

# les techniques de reproduction artificielle

## au secours des juments infertiles

**Stefan Deleuze**

Département des Sciences Cliniques  
Clinique des Animaux de  
Compagnie et des Equidés  
Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Université de Liège  
Boulevard de Colonster, 20-B41  
B-4000 Liège, Belgique

### Objectif pédagogique

■ Appréhender les techniques de reproduction assistées actuellement disponibles pour traiter les cas d'infertilité chez la jument.

### Essentiel

■ L'ovocyte doit quitter son état de quiescence pour atteindre un état de maturation qui le rend apte à être fécondé.

■ Il existe trois techniques efficaces de production *in vitro* d'embryons :  
- la maturation *in vitro* (MIV) des ovocytes ;  
- la fécondation (FIV) ;  
- la culture *in vitro* d'embryons jusqu'à un stade de développement qui permet son transfert.

Les techniques de reproduction assistée (ARTs) sont de plus en plus largement envisagées pour venir au secours des juments infertiles. Cette revue vise à donner un aperçu des techniques actuellement disponibles de même que leurs applications spécifiques et leur rendement.

De nombreuses étapes sont nécessaires pour conduire à la naissance d'un poulain. L'ovocyte doit avant tout, quitter son état de quiescence pour atteindre un état de maturation qui le rend apte à être fécondé. À ce stade, l'ovulation a lieu, l'ovocyte mûri est libéré hors du follicule, et migre ensuite dans l'ampoule de l'oviducte pour y être fécondé. L'ovocyte fécondé progresse dans l'oviducte pour atteindre la corne utérine environ 6 jours après l'ovulation. Le jeune embryon inhibe la disparition du corps jaune nécessaire à sa survie et après implantation et mise en place de la placentation, il poursuit son développement jusqu'au terme. Chacune de ces étapes représente un écueil possible pour la cascade complexe d'événements, qui mène à la naissance d'un poulain.

● L'acronyme "ART" pour : "Assisted Reproduction Technologies", ou en français : "Techniques de Reproduction Assistée" (TRA), reprend des procédures allant de l'insémination artificielle à la production de clones. Ces techniques de reproduction assistée permettent en ce moment de préserver le potentiel génétique d'animaux subfertiles ou même morts.

● Les premiers pas et les premiers grands succès ont été rapportés dans l'espèce bovine. Bénéficiant d'un intérêt marqué par le secteur bovin et d'une disponibilité quasi illimitée d'ovocytes qui proviennent d'ovaires prélevés en abattoirs, les recherches ont rapidement débouché sur des techniques efficaces de production *in vitro* d'embryons reprenant trois étapes essentielles :

1. la maturation *in vitro* (MIV) des ovocytes ;



1 Lors de la ponction, un opérateur immobilise l'ovaire par voie transrectale. - La sonde échographique introduite dans le vagin permet de visualiser à l'écran les follicules et l'aiguille de ponction manipulée par un second opérateur (photo S. Deleuze, Université de Liège).

2. la fécondation (FIV) ;

3. la culture *in vitro* d'embryons jusqu'à un stade de développement qui permet son transfert.

● L'industrie du cheval, en refusant encore dans bien des cas, le recours à ces biotechnologies, et la bien moindre disponibilité d'ovaires d'abattoirs, n'ont pas permis un essor aussi rapide des techniques de reproduction assistée dans cette espèce. Néanmoins, ces dernières années, ces techniques ont été utilisées pour une meilleure valorisation du potentiel génétique d'une jument ou pour obtenir un poulain de juments infertiles.

● Après une brève introduction, cet article développe le transfert d'embryon, puis les méthodes de récolte d'ovocytes, et les différentes techniques qui utilisent ces ovocytes et permettent de produire des poulains à partir de ceux-ci. Il s'agit précisément du transfert intra-folliculaire et intra-salpyngien d'ovocytes, de l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde et enfin, du clonage (photo 1).

### LE TRANSFERT D'EMBRYON

● Le transfert d'embryon permet d'obtenir plusieurs poulains d'une même jument au cours d'une même saison. Il permet aussi de produire des poulains de juments qui poursuivent une carrière sportive sans devoir interrompre cette dernière ou plus encore, de juments souffrant d'affections utérines les empêchant de mener à terme une gestation.

## AFFECTIONS

■ Crédit Formation Continue :  
0,05 CFC par article

Parmi ces affections, on peut citer à titre d'exemple l'endométrite chronique, l'endométriose, l'incompétence cervicale.

● L'arrivée de l'embryon dans la lumière utérine a lieu 6 jours après l'ovulation ; aussi, les récoltes sont réalisées en routine au 7<sup>e</sup> ou 8<sup>e</sup> jour.

### Comment l'effectuer

● L'embryon est collecté par lavage utérin : une sonde de collecte à simple ou à double voie, avec un ballonnet est introduite dans le col utérin et la lumière utérine est rincée à plusieurs reprises avec 1 à 2 litres de Ringer Lactate ou du PBS ou encore un liquide de collecte spécifique, dont il existe plusieurs spécialités commerciales de marques différentes.

● **L'injection d'ocytocine durant le dernier rinçage favorise la vidange de l'utérus et augmente le taux de succès des récoltes** [34].

● Le liquide collecté est filtré et le filtre est examiné sous la loupe. Au moment de la collecte, l'embryon qui est au stade blastocyste mesure > 300 µm. Sa qualité est évaluée, il est lavé, puis monté dans une paillette dans une goutte de milieu. Enfin, il est transféré par voie trans-cervicale dans le corps utérin d'une jument receveuse. Celle-ci a ovulé entre 1 jour avant et 4 jours après la donneuse [1].

### Choix de jument et taux de réussite

● **Les receveuses idéales sont des juments jeunes car leur tractus reproducteur est le plus souvent intact**, et dociles car elles doivent être manipulées et échographiées très souvent.

● **Le taux moyen de collecte d'embryon attendu est approximativement de 50 p. cent.** Avec un taux de gestation après transfert d'un embryon de bonne qualité d'environ 70 p. cent, on peut estimer le taux de succès moyen du transfert d'embryon à plus ou moins 35 p. cent par cycle [38].

● En France, seules les personnes ayant obtenu le diplôme de chef de centre délivré par le ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (délivré par le Ministre de l'Agriculture après une formation de 4 à 6 semaines et un examen théorique et pratique) sont habilitées à réaliser le transfert d'embryon chez le cheval.

● Les difficultés et les risques d'un programme de transfert d'embryons sont, comme dans tous les centres d'insémination artificielle, liés aux palpations rectales, aux échographies, aux inséminations artificielles et aux lavages utérins, auxquels il faut ajouter la gestion des receveuses et la maîtrise tech-

nique des collectes et transferts à proprement parler.

→ **Le transfert d'embryon est, somme toute, assez accessible et peu complexe par comparaison avec les autres TRA (Techniques de Reproduction Assistée) qui nécessitent toutes, la disponibilité d'ovocytes.**

### Limites de la technique

● **Chez le cheval, le transfert d'embryon souffre de l'absence de protocoles de superovulation véritablement efficaces**, ce qui limite beaucoup le rendement et la généralisation de la technique.

● En outre, la mise à disposition permanente de receveuses synchrones nécessite un troupeau de juments de grande taille et une gestion journalière assez lourde que des petites structures peuvent difficilement supporter seules. Certains centres spécialisés dans le transfert d'embryon, qui disposent de tels troupeaux se sont donc développés tant en Amérique qu'en Europe.

● Les receveuses pleines sont en général louées au propriétaire de la donneuse pour environ 2500 €. Les frais de récolte et de transfert, s'ils ne sont pas compris, s'élèvent à plus ou moins 75 € et 500 € respectivement.

● La réfrigération d'embryons équins est suffisamment maîtrisée et permet leur acheminement vers ces centres dans un délai de 24 h lorsque les récoltes ne sont pas réalisées sur site.

● Après récolte, l'embryon est lavé et placé dans un tube contenant un milieu nutritif. Certaines firmes proposent des boîtes de transport qui permettent de maintenir l'embryon à 4°C durant son trajet vers le centre où il est alors transféré dans l'utérus d'une receveuse.

A l'inverse de la réfrigération, et ce, malgré de récents progrès, la congélation (cryoconservation) qui permettrait une conservation quasi illimitée des embryons se heurte toujours à des difficultés pratiques. Néanmoins, de récents progrès ont permis de voir apparaître cette technique dans certains programmes commerciaux qui permettent des taux de poulinage de 45 p. cent [14].

### LA COLLECTE, L'ÉVALUATION ET LA MATURATION DES OVOCYTES

#### La collecte des ovocytes *ex-vivo*

La recherche s'est développée essentiellement à partir d'ovocytes prélevés à l'abattoir, ce qui permet de multiplier considérablement le nombre d'ovocytes disponibles par rapport à la ponction sur jument vivante.

### Essentiel

■ Les receveuses idéales sont des juments jeunes car leur tractus reproducteur est le plus souvent intact.

### En pratique

■ Les oaires sont en général acheminés vers le laboratoire dans une solution de NaCl à 0,9% entre 25 et 35°C.

## en pratique

**La collecte d'ovocytes à partir d'ovaires prélevés *post-mortem* (ex vivo) et la collecte d'ovocytes par ovum pick up (*in vivo*)****La collecte d'ovocytes à partir d'ovaires prélevés *post-mortem* (ex vivo)**

- La récolte des ovocytes équins présente certaines difficultés techniques. L'ensemble des étapes doit être réalisé avec un souci constant des conditions d'hygiène, de température, de pH et de milieu dans lequel se trouvent les ovocytes, afin de les préserver au maximum.
- Les ovocytes peuvent être récoltés par aspiration à l'aide d'une aiguille 18G et d'un système d'aspiration (+/- 1 bar) ou d'une pompe à vide (100 - 150 mm Hg). L'ovaire peut également être tranché afin d'augmenter le nombre de follicules accessibles.
- L'ovocyte équin présente la particularité d'être fermement ancré sur un cumulus oophorus épais et trapu, et dont les cellules présentent des extensions s'engrenant dans la couche de la thèque. Cette caractéristique rend difficile l'extraction de l'ovocyte. Après une incision des follicules visibles, leur paroi est grattée à l'aide d'une curette. L'ovaire est ensuite disséqué en petits fragments afin d'accéder aux follicules qui se trouvent à l'intérieur du parenchyme ovarien.
- Alternativement, un grattage avec le biseau de l'aiguille peut être réalisé en cours

d'aspiration des follicules. Malgré cela, le taux global de récolte d'ovocytes équins reste faible (3 - 5 ovocytes / ovaire) étant donné que l'ovaire d'une jument comporte en moyenne six follicules antraux, et l'on considère qu'en terme de temps et de personnel, la collecte d'ovocytes équins est dix fois plus ardue que celle d'ovocytes bovins [15].

**la collecte d'ovocytes par ovum pick up (*in vivo*)**

- La collecte d'ovocytes peut être réalisée par ponction par le flanc qui nécessite très peu de matériel. Un trocard est placé dans la fosse sous-lombaire de la jument, l'ovaire est manipulé par voie trans-rectale et conduit en regard du trocard, une aiguille y est passée au travers et le follicule est ponctionné et rincé à plusieurs reprises à l'aide de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) hépariné. Cette technique ne permet toutefois pas de visualiser le follicule et l'aiguille d'aspiration, et ne donne des résultats satisfaisants que pour la ponction de follicules de grande taille.
- La ponction échoguidée par voie transvaginale est depuis une vingtaine d'années devenue la technique de choix. La technique adaptée à partir de celle utili-

sée chez le bovin permet maintenant d'obtenir des taux de collectes qui vont de 51 à 86 p. cent [23] et l'on obtient environ 3-5 ovocytes immatures par séance de ponction.

- La jument est tranquilisée et une sonde échographique sectorielle de 7,5 MHz est introduite dans le vagin antérieur jusqu'au niveau du col (fornix). L'ovaire est manipulé à travers la paroi rectale et positionné en regard de la sonde, et une aiguille est avancée le long de la sonde et introduite dans la cavité antrale au travers de la paroi du vagin. Le liquide folliculaire est aspiré, et le follicule est rincé à plusieurs reprises. Des mouvements de rotation de l'aiguille sont réalisés en cours d'aspiration pour gratter la paroi folliculaire afin d'en détacher l'ovocyte. Le liquide folliculaire et les liquides de rinçage sont récoltés et transmis aussitôt en salle de culture pour rechercher l'ovocyte. Les follicules de plus de 25 mm sont ponctionnés à l'aide d'une aiguille à simple voie, puis vidangés et remplis à plusieurs reprises. Les follicules de moins de 25 mm sont ponctionnés à l'aide d'une aiguille à double voie qui permet un rinçage continu durant la ponction [15]. Cette technique a récemment été décrite pour la collecte d'ovocytes d'ânesse [27].

**Essentiel**

- L'ovocyte équin présente la particularité d'être fermement ancré sur un cumulus oophorus épais et trapu, et dont les cellules présentent des extensions s'engrenant dans la couche de la thèque.
- La collecte d'ovocytes peut être réalisée par ponction par le flanc ; celle-ci nécessite très peu de matériel.

**Manipulation et transport des ovaires prélevés après la mort d'une jument**

- Les ovaires sont en général acheminés vers le laboratoire dans une solution de NaCl à 0,9 % entre 25 et 35°C.
- Dans l'idéal, les ovaires doivent arriver au laboratoire dans les 6 h qui suivent la mort de la jument. La solution optimale est peut-être de réaliser la récolte des ovocytes sur place, tout de suite après le prélèvement des ovaires et de les placer immédiatement dans les conditions de maturation *in vitro* dans un incubateur portable pour les ramener au laboratoire. Cette méthode encore peu utilisée permet sans doute d'obtenir des taux de maturation optimaux, mais elle comporte des difficultés techniques évidentes (lieu et matériel de récolte des ovocytes sur place, transport des ovocytes à température et atmosphère contrôlées) [4].

**La collecte d'ovocytes à partir d'ovaires prélevés *post-mortem* (ex vivo)**

- La collecte d'ovocytes à partir d'ovaires prélevés *post-mortem* (ex vivo) est dévelop-

pé dans l'*encadré en pratique*.

- Les difficultés techniques constituent un frein au développement de la recherche fondamentale sur l'ovocyte équin, donc de toutes les TRA qui en découlent.
- Les ovocytes collectés à partir d'ovaires d'abattoir représentent par définition une population très hétérogène et souffrent entre autre, d'un manque d'informations concernant l'âge des juments, leur phase du cycle et leur état gestatif.
- Contrairement aux animaux de rente, l'application des biotechnologies pour la production d'embryons équins est limitée aux animaux souffrant de troubles de la fertilité ou aux sportifs de haut niveau. Il n'y a donc dans cette espèce, en dehors des fins de recherche que peu d'intérêt réel à produire des embryons à partir d'ovaires prélevés en abattoirs.

**La collecte d'ovocytes par ovum pick up (*in vivo*)**

- Pour les utilisations plus cliniques, les ovocytes sont souvent collectés *in vivo* après



initiation de la maturation folliculaire et ovocytaire chez une jument en œstrus. Cette maturation peut être induite par l'administration de préparations commerciales contenant de l'hCG (effet LH), ou un analogue de GnRH (induction d'un pic endogène de LH) (*encadré en pratique, photos 2, 3*).

### L'évaluation des ovocytes collectés

- Après collecte *ex vivo* ou *in vivo*, les ovocytes peuvent être dénudés mais ils sont en général entourés d'une quantité plus ou moins abondante de cellules de la corona radiata et du cumulus oophorus qui forment le Complexe Ovocyte-Cumulus (COC). Les COC's peuvent être caractérisés en fonction de leur degré d'expansion et celui-ci est directement corrélé au degré de maturation nucléaire de l'ovocyte [23].
- Les ovocytes immatures sont associés à des COC's compacts.
- Les COC's expansés sont associés à des follicules en cours d'atréxie. Ils présentent une meilleure aptitude à la reprise de la méiose après maturation *in vitro* [26].

### La maturation *in vitro* des ovocytes (MIV)

- Pour qu'un ovocyte puisse être fécondé, il doit achever sa maturation nucléaire et cytoplasmique. La maturation cytoplasmique repose en majorité sur l'accumulation de protéines et d'ARNm dans l'ovocyte. La maturation nucléaire repose sur la reprise de la méiose et le développement jusqu'au stade de métaphase II, ce qui peut être facilement évalué par des colorations spécifiques de l'ADN qui permettent la visualisation de la localisation périphérique des chromosomes métaphasiques et la présence d'un globule polaire dans l'espace périvitellin (*photos 4, 5*).
- La plupart des études qui portent sur la maturation *in vitro* des ovocytes équins se sont intéressées à leur maturation nucléaire davantage qu'à leur maturation cytoplasmique pour laquelle le seul critère fiable est leur aptitude à produire un embryon. Bien que des modifications cytoplasmiques au cours de la maturation, comme par exemple la migration des granules corticaux ou des mitochondries, aient été décrites [23, 25], leur importance en matière de compétence ovocytaire n'a pas été explorée.
- Les milieux utilisés pour la MIV d'ovocytes équins dérivent principalement du secteur bovin.



2 OPU: l'ovaire est manipulé par voie transrectale et ramené contre la paroi du vagin pour obtenir une image des follicules, à l'aide d'une sonde échographique montée sur un manche introduit dans le vagin (photos S. Deleuze, Université de Liège).

- Actuellement, la plupart des milieux utilisent comme base le TCM-199, le EMMI et des solutions de sels auxquels sont ajoutées du sérum de veau fœtal (FCS) et des hormones telles que la LH, la FSH, le benzoate d'oestradiol ou l'EGF.
- La durée de maturation nécessaire a également fait l'objet de nombreuses investigations. Il est admis maintenant que l'on peut espérer un taux de maturation jusqu'au stade de métaphase II de l'ordre de 50 à 80 p. cent après 30 h d'incubation sous atmosphère contrôlée (39°C et 5 p. cent de CO<sub>2</sub>) et qu'une durée prolongée d'incubation n'améliore pas ce résultat [15].

### LES TECHNIQUES DE REPRODUCTION ASSISTÉE

- Au cours des dix dernières années, les techniques de reproduction assistée chez le cheval ont été largement développées. Cependant, la plupart de ces techniques requièrent des équipements spécifiques et une expertise particulière ce qui explique qu'elles restent mises en œuvre dans des laboratoires spécialisés la plupart du temps.
- Ces techniques utilisent des ovocytes matures ou immatures de juments obtenus par les différents procédés évoqués ci-dessus.
- La fécondation *in vitro* (FIV) conventionnelle reste actuellement peu utilisable chez la jument ; les techniques restent peu répétables et, à ce jour, et seuls deux poulains sont nés après FIV d'ovocytes maturés *in vivo* [4, 44]. Les raisons invoquées concernent principalement l'absence d'une méthode efficace de capacitation des spermatozoïdes équins, les changements dans la zone pellucide [18, 29] ou une maturation *in vitro* des ovocytes imparfaite [34]. Les traitements qui induisent la capacitation, la réaction acrosomique des spermatozoïdes équins et qui permettent



3 OPU : un second opérateur introduit l'aiguille dans un guide présent dans le manche de la sonde échographique. - Le contrôle de l'image permet la ponction échoguidée des follicules ovariens.



4 Un ovocyte en métaphase I avec le globule polaire dans l'espace périvitellin.



5 Ovocyte en métaphase II. Coloration au bis-benzamide.

### Essentiel

- Pour qu'un ovocyte puisse être fécondé, il doit achever sa maturation nucléaire et cytoplasmique.

## AFFECTIONS

leur pénétration dans l'ovocyte sont l'ionophore calcique A23187 [2], l'héparine [17] et la procaine [35]. Mais pour ces trois traitements, les taux de FIV restent globalement peu satisfaisants (10 à 22 p. cent). Si des taux de fécondation de 40 à 60 p. cent par FIV conventionnelle [3, 41] ont laissé espérer que cette technique pourrait prendre une nouvelle place dans les TRA, il s'est avéré que ces taux traduisaient en fait une activation ovocytaire par la procaine et non de réelles fécondations [39].

● **En attendant, pour contourner ces difficultés, différentes approches pour produire des embryons à partir d'ovocytes soit *in vitro*, soit *in vivo* ont été explorées.** Parmi celles-ci, le transfert intra-folliculaire d'ovocytes, le transfert intra-salpyngien d'ovocytes et l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde.

#### **Le transfert d'ovocyte intra-folliculaire (TOIF)**

● Le transfert intra-folliculaire a été d'abord tenté chez le babouin, chez le bovin et chez le porc mais toujours sans succès, probablement suite aux dommages subis par les follicules lors des manipulations [20, 27].

● Grâce à l'anatomie particulière de son ovaire qui présente une zone médullaire périphérique et une tunique albuginée épaisse et résistante, la jument constitue un modèle privilégié pour l'étude du Le transfert intra-folliculaire (TOIF).

**En pratique :** La procédure s'apparente à celle décrite pour *l'ovum pick up*.

- Le follicule pré-ovulatoire est ponctionné et quelques millilitres de liquide folliculaire sont aspirés.

- Les ovocytes sont injectés dans le follicule et le circuit est flushé avec le liquide folliculaire initialement prélevé. Ceci a permis d'obtenir des embryons équins après transfert d'ovocytes immatures dans des follicules pré-ovulatoires [27].

● Plus récemment, des embryons ont été obtenus après TOIF d'ovocytes préalablement maturés *in vitro* [14]. Les taux rapportés d'embryons en excès par rapport aux ovocytes des receveuses varient de 8,9 p. cent (12 embryons en excès / 135 ovocytes transférés) [27] à 12,8 p. cent (6 embryons en excès / 45 ovocytes transférés) [14].

● Le TOIF semble augmenter l'incidence des follicules anovulatoires mais lorsque les ovocytes immatures d'une jument sont réinjectés dans son propre follicule préovulatoire, il reste cependant une procédure

relativement simple et peu invasive qui peut être envisagée pour contourner l'absence de protocoles efficaces de superovulation chez la jument [14]. Bien qu'il n'y ait pas d'utilisation commerciale rapportée, ceci permettrait d'obtenir davantage d'embryons pour le transfert chez des juments pour lesquelles celui-ci est envisagé comme solution à leur infertilité.

#### **Le transfert d'ovocytes intra-salpyngien (Oocyte Transfer, OT)**

● La technique de transfert d'ovocytes intra-salpyngien consiste à transférer chirurgicalement un ou plusieurs ovocytes d'une donneuse dans l'oviducte d'une receveuse (**encadré Technique**).

● Bien qu'il ait été démontré que des juments cycliques et non cycliques peuvent être utilisées comme receveuses sans affecter le taux de gestation [10], et que certaines études rapportent l'utilisation de brebis comme receveuses [39], la plupart des transferts utilisent des juments cycliques dont l'ovocyte du follicule dominant a été retiré avant transfert afin d'éviter les manipulations hormonales des juments non cyclées destinées à mimer la phase œstrale.

● Lorsque l'ovocyte du follicule pré-ovulatoire de la receveuse n'est pas collecté, le risque qu'un poulain résulte de la fécondation de ce dernier est très faible si le follicule a été complètement aspiré (follicule complètement collabé et présence de sang dans le circuit de collecte).

● Si la ponction du follicule est incomplète, le risque de produire un embryon issu de la donneuse est d'environ 30 p. cent, et la jument ne doit pas être sollicitée [28].

● Actuellement, en utilisant des ovocytes issus de follicules pré-ovulatoires donc maturés *in vivo*, on peut escompter des taux de blastocystes avoisinant les 85 p. cent et le transfert d'ovocytes dans la trompe utérine (ou l'oviducte) d'une receveuse peut donc actuellement être considéré comme une solution alternative au transfert d'embryon chez les juments infertiles [29].

#### **Les applications cliniques**

● L'application clinique majeure du transfert intra-salpyngien d'ovocytes concerne les juments qui souffrent d'affections utérines, cervicales ou salpyngiennes qui ne leur permettent pas de produire un embryon qui peut être collecté et transféré dans l'utérus d'une jument receveuse.

## technique

### Comment réaliser le transfert d'ovocytes intra-salpyngien (Oocyte Transfer, OT)

- Une laparotomie par le flanc permet l'accès à l'ovaire et à la trompe utérine (ou oviducte), une pipette est introduite dans sa lumière et les ovocytes y sont déposés [16].
- Les ovocytes peuvent être maturés *in vivo* et récoltés à partir d'un follicule pré-ovulatoire, ou bien, ils peuvent être obtenus à partir de follicules immatures et ensuite maturés *in vitro*.
- La receveuse est inséminée avant et après transfert des ovocytes afin que la fécondation et le développement embryonnaire se déroulent

dans l'oviducte et dans l'utérus.

- Alternativement, les spermatozoïdes peuvent être déposés dans l'oviducte en même temps que les ovocytes ; on parlera alors de GIFT pour "Gamete Intra-Falopian Transfer".
- L'utilisation de sperme frais pour le GIFT donne de meilleurs résultats que le sperme congelé [13], mais le transfert d'ovocytes seuls suivi de l'insémination de la receveuse est plus largement utilisé.

● L'autre application essentielle de cette technique est d'obtenir un poulain après la mort inopinée d'une jument. Les ovaires prélevés rapidement après la mort de la jument peuvent être acheminés vers le laboratoire et les ovocytes récoltés afin de les transférer dans l'oviducte d'une receveuse.

Le premier poulain issu du transfert d'ovocytes récoltés à partir d'ovaires après la mort de la jument donneuse et ensuite maturés *in vitro*, est né en 2003 [8]. Les mêmes auteurs rapportent un taux de développement embryonnaire de 15 p. cent (n = 191) après un transfert d'ovocytes collectés *post-mortem* à partir de juments de grande valeur [6].

● Les taux de développement embryonnaire après transfert intra-salpyngien d'ovocytes maturés *in vitro* rapportés dans la littérature sont variables et même les taux les plus élevés : 24,1 p. cent (2 / 29) [40] et 32,5 p. cent (13 / 40) [14] restent plus faibles que ceux obtenus après transfert d'ovocytes maturés *in vivo*, et collectés à partir de follicules préovulatoires qui varient de 73 p. cent à 83 p. cent [7, 9].

→ Ces résultats sont obtenus après transfert d'un seul ovocyte dispensant ainsi du transfert d'embryon nécessaire pour éviter les gestations multiples, lequel comporte bien évidemment un taux d'échec, donc la perte de gestations obtenues de manière laborieuse. Un facteur majeur affectant le taux de succès reste l'âge de la jument donneuse. Les ovocytes de juments donneuses âgées présentent davantage d'anomalies morphologiques [5] et produisent significativement moins de vésicules embryonnaires (31 p. cent vs 92 p. cent) [7].

### L'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (intra-cytoplasmic sperm injection : ICSI)

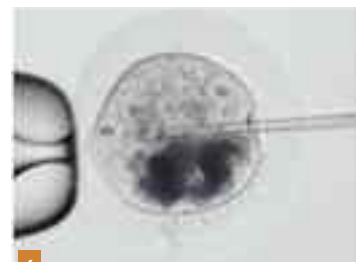
● Alors que les techniques conventionnelles de FIV restent décevantes dans l'espèce

équine, l'ICSI (injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (intra-cytoplasmic sperm injection) s'est avérée une méthode efficace pour réaliser la fécondation *in vitro* des ovocytes équins [22, 30].

● La technique repose sur la micromanipulation d'un spermatozoïde qui est injecté dans l'ooplasme d'un ovocyte dénudé en métaphase II. Pratiquement, l'ovocyte est immobilisé et, à l'aide d'un micro-injecteur, un spermatozoïde est déposé dans le cytoplasme (photo 6). Cette technique élimine la difficulté de la capacitation du sperme équin, du passage de la zone pellucide de l'ovocyte et permet même l'usage de sperme de qualité médiocre ou d'étalons oligospermiques. Ce qui en fait également une technique envisageable pour le traitement de l'infertilité de certains étalons.

● Les résultats avec du sperme frais et du sperme congelé sont comparables [11] pour autant qu'un spermatozoïde mobile soit sélectionné pour l'injection intra-cytoplasmique [33]. Une fois la fécondation obtenue, l'ovocyte peut éventuellement être activé chimiquement. Ensuite, l'embryon doit encore être cultivé jusqu'au stade morula ou blastocyste afin de pouvoir être transféré dans l'utérus d'une jument receveuse. Cette étape de culture *in vitro* reste délicate et les jeunes embryons issus de l'ICSI peuvent alternativement être transférés dans l'oviducte d'une jument receveuse afin d'y poursuivre leur développement. La culture des embryons peut également être réalisée *in vivo* dans les oviductes de brebis avant d'être transférés dans l'utérus d'une jument receveuse [30].

● Depuis la naissance en 1996 d'un premier poulain né après ICSI [37], la technique n'a cessé de s'améliorer et plusieurs poulains sont nés depuis en utilisant cette méthode [21, 34, 37]. Des études récentes rapportent



6 ICSI : dépôt d'un spermatozoïde dans l'ooplasme à l'aide d'une micropipette (photo K. Smits, Université de Liège).

### Références

1. Allen WR. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reproduction in domestic animals = Zuchtthygiene* 2005;40:310-29.
2. Alm H, Torner H, Blottner S, coll. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on *in vitro* fertilization of horse oocytes. *Theriogenology* 2001;56:817-29.
3. Bezdard J, Magistrini M, Battut I, coll. Fécondation *in vitro* chez les équidés. *Rec Med Vet* 1992;168:993-1003.
4. Caillaud M, Reis AP, Achard E, coll. Oocyte maturation in a portable incubator: an alternative for laboratories situated far from abattoirs. 7<sup>th</sup>. International Symposium on Equine Embryo Transfer, Cambridge, UK 2008:10-1.
5. Carnevale E, Uson M, Bozzola J, coll. Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. *Theriogenology* 1999;51:299.
6. Carnevale E, Coutinho da Silva MA, Preis KA, coll. Establishment of pregnancies from oocytes collected from ovaries of euthanized mares. 50<sup>th</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver (CO) 2004:531-3.
7. Carnevale EM, Ginther OJ. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *biol Reprod Mono* 1995;1:209-14.

➤ Suite p. 94

## AFFECTIONS



## Références (suite)

8. Carnevale EM, Maclellan LJ, Coutinho da Silva MA, Squires EL. Pregnancies attained after collection and transfer of oocytes from ovaries of five euthanized mares. *J Am Vet Med Assoc* 2003;222:60-2.
9. Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Maclellan LJ, coll. Use of parentage testing to determine optimum insemination time and culture media for oocyte transfer in mares. *Reproduction* 2004;128:623-8.
10. Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Panzani D, coll. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology* 2005;64:519-27.
11. Choi YH, Love CC, Love LB, Varner DD, coll. Developmental competence *in vivo* and *in vitro* of *in vitro*-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction* 2002;123:455-65.
12. Choi YH, Roasa LM, Love CC, coll. Blastocyst formation rates *in vivo* and *in vitro* of *in vitro*-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 2004;70:1231-8.
13. Coutinho da Silva MA, Carnevale EM, Maclellan LJ, coll. Use of fresh, cooled and frozen semen during gamete intrafallopian transfer in mares. *Theriogenology* 2002;58:763-6.
14. Deleuze S, Goudet G, Caillaud M, coll. Efficiency of embryonic development after Intra-Follicular and Intra-Oviductal transfer of *in vitro* and *in vivo* matured horse oocytes. *Theriogenology* 2009;72:203-9.
15. Deleuze S, Ponthier J, Hanzen C. Reproduction assistée dans l'espèce équine : collecte, évaluation, maturation et utilisations d'ovocytes équins. *Ann Med Vet* 2009;153:22-30.
16. Deleuze S, Dubois CS, Caillaud M, coll. Influence of cysteamine on *in vitro* maturation, *in vitro* and *in vivo* fertilization of equine oocytes. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene* 2010;45:1-7.
17. Dell'Aquila ME, Fusco S, Lacalandra GM, Maritato F. *In vitro* maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology* 1996;45:547-60.
18. Dell'Aquila ME, De Felici M, Massari S, coll. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured *in vitro*. *Biol Reprod* 1999;61:533-40.
19. Duchamp G, Bour B, Combarous Y, Palmer E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 1987;35:221-8.
20. Fleming AD, Salgado R, Kuehl TJ. Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate dominant follicle *in vivo*. *Theriogenology* 1985;23:193.
21. Galli C, Crotti G, Duchi R, coll. Frozen-thawed embryos produced by Ovum Pick Up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology* 2002;58:705-8.
22. Galli C, Colleoni S, Duchi R, coll. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranging from *in vitro* maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 2007;98:39-55.
23. Goudet G, Bezaud J, Duchamp G, coll. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol Reprod* 1997;57:232-45.

► Suite p. 95

des taux de clivage après ICSI de 50 à 80 p. cent [11]. Mais, seul un faible pourcentage de ces zygotes clivés poursuivent leur développement en culture jusqu'à former un blastocyste.

Différents milieux de culture des jeunes embryons jusqu'au stade où ils peuvent être transférés, de même que des co-cultures avec différents types cellulaires ont été étudiés mais les taux de développement jusqu'au stade blastocyste dans ces études sont restés faibles (4 à 16 p. cent). En revanche, la mise en culture des zygotes potentiels (soit les ovocytes après ICSI) *in vivo* dans l'oviducte d'une jument [12] ou d'une brebis receveuse [21, 33] permet un meilleur taux de développement embryonnaire (approximativement 36 p. cent) [22], les meilleurs résultats ayant été obtenus après culture dans l'oviducte d'une brebis (45 p. cent) [21, 33].

● Cependant, récemment, un milieu de culture *in vitro* utilisant du DMEM-F12 sous atmosphère mixte contrôlée a permis d'obtenir des taux de développement de blastocystes (27-38 p. cent) se rapprochant de ces résultats [22] ce qui permet un transfert d'embryon par voie trans-cervicale classique.

● Actuellement, des taux de gestation de l'ordre de 60 p. cent peuvent être attendus après transfert cervical d'un embryon ayant atteint le stade de blastocyste *in vitro* [42].

La production de poulains par ICSI nécessite la collecte d'ovocytes, leur mise en maturation *in vitro*, l'injection intra-cytoplasmique du spermatozoïde, la mise en culture de l'embryon jusqu'à un stade où il peut être transféré par voie trans-cervicale : autant d'étapes qui sont à l'origine d'un taux de réussite global faible qui limite cette technique à des juments de haute valeur même si le service est commercialement disponible dans certains centres.

### Transfert nucléaire (Clonage)

● Le premier poulain cloné a été produit en Italie en 2003 à partir d'un noyau de fibroblaste. Pour produire un clone, le noyau d'une cellule somatique (*i.e.* non sexuelle) de l'individu donneur à cloner est injecté dans un ovocyte dont le noyau a été extrait. L'ovocyte est ensuite stimulé pour initier le développement embryonnaire. L'approche s'apparente donc fondamentalement à celle de l'ICSI mais requiert encore plus de maîtrise technique.

● Une fois le développement embryonnaire initié, il faut comme dans le cas de l'ICSI, cultiver ce jeune embryon jusqu'à un stade

où il peut être transféré dans une jument receveuse. Le taux de réussite de transferts d'embryons clonés est à peu près semblable à celui des transferts classiques (+/- 60 p. cent), mais approximativement 50 à 70 p. cent des gestations de clones sont perdues à divers stades.

Les clones qui naissent présentent plus fréquemment des syndromes de maladaptation néonatale, des malformations angulaires des membres, mais semblent être normaux après la 2<sup>e</sup> semaine de vie [31].

● Avec des taux moyens d'embryons transférables rapportés au nombre d'ovocytes utilisés de 3,55 p. cent [32], la technique reste très lourde et consommatrice d'un grand nombre d'ovocytes dont la disponibilité est limitée.

→ L'intérêt du clonage doit être vu comme une méthode pour préserver un matériel génétique plus que pour reproduire un type individuel. Les clones souffrent de désordres dans la période néonatale qui vont influencer négativement leur éventuelle carrière sportive. En outre, bien qu'ils aient le même matériel génétique nucléaire que leur donneur, celui-ci n'est pas exprimé de la même manière (phénomènes épigénétiques), ce qui explique qu'ils soient phénotypiquement différents. L'environnement, l'entraînement, ... interviennent aussi sur les performances de l'animal. Enfin, si l'ADN nucléaire du donneur remplace bien celui de l'ovocyte receveur, c'est malgré tout l'ADN mitochondrial de celui-ci qui sera présent dans le clone. L'impact réel de l'origine de l'ADN mitochondrial sur le phénotype et les performances des clones équins est actuellement toujours à l'étude. Il faut donc oublier cette image de science fiction où le clonage permet de reproduire des individus parfaitement identiques à l'envie.

Quoi qu'il en soit, l'absence de l'ADN mitochondrial de la donneuse chez les clones, la lourdeur et le coût de production d'un clone rendent cette technique peu utilisée pour les juments infertiles pour lesquelles des techniques alternatives plus intéressantes et plus abordables sont disponibles.

● Les candidats les plus évidents pour le clonage sont des hongres qui se sont avérés être des animaux sortant de l'ordinaire mais dont aucune descendance n'a été assurée avant leur castration.

● De manière comparable, le clonage constitue également une option salvatrice pour des étalons souffrant d'infertilité liée à des affections irréversibles telle que la dégéné-

rescence testiculaire.

● **Les poulains issus de clonage présentent dans 50 p. cent des cas des désordres de la période néonatale** tels que des anomalies placentaires, un syndrome de maladaptation néonatale, un cordon ombilical anormalement long et des déformations angulaires des membres [36].

Récemment, le remplacement des ovocytes par des cellules souches de moëlle osseuse pour le transfert nucléaire a permis d'obtenir la naissance de 17 poulains pour 232 blastocystes transférés [43]. Cette approche permettra sans doute d'améliorer l'efficacité de l'ICSI dans le futur.

● **Le clonage peut aussi présenter un risque de concentration des gènes.** La plupart des ART's (IA, conservation et transport de sperme) permettent déjà une utilisation plus intense d'un étalon donné par rapport à la saillie naturelle. Techniquement, le clonage permet de passer outre la limite de l'âge de l'étalon qui pourrait être utilisée sans fin et ainsi, aboutir sur un cul-de-sac en terme de sélection.

## CONCLUSION

● Les techniques de reproduction assistée permettent d'optimiser la carrière reproductrice d'une jument en augmentant le nombre annuel de poulains issus d'une même

jument grâce au transfert d'embryon notamment. Elles permettent également d'obtenir des poulains de juments infertiles et ainsi, de valoriser le potentiel génétique de juments qui ne pourraient plus produire de poulains si l'on se limitait à des techniques de reproduction dites "classiques".

● **Les causes d'infertilités chez la jument sont nombreuses et pour un certain nombre d'entre elles, aucun traitement véritablement efficace n'est disponible.** À l'inverse, des animaux de production, dans la filière équine, la valeur de l'individu pour ses performances et sa génétique, peuvent justifier le recours à des techniques de reproduction assistées de haut niveau.

● Ces techniques ont fait des progrès énormes durant ces dernières années dans l'espèce équine. Cependant, elles demandent le plus souvent un matériel et une expertise hautement spécialisés qui en limitent l'accès et la justification à des individus de haut niveau ou de haut potentiel.

● Les années à venir verront probablement se généraliser l'accès à ces techniques. Peut-être verrons-nous au même titre que l'insémination artificielle qui est devenue une pratique courante, le transfert intra-salpingien d'ovocyte ou l'ICSI devenir des pratiques ordinaires de l'élevage équin. □

## formation continue

1. Lors de la mort inopinée d'une jument de grande valeur, il est possible d'obtenir un dernier poulain :
  - a. en prélevant les ovocytes immatures sur place et les transférant chirurgicalement dans l'utérus d'une jument receveuse
  - b. en prélevant ses ovaires et les acheminant vers un laboratoire pour prélever les ovocytes immatures
  - c. en prélevant des fibroblastes pour les soumettre au laboratoire à une énucléation et un transfert nucléaire
  - d. uniquement si la cause de mortalité n'est pas une cause infectieuse
2. Le clonage dans l'espèce équine :
  - a. permet d'obtenir un grand nombre d'individus parfaitement identiques au donneur
  - b. nécessite un ovocyte et n'est donc réalisable que pour les juments
  - c. est essentiellement destiné à préserver une génétique plutôt que reproduire un phénotype
  - d. a globalement un rendement qui s'apparente à celui du transfert d'embryons
3. Le transfert d'embryon dans l'espèce équine :
  - a. permet le plus souvent de récolter deux à trois embryons par cycle et par jument
  - b. peut être réalisé dans l'utérus d'une receveuse choisie au hasard pour autant qu'elle ait moins de 3 ans
  - c. peut être réalisé, en France, par tout docteur en médecine vétérinaire
  - d. donne actuellement un rendement global de l'ordre de 35 p. cent

## Références (suite)

24. Goudet G, Bezaud J, Duchamp G, Palmer E. Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: an alternative to *in vitro* maturation in the mare? *Equine Vet J Suppl* 1997;25:54-9.
25. Grondahl C, Hyttel P, Grondahl ML, coll. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation *in vivo*. *Mol Reprod Dev* 1995;42:94-105.
26. Hinrichs K. The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. *Theriogenology* 1991;36:157-68.
27. Hinrichs K, Digiorgio LM. Embryonic development after intra-follicular transfer of horse oocytes. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;44:369-74.
28. Hinrichs K, Betschart R, McCue P, Squires E. Effect of timing of follicles aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer in the mares. *J Reprod Fertil* 2000;56:493-8.
29. Hinrichs K, Love CC, Brinsko SP, coll. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. *Biol Reprod* 2002;67:256-62.
30. Hinrichs K. Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology* 2005;64:535-41.
31. Johnson AK, Clark-Price SC, Choi YH, coll. Physical and clinicopathologic findings in foals derived by use of somatic cell nuclear transfer: 14 cases (2004-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2010;236:983-90.
32. Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, coll. Somatic cell nuclear transfer in horses: effect of oocyte morphology, embryo reconstruction method and donor cell type. *Reproduction* 2005;130:559-67.
33. Lazzari G, Crotti A, Turini P, coll. Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic injection (ICSI) of *in vitro* matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. *Theriogenology* 2002;58:709-12.
34. Li X, Morris LH, Allen WR. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction* 2001;121:925-32.
35. McPartlin LA, Suarez SS, Czaya CA, coll. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful *in vitro* fertilization of equine oocytes. *Biol Reprod* 2009.
36. Palmer E, Bezaud J, Magistrini M, Duchamp G. *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;44:375-84.
37. Squires EL, Wilson JM, Kato H, Blaszczyk A. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1996;45:306.
38. Squires EL. Integration of future biotechnologies into the equine industry. *Anim Reprod Sci* 2005;89:187-98.
39. Wirtu G, Bailey TL, Chauhan MS, coll. Xenogenous fertilization of equine oocytes following recovery from slaughterhouse ovaries and *in vitro* maturation. *Theriogenology* 2004;61:381-91.
40. Zhang JJ, Boyle MS, Allen WR. Recent studies on *in vitro* fertilization of equine oocytes. *Equine Vet J* 1989;21:101-4.

L'auteur déclare ne pas être en situation de lien d'intérêt en relation avec cet article.

## Reproduction interdite

Toute reproduction ou représentation, intégrale ou partielle, par quelque procédé que ce soit, de la présente publication sans autorisation est illicite et constitue une contrefaçon. L'autorisation de reproduire un article dans une autre publication doit être obtenue auprès de l'éditeur, NÉVA. L'autorisation d'effectuer des reproductions par reprographie doit être obtenue auprès du Centre français d'exploitation du droit de la copie (C.F.C.).



## NÉVA

EUROPARC 15, rue E. Le Corbusier  
94035 CRÉTEIL CEDEX  
Tél : (33) 1-41-94-51-51  
Courriel : neva@neva.fr