 85-87.

Oguri N., Tsutsumi Y., 1972. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. *J. Reprod. Fert.*, 31, 187-195.

Squires E.L., Garcia R.H., 1985. Factors affecting success of equine embryo transfer. *Equine Vet. J., Suppl.* 3, 92.

Squires E.L., Mc Cue P.M., Vanderwall D., 1999. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51, 91-104.

Wilson J.M., Caceci T., Kraemer D.C., Potter G.D., Neck K.F., 1986. Hatching of the equine embryo : an electron microscopy study. *Biol. Reprod.*, 34, Suppl. 1, 101.

Yamamoto Y., Oguri N., Tsutsumi Y., Hachinohe Y., 1982. Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 32, 399-403.

Endocrinologie de l'étalon

Dans beaucoup d'espèces de mammifères, dont le cheval, le déroulement de la spermatogénèse dépend du bon fonctionnement de l'axe hypothalamus-hypophyse-testicule. Celui-ci repose sur des mécanismes de stimulation de l'hypothalamus qui, par le GnRH qu'il sécrète, agit sur l'hypophyse. Les hormones hypophysaires (LH, FSH) vont à leur tour induire la sécrétion des hormones stéroïdes (testostérone et oestrogènes) par les testicules. Toutes ces stimulations sont

modulées par des mécanismes de feed-back dus aux sécrétions du testicule, mais aussi très certainement par des interactions locales entre cellules dans le testicule, principalement les cellules de Leydig et les cellules de Sertoli.

Le contrôle hormonal

Chez l'étalon au repos sexuel, la fréquence approximative est, selon les auteurs, d'un

M. VIDAMENT

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

e-mail :
marianne.vidament@
tours.inra.fr