

Fécondation *in vitro* chez les ovins, caprins et équins

Y Cognié¹, N Crozet², Y Guérin¹, N Poulin¹,
J Bézard¹, G Duchamp¹, M Magistrini¹, E Palmer¹

¹ INRA, physiologie de la reproduction, 37380 Nouzilly

² INRA, biologie de la fécondation, 78352 Jouy-en-Josas Cédex, France

(Reçu le 15 décembre 1991; accepté le 8 février 1992)

Résumé — La production *in vitro* d'œufs fécondés et de jeunes embryons présente un intérêt majeur pour approfondir nos connaissances sur la maturation des gamètes et pour aider au développement de nouvelles biotechnologies concernant les productions animales (transfert d'embryons, clonage, transgénèse). Dans cette revue, nous présentons les solutions techniques récemment mises au point concernant la manipulation des gamètes et la fécondation *in vitro* chez les petits ruminants et les équins. L'ovocyte de mammifère séparé de son environnement folliculaire est capable de reprendre spontanément sa maturation nucléaire *in vitro*. L'ovocyte qui atteint le stade métaphase II dans ces conditions n'est cependant pas compétent pour assurer une fécondation et un développement embryonnaire normal. La maturation cytoplasmique de l'ovocyte est nécessaire à la décondensation de la chromatine du gamète mâle et au bon déroulement des premières segmentations de l'œuf. Cette maturation cytoplasmique est associée à des changements dans la synthèse des protéines et à la réorganisation de différents organelles. La co-culture du complexe ovocyte-cumulus avec des cellules de la granulosa permet d'améliorer l'aptitude au développement des œufs FIV dans un milieu supplémenté en FSH, LH et œstradiol. Le temps nécessaire pour obtenir une maturation complète *in vitro* diffère selon les espèces : 24 h (brebis), 27 h (chèvre) ou 36 h (jument). Les mécanismes de capacitation, encore mal connus, impliquent un « décapage » de la tête du spermatozoïde du matériel déposé pendant le transit épидидymaire et après contact avec le plasma séminal. Les conditions de capacitation *in vitro* diffèrent selon les espèces : addition de sérum de brebis en chaleur inactivé chez le bélier et le bouc, ou passage rapide dans de l'ionophore calcique A 23 187 chez l'étaalon. L'efficacité du procédé de capacitation peut être évaluée par le temps nécessaire au passage du spermatozoïde dans l'ooplasmе (2 h chez les ovins). Après un temps d'incubation raccourci (1 h vs 6 h) des spermatozoïdes de bélier, un retard de pénétration de l'ovocyte et un taux élevé de polyspermie sont observés. La variabilité du taux de fécondation enregistrée entre différents éjaculats ou différents béliers peut être réduite en augmentant la concentration de Ca²⁺ dans le milieu de fécondation. La température d'incubation doit être très précisément celle de la température centrale de ces mammifères (39 °C). Chez les ovins, après lavage du sperme et incubation pendant 6 h en présence de sérum de brebis en œstrus, 83 % des ovocytes sont fécondés *in vitro*. Après transfert de 3 ovocytes par receveuse synchronisée, le taux de gestation est de 50% et la taille de la portée moyenne est de 1,65. Avec la technique utilisée chez les ovins, 67 et 70% des ovocytes maturés *in vitro* et *in vivo* sont normalement fécondés dans l'espèce caprine et des expériences sont en cours pour vérifier leur aptitude au développement. Chez la jument, seuls les ovocytes ponctionnés de follicules préovulatoires sont utilisés en FIV, 26% des ovocytes sont fécondés *in vitro* (18% de segmentation et 8% de fécondation sans segmentation). Le transfert chirurgical des

embryons FIV n'a donné, à ce jour, qu'un poulain sur 11 transferts. Malgré les progrès réalisés, l'aptitude au développement des ovocytes fécondés *in vitro* reste faible et nécessite une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la maturation terminale des gamètes.

fécondation *in vitro* / ovocyte / ovin / caprin / équin

Summary — *In vitro* fertilization in ovine, caprine and equine species. Efficient *in vitro* production of eggs and early embryos is of considerable value for basic research on final gamete maturation and for the development of new biotechnologies of agricultural interest (embryo transfer, cloning, gene transfer). The *in vitro* procedures of oocyte maturation, sperm capacitation and fertilization existing in small ruminants and equine species have been presented. Mammalian oocytes removed from their follicular environment are able to undergo spontaneous nuclear maturation *in vitro*. However, oocytes which reach metaphase II under these conditions are not capable of ensuring normal fertilization and further embryonic development. Developmental incapacity results from abnormal cytoplasmic maturation involved in the regulation of sperm chromatin decondensation and in the reorganization of many organelles. Co-culture of cumulus–oocyte complexes with granulosa cells in a medium supplemented with follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and oestradiol enhances the developmental capacity of *in vitro* fertilized (IVF) oocytes. The time to complete maturation *in vitro* differs among species: 24 h in the sheep, 27 h in the goat and 36 h in the mare. The mechanisms of capacitation are poorly understood and involve the removal of sperm coating materials acquired during epididymal transit or during exposure to the seminal plasma and a cholesterol depletion which result in increased membrane permeability to calcium. The *in vitro* capacitation process differs among species: addition of heat-inactivated sheep serum in ram and buck, short treatment by the calcium ionophore A 23 187 in the stallion. The efficiency of a capacitation procedure can be evaluated by the time required for sperm-egg penetration (2 h in sheep). A shorter time for ram sperm preincubation (1 h vs 6 h) led to delayed oocyte penetration and a high incidence of polyspermy. The variability in fertilization rates among males and between ejaculates could be reduced by raising the Ca^{2+} concentration in the fertilization medium. The incubation temperature should be precisely that of the body of these mammals (39 °C). In sheep, after the incubation of washed ejaculated spermatozoa for 6 h in the presence of oestrous sheep serum, 83% of the oocytes were fertilized. Pregnancy rates of 50% were attained, with a mean litter size of 1.65, when 3 *in vitro* fertilized zygotes were transferred into 1 recipient. When the technique proposed for the sheep applied to the goat, 67 and 70% of ovulated and *in vitro* matured oocytes respectively were normally fertilized. Zygote transfers to recipient goats are now in progress. In the mare, only preovulatory oocytes were used: 26 % were fertilized *in vitro* (18% cleaved). Only 1 birth has been reported after 11 surgical transfers of these zygotes. Further studies on the mechanisms involved in the final maturation of the gametes are still required to improve the rates of embryonic development after IVF in these species.

***In vitro* fertilization / oocyte / sheep / goat / horse**

INTRODUCTION

La production *in vitro* d'œufs fécondés et de jeunes embryons a plusieurs objectifs. C'est, en premier lieu, d'approfondir nos connaissances sur la maturation des gamètes, c'est ensuite de favoriser le développement de nouvelles biotechnologies (transfert d'embryons, clonage, transgé-

nèse), et c'est enfin de faire produire des embryons à des femelles stériles ou condamnées (espèce équine).

La réalisation de la fécondation *in vitro* nécessite le prélèvement et la maturation des gamètes mâles et femelles, la mise en contact de ces gamètes dans un tube et la remise en place des jeunes embryons obtenus dans le tractus génital de la femelle

porteuse. Ces différentes opérations impliquent de nombreux mécanismes physiologiques plus ou moins bien étudiés, ce qui explique que même si des naissances (en nombre limité) ont été obtenues par différentes équipes, les résultats peuvent être variables intra- ou intergroupes. Cette variabilité des résultats est un handicap pour la mise en place de la production d'embryons *in vitro*. Dans cette revue nous présentons les solutions techniques envisagées pour chacune des étapes permettant à l'heure actuelle d'utiliser au mieux le système *in vitro* en sachant que son rendement optimum est encore loin d'être atteint.

MATURATION OVOCYTAIRE

Il est bien connu que l'ovocyte de mammifère séparé de son environnement folliculaire est capable de reprendre spontanément sa maturation nucléaire *in vitro*. L'ovocyte qui atteint le stade métaphase II dans ces conditions n'est cependant pas compétent pour assurer une fécondation et un développement embryonnaire normal (Thibault et Gérard, 1970; Moor et Trounson, 1977). La maturation cytoplasmique de l'ovocyte est nécessaire à la décondensation de la chromatine du gamète mâle et au bon déroulement des premières segmentations de l'œuf. Chez la brebis, Moor et Gandolfi (1987), suggèrent que l'apparition de nouvelles protéines synthétisées par l'ovocyte pendant cette période, pourrait jouer un rôle dans cette maturation cytoplasmique. La réorganisation de différents organelles et la distribution périphérique des granules corticaux semblent également être des facteurs importants de cette maturation ovocytaire. En particulier, la polyspermie peut être la conséquence d'une faible exocytose des granules corticaux.

Les cellules de la granulosa et du cumulus qui entourent l'ovocyte jouent un rôle essentiel dans la préparation finale de l'ovocyte à la fécondation. Chez la brebis, les jonctions intercellulaires sont maintenues pendant les 12 h suivant le début de la méiose, ce qui permet l'entrée de nutriments et de stéroïdes dans l'ovocyte en voie de maturation. La rupture des jonctions entre l'ovocyte et le cumulus (expansion du cumulus) est étroitement associée avec la maturation corticale de l'ovocyte de lapine (Szöllösi *et al*, 1978).

Les techniques de maturation *in vitro* des ovocytes s'inspirent des conditions de maturation *in vivo*. La co-culture du complexe ovocyte-cumulus avec des cellules de la granulosa dans un milieu supplémenté en LH-FSH, œstradiol et 10% de sérum de veau fœtal (brebis : Staigmiller et Moor, 1984; chèvre : De Smedt *et al*, 1992) permet la progression jusqu'au stade métaphase II chez 80–85% des ovocytes mis en culture. La présence de cellules de granulosa ($1 - 3 \times 10^6$ cellules/ml) améliore l'aptitude au développement des ovocytes de brebis maturés et fécondés *in vitro*; 55% atteignent le stade blastocyte (au lieu de 2 % dans le lot maturé sans cellules de granulosa) après transplantation dans un oviducte de brebis receveuse synchronisée (Staigmiller et Moor, 1984). Chez la brebis (Wahid *et al*, 1991), le sérum de femelle en chaleur semble remplacer favorablement la préparation hormonale (LH/FSH/œstradiol) en ce qui concerne l'aptitude au développement des ovocytes maturés *in vitro*, comme cela a déjà été montré chez la vache (Le Guienne *et al*, 1988).

Le taux de succès du procédé de maturation est influencé, pour des ovocytes entourés d'un cumulus intact et compact, par la taille du follicule dans lequel l'ovocyte est prélevé (tableau I).

À une température optimale de 39 °C, le temps nécessaire pour obtenir une ma-

Tableau I. Influence de la taille du follicule sur la maturation *in vitro* de l'ovocyte de chèvre (d'après De Smedt *et al*, 1992).

Diamètre follicule (mm)	No ovocytes	Stade de la méiose après 27 h culture % ovocytes			
		GV	Meta I	Ana I-Telo I	Meta II
1-2	25	4	68	4	24
2-6	50	-	10	4	86

turation complète *in vitro* diffère selon les espèces : 24 h chez la brebis (Szöllösi *et al*, 1988), 27 h chez la chèvre (De Smedt *et al*, 1992) ou 36 h chez la jument (Bézar *et al*, 1992) ou 36 h chez la jument (Bézar comm pers).

À partir d'ovaires d'une grande hétérogénéité, prélevés à l'abattoir, le nombre d'ovocytes utilisables est faible (2-3/brebis) mais le rendement peut être amélioré (10-12/brebis) par un prétraitement de la femelle donneuse avec pFSH les 2 j précédant la collecte. Les brebis prétraitées par FSH seraient une source d'ovocytes ayant un taux de clivage plus élevé que celui observé chez des ovocytes provenant de femelles non prétraitées (Pugh *et al*, 1990).

CAPACITATION DES SPERMATOZOÏDES ET FÉCONDATION *IN VITRO*

Les spermatozoïdes éjaculés doivent séjourner dans le tractus génital femelle avant d'acquérir l'aptitude à féconder les ovocytes. Les changements moléculaires intervenant dans les membranes du spermatozoïde pendant son transit vers l'ovocyte, appelés capacitation, sont encore mal connus. Ils impliquent à la fois un «décapage» de la tête du spermatozoïde du matériel déposé pendant le transit épi-

didymaire et après le contact avec le plasma séminal et un appauvrissement de la membrane externe en cholestérol induisant une plus grande perméabilité aux ions calcium (Langlais et Roberts, 1985). Les conditions de capacitation *in vitro* diffèrent selon les espèces mais dans tous les cas, elles se doivent de préserver des taux de survie et de mobilité élevés pendant plusieurs heures.

Après lavage et sélection ascendante des spermatozoïdes mobiles, l'addition de 20 % de sérum inactivé de femelle en œstrus au milieu de culture, permet la capacitation après 4-5 h d'incubation à 39 °C, du sperme de bélier et de bouc (Crozet *et al*, 1987, De Smedt *et al*, 1992). Pour le sperme de bouc, comme pour le sperme de taureau, un bref passage dans une solution héparinée (10 µg/ml) est proposé par Younis *et al* (1991). Un passage rapide dans de l'ionophore calcique A 23 187, a été également utilisé pour capaciter du sperme de différentes espèces et plus particulièrement chez la jument (Magistrini et Crozet, 1990). Tous ces procédés permettent d'obtenir des fécondations *in vitro*, mais leur efficacité en terme de capacitation devrait être évaluée par la mesure du temps nécessaire au passage du spermatozoïde dans l'ooplasme. Chez la brebis, le sperme capacité en présence de sérum, commence sa réaction acrosomique sur la zone pellucide de l'ovocyte 1 h post-insémination et son noyau se décondense dans l'ooplasme dès la 2^e h post-insémination (Crozet, 1988). Pour la semence d'un bélier, Cognié *et al* (1990) observent que le raccourcissement de la période d'incubation (1 h au lieu de 5 h) entraîne un retard de pénétration des ovocytes et une augmentation du taux de polyspermie (respectivement 49 % vs 18 %, $P < 0,05$).

Une concentration élevée de spermatozoïdes (0,5 - 1 x 10⁶/ml) est nécessaire pour la réussite de la FIV mais a comme

conséquence, dans 10–20% des cas, la pénétration de plusieurs spermatozoïdes dans l'ovocyte avant que la réaction corticale et le système de blocage de la polyspermie puissent se mettre en place. Chez la brebis et la chèvre, ce sont 60 % des ovocytes qui sont fécondés en moyenne par un seul spermatozoïde (tableau II) qui pourront continuer à se développer. Les variations du taux de fécondation observées entre différents béliers ou entre différents éjaculats d'un même bélier (Fukui *et al*, 1988) peuvent être réduites en augmentant la concentration du calcium dans le milieu de fécondation (Huneau et Crozet, 1989). Au contraire, des conditions discriminantes pourraient être recherchées comme moyen rapide d'évaluation de la fertilité *in vivo* des mâles utilisés dans les centres d'insémination artificielle (Marquant-Le Guienne *et al*, 1990).

FÉCONDATION *IN VITRO* ET DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Chez la brebis et la chèvre, 1 ml de milieu de fécondation (milieu de Brackett modifié tamponné avec 10 mmol.l⁻¹ d'Hepes supplémenté avec 20% de sérum de femelle en œstrus et 7.75 mmol.l⁻¹ de lactate de calcium à pH 7,7) est utilisé pour l'incubation à 39 °C pendant 17 h, de 1 x 10⁶ spermatozoïdes avec 5–10 ovocytes sous atmosphère normale. La mise en évidence de la fécondation est liée, après fixation de l'œuf dans un mélange acide/alcool (1V/3V), à la présence des pronoyaux mâle et femelle et de la pièce intermédiaire du flagelle du spermatozoïde au centre de l'œuf. Chez la brebis, en moyenne, 83% des ovocytes sont fécondés *in vitro*. Après transfert dans l'oviducte d'une brebis synchronisée, de 3 œufs monocellulaires

Tableau II. FIV d'ovocytes maturés *in vivo* ou *in vitro* et développement embryonnaire *in vivo* chez les ovins, caprins et équins.

	Maturation des ovocytes	Fécondation (%)	Ov monosperm ou segmentation (%)	Nb œufs receveuse	Nb gestation (nb transfert)	Survie embryonnaire (%)
Ovins						
Crozet <i>et al</i> , 1987	<i>in vivo</i>	83	(63)	2 à 5	4 (7)	?
Pugh <i>et al</i> , 1990	<i>in vitro</i>	–	(53)	4	15 (17)	35
Cognié <i>et al</i> , 1991	<i>in vivo</i>	83	62	3	19 (38)	37
Caprins						
De Smedt <i>et al</i> , 1991	<i>in vitro</i>	85	60	–	–	–
Idem	<i>in vivo</i>	83	57	–	–	–
Younis <i>et al</i> , 1991	<i>in vitro</i>	57	(33)	5	3 (9)	0
Cognié <i>et al</i> , 1992	<i>in vivo</i>	70	52	3 à 5	4 (6)	8
Équins						
Palmer <i>et al</i> , 1990	<i>in vivo</i>	26	(18)	1	1 (11)	9
Zhang <i>et al</i> , 1990	<i>in vitro</i>	33	(24)	–	–	–

(17 h après FIV : Cognié *et al*, 1990) ou de 4 œufs divisés par receveuse (+ de 24 h après FIV : Pugh *et al*, 1990), respectivement 50 et 88% des femelles transférées deviennent gestantes. Dans ces 2 expériences, 35–37% des œufs normalement fécondés ont donné naissance à des agneaux viables (tableau II). Avec la même technique de capacitation du sperme à l'aide de sérum de femelle en œstrus, les taux de fécondation des ovocytes maturés *in vitro* et *in vivo* sont très proches dans l'espèce caprine (De Smedt *et al*, 1992) et comparables à ceux obtenus dans l'espèce ovine (tableau II). Avec la technique de capacitation du sperme de bouc par passage rapide sur héparine, des taux de fécondation plus faibles ont été obtenus par Younis *et al*, (1991) pour des ovocytes maturés *in vivo* ou *in vitro*. Dans l'espèce caprine, l'étude de l'aptitude au développement des ovocytes fécondés *in vitro* est en cours de réalisation et les premiers résultats obtenus (tableau II) doivent être confirmés sur des effectifs plus importants.

Pour le sperme d'étalon, seule la méthode de capacitation par passage rapide sur une solution enrichie par l'ionophore calcique A 23 187, a permis d'obtenir la fécondation *in vitro* d'ovocytes maturés *in vitro*. Dans les 2 cas rapportés, les faibles taux de fécondation (tableau II) indiquent que dans cette espèce la méthode de capacitation de la semence doit encore être perfectionnée. Le transfert chirurgical des embryons obtenus *in vitro*, n'a donné à ce jour qu'un poulain sur les 11 transferts effectués (Palmer *et al*, 1990).

CONCLUSION

Les techniques de maturation et de fécondation *in vitro* des ovocytes chez les petits ruminants et les équins ont énormément progressé au cours de ces 5 dernières an-

nées, rendant chaque jour plus réaliste le projet de produire en grand nombre et à faible coût des embryons utilisables pour l'expérimentation ou le commerce. Cependant l'amélioration des procédés *in vitro* (maturation des gamètes, fécondation, premiers stades de développement embryonnaire) est encore possible, en particulier dans l'espèce équine, grâce à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les différentes étapes. La mise au point de méthodes *in vitro* permettant de discriminer rapidement les différents mâles sur leur fécondance avant leur entrée dans les centres d'insémination est envisageable dans un proche avenir.

RÉFÉRENCES

- Cognié Y, Guérin Y, Guyader C, Poulin N, Crozet N (1990) *In vitro* fertilization of sheep oocytes matured *in vivo*. In: *Fertilization in mammals. Serono symp.* Norwell, MA, abstr 441
- Cognié Y, Guérin Y, Guyader C, Poulin N, Crozet N (1991) *In vitro* fertilization of sheep oocytes matured *in vivo*. *Theriogenology* 35, 393-400
- Crozet N (1988) Fine structure of sheep fertilization *in vitro*. *Gamete Res* 19, 291-303
- Crozet N, Huneau D, De Smedt V, Théron MC, Szöllösi D, Torrès S, Sévellec C (1987) *In vitro* fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Res* 16, 159-170
- De Smedt V, Crozet N, Ahmed-Ali M, Martino A, Cognié Y (1992) *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology* (accepté pour publication)
- Fukui Y, Glew AM, Gandolfi F, Moor RM (1988) Ram specific effects on *in vitro* fertilization and cleavage of sheep oocytes matured *in vitro*. *J Reprod Fertil* 82, 337-340
- Huneau D, Crozet N (1989) *In vitro* fertilization in the sheep: effect of elevated calcium concentration at insemination. *Gamete Res* 23, 119-125
- Langlais J, Roberts KD (1985) A molecular membrane model of sperm capacitation and

- the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Res* 12, 183-224
- Le Guienne B, Thibault C, Chupin D, Gérard M, Thibier M (1988) Fécondation *in vitro* chez les mammifères domestiques. État actuel et perspectives. *Elev Insém* 225, 13-22
- Magistrini M, Crozet N (1990) Capacitation et réaction acrosomique chez les animaux domestiques. *Contracep Fertil Sex* 18, 785-789
- Marquant Le Guienne B, Humblot P, Thibier M, Thibault C (1990) Evaluation of bull semen fertility by homologous *in vitro* fertilization tests. *Reprod Nutr Dév* 30, 259-266
- Moor RM, Trounson AO (1977) Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 40, 101-109
- Moor RM, Gandolfi F (1987) Molecular and cellular changes associated with maturation and early development of sheep eggs. *J Reprod Fertil suppl* 34, 55-69
- Palmer E, Magistrini M, Bézard J, Duchamp G (1990) Gestation après fécondation *in vitro* dans l'espèce équine. *CR Acad Sci Sér III* 310, 71-74
- Pugh PA, Fukni Y, Tervit HR, Thompson JG (1990) Successful use of frozen ram semen for *in vitro* fertilization of *in vitro* matured sheep oocytes. *Aust Soc Reprod Biol, Abst* 88
- Staigmiller RB, Moor RM (1984) Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. *Gamete Res* 9, 221-229
- Szöllösi D, Gerard M, Menezo Y, Thibault C (1978) Permeability of ovarian follicle; corona cell oocyte relationship in mammals. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 18, 511-521
- Szollosi D, De Smedt V, Crozet N, Brender C (1988) *In vitro* maturation of sheep ovarian oocytes. *Reprod Nutr Dév* 28(4B), 1047-1080
- Thibault C, Gerard M (1970) Facteur cytoplasmique nécessaire à la formation du pronucleus mâle dans l'ovocyte de lapine. *CR Acad Sci* 270, 2025-2026
- Washid H, Gordon I, Sharif F, Lonergan P, Monaghan P, Gallagher M (1991) Development of ovine blastocysts following maturation. Fertilization and culture of oocytes *in vitro*. 7^e Coll AETE. Cambridge, 14-15 Septembre, abstr 214
- Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett (1991) *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod* 44, 1177-1182