

**CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2022 - Thèse n° 094

**LA FECONDATION *IN VITRO* CHEZ LA JUMENT  
ET LA VACHE**

**THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 18 novembre 2022  
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

FOULQUE Emma



**CAMPUS VÉTÉRINAIRE DE LYON**

Année 2022 - Thèse n° 094

**LA FECONDATION *IN VITRO* CHEZ LA JUMENT  
ET LA VACHE**

**THESE**

Présentée à l'Université Claude Bernard Lyon 1  
(Médecine – Pharmacie)

Et soutenue publiquement le 18 novembre 2022  
Pour obtenir le titre de Docteur Vétérinaire

Par

FOULQUE Emma



## Liste des enseignants du Campus vétérinaire de Lyon (26-01-2022)

Mme	ABITBOL	Marie	Professeur
M.	ALVES-DE-OLIVEIRA	Laurent	Maître de conférences
Mme	ARCANGIOLI	Marie-Anne	Professeur
Mme	AYRAL	Florence	Maître de conférences
Mme	BECKER	Claire	Maître de conférences
Mme	BELLUCO	Sara	Maître de conférences
Mme	BENAMOU-SMITH	Agnès	Maître de conférences
M.	BENOIT	Etienne	Professeur
M.	BERNY	Philippe	Professeur
Mme	BONNET-GARIN	Jeanne-Marie	Professeur
M.	BOURGOIN	Gilles	Maître de conférences
M.	BRUTO	Maxime	Maître de conférences Stagiaire
M.	BRUYERE	Pierre	Maître de conférences
M.	BUFF	Samuel	Professeur
M.	BURONFOSSE	Thierry	Professeur
M.	CACHON	Thibaut	Maître de conférences
M.	CADORÉ	Jean-Luc	Professeur
Mme	CALLAIT-CARDINAL	Marie-Pierre	Professeur
M.	CHABANNE	Luc	Professeur
Mme	CHALVET-MONFRAY	Karine	Professeur
M.	CHAMEL	Gabriel	Maître de conférences
M.	CHETOT	Thomas	Maître de conférences Stagiaire
Mme	DE BOYER DES ROCHES	Alice	Maître de conférences
Mme	DELIGNETTE-MULLER	Marie-Laure	Professeur
Mme	DJELOUADJI	Zorée	Professeur
Mme	ESCRIOU	Catherine	Maître de conférences
M.	FRIKHA	Mohamed-Ridha	Maître de conférences
M.	GALIA	Wessam	Maître de conférences
M.	GILLET	Benoit	AERC
Mme	GILOT-FROMONT	Emmanuelle	Professeur
M.	GONTHIER	Alain	Maître de conférences
Mme	GREZEL	Delphine	Maître de conférences
Mme	HUGONNARD	Marine	Maître de conférences
Mme	JOSSON-SCHRAMME	Anne	Chargé d'enseignement contractuel
M.	JUNOT	Stéphane	Professeur
M.	KODJO	Angeli	Professeur
Mme	KRAFFT	Emilie	Maître de conférences
Mme	LAABERKI	Maria-Halima	Maître de conférences
Mme	LAMBERT	Véronique	Maître de conférences
Mme	LE GRAND	Dominique	Professeur
Mme	LEBLOND	Agnès	Professeur
Mme	LEDoux	Dorothée	Maître de conférences
M.	LEFEBVRE	Sébastien	Maître de conférences
Mme	LEFRANC-POHL	Anne-Cécile	Maître de conférences
M.	LÉGROS	Vincent	Maître de conférences
M.	LEPAGE	Olivier	Professeur
Mme	LOUZIER	Vanessa	Professeur
M.	LURIER	Thibaut	Maître de conférences Stagiaire
M.	MAGNIN	Mathieu	Maître de conférences Stagiaire
M.	MARCHAL	Thierry	Professeur
Mme	MOSCA	Marion	Maître de conférences
M.	MOUNIER	Luc	Professeur
Mme	PEROZ	Carole	Maître de conférences
M.	PIN	Didier	Professeur
Mme	PONCE	Frédérique	Professeur
Mme	PORTIER	Karine	Professeur
Mme	POUZOT-NEVORET	Céline	Maître de conférences
Mme	PROUILLAC	Caroline	Professeur
Mme	REMY	Denise	Professeur
Mme	RENE MARTELLET	Magalie	Maître de conférences
M.	ROGER	Thierry	Professeur
M.	SAWAYA	Serge	Maître de conférences
M.	SCHRAMME	Michael	Professeur
Mme	SERGEANTET	Delphine	Professeur
M.	TORTEREAU	Antonin	Maître de conférences
Mme	VICTONI	Tatiana	Maître de conférences
M.	VIGUIER	Eric	Professeur
Mme	VIRIEUX-WATRELOT	Dorothée	Chargé d'enseignement contractuel
M.	ZENNER	Lionel	Professeur



# **REMERCIEMENTS JURY**

**A Monsieur le Professeur Alain CALENDER,**

De l'Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine de Lyon,  
De m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse,  
Avec toute ma gratitude et mes hommages respectueux.

**A Madame le Docteur Anne-Cécile LEFRANC-POHL,**

De Vetagro Sup campus vétérinaire de Lyon  
Pour m'avoir proposé le sujet,  
Pour avoir accepté d'encadrer et de corriger mon travail,  
Pour votre gentillesse et votre bienveillance,  
Sincères remerciements.

**A Monsieur le Professeur Jean-Luc CADORE,**

De Vetagro Sup campus vétérinaire de Lyon,  
Pour avoir accepté de participer au jury de cette thèse,  
Pour votre enseignement et votre pédagogie en clinique  
Remerciements chaleureux.









# TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES FIGURES.....</b>	<b>13</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>19</b>
<b>PARTIE I : PHYSIOLOGIE DE LA FÉCONDATION CHEZ LA VACHE ET CHEZ LA JUMENT .....</b>	<b>21</b>
<b>A. RAPPEL ANATOMIQUE .....</b>	<b>21</b>
1. <i>Partie glandulaire.....</i>	<i>22</i>
a. Chez la vache.....	22
b. Chez la jument.....	23
2. <i>Partie tubulaire.....</i>	<i>26</i>
a. Les trompes utérines .....	27
b. L'utérus.....	28
i. Chez la vache.....	28
ii. Chez la jument.....	28
c. Le col utérin.....	29
i. Chez la vache.....	30
ii. Chez la jument.....	30
d. Le vagin.....	30
i. Chez la vache.....	30
ii. Chez la jument.....	31
3. <i>Le sinus uro-génital.....</i>	<i>31</i>
a. Le vestibule vaginal .....	31
b. La vulve.....	32
i. Chez la vache.....	32
ii. Chez la jument.....	32
<b>B. SUIVI DES CYCLES ŒSTRAUX CHEZ LA VACHE ET CHEZ LA JUMENT .....</b>	<b>33</b>
1. <i>Physiologie sexuelle de la femelle non gestante.....</i>	<i>33</i>
a. Le cycle œstral.....	33
b. Le cycle ovarien .....	33
i. La phase folliculaire.....	33
ii. La phase lutéale.....	34
2. <i>Suivi des cycles : évaluation de la fonction reproductrice.....</i>	<i>36</i>
3. <i>Le suivi échographique .....</i>	<i>37</i>
a. La palpation transrectale .....	37
b. L'échographie transrectale de l'appareil reproducteur .....	40
<b>C. LA FECONDATION <i>IN VIVO</i> : MATURATION, CAPACITATION, FECONDATION.....</b>	<b>44</b>
1. <i>La maturation ovocytaire in vivo.....</i>	<i>44</i>
a. La folliculogénèse .....	44
b. La maturation nucléaire de l'ovocyte.....	45

c.	La maturation cytoplasmique .....	46
2.	<i>La capacitation in vivo des spermatozoïdes</i> .....	49
a.	Structure du spermatozoïde .....	49
b.	La capacitation .....	51
i.	Les changements membranaires lipidiques .....	52
ii.	Importance des glycocalyx .....	53
iii.	Rôle de la progestérone dans la capacitation .....	54
3.	<i>La fécondation in vivo</i> .....	56
a.	Fixation de l'ovocyte à la zone pellucide .....	56
b.	Fusion des deux gamètes .....	56
c.	Initiation du cycle cellulaire .....	58

**PARTIE II : LA FÉCONDATION *IN VITRO* : PRÉPARATION DES GAMÈTES ET TECHNIQUE DE RÉALISATION..... 61**

A.	LA MATURATION OVOCYTAIRE <i>IN VITRO</i> .....	61
1.	<i>La collecte des ovocytes</i> .....	61
a.	Chez la vache .....	61
i.	Récolte des ovocytes <i>in vivo</i> .....	61
ii.	Récolte des ovocytes par ovariectomie ou en <i>post mortem</i> .....	63
b.	Chez la jument .....	64
i.	Récolte des ovocytes <i>in vivo</i> .....	64
ii.	Récolte des ovocytes en <i>post mortem</i> .....	65
2.	<i>La sélection des ovocytes</i> .....	66
a.	Chez la vache .....	66
i.	Classification des ovocytes .....	66
ii.	Importance des cellules du cumulus .....	66
iii.	Importance de la sélection des follicules .....	67
b.	Chez la jument .....	68
i.	Classification des ovocytes .....	68
ii.	La sélection des follicules .....	68
3.	<i>Réalisation de la maturation in vitro</i> .....	69
a.	Les milieux .....	69
i.	Chez la vache .....	69
ii.	Chez la jument .....	71
b.	Les conditions de cultures .....	72
i.	Chez la vache .....	72
ii.	Chez la jument .....	74
c.	Les étapes de la maturation <i>in vitro</i> .....	75
i.	Chez la vache .....	75
ii.	Chez la jument .....	76
B.	PRÉPARATION DES SPERMATOZOÏDES .....	77
1.	<i>La collecte des spermatozoïdes</i> .....	77
a.	Le vagin artificiel .....	78
b.	L'électroéjaculation .....	79
2.	<i>La sélection des spermatozoïdes</i> .....	80

a.	Chez le taureau.....	80
b.	Chez l'étalon .....	80
3.	<i>La capacitation in vitro</i> .....	81
a.	Chez le taureau.....	81
i.	Température et paramètres d'ambiance.....	81
ii.	Les milieux pour la capacitation.....	82
b.	Chez l'étalon .....	84
C.	OBTENTION DE L'EMBRYON PAR FÉCONDATION <i>IN VITRO</i> .....	85
1.	<i>La fécondation in vitro chez la vache</i> .....	85
a.	Les milieux .....	86
b.	Autres paramètres.....	86
2.	<i>La fécondation in vitro chez la jument</i> .....	87
3.	<i>La fécondation assistée chez la jument</i> .....	88
a.	Les milieux .....	88
b.	Paramètres d'ambiances .....	89
c.	Technique de réalisation.....	89
<b>PARTIE III : DÉVELOPPEMENT ET DEVENIR DES EMBRYONS OBTENUS PAR FÉCONDATION <i>IN VITRO</i></b> .....		<b>91</b>
A.	DÉVELOPPEMENT ET TRANSFERT DES EMBRYONS .....	91
1.	<i>Développement des embryons en milieu de culture</i> .....	91
a.	Les systèmes de culture des embryons.....	91
b.	Culture dans un milieu unique .....	92
c.	Culture dans plusieurs milieux .....	93
d.	Les paramètres d'ambiances.....	93
2.	<i>Evaluation des embryons</i> .....	94
3.	<i>Cryopréservation des embryons</i> .....	94
a.	La congélation lente ou « slow freezing » .....	95
b.	La vitrification .....	95
4.	<i>Transfert de l'embryon</i> .....	96
B.	INTÉRÊTS ET INCONVÉNIENTS DE LA FÉCONDATION <i>IN VITRO</i> CHEZ LA VACHE ET CHEZ LA JUMENT .....	96
1.	<i>Avantages et utilisations de la fécondation in vitro</i> .....	96
2.	<i>Risques et limites de la fécondation in vitro</i> .....	97
<b>CONCLUSION</b> .....		<b>101</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE :</b> .....		<b>103</b>



# TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Vue latérale de l'appareil reproducteur et des structures adjacentes chez la vache (Source : Ball et Peters (5)).....	21
Figure 2 : Vue latérale de l'appareil reproducteur et des structures adjacentes chez la jument (Source : Brinsko et al. (7)) .....	22
Figure 3 : Coupe longitudinale d'un ovaire de vache (Source : Ball et Peters (10))...	23
Figure 4 : Coupe longitudinale d'un ovaire de jument (Source : Davis Morel (8)).....	25
Figure 5 : Vue dorsale de l'utérus de la vache (Source : Barone (6)) .....	26
Figure 6 : Vue dorsale de l'utérus de la jument (Source : Brinsko et al (7)).....	26
Figure 7 : Vues dorsale et caudale du col utérin chez la vache (Source : Barone (6)) .....	29
Figure 8 : Vue caudale de la vulve d'une vache (Source : Barone (6)).....	32
Figure 9 : Vue caudale de la vulve d'une jument (Source : Barone (6)).....	32
Figure 10 : Représentation schématique du contrôle hormonal de l'activité ovarienne chez la jument (Source : Brinsko et al. (7)) .....	35
Figure 11 : Section transversale d'une jument : localisation du col de l'utérus à la palpation transrectale (Source : Brinsko et al. (7)).....	39
Figure 12 : Section transversale d'une jument : palpation transrectale du corps utérin (Source : Brinsko et al. (7)).....	39
Figure 13 : Section transversale d'une jument : palpation transrectale des ovaires (Source : Brinsko et al. (7)).....	39
Figure 14 : Image échographique d'un follicule chez la vache (Source : Annabelle Pré).....	41
Figure 15 : Image échographique d'un follicule chez la jument (Source McCue P.M. (16)).....	41
Figure 16 : Image échographique d'un corps jaune chez la vache (Source : Annabelle Pré).....	42
Figure 17 : Image échographique d'un corps jaune chez la jument (Source : McCue P.M. (16)).....	42
Figure 18 : Image échographique d'un utérus de vache en œstrus (coupe transversale) (Source : Annabelle Pré).....	43
Figure 19 : Image échographique d'un utérus de vache en diœstrus (coupe transversale) (Source : Annabelle Pré).....	43

Figure 20 : Image échographique d'un utérus de jument en œstrus (coupe transversale) (Source : McCue P M. (16)) .....	43
Figure 21 : Image échographique d'un utérus de jument en diœstrus (coupe transversale) (Source : McCue P M. (16)) .....	43
Figure 22 : Les différentes étapes de la méiose (Source : modifié depuis Mermillod (18)) .....	46
Figure 23 : Dynamique du cytosquelette au cours de la maturation (Source : Ferreira et al (19)) .....	48
Figure 24 : Représentation schématique d'un spermatozoïde et de la structure du flagelle (Source : Turner (23)).....	51
Figure 25 : Schéma des différents mécanismes à l'origine de la libération des spermatozoïdes du réservoir (Source : Mirihagalle et al. (26)) .....	55
Figure 26 : Schéma des différentes protéines impliquées dans l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovule (Source : Deneke et Pauli (28)) .....	57
Figure 27 : Représentation schématique des gamètes et de la fécondation (Source : Deneke et Pauli (28)) .....	58
Figure 28 : Schéma des différentes étapes nucléaires du zygote au cours de la fécondation (Source : Modifié depuis Thibault (24)) .....	59
Figure 29 : Schéma d'un vagin artificiel (Source : Davis Morel (72)) .....	79
Figure 30 : Réalisation de l'ICSI par micromanipulation. A : mis en place de l'ovocyte ; B : injection du spermatozoïde dans l'ovocyte (Source : Rader et al. (94)) .....	90



## **TABLE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Compositions des différents milieux de capacitation (Source : Parrish) 84



# LISTE DES ABREVIATIONS

% : Pourcent  
> : Supérieur à  
°C : Degré Celsius  
µg : Microgramme  
ADAM : A Disintegrin And Metalloprotease domain  
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique  
ARNm : Acide ribonucléique messenger  
BO : Bracket-Oliphant  
BSA : Bovine serum albumin/ Albumine de sérum bovin  
BSP : Bovine seminal plasma/ Plasma séminal de bovin  
Ca<sup>2+</sup> : Ion calcique  
cm : Centimètre  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone  
COC : Cumulus Oocyte Complex/Complexe Cumulus-Oocyte  
Cx43 : Connexine 43  
CZB-H : Chatot-Ziomek-Bavister-Hepes  
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole  
DMEM/F-12 : Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham  
EGF : Epidermal growth factor/Facteur de croissance épidermique  
FIV : Fécondation *in vitro*  
FSH : Follicle-stimulating hormone/Hormone de stimulation des follicules  
GnrH : Hormone de libération des gonadotrophines  
h : Heure  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Dioxyde de dihydrogène  
hcG : Human chorionic gonadotropin/Gonadotrophine chorionique humaine  
HDL : High density lipoprotein/Lipoprotéine de haute densité  
HEPES-TALP® : Hepes-buffered Tyrode's albumin-lactate-pyruvate  
HIS : High Ionic Strength  
HO : Hoechst 33342  
ICSI : Injection Intracytoplasmique de spermatozoïde  
IETS : International Embryo Transfer Society  
IGF-1 : Insulin like growth factor-1/ Facteur de croissance de type insuline-1  
IZUMO1 : Izumo sperm-egg fusion 1

L : Litre  
LH : Luteinising Hormone/ Hormone lutéinisante  
EG : Ethylène glycol  
M199 : Medium 199  
mg : Milligramme  
EBSS : Earle's balanced salt solution  
mL : Millilitre  
mm : Millimètre  
Mmol : Millimole  
NaCL : Chlorure de sodium  
O<sub>2</sub> : Dioxygène  
OPU : Ovum pick up  
PBS : Phosphates Buffered Saline  
pFSH : porcine follicle-stimulating hormone/ hormone folliculo-stimulante  
porcine  
PGF2 $\alpha$  : Prostaglandine F2 $\alpha$   
PI : Iodure de propidium  
PKA : Protéine kinase A  
pLH : porcine luteinizing hormone/ hormone lutéinisante porcine  
PVP : Polyvinylpyrrolidone  
SOF : Fluide d'oviducte synthétique  
Sp-TALP-H : Sperm- Tyrode's albumin-lactate-pyruvate-Heparin  
WNT :Wingless

# Introduction

La fécondation *in vitro* (FIV) est la fécondation d'un ovocyte, prélevé sur une femelle donneuse, par un spermatozoïde en laboratoire dans des milieux de culture adaptés. L'embryon obtenu se développe ensuite *in vitro* et est ensuite transféré dans une femelle porteuse.

Les premiers résultats obtenus avec cette technique de reproduction artificielle datent de 1959 chez le lapin (1). Par la suite, cette méthode a pu être développée chez l'homme, avec la naissance du premier bébé éprouvette au Royaume-Uni en 1978 (2). Depuis, les avancées sur la fécondation *in vitro* chez l'homme ont permis l'obtention de milliers d'enfants. Selon les rapports de l'Agence de la Biomédecine, près de 21 000 enfants sont nés par procréation médicalement assistée en France en 2019.

La FIV chez la vache et chez la jument n'a pu aboutir à des résultats concluants que bien plus tard. En 1981, le premier veau né par fécondation *in vitro* a été obtenu aux Etats-Unis (3). Chez la jument, ce n'est qu'en 1990 que la première naissance d'une pouliche, suite à la réalisation d'une fécondation *in vitro*, a eu lieu (4). Ces dernières années, la technique de FIV a beaucoup évolué avec des protocoles différents selon les espèces. Cette technique permet de lutter contre les problèmes d'infertilité et d'améliorer la descendance des parents. Elle est notamment de plus en plus développée pour la conservation génétique de certaines vaches à haute production laitière. En effet, le transfert d'embryon présente l'inconvénient de ne pas pouvoir garantir l'obtention d'un embryon, notamment si la fécondation n'a pas eu lieu lors de l'insémination. De ce fait, la FIV permet la production d'un plus grand nombre d'embryons pour une même donneuse. Chez la vache, des protocoles de superovulation peuvent également y être couplés afin d'obtenir un nombre d'autant plus conséquent d'embryons.

L'objet de cette thèse est ainsi de voir où en est le développement et l'efficacité de cette technique à l'heure actuelle, aussi bien chez la vache que chez la jument, et de mettre en évidence les étapes et les protocoles qui pourraient être améliorés.

Au cours de cette étude bibliographique sur la fécondation *in vitro* chez la vache et chez la jument, les différences et les points communs entre les deux espèces seront rappelés dans un premier temps en ce qui concerne l'anatomie, puis, dans un second temps, au cours des différentes étapes de la FIV, à savoir durant les étapes de maturation ovocytaire, capacitation des spermatozoïdes, fécondation et culture des embryons. Les intérêts et les avantages de la FIV seront soulignés et les limites et questionnements sur cette technique seront soulevés.

# Partie I : Physiologie de la fécondation chez la vache et chez la jument

## A. Rappel anatomique

L'appareil reproducteur chez la vache et chez la jument se compose de :

- la **partie glandulaire**, à savoir les deux ovaires qui ont un fonctionnement cyclé et limité dans le temps.
- la **partie tubulaire**, formant les voies génitales, composée des cornes utérines, de l'utérus, du col de l'utérus et du vagin. Elle permet notamment le transport des gamètes (ovule et spermatozoïde), leur fécondation ainsi que le bon déroulement de la gestation.
- le **sinus uro-génital**, composé du vestibule vaginal, ainsi que de la vulve, et qui a un rôle principalement pour la copulation (*Figures 1 et 2*).

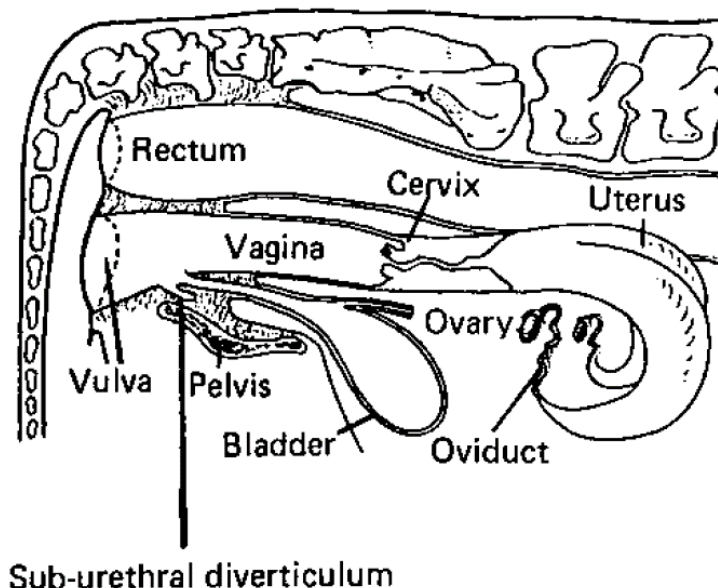


Figure 1 : Vue latérale de l'appareil reproducteur et des structures adjacentes chez la vache  
(Source : Ball et Peters (5))

Légendes : Bladder : Vessie ; Cervix : Col ; Ovary : Ovaire ; Oviduct : Oviducte ; Pelvis ; Rectum ; Sub-urethral diverticulum : Diverticulum sous-urétral ; Uterus : Utérus ; Vagina : Vagin ; Vulva : Vulve

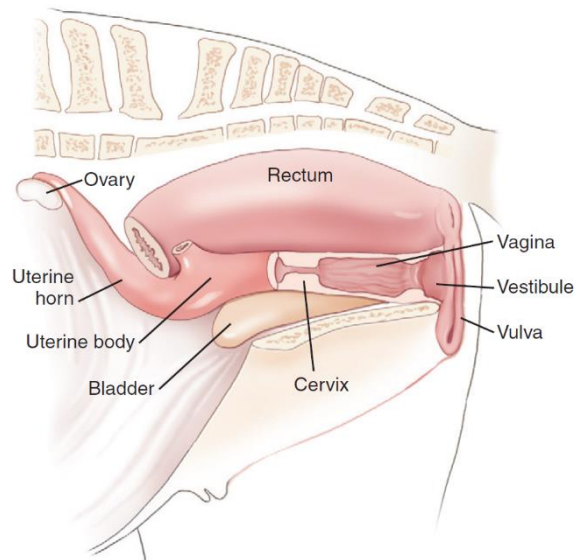


Figure 2 : Vue latérale de l'appareil reproducteur et des structures adjacentes chez la jument  
(Source : Brinsko et al. (7))

Légendes : Bladder : Vessie ; Cervix : Col ; Ovary : Ovaire ; Rectum ; Uterine body : Corps utérin ; Uterine horn : Corne utérine ; Vagina : Vagin ; Vestibule ; Vulva : Vulve

## 1. Partie glandulaire

La partie glandulaire de l'appareil reproducteur est composée des ovaires. L'**ovaire** est un organe complexe et cyclé. Son fonctionnement est basé sur des interactions hormonales et environnementales. Ils ont pour principale fonction la sécrétion d'hormones et la formation des gamètes femelles, les ovocytes.

### a. Chez la vache

Les ovaires se situent légèrement médialement aux extrémités des cornes utérines et sont fixés à l'aide d'une extension du ligament large, le ligament ovarique. Ils sont de forme ovale. Leur taille varie grandement suivant le stade de reproduction de la vache. Leur longueur varie entre 1,5 et 5 cm et leur diamètre entre 1 et 3 cm. Ils sont rosés et présentent une consistance ferme et élastique.



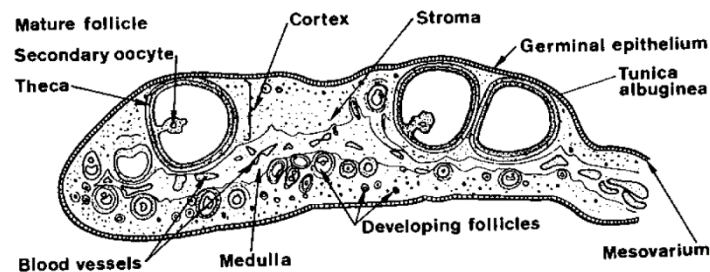


Figure 3 : Coupe longitudinale d'un ovaire de vache (Source : Ball et Peters (10))

Légendes : Blood vessels : Vaisseaux sanguins ; Cortex : Cortical ; Developing follicles : Follicules développés ; Germinal epithelium : Épithélium germinal ; Mature follicle : Follicule mature ; Medulla : Médulla ; Mesovarium : Mésovarium ; Secondary oocyte : Oocyte secondaire ; Stroma ; Theca ; Tunica albuginea

La structure de l'ovaire varie au cours des cycles et sa surface se retrouve modifiée suivant la croissance des follicules, leur régression, l'ovulation, la présence d'un corps jaune ou sa régression. La partie médullaire de l'ovaire, qui se compose de tissu conjonctif, nerfs et vaisseaux sanguins, est centrale et la partie corticale de l'ovaire, qui contient les follicules, se trouve à la périphérie de la zone médullaire. (Figure 3) (5).

#### b. Chez la jument

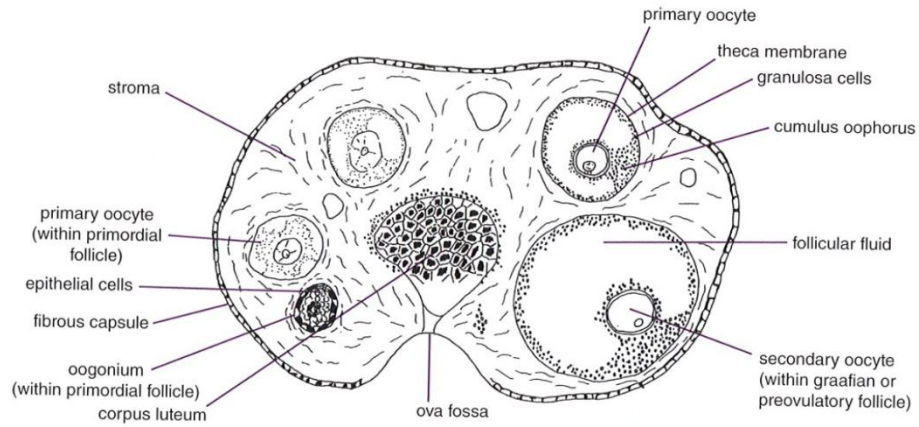
Les ovaires sont la partie la plus crâniale de l'appareil reproducteur. Ils sont en forme de « haricot blanc » et leur taille varie suivant leur activité : ils sont plus larges durant la période de reproduction (printemps/été) et plus petit durant l'anœstrus, qui a lieu en hiver. En moyenne, les ovaires ont une longueur de 6 à 8 cm, une hauteur de 3 à 4 cm et pèsent entre 70 et 80 grammes.

Les ovaires sont situés dans la partie sub-lombaire au niveau de la quatrième et de la cinquième vertèbre lombaire. Ils sont suspendus par le ligament large et se localisent quelques centimètres caudalement au rein correspondant (entre 5 à 15 cm (6)). En général, l'ovaire droit est plus crânial que l'ovaire gauche. Ils se trouvent, en moyenne, à une distance de 50 à 60 cm du périnée (6).

Chaque ovaire possède deux faces (médiale et latérale), deux bords (dorsal et ventral, ce dernier étant libre contrairement au bord dorsal) et deux pôles (crânial et caudal, ce dernier étant relié à l'utérus par le ligament propre de l'ovaire). Le bord ventral est en dépression, formant la fosse d'ovulation, et le bord dorsal permet la fixation de l'ovaire au plafond de la cavité abdominale par le ligament suspenseur de l'ovaire. Le ligament large permet la fixation de l'ensemble du tractus génital. Il forme une lame médiale, le mésovarium, qui est fixé à l'ovaire, et une lame latérale, le mésosalpinx, qui est fixé sur la trompe utérine. Le mésoalpinx rejoint le ligament large en passant crânialement et caudalement à l'ovaire. Il forme ainsi, avec le mésovarium, la bourse ovarique.

Les ovaires sont d'aspects lisses et recouverts en partie par le péritoine, ce qui leur donne une couleur blanc nacré.

L'ovaire est composé de deux zones, la zone corticale et la zone médullaire, comme chez la vache. Chez la jument, la conformation de ces deux zones diffère des autres espèces puisque la zone médullaire est la zone superficielle alors que la zone corticale se trouve au centre. Le tissu cortical rejoint, quant à lui, la surface de l'ovaire uniquement au niveau de la fosse ovulatoire, qui devient ainsi l'unique zone où l'ovulation peut se produire (*Figure 4*) (7), (8).



*Figure 4 : Coupe longitudinale d'un ovaire de jument (Source : Davis Morel (8))*

Légendes : Corpus luteum : Corps jaune ; Cumulus oophorus ; Epithelial cells : Cellules épithéliales ; Fibrous capsule : Capsule fibreuse ; Follicular fluid : Liquide folliculaire ; Granulosa cells : Cellules de la granulosa ; Oogonium (with primordial follicle) : Oogonium (avec follicule primordial) ; Ova fossa : Fosse ovulatoire ; Primary oocyte (with primordial follicle) : Oocyte primaire (avec follicule primordial) ; Secondary oocyte (within graafian or preovulatory follicle) : Oocyte secondaire (dans le follicule de De Graaf ou préovulatoire) ; Stroma ; Theca membrane : membrane de la thèque

## 2. Partie tubulaire

La partie tubulaire, en forme de Y est composée :

- des **trompes utérines**, ou oviductes, où a lieu la fécondation des gamètes
- de l'**utérus**, lieu où se déroule la gestation
- du **col utérin**, fermé lors de la gestation et ouvert lors de la mise-bas
- du **vagin**, qui permet la copulation (*Figure 5 et 6*).

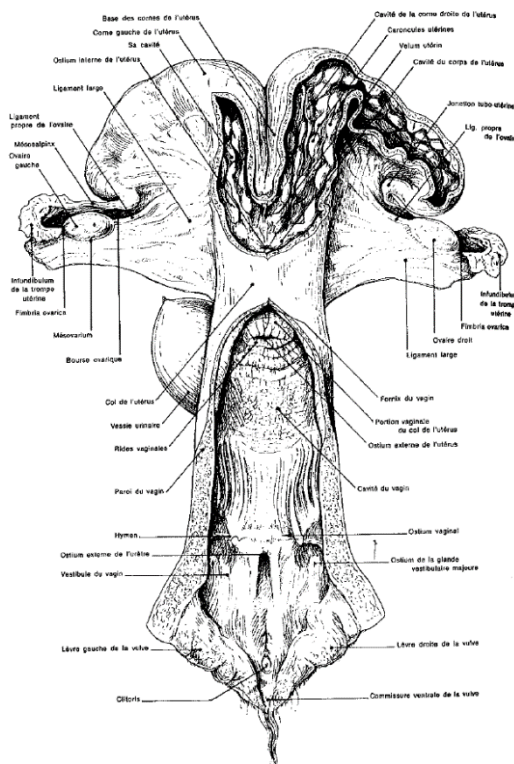


Figure 5 : Vue dorsale de l'utérus de la vache  
(Source : Barone (6))

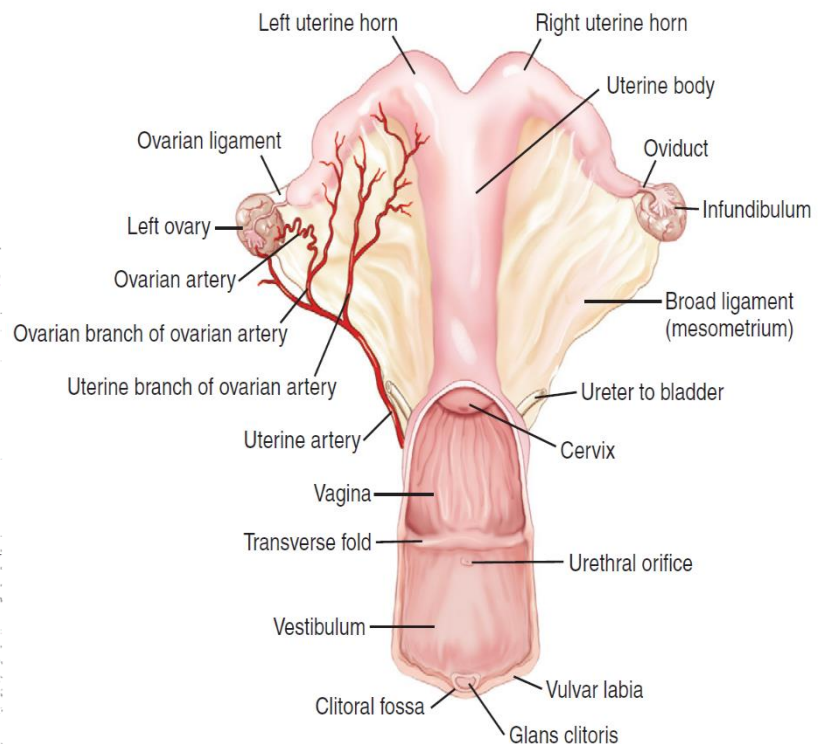


Figure 6 : Vue dorsale de l'utérus de la jument  
(Source : Brinsko et al (7))

Légende Figure 6 : Left/Right uterine horn : Corne utérine gauche/droite ; uterine body : corps utérin ; oviduct : oviducte ; infundibulum ; broad ligament (mesometrium) : ligament large (mésomètre) ; ureter to bladder : uretère ; cervix : col utérin ; urethral orifice : orifice urétral ; vulvar labia : lèvres vulvaires ; glans clitoridis : gland du clitoris ; clitoral fossa : fosse clitoridienne ; vestibulum : vestibule ; transverse fold : pli transverse ; vagina : vagin ; uterine artery : artère utérine ; uterine branch of ovarian artery : branche utérine de l'artère ovarienne ; ovarian branch of ovarian artery : Branche ovarienne de l'artère ovarienne ; ovarian artery : artère ovarienne ; left ovary : Ovaire gauche ; ovarian ligament : Ligament propre de l'ovaire

### a. Les trompes utérines

Les trompes utérines sont au nombre de deux et sont divisées en trois parties :

- L'**infundibulum** est la partie des trompes la plus proche des ovaires, en forme d'entonnoir. Chez la vache, l'infundibulum s'ouvre au niveau médio-ventral de l'ovaire (9). Chez la jument, la partie crâniale de l'infundibulum est attachée à la surface latérale de l'ovaire par le ligament propre de l'ovaire et enveloppe la fosse ovulatoire facilitant ainsi l'entrée de l'ovule dans la trompe utérine (7).
- L'**ampoule** correspond à la partie médiane des cornes et est assez élargie (4 à 8 mm). Elle est le lieu de la fécondation et du début du clivage de l'ovule fécondé (9).
- L'**isthme** est la partie des trompes utérines qui se rétrécit et connecte l'ampoule à l'utérus. Chez la vache, il n'y a pas de véritable isthme, la trompe se réduit de manière progressive jusqu'à l'ampoule (9). Chez la jument, la musculature importante de l'isthme permet un stockage des spermatozoïdes et permet leur transport de l'utérus jusqu'à l'ampoule, ainsi que le transport de l'embryon de l'ampoule jusqu'à la lumière de l'utérus. L'isthme se termine dans l'utérus par la papille oviductale. Durant l'œstrus, l'œdème entraîne une accentuation des plis longitudinaux de cette papille. Les spermatozoïdes se retrouvent donc piégés au niveau de ces plis durant les quatre heures suivant leur introduction. La papille pourrait jouer un rôle dans la sélection des spermatozoïdes normaux et permet également leur stockage en attendant l'éventuelle fécondation. De plus, l'adhésion des spermatozoïdes aux cellules épithéliales préviendrait la capacitation prématurée des spermatozoïdes et augmenterait ainsi leur durée de vie dans les voies génitales femelles (7).

## b. L'utérus

L'utérus est formé de trois parties : les **cornes utérines**, le **corps utérin** et le **col utérin**.

### i. Chez la vache

L'utérus est de type bipartitus avec les cornes utérines plus longues que le corps utérin. Les cornes sont spiralées et incurvées latéralement et ventralement, rapprochant les ovaires de l'entrée du bassin. Elles mesurent entre 20 à 40 cm contre 5 cm pour le corps utérin et ont un diamètre variant de 1,5 à 4 cm chez la femelle non gestante. Elles sont unies par deux ligaments intercornuaux, le ligament intercornual dorsal et le ligament intercornual ventral.

L'utérus est suspendu dans la cavité pelvienne par le **ligament large** qui s'attache au bord ventral de l'utérus. Ce ligament permet également l'innervation et la vascularisation de l'utérus. L'épaisseur de la paroi utérine varie entre 3 et 10 mm. Elle possède trois couches :

- l'**endomètre**, la couche la plus interne
- le **myomètre**, une couche musculaire intermédiaire
- la **séreuse**, la couche la plus externe.

L'endomètre est composé de nombreuses glandes épithéliales et forme des plis longitudinaux et des bosses appelées cotylédons ou caroncules. Les cotylédons s'hypertrophient durant la gestation et sont les points d'attaches du placenta (5).

### ii. Chez la jument

L'utérus est de type bicorne, avec le corps utérin mesurant en moyenne 20 cm et les cornes utérines d'une longueur moyenne de 18 cm. La largeur des cornes varie entre 5 à 6 cm pour une largeur du corps utérin de 6 à 8 cm. Les cornes utérines sont convexes ventralement.

Chez la jument, l'attache du ligament large sur l'utérus se fait sur son bord dorsal et s'insère au niveau de la troisième vertèbre lombaire.

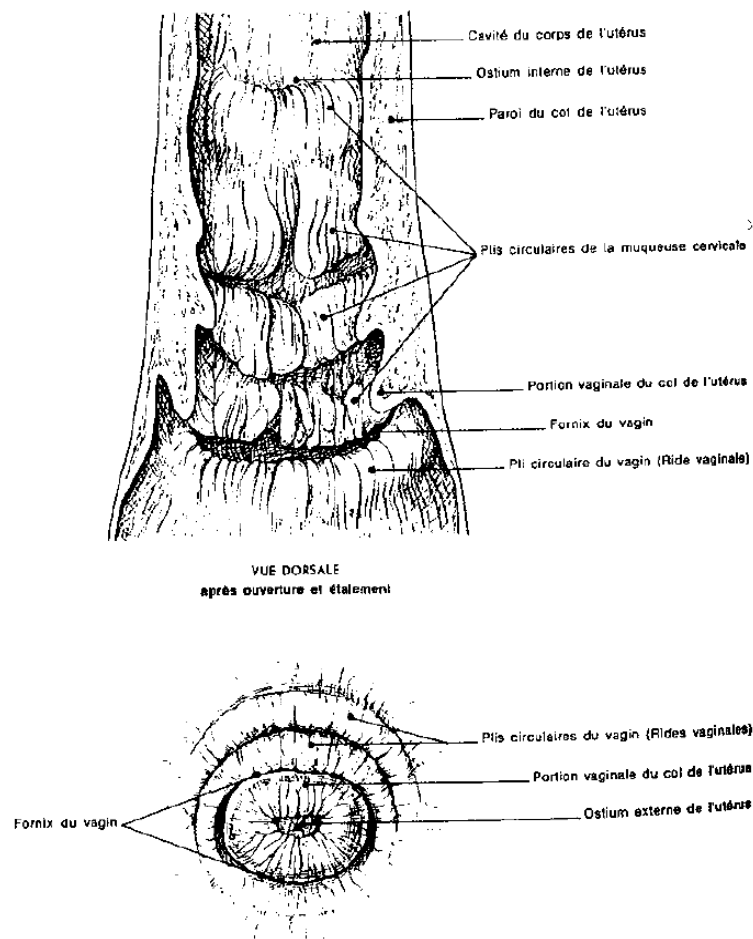
L'**endomètre** forme entre 12 à 14 plis au niveau des cornes utérines et 8 à 10 plis dans le corps utérin. Ces plis n'ont pas le même aspect suivant le moment du cycle œstral de la jument :ils s'hypertrophient notamment durant l'œstrus (6).

Le **myomètre** est composé de deux couches : la plus interne forme des anneaux circulaires tandis que la couche externe est longitudinale, en continuité avec le myomètre des cornes utérines.

La séreuse, ainsi que les vaisseaux sanguins de l'utérus, sont dans la continuité du ligament large (7).

### c. Le col utérin

Le col utérin est la jonction entre la vagin et l'utérus (*Figure 7*).



*Figure 7 : Vues dorsale et caudale du col utérin chez la vache*

*(Source : Barone (6))*

#### i. Chez la vache

La taille du col utérin est variable : chez la génisse, sa longueur oscille entre 2 à 3 cm, contre 10 cm chez la vache mature. Le col utérin présente une muqueuse avec des plis longitudinaux et circulaires très épais. Le dernier pli circulaire forme la « fleur épanouie » dans la cavité vaginale. La lumière du col utérin est la plupart du temps fermée, sauf lors du vêlage, où il s'ouvre totalement, ou lors de l'œstrus, où il se dilate légèrement. Durant la phase lutéale ou la gestation, un bouchon de mucus épais et brunâtre se forme, augmentant l'étanchéité du col (5).

#### ii. Chez la jument

Son épaisseur est de 30 à 35 mm. Sa muqueuse est blanchâtre ou rosée, plissée dans la longueur. Comme chez la vache, un ostium externe, formé de plis épais et peu saillants, forme la « fleur épanouie ». Le col utérin est fermé durant la période de diœstrus. Au cours de l'œstrus, il devient plus mou et plus large et s'ouvre largement au point de s'effacer complètement, ce qui n'est pas le cas chez la vache (6). Son épithélium contient des cellules sécrétrices qui produisent un mucus lubrifiant lors de l'œstrus et un bouchon muqueux imperméable lors du diœstrus ou de la gestation.

Contrairement à la vache, lors de l'œstrus, le col se contracte grâce à une couche de muscles circulaires riches en fibres élastiques. De plus, il ne présente pas d'anneaux transverses obstruants (7).

#### d. Le vagin

##### i. Chez la vache

Le vagin s'étend du col de l'utérus à la partie externe de l'appareil reproducteur, à savoir la vulve. Il se trouve dans la cavité pelvienne. Sa longueur n'est pas fixe et dépend de l'état gestationnel de l'animal et sa paroi est élastique. Les cellules proches du col utérin produisent du mucus et sont particulièrement actives lors de l'œstrus (5).



## ii. Chez la jument

Le vagin est long de 20 à 25 cm, avec un diamètre de 3 à 5 cm dans le sens dorso-ventral et de 6 à 9 cm dans le sens latéro-médial. Il s'étend de la partie externe du col utérin au pli transversal qui recouvre l'orifice urétral externe. Sa muqueuse est rose lors du diœstrus et se congestionne lors de l'œstrus. Elle est légèrement plissée et élastique (6). La partie crâniale du vagin est recouverte d'une séreuse et se trouve dans la cavité péritonéale, contrairement à la partie caudale du vagin qui n'est pas recouverte d'une séreuse et se trouve en région rétropéritonéale (7).

### 3. Le sinus uro-génital

#### a. Le vestibule vaginal

Le vestibule vaginal forme un conduit légèrement aplati entre le vagin et la vulve. C'est la partie uro-génitale avec l'abouchement de l'urètre. Le méat urétral se situe environ à 10 cm de la vulve, juste caudalement au diverticule sub-urétral qui forme un cul-de-sac (5).

Chez la vache, le vestibule vaginal mesure de 8 à 10 cm contre 10 à 15 cm chez la jument.

## b. La vulve

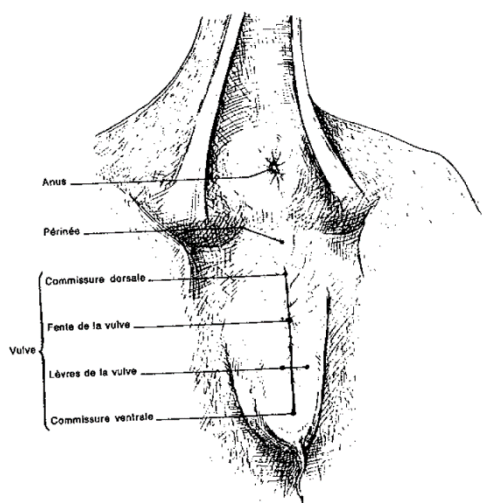


Figure 8 : Vue caudale de la vulve d'une vache (Source : Barone (6))

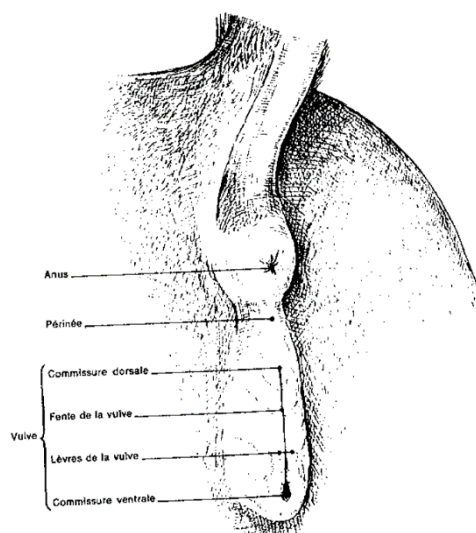


Figure 9 : Vue caudale de la vulve d'une jument (Source : Barone (6))

### i. Chez la vache

Le vagin, partie la plus externe du tractus reproducteur, permet la pénétration lors de l'accouplement et l'expulsion du veau lors du part. Chez la vache, il n'y a qu'une seule paire de lèvres vulvaires, épaisses, avec une peau assez fine. Le clitoris, qui encadre la vulve, est composé d'un corps rectiligne de 6 à 8 cm de long et d'un gland volumineux (Figure 8) (5).

### ii. Chez la jument

Les lèvres vulvaires sont minces. L'ouverture verticale de la vulve commence 5 à 7 cm au-dessous de l'anus et s'étend sur une longueur de 12 à 15 cm (7). La peau est fine et composée de glandes sébacées et sudoripares. La peau, ainsi que la muqueuse vulvaire, sont très souvent pigmentées. Le clitoris mesure 7 à 9 cm de long et le gland peut être visualisé au niveau de la partie ventrale de la commissure ventrale (Figure 9) (6).

## B. Suivi des cycles œstraux chez la vache et chez la jument

### 1. Physiologie sexuelle de la femelle non gestante

#### a. Le cycle œstral

Chez la vache et chez la jument, le cycle œstral dure 21 jours. Il est divisé en quatre phases (10) :

- Le **pro-œstrus**, où se produit la maturation folliculaire
- L'**œstrus**, période de réceptivité sexuelle
- Le **metœstrus**, période post-ovulation
- Le **diœstrus**, avec la présence d'un ou plusieurs corps jaune(s) actif(s).

Lors du cycle œstral, des modifications de comportement, notamment les manifestations de chaleurs, sont visibles. Chez la vache, les chaleurs durent 6 à 14 heures avec l'ovulation qui se produit environ 18 heures après le début des chaleurs. Chez la jument, les chaleurs durent entre 3 et 12 jours avec l'ovulation qui se produit un à deux jours avant la fin des chaleurs.

#### b. Le cycle ovarien

Le cycle ovarien peut être décrit selon deux phases : une **phase folliculaire**, qui correspond au pro-œstrus et à l'œstrus, et une **phase lutéale**, qui correspond au metœstrus et au diœstrus.

##### i. La phase folliculaire

Le cycle ovarien débute par la libération par l'hypothalamus de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), qui entraîne la libération de la FSH (Follicle-stimulating hormone) par la glande pituitaire, qui stimule la croissance des follicules. C'est la **phase de recrutement**. Parmi les follicules en croissance durant la phase de recrutement, un seul follicule, le plus mature, deviendra dominant et sera destiné à ovuler, c'est la **phase de sélection** (11).

Chez la vache, des vagues folliculaires se succèdent au cours du cycle folliculaire. Elles sont au nombre de trois par cycle et durent en moyenne sept jours.

Lors des deux premières vagues, le follicule dominant n'ovule pas mais devient atrophique par absence de LH (Luteinising Hormone). En effet, c'est la présence de LH qui permet la maturation des follicules et l'ovulation. Une production de LH de manière pulsatile, avec des pulses de basses amplitudes et de hautes fréquences, permet la maturation du follicule dominant. Par ailleurs, la production de LH est en étroite relation avec la présence d'œstrogènes, qui sont produits par les cellules de la thèque interne et de la granulosa. C'est donc l'augmentation de la production d'œstrogènes qui va initier la production de GnRH par l'hypothalamus et ainsi produire un pic de LH responsable de l'ovulation. (10).

Chez la jument, le devenir des vagues folliculaires dépend de la concentration circulante de FSH. C'est la diminution de la concentration en FSH, et l'augmentation de la concentration en LH, qui entraîne la sélection d'un follicule dominant et l'ovulation. Lors de la phase de recrutement, les follicules ne produisent que très peu d'œstrogène et d'inhibine. La FSH entraîne la sélection d'un follicule dominant, qui produit de l'œstrogène et de l'inhibine, en grande quantité, provoquant un rétrocontrôle négatif sur la production de FSH. Cette diminution de FSH, ajoutée à une lyse du corps jaune, et donc à la diminution de la progestérone, entraîne une augmentation de la concentration en LH provoquant l'ovulation du follicule dominant. Si l'environnement hormonal n'est pas propice à la sélection d'un follicule dominant, et à l'ovulation, les follicules présents sur l'ovaire régressent (12).

## ii. La phase lutéale

Durant la phase lutéale, qui commence après l'ovulation, le corps jaune se forme : ce sont les cellules restantes suite à la rupture du follicule, c'est-à-dire les cellules de la thèque interne et de la granulosa, qui prolifèrent et deviennent des cellules lutéales formant ainsi le corps jaune. Cette différenciation cellulaire se produit sous l'influence de la LH qui permet ainsi de passer d'une production d'œstradiol à une production de progestérone par ces cellules et permet également le maintien du corps jaune. La concentration en progestérone augmente de manière linéaire à la taille du corps jaune. L'augmentation de progestérone permet de préparer l'utérus à l'arrivée de l'embryon. Elle exerce également un feedback négatif sur la GnRH et sur la LH, inhibant ainsi la maturation des follicules. Chez la vache, des vagues folliculaires sont également présentes durant la phase lutéale (10). En cas de non-gestation, il y a lutéolyse, le



## 2. Suivi des cycles : évaluation de la fonction reproductrice

L'évaluation de la fonction reproductrice est indispensable aussi bien chez la femelle donneuse d'ovocyte, pour déterminer si une FIV est nécessaire ou pas, que chez la femelle receveuse de l'embryon produit par FIV. Cette évaluation se réalise principalement sur la base d'un examen clinique et sur différentes techniques d'évaluation de la qualité de l'appareil reproducteur.

Avant toute manipulation ou tout examen, il est nécessaire de vérifier l'identité de la vache ou de la jument afin d'éviter une éventuelle erreur d'identification des gamètes, voire une fraude. Une anamnèse est indispensable pour analyser l'historique de reproduction de la femelle donneuse. Pour cela, un bilan des gestations antérieures est réalisé avec une évaluation du nombre de veaux, ou poulains, nés à terme dans le passé, le nombre de cycles ayant abouti à un diagnostic de gestation positif, les différents actes réalisés lors de suivis antérieurs, les difficultés rencontrées lors de la saison...

Un examen clinique général est tout d'abord réalisé pour s'assurer de la bonne santé de la femelle, avec un intérêt plus particulier au régime alimentaire et à la note d'état corporel.

Dans un second temps, la conformation de la région périnéale et de la vulve est évaluée. La vulve doit être en position verticale avec les deux tiers inférieurs localisés sous l'os pelvien. Le tonus musculaire de la vulve est aussi examiné afin d'éviter les entrées d'air au niveau du vestibule et du vagin.

Puis, le vagin est examiné à l'aide d'un speculum afin d'évaluer son aspect visuel et la partie externe du col de l'utérus. Le speculum nous permet de déterminer le stade du cycle œstral où se situe la femelle, de détecter la présence d'une accumulation d'urine dans le vagin, d'une inflammation du vagin ou du col de l'utérus. Ce dernier peut éventuellement être délicatement palpé pour détecter la présence d'anormalité comme des adhésions ou des lacérations.

Ensuite, l'intégralité du tractus génital interne est évaluée par palpation transrectale, suivie par un examen échographique par voie transrectale. Ces examens sont détaillés dans la partie suivante.

Des prélèvements peuvent être réalisés pour évaluer l'aspect fonctionnel de l'appareil génital interne : une cytologie et une bactériologie de l'utérus, voire une biopsie endométriale

Ces évaluations permettent une vision globale de la fonction de reproduction chez la vache et chez la jument afin d'optimiser les chances de réussite pour la FIV (13).

### 3. Le suivi échographique

Comme vu précédemment, l'échographie est essentielle dans le processus aboutissant à la fécondation *in vitro*. Elle permet de vérifier l'intégrité de l'appareil génital interne mais aussi de réaliser le suivi des cycles ovariens avec précision.

#### a. La palpation transrectale

La palpation transrectale est un acte indispensable à réaliser avant l'échographie. Certaines caractéristiques anatomiques sont plus facilement identifiables par la palpation que par l'échographie comme le tonus de l'utérus ou du col utérin, la souplesse d'un follicule ou la sensibilité d'un ovaire.

La palpation transrectale est un acte à réaliser avec délicatesse et sous lubrification pour diminuer le risque de lacération et améliorer le confort de l'animal. Le risque majeur est la lacération, voire la perforation, du rectum qui peut être fatale à l'animal. Il est primordial d'en informer l'éleveur ou le propriétaire en amont de cet examen pour obtenir un consentement éclairé de celui-ci. Pour faciliter la palpation transrectale on peut administrer de la N-butylscopolamine en intra-veineuse quelques minutes avec la réalisation de l'examen, en faisant attention aux temps d'attentes chez les différentes espèces.

Dans un premier temps, le rectum est vidé de ses matières fécales pour faciliter la palpation. La taille et le tonus du col utérin peuvent ensuite être évalués (*Figure 11*). Puis, la main est avancée crânialement en suivant le corps de l'utérus (*Figure 12*) jusqu'à atteindre la bifurcation des deux cornes utérines et continuer enfin sur les deux

cornes utérines. Les ovaires se trouvent à l'extrémité des cornes utérines et peuvent être palpés (*Figure 13*).

Pour les atteindre, chez la vache, ils se trouvent en général à 10 cm de la ligne médiane et 5 cm derrière le plancher pelvien vers la bifurcation utérine. Il est possible de suivre le ligament large pour les localiser (9). A la palpation, les follicules font des protrusions en forme de dôme à la surface de l'ovaire. Ils sont d'aspect lisse avec une consistance liquidienne. Le corps jaune, quant à lui, est facilement palpable : il a un aspect en « bouchon de champagne » à la surface de l'ovaire avec une consistance élastique et ferme. Pour palper l'utérus, celui-ci peut être ramené dans la cavité pelvienne. Sa taille et sa consistance peuvent être évaluées. L'utérus est plus flasque avec une consistance « pâteuse » lors de l'œstrus. Le col utérin est plus court et atonique pendant l'œstrus. Il devient tonique après l'ovulation.

Chez la jument, il faut avancer crânialement à la corne utérine en prenant un axe latéro-dorsal. Les follicules et les corps jaunes ne sont pas palpables car le cortex et la médulla sont inversés anatomiquement.

L'utérus est flasque pendant l'œstrus et tonique pendant le diœstrus. Le col utérin, quant à lui, est effacé et mou pendant l'œstrus, mais tonique et proéminent durant le diœstrus. Chez les juments plus âgées, il est important de détecter précocement les défauts de tonicités du col utérin pour optimiser au mieux la mise à la reproduction et éviter une rétention des fluides dans l'utérus. (14).





Figure 9 : Section transversale d'une jument : localisation du col de l'utérus à la palpation transrectale  
(Source : Brinsko et al. (7))

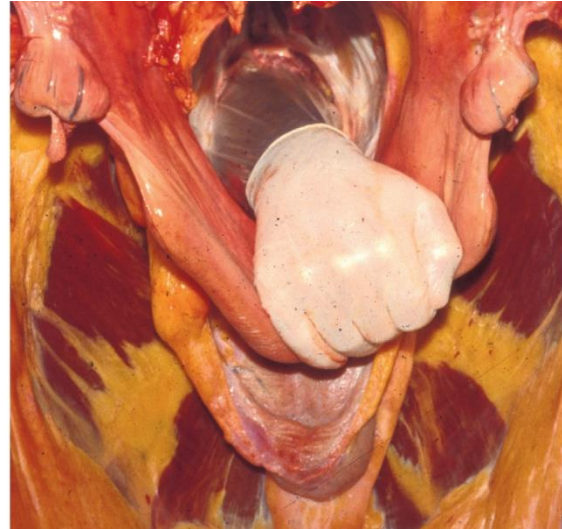


Figure 10 : Section transversale d'une jument : palpation transrectale du corps utérin  
(Source : Brinsko et al. (7))



Figure 11 : Section transversale d'une jument : palpation transrectale des ovaires (Source : Brinsko et al. (7))

## b. L'échographie transrectale de l'appareil reproducteur

La palpation transrectale est quasi systématiquement suivie d'une échographie transrectale de l'appareil reproducteur. Elle permet de visualiser les différentes structures du tractus génital qui ne sont ni palpables, ni différenciables par palpation transrectale. Elle permet également de faire un diagnostic de gestation, de détecter la présence de jumeaux de manière précoce (notamment chez la jument) et de détecter des pathologies utérines ou ovariennes. Dans le cadre de la fécondation *in vitro*, l'échographie permet de suivre le cycle de la femelle receveuse de l'embryon, de la maturation des follicules jusqu'à la formation du corps jaune, et ensuite pour le diagnostic de gestation. Du côté de la femelle donneuse, l'échographie sert au suivi des cycles afin de déterminer le moment optimal pour faire la ponction des follicules lors de l'OPU (Ovum pick up) (voir la partie *II.A.1. Collecte des ovocytes*).

Comme pour la palpation transrectale, l'échographie transrectale doit se faire de manière délicate à l'aide d'un gant à usage unique largement lubrifié. La vidange préalable du rectum est essentielle pour la visualisation des différentes structures. Une sonde linéaire, de fréquence entre 5.0 à 7.5 MHz, est utilisée pour l'examen échographique de l'appareil génital (9). Lors de l'introduction de la sonde, la vessie de la femelle est en premier lieu visualisée. Crânialement à celle-ci, le col de l'utérus puis l'utérus sont ensuite repérables. L'utérus est échographié dans sa totalité en visualisant d'abord le corps utérin puis les cornes utérines. Chaque corne utérine doit être visualisée dans son intégralité, notamment lors du diagnostic de gestation pour ne pas passer à côté d'une éventuelle vésicule embryonnaire ou de la présence de jumeaux. Puis, plus crânialement encore, se trouvent les ovaires. La visualisation de l'ensemble de l'appareil génital doit se faire en continuité afin de ne pas passer à côté de vésicules embryonnaires ou de zones pathologiques.

### *Echographie des ovaires*

Les structures notables observables sur les ovaires sont les follicules, les corps jaunes, les corps jaunes hémorragiques et les corps jaunes en régression. L'échographie des ovaires est une étape déterminante dans la FIV étant donné que les follicules seront ponctionnés sous contrôle échographique. Il est ainsi nécessaire de pouvoir les dénombrer et les localiser pendant tout le processus de ponction.

Un follicule est une structure liquidienne qui contient le liquide folliculaire. A l'échographie, il est visualisé par une structure ronde à ovale avec un contenu anéchogène (c'est-à-dire un contenu noir) (*Figure 14 et 15*). La paroi de cette structure est épaisse, lisse et bien définie. L'ovulation est détectée lorsque le follicule dominant disparaît pendant l'œstrus. Un suivi régulier est ainsi primordial pour détecter cette ovulation. La visualisation du corps jaune sera ensuite possible. Chez la vache, le corps jaune mature est hypoéchogène comparé au stroma de l'ovaire (*Figure 16*). Chez la jument, on observe une structure homogène et hyperéchogène comparée au tissu ovarien (*Figure 17*). Chez les deux espèces, une cavité anéchogène peut être présente au début de sa formation qui diminue de taille au cours du cycle avec un remplissage progressif de la cavité par de la fibrine.

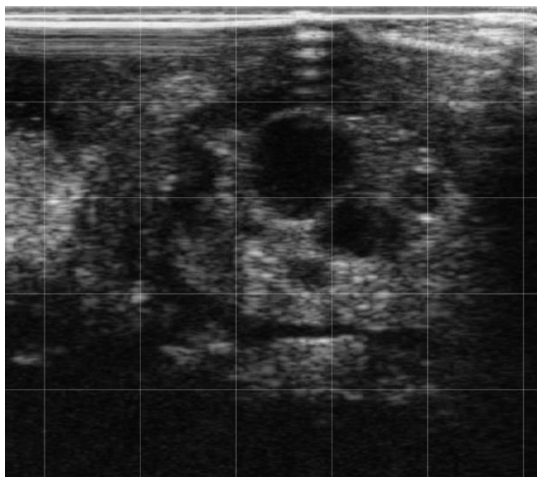


Figure 12 : Image échographique d'un follicule chez la vache  
(Source : Annabelle Pré)

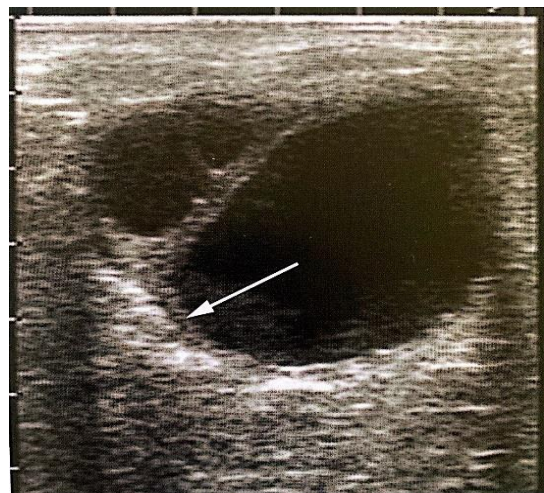


Figure 13 : Image échographique d'un follicule chez la jument  
(Source McCue P.M. (16))

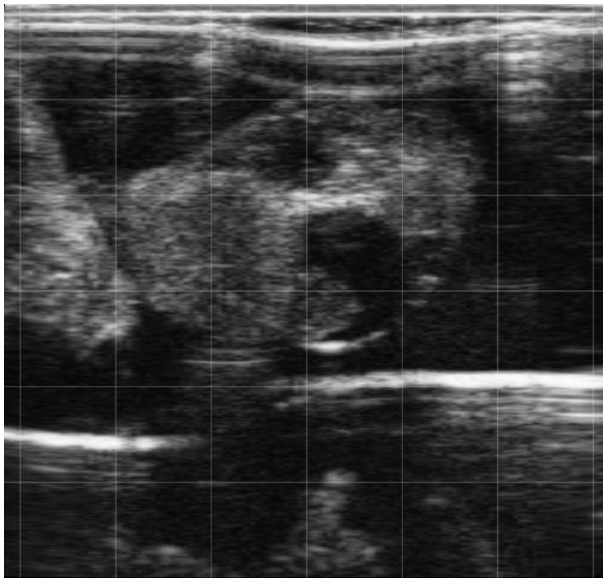


Figure 14 : Image échographique d'un corps  
jaune chez la vache  
(Source : Annabelle Pré)

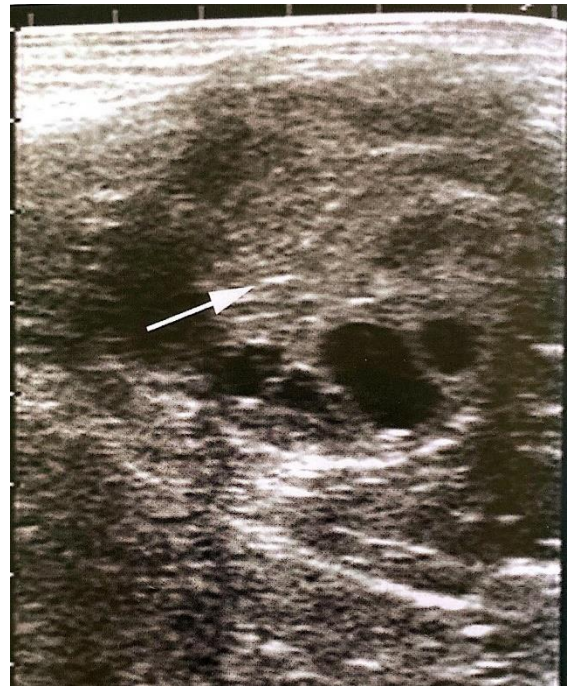


Figure 15 : Image échographique d'un  
corps jaune chez la jument  
(Source : McCue P.M. (16))

L'échographie des ovaires permet aussi de détecter des anomalies pouvant expliquer un échec lors de la mise à la reproduction, comme des follicules anovulatoires, des tumeurs ovariennes, telles que des tumeurs de la granulosa chez la jument, ou des kystes ovariens.

### *L'échographie de l'utérus*

L'échographie de l'utérus permet de situer le moment du cycle où se trouve la femelle. Lors de l'œstrus, l'utérus est œdématié sous l'effet des estrogènes et peut présenter une légère accumulation de liquide dans sa lumière. A l'échographie, un utérus œdématié est souvent comparé à des « quartiers d'oranges » ou encore à une « roue de vélo » (Figure 18 et 20). Durant le diœstrus, l'utérus revient à sa taille normale, il apparaîtra donc homogène et non œdématié (Figure 19 et 21). Un utérus avec la présence de liquide ou d'œdème en diœstrus est signe d'une inflammation, voire d'une infection.



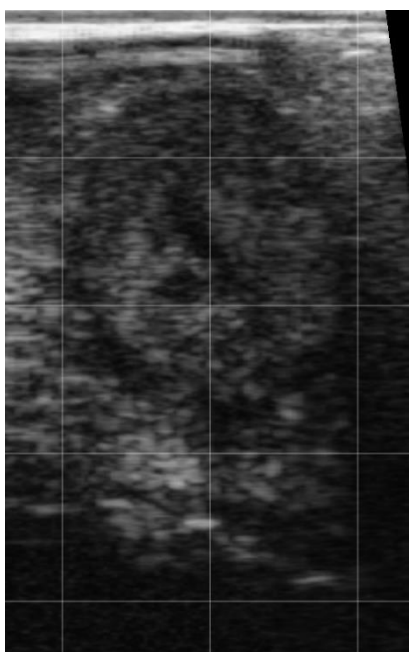


Figure 16 : Image échographique d'un utérus de vache en œstrus (coupe transversale)  
(Source : Annabelle Pré)

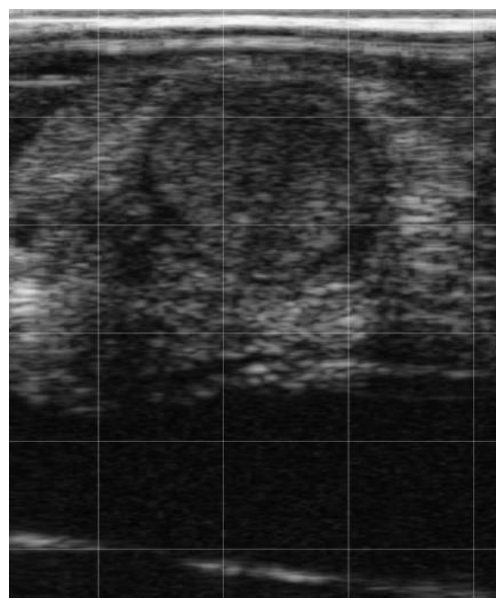


Figure 17 : Image échographique d'un utérus de vache en dioestrus (coupe transversale)  
(Source : Annabelle Pré)



Figure 18 : Image échographique d'un utérus de jument en œstrus (coupe transversale)  
(Source : McCue P M. (16))

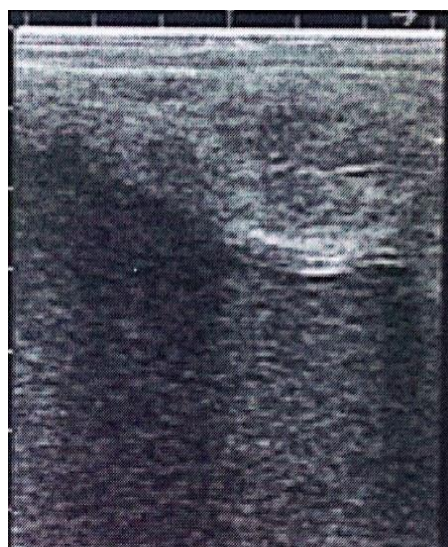


Figure 19 : Image échographique d'un utérus de jument en dioestrus (coupe transversale)  
(Source : McCue P M. (16))

L'échographie de l'utérus permet également de faire un diagnostic de gestation en le parcourant dans son intégralité pour visualiser la vésicule embryonnaire. Le diagnostic de gestation se fait à partir du 25<sup>ème</sup> jour post-ovulation chez la vache et entre 12 et 15 jours post-ovulation chez la jument (15)(16).

## C. La fécondation *in vivo* : maturation, capacitation, fécondation

Après avoir vu les différences anatomiques entre la vache et la jument, et après avoir décrit les différentes étapes conduisant à l'ovulation, les phénomènes conduisant à la fécondation des deux gamètes seront abordés dans cette partie. C'est la compréhension de tous les mécanismes qui se produisent *in vivo* qui a permis, par la suite, de réaliser et d'obtenir des embryons *in vitro*. Certains mécanismes ne sont pas encore totalement élucidés et constituent un enjeu majeur dans l'amélioration du rendement de la fécondation *in vitro*.

### 1. La maturation ovocytaire *in vivo*

#### a. La folliculogénèse

L'ovogénèse est le processus aboutissant à la formation des ovules. Ce processus commence dès la vie embryonnaire par les cellules germinales primordiales qui se multiplient par mitose dans les gonades du fœtus, donnant ainsi les oogonies. Certains de ces oogonies rentrent dans la première phase de la méiose aux environs de 80 jours de gestation pour donner les ovocytes primaires bloqués en prophase I de la méiose jusqu'à la puberté. Vers le milieu de la gestation, les ovocytes primaires se retrouvent entourés de cellules, qui sont les précurseurs des cellules de la granulosa, formant ainsi le follicule primordial. A la naissance, plusieurs milliers de follicules primordiaux, ainsi que d'ovocytes primaires, sont dans l'ovaire, constituant le réservoir de gamètes pour l'entièreté de la vie de la femelle.

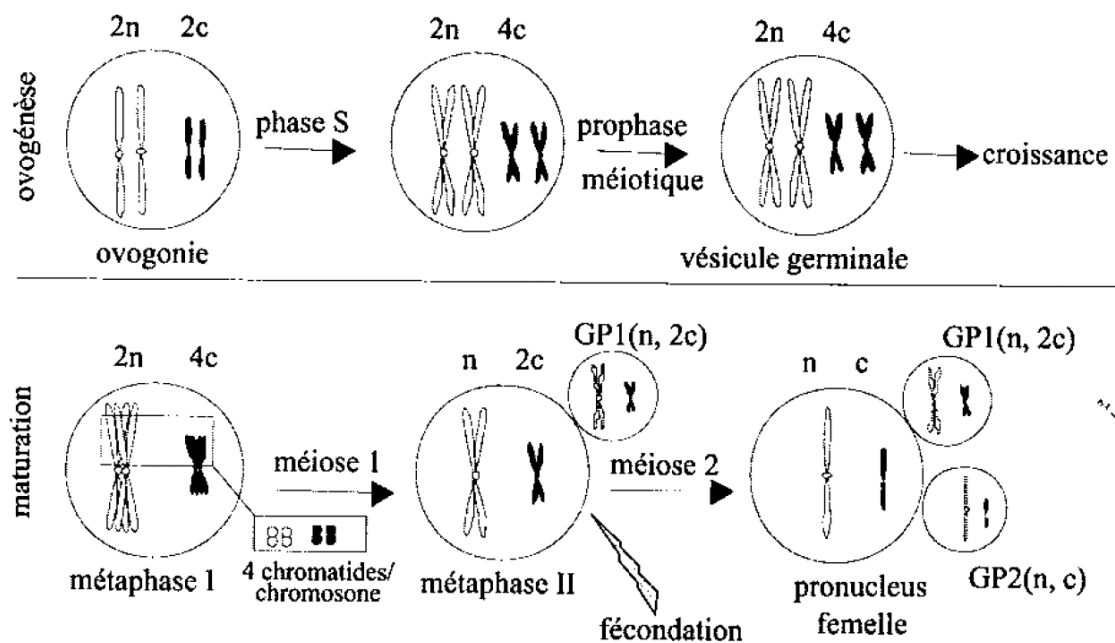
À la puberté, la folliculogénèse permet la formation de follicules matures. Le follicule primordial devient un follicule primaire avec une couche distincte de cellules de la granulosa, une augmentation de taille de l'ovocyte et la formation de la zone

pellucide autour de celui-ci. Puis, ce follicule primaire devient un follicule secondaire avec plusieurs couches de cellules de la granulosa, et enfin un follicule antral, rempli de liquide folliculaire. Au cours d'un cycle œstral, un seul follicule deviendra mature pour donner le follicule pré-ovulatoire. Sous la dépendance de la LH, l'ovocyte primaire de ce follicule pré-ovulatoire reprendra la méiose jusqu'à la métaphase II. Cet ovocyte est facilement reconnaissable, puisqu'au cours de la méiose un globule polaire se forme contenant les chromosomes issus de la division réductionnelle. L'ovulation intervient ensuite, c'est-à-dire que le follicule mature dégénère pour libérer l'ovule dans les trompes utérines, au niveau de l'infundibulum.

Durant cette première maturation, un changement au niveau des cellules de la granulosa qui se situent à proximité de l'ovocyte apparaît et celles-ci deviennent les cellules du cumulus. Elles sont, dans un premier temps, très adhérentes à la zone pellucide, puis se développent au cours de la maturation sous l'effet de l'acide hyaluronique produit par les cellules de la granulosa (17).

#### b. La maturation nucléaire de l'ovocyte

La maturation nucléaire de l'ovocyte commence quelques heures après le pic de LH, par la rupture de la vésicule germinale. Elle débute par une dégénération de l'enveloppe nucléaire qui se plisse, dans un premier temps, puis se fragmente avant de disparaître totalement. En parallèle, la condensation des chromosomes se produit. Celle-ci commence après les premiers signes d'ondulation de l'enveloppe nucléaire et se poursuit après la rupture de la vésicule germinale. A la fin de la condensation des chromosomes, les kinétochores, qui ancrent les chromosomes aux microtubules, apparaissent et sont captés par les microtubules. La plaque métaphasique de la première division méiotique se forme grâce à la migration des chromosomes le long des microtubules (métaphase I). Il y a ensuite formation d'un fuseau aplati, en forme de tonneau (car les centrioles disparaissent avant la croissance de l'ovocyte), et que l'on appelle le fuseau méiotique. Les chromosomes homologues se séparent ensuite et migrent chacun vers un pôle du fuseau. La télophase I forme ainsi le premier globule polaire. Les chromosomes de l'ovocyte se répartissent de nouveau sur une plaque métaphasique (métaphase II) et restent à ce stade jusqu'à la fécondation de l'ovocyte (*Figure 22*) (18).



*Figure 20 : Les différentes étapes de la méiose (Source : modifié depuis Mermillod (18))*

### c. La maturation cytoplasmique

La maturation cytoplasmique correspond à la réorganisation des organites dans l'ovocyte et au stockage des ARNm (Acide ribonucléique messenger), des protéines et des facteurs de transcription nécessaires pour la fécondation et pour le développement de l'embryon (19).

La maturation cytoplasmique intervient à trois niveaux :

- une redistribution des organites au sein du cytoplasme de l'ovocyte
- des changements de dynamique des filaments du cytosquelette
- une maturation moléculaire.

#### *La redistribution des organites au sein du cytoplasme de l'ovocyte*

La redistribution des organites dépend des besoins de la cellule au cours des différents stades du développement. Elle se fait grâce aux différents éléments du cytosquelette de l'ovocyte.

Par exemple, dans le cas des mitochondries, celles-ci se situent principalement à la périphérie de la cellule avant le pic de LH. Puis, elles se rassemblent dans la corticale lors de la dernière étape de la maturation nucléaire, pour enfin se disperser



dans toute la cellule après l'extrusion du premier globule polaire. Une variation de la quantité de mitochondries est également observable au cours du développement, couplé à un changement de leur activité, en corrélation avec les besoins de l'ovocyte. Les ribosomes ont également une place centrale puisque la synthèse de protéines est essentielle pour la maturation, mais également pour le développement du zygote.

De même que pour les mitochondries, le réticulum endoplasmique (RE) se voit redistribuer au cours du développement. Pendant la rupture vésicale, le RE est uniformément distribué dans tout l'ovocyte. Puis, il se retrouve dans la région corticale de l'ovocyte jusqu'à la métaphase II. Le RE possède différentes fonctions au sein de l'ovocyte comme la formation et la dégradation des protéines, ou encore la régulation du calcium  $Ca^{2+}$ , un élément essentiel lors de la fécondation. Les granules corticaux se retrouvent également à la périphérie de l'ovocyte. Leurs dégranulations est le principal mécanisme dans la prévention de la polyspermie. Elles libèrent le contenu de l'appareil de Golgi, modifiant les récepteurs des spermatozoïdes sur la zone pellucide, et limitant ainsi la polyspermie.

#### *Les changements de dynamique des filaments du cytosquelette*

Les filaments du cytosquelette peuvent s'adapter aux besoins de la cellule en changeant leur structure. Ils sont également responsables de la ségrégation des chromosomes lors de la maturation nucléaire et de la redistribution des organites lors de la maturation cytoplasmique.

Il existe trois types de filaments dans la cellule (*Figure 23*) :

- les microtubules, qui sont impliqués dans la redistribution des organites,
- les filaments d'actine
- les filaments intermédiaires.

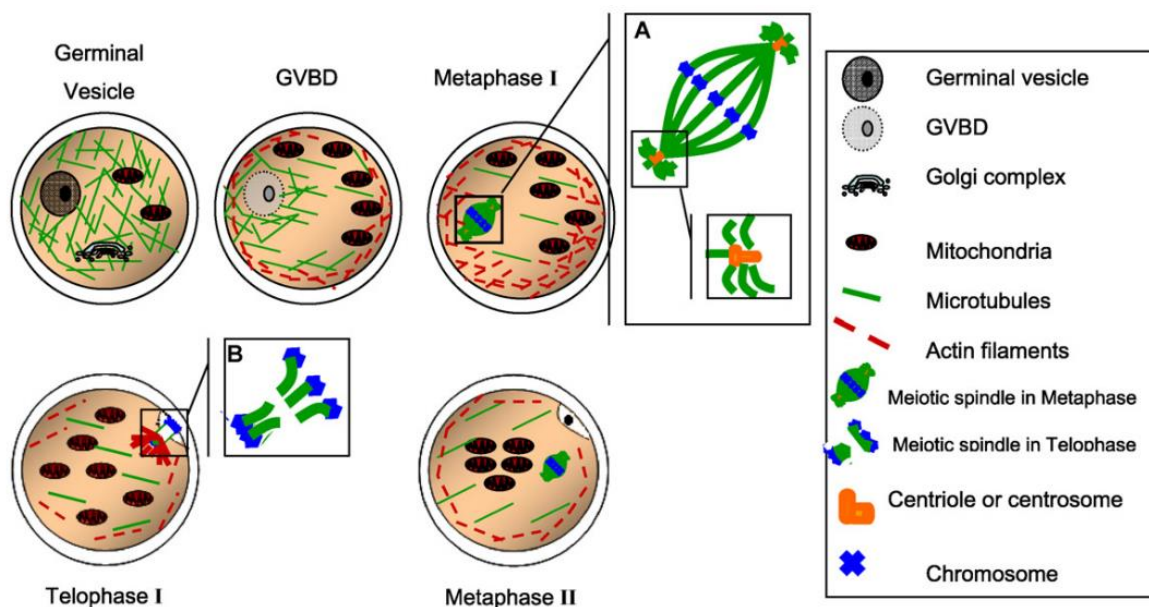


Figure 21 : Dynamique du cytosquelette au cours de la maturation  
 (Source : Ferreira et al (19))

Légendes : Germinal Vesicle : Vésicule germinale ; GVBD : Rupture de la vésicule germinale ; Golgi complex : Complexe de Golgi ; mitochondria : Mitochondrie ; Actin filaments : Filaments d'actines ; Meiotic spindle in Metaphase : Fuseau méiotique en Métaphase ; Meiotic spindle in Telophase : Fuseau méiotique en Télaphase ; Centriole or centrosome : Centriole ou centrosome

### La maturation moléculaire

Elle a lieu en même temps que les phases de croissance et de maturation de l'ovocyte. Elle implique la transcription, le stockage et la transformation des ARNm exprimés par les chromosomes, puis la traduction en protéines par les ribosomes. Ces protéines participent à la fois à la croissance et à la maturation de l'ovocyte, mais également à la fécondation et à l'embryogénèse. Après la reprise de la méiose, il n'y a plus d'expression génétique, les chromosomes étant sous forme condensés. Les ARNm transcrits avant la condensation des chromosomes doivent être stockés de manière transitoire pour pouvoir être utilisés au moment voulu. Ils se trouvent sous forme de particules ribonucléoprotéiques, qui les protègent de la dégradation nucléolytique jusqu'au moment de l'émission des signaux initiant leurs traductions. Cette inactivation des ARNm se fait grâce à un phénomène de polyadénylation.

Les protéines issues de ces ARNm sont essentielles au développement de l'ovocyte. Il s'agit de protéines responsables de la régulation du cycle cellulaire, notamment la protéine MPF (Facteur de promotion de la mitose), responsable de la reprise de la méiose. Certains ARNm sont issus de la maturation des COCs (Cumulus Oocyte Complex) et permettent l'équilibre et la coordination des cellules. Par exemple, les gonadotrophines jouent un rôle essentiel dans le développement de l'ovocyte. On note la présence d'ARNm codant les récepteurs à la FSH, à la LH et à la connexine 43 (FSHr, LHr et Cx 43r) au niveau du complexe ovocyte-cumulus. La connexine 43 permet le lien entre l'ovocyte et les cellules du cumulus via des jonctions gap. Ces récepteurs sont utilisés comme marqueurs indicatifs de la maturation et de la qualité de l'ovocyte.

D'autres marqueurs de la maturation cytoplasmique ovocytaire existent, notamment le glutathion. C'est une enzyme permettant la protection de l'ovocyte en éliminant les ROS (espèces réactives de l'oxygène) produites par les mitochondries. Après la fécondation, son activité est associée à la décondensation de la chromatine du spermatozoïde, entraînant l'activation de l'ovocyte et la transformation de la tête du spermatozoïde en un pronucléus mâle (19).

## 2. La capacitation *in vivo* des spermatozoïdes

La capacitation correspond aux changements que subissent les spermatozoïdes, après éjaculation dans les voies génitales femelles, pour pouvoir féconder l'ovule. Elle est indispensable pour la fécondation. Les changements que subissent les spermatozoïdes dans les voies génitales sont principalement de l'ordre structurel et fonctionnel. Bien que la capacitation soit bien décrite chez la vache, il reste une zone d'ombre concernant l'espèce équine, chez qui la capacitation *in vitro* reste difficile à obtenir (20).

### a. Structure du spermatozoïde

Le spermatozoïde peut être décrit en trois parties :

- La tête
- La pièce intermédiaire
- Le flagelle

### *La tête*

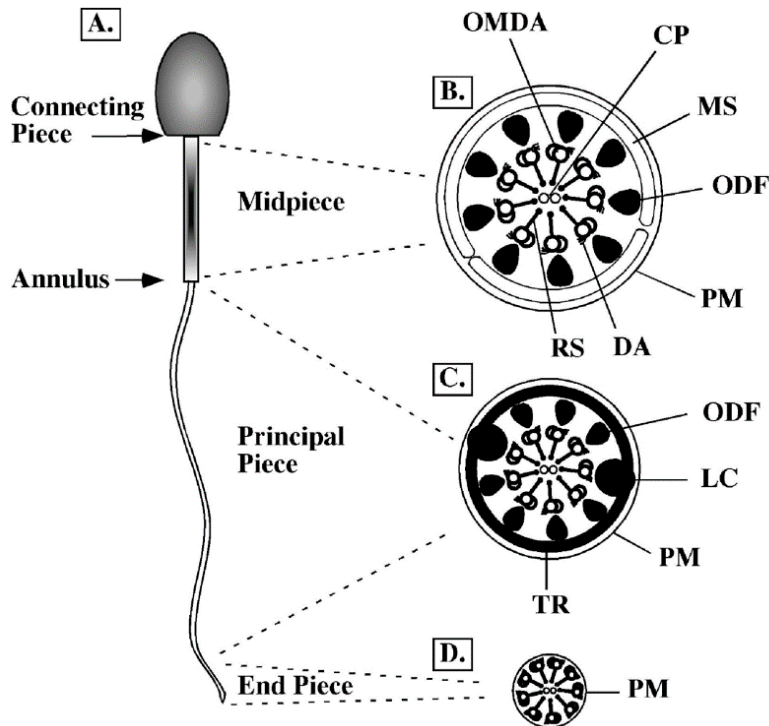
La tête est composée du noyau qui contient l'entièreté du matériel génétique du père, et de l'acrosome, qui recouvre en grande partie la tête du spermatozoïde. Le noyau apporte le patrimoine génétique du père au niveau de l'ovule, permettant ainsi, à partir de deux cellules haploïdes, de former un embryon diploïde. L'ADN (Acide désoxyribonucléique) contenu dans le noyau est six fois plus condensé que les chromosomes lors de la mitose, ce qui permet une protection optimale du matériel génétique lors du transport. Les histones sont remplacés par des protamines ce qui permet un remodelage de la chromatine et cause de nombreuses cassures des brins d'ADN qui sont ensuite réparés par ligature (21). L'acrosome est formé d'une membrane interne et d'une membrane externe. Il a un rôle majeur dans la fécondation en permettant, grâce à la réaction acrosomique, le passage du spermatozoïde à travers la zone pellucide et la fusion des deux gamètes (22). Dans l'espèce équine, la tête est plus longue et fine que chez les bovins.

### *La pièce intermédiaire*

La pièce intermédiaire est séparée de la tête par un anneau qui marque une rupture entre la membrane plasmique de la tête et de la pièce intermédiaire. Elle est composée de neuf fibres externes denses, qui entourent les neuf paires de microtubules, elles-mêmes entourant un doublet de microtubules (axonème). Ces fibres, ainsi que l'axonème, sont entourés d'une gaine contenant des mitochondries permettant de produire l'énergie nécessaire au déplacement du spermatozoïde sous forme d'ATP (Adénosine triphosphate) (23).

### *Le flagelle*

La structure du flagelle ressemble à la structure de la pièce intermédiaire. On retrouve l'axonème qui est présent sur toute la longueur du flagelle. La gaine avec les mitochondries est remplacée par une membrane plasmique. Les doublets trois et huit de l'axonème sont remplacés par deux colonnes longitudinales de gaine fibreuse sur la pièce principale du flagelle. La partie terminale du flagelle contient seulement l'axonème entouré d'une membrane plasmique. Le flagelle donne au spermatozoïde sa capacité à se mouvoir dans les voies génitales femelles (*Figure 24*) (23).



*Figure 22 : Représentation schématique d'un spermatozoïde et de la structure du flagelle*

*(Source : Turner (23))*

**Légendes :** *Connecting piece : Zone de connexion ; Annulus : Anneau ; Midpiece : Pièce intermédiaire ; Principal piece : Corps du flagelle ; End Piece : Extrémité du flagelle ; OMDA : Doublets de microtubules externe de l'axonème ; CP : Paire centrale de mitochondries ; MS : Gaine mitochondriale ; ODF : Fibres externes denses ; PM : Membrane plasmique ; DA : Bras de dynéine ; RS : rayons ; LC : Colonne longitudinale de la gaine fibreuse ; TR : Liaison transversale des deux colonnes longitudinales*

#### b. La capacitation

Avant de pouvoir initier la capacitation, il est nécessaire que les spermatozoïdes soient séparés du plasma séminal produit par les glandes annexes. Cela se fait lors du passage du col chez la vache ou par résorption dans l'utérus chez la jument (24).

La capacitation concerne principalement des changements membranaires du spermatozoïde. Ces changements sont principalement d'ordre lipidique et phospholipidique avec une redistribution de ces derniers au sein de la membrane. Cela contribue à une augmentation de la fluidité membranaire mais aussi à des remaniements de l'architecture de la membrane pour permettre l'entrée du spermatozoïde dans l'ovocyte (25).

Lors de l'accouplement, les spermatozoïdes sont déposés au niveau de l'entrée du col de l'utérus chez la vache et dans l'utérus chez la jument. Ils migrent dans le tractus génital femelle jusqu'à l'isthme et sont retenus par l'épithélium des trompes utérines, formant ainsi un réservoir. La fécondation a lieu dans l'ampoule : il faut donc que les spermatozoïdes soient libérés du réservoir. Ce réservoir permet le stockage des spermatozoïdes et le maintien de leur viabilité jusqu'à ce que l'ovule atteigne l'ampoule, mais il est surtout essentiel pour le délai nécessaire à la réalisation de la capacitation. Actuellement, il n'est pas démontré si la capacitation induit la libération du spermatozoïde du réservoir ou si la libération du spermatozoïde achève la capacitation (26).

#### i. Les changements membranaires lipidiques

La membrane plasmique des spermatozoïdes possède une composition particulière par rapport aux autres cellules. Elle présente un taux élevé de cholestérol au niveau de la zone apicale et équatoriale de la tête. Les glycérophospholipides sont sous une forme particulière de plasmalogènes, qui possèdent un fort pouvoir oxydant. La membrane est riche en sphingomyéline. Le fort taux de cholestérol et de glycérophospholipides contribue à diminuer la diffusion dans certaines zones de la membrane. La rigidification, ainsi que la stabilisation de la membrane, sont permises par l'interaction entre le cholestérol et la sphingomyéline. La membrane est ainsi perméable, ce qui contribue à un défaut de répartition des divers constituants entre le feuillet interne et externe de la bicouche lipidique : les aminophospholipides se situent au niveau du feuillet interne et les phospholipides au niveau du feuillet externe (27).

La particularité de l'étalon est que sa membrane contient bien plus d'acide gras que le taureau. Il faut savoir qu'au sein d'une même espèce on trouve une grande variabilité de la composition de la membrane des spermatozoïdes, mais aussi une grande variabilité chez un même individu. Il est donc difficile de décrire précisément la composition de cette membrane (25).

Lors de la capacitation, une augmentation de la diffusion des lipides est observable au sein de la membrane, sauf au niveau de la région post-acrosomale du spermatozoïde. Cette augmentation de diffusion est associée à un efflux de cholestérol dans les voies génitales femelles. Ceci est permis par la présence de HDL (Lipoprotéine à haute densité) dans les liquides de l'oviducte et des follicules. Chez

les bovins, une synergie existe aussi entre les HDL et les protéines « bovine seminal plasma » (BSP), ce qui favorise l'efflux de cholestérol et la capacitation des spermatozoïdes.

Le cholestérol est redistribué dans la membrane et se retrouve au niveau de la zone apicale de la tête. L'efflux de cholestérol cause l'activation et le passage des phospholipides entre les feuilletts via une interaction entre les cavéolines-1 et les scramblases, qui sont les protéines de translocation des phospholipides. Les bicarbonates, à fortes concentrations, activent également les scramblases et provoquent la translocation des phosphatidylcholines et des sphingolipides du feuillet externe au feuillet interne. La redistribution des phospholipides favorise ainsi les interactions avec les molécules de signalisation, notamment les récepteurs spermatiques permettant la fusion avec la zone pellucide de l'ovocyte. Elle favorise aussi l'augmentation de la perméabilité de la membrane aux ions bicarbonates et calciques nécessaire pour l'hyperactivation transitoire du spermatozoïde et pour la réaction acrosomique (27).

Il semblerait que la capacitation soit dépendante de la vitesse d'efflux du cholestérol. C'est pour cela que, chez l'étalon, la capacitation est plus longue de par la forte concentration en cholestérol (25).

## ii. Importance des glycocalyx

Les glycocalyx sont des structures composées de glycoprotéines et de polysides. Ils se lient aux glycoprotéines et à certains lipides présents du côté extracellulaire de la membrane plasmique du spermatozoïde. Ils jouent un rôle essentiel dans le contact entre l'ovocyte et le spermatozoïde grâce aux liaisons qu'ils peuvent former avec les éléments de la membrane spermatique lors de la capacitation.

Lors de la capacitation, une phosphorylation de la tyrosine des protéines membranaire de la tête et du flagelle des spermatozoïdes a lieu. Cela provoque des changements de conformation des protéines, qui contribuent à augmenter l'affinité de la membrane avec la zone pellucide de l'ovocyte, à l'hyperactivité transitoire du spermatozoïde et également à l'induction de la réaction de l'acrosome. Il semblerait que l'élimination des glycocalyx entraîne l'oligomérisation des protéines de la membrane entraînant ainsi les changements de conformation de ces protéines lors de

la capacitation (25). L'élimination des glycoalyx permet de rendre apparent les récepteurs spermatiques permettant la fixation à la zone pellucide par la protéine ZP3 (Zone pellucide 3) (24).

### iii. Rôle de la progestérone dans la capacitation

La progestérone induit un signal qui permet la libération du spermatozoïde du réservoir. Elle entraîne l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le spermatozoïde provoquant une hyperactivité de celui-ci, lui permettant de se libérer du réservoir. Plusieurs voies de signalisation interviennent dans la transduction du signal de la progestérone. On trouve la voie AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) qui est la première à avoir été mise en évidence.

L'AMPc active le PKA (protéine kinase A), ce qui a deux conséquences :

- à court terme, elle provoque l'hyperactivation du spermatozoïde, c'est à dire une augmentation de la fréquence du battement flagellaire et un mouvement rotatoire.
- à long terme, elle provoque la phosphorylation des Tyr-protéines, en particulier chez l'homme.

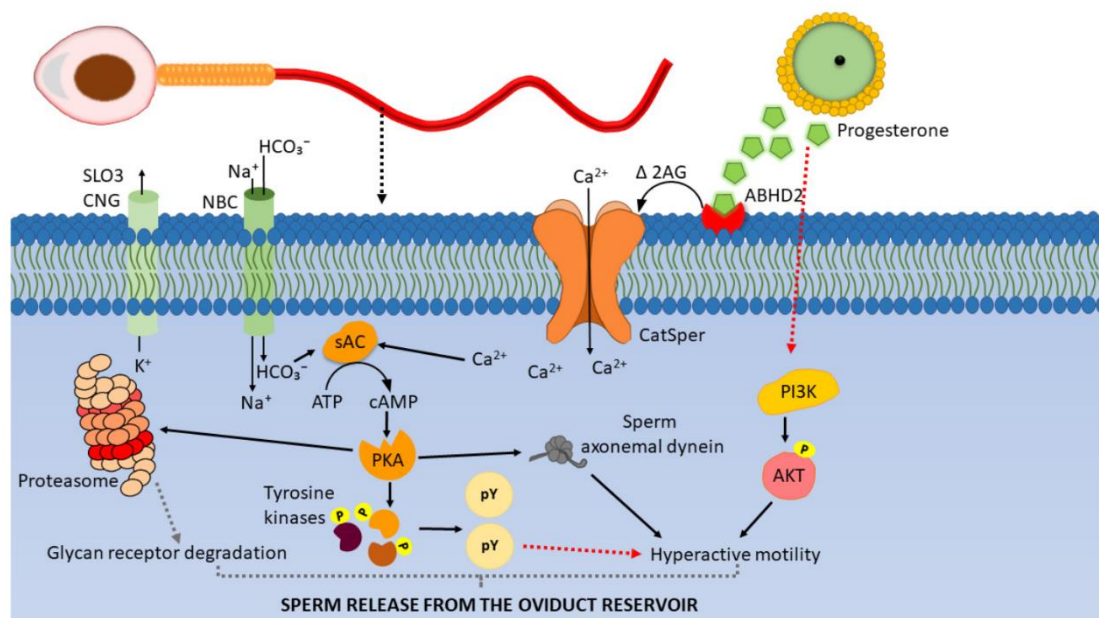
On pourra également citer l'axe PI3/Akt (Phosphoinositide 3-kinase /Protéine kinase B) qui semblerait réguler la phosphorylation des protéines (27).

La progestérone provient en majorité du corps jaune présent sur l'ovaire lors de l'ovulation. Il y a une circulation de cette progestérone jusqu'au réservoir de spermatozoïdes présent dans l'oviducte. Elle peut également être synthétisée par les cellules épithéliales de l'oviducte, comme chez la jument. Une autre source de progestérone semble être les cellules du cumulus présentes autour de l'ovocyte et formant le complexe cumulus-ovocyte (COC). Les COCs se trouvent au niveau de l'ampoule tandis que le réservoir se trouve au niveau de l'isthme. On suppose donc une action paracrine des COCs sur la libération du réservoir des spermatozoïdes.



Les spermatozoïdes non capités se fixent aux cellules de l'isthme par des protéines de liaison comme BSP-1, BSP-3 et BSP-5 (Binder of sperm-1/3/5) chez les bovins. L'élimination de ces BSP (Binder of sperm) par des composants du liquide de l'oviducte, ou leurs dégradations, favorisent l'efflux de cholestérol et donc initient la capacitation. La libération de spermatozoïdes induite par la progestérone montre des spermatozoïdes avec une faible concentration en protéines BSP-3 et BSP-5 et une augmentation de la fluidité membranaire. La progestérone induirait ainsi une perte de protéines membranaires provoquant la libération des spermatozoïdes des cellules de l'oviducte, bien que le mécanisme ne soit pas encore connu (*Figure 25*) (26).

D'autres facteurs semblent déclencher la capacitation via des mécanismes similaires à la progestérone, comme l'albumine, ou encore l'ultrafiltrat de sérum de cordon foetal.



*Figure 23 : Schéma des différents mécanismes à l'origine de la libération des spermatozoïdes du réservoir (Source : Mirihagalle et al. (26))*

*Légendes : Sperm release from the oviduct reservoir : Libération des spermatozoïdes du réservoir de l'oviducte ; Sperm axonemal dynein : Dynéine axonémale du spermatozoïde ; Hyperactive motility : Hyperactivation ; Glycan receptor degradation : Dégradation des récepteurs glycanes*

### 3. La fécondation *in vivo*

#### a. Fixation de l'ovocyte à la zone pellucide

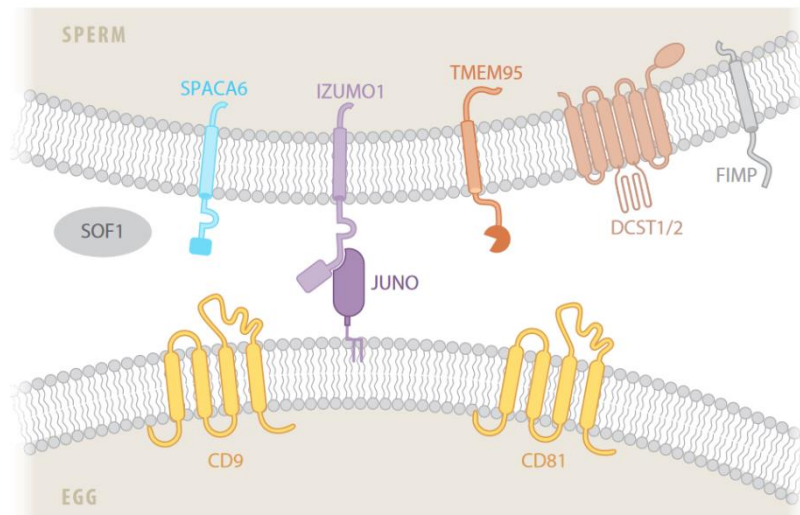
La reconnaissance de la zone pellucide se fait principalement grâce à une enzyme membranaire, la galactosyltransférase, qui se situe au niveau de la membrane plasmique de l'acrosome et qui se fixe à une glycoprotéine de la zone pellucide, la ZP3 chez la souris ou une homologie de la ZP3 chez les autres espèces (24).

La reconnaissance avec la zone pellucide entraîne la réaction acrosomique. Il y a alors une fusion ponctuelle de la membrane plasmique de la zone pellucide avec la membrane externe de l'acrosome. Cette fusion entraîne la libération des diverses enzymes de l'acrosome, notamment des protéases, des hyaluronidases, des phosphatases... qui permettent au spermatozoïde de pénétrer la zone pellucide (22). La progestérone joue un rôle important dans le déclenchement de la réaction acrosomique. *In vitro*, elle permet de la déclencher en se fixant sur des protéines membranaires, entraînant une augmentation de la concentration en  $Ca^{2+}$ . L'entrée du spermatozoïde à travers la zone pellucide laisse une trace oblique, nette, résultant de la poussée du spermatozoïde à travers la zone pellucide, plutôt que d'une digestion enzymatique (24).

#### b. Fusion des deux gamètes

Le spermatozoïde ayant subi la réaction acrosomique rejoint l'espace périvitellin, c'est-à-dire l'espace entre la membrane plasmique et la zone pellucide. La membrane plasmique du segment équatorial du spermatozoïde, et non pas la membrane interne de l'acrosome, fusionne avec la membrane de l'ovocyte. La fusion s'étend ensuite aux régions postérieures de la tête. L'acrosome se retrouve enfermé dans le cytoplasme cortical de l'ovocyte (22). La fusion des membranes se fait grâce à une famille de protéines, présentes sur la membrane plasmique interne de l'acrosome et sur la membrane de l'ovule, appelée ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease domain*) (24). D'autres protéines comme les tétraspanines semblent impliquées dans la reconnaissance et la fusion des gamètes. Actuellement, les protéines impliquées dans la reconnaissance entre le spermatozoïde et l'œuf sont au

nombre de neuf. Trois de ces protéines sont connues depuis longtemps : IZUMO1 (Izumo sperm-egg fusion 1), JUNO/IZUMO1R et CD9. Six autres ont ensuite été mises en évidence depuis 2020 (*Figure 26*) (28).



*Figure 24 : Schéma des différentes protéines impliquées dans l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovule (Source : Deneke et Pauli (28))*

La fusion des deux gamètes est l'étape la moins bien comprise actuellement dans la fécondation. Toutes les protéines impliquées dans la reconnaissance ne suffisent pas à induire la fusion entre l'ovocyte et le spermatozoïde. Il semblerait que d'autres mécanismes ou d'autres facteurs soient impliqués dans la fusion des deux gamètes (28).

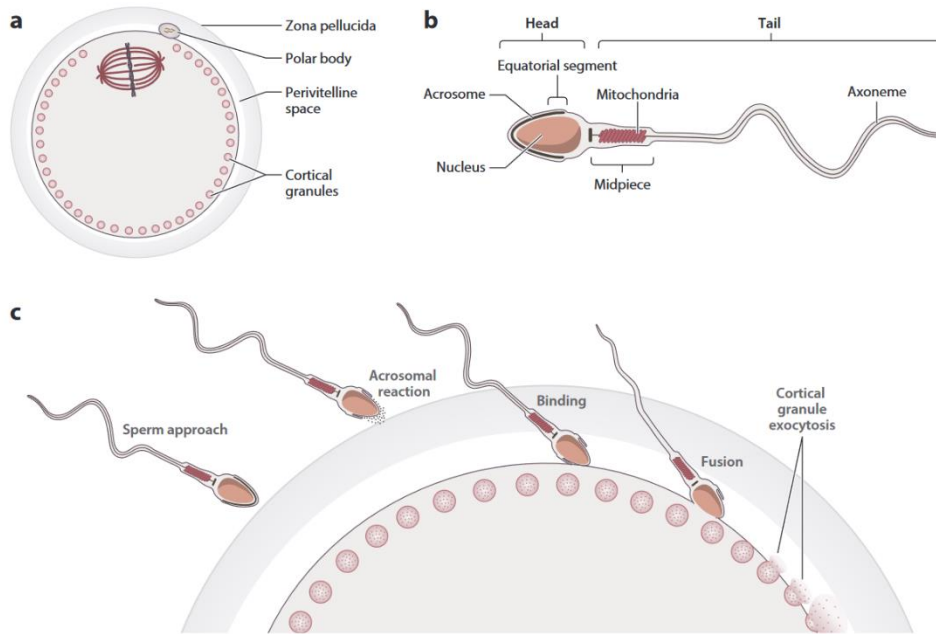


Figure 25 : Représentation schématique des gamètes et de la fécondation  
 (Source : Deneke et Pauli (28))

Légendes : Zona pellucida : Zone pellucide ; Polar body : Globule polaire ; Perivitelline space : Zone pellucide ; Cortical granules : Granules corticaux ; Head : Tête ; Tail : Queue ; Acrosome ; Nucleus : Noyau ; Equatorial segment : Segment équatorial ; Mitochondria : Mitochondrie ; Midpiece : Pièce intermédiaire ; Axoneme : Axonème ; Sperm approach : Approche du spermatozoïde ; Acrosomal reaction : Réaction acrosomique ; Binding : Liaison ; Fusion ; Cortical granule exocytosis : Exocytose des granules corticaux

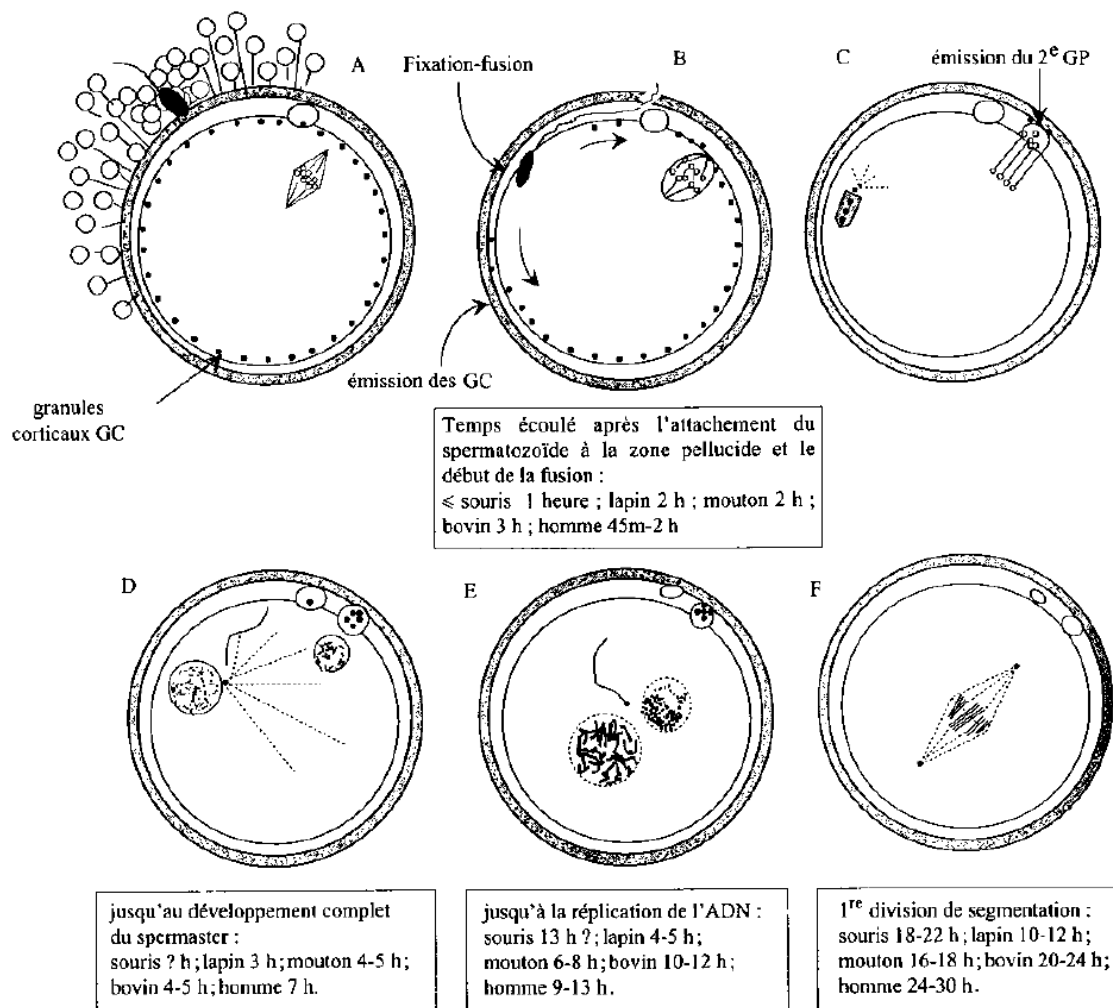
La fusion entraîne l'exocytose des granules corticaux de l'ovocyte. Cela commence au niveau de la zone de fusion, puis s'étend à tout l'ovocyte. La libération des enzymes des granules corticaux modifie la zone pellucide rendant la polyspermie impossible (Figure 27) (29).

### c. Initiation du cycle cellulaire

Le spermatozoïde pénètre dans le cortex de l'œuf. Son noyau perd son enveloppe. Les protamines sont remplacées par des histones, ce qui entraîne la décondensation des chromosomes. Une nouvelle enveloppe se forme autour des chromosomes à partir de vésicules du réticulum endoplasmique et forme le pronucléus mâle. Lors de la fusion, l'ovocyte reprend sa seconde division de maturation. Au cours

de la télophase II, un second globule polaire se forme avec l'un des deux groupes de chromosomes. L'autre groupe forme le pronucléus femelle. Les deux noyaux se répliquent séparément dans un premier temps, puis un cycle cellulaire commence. Au cours de la première division de segmentation, il n'y a jamais fusion des pronucléi. Durant la prophase, les chromosomes paternels et maternels restent séparés. Cette séparation continue jusqu'au noyau des blastomères des morulas (*Figure 28*) (24).

Concernant les organites cellulaires, les mitochondries du spermatozoïde sont détruites : il ne reste plus que les mitochondries maternelles qui s'agrègent autour des noyaux pour apporter l'énergie nécessaire à la réplication puis migrent aux deux pôles du fuseau de première division de segmentation.



*Figure 26 : Schéma des différentes étapes nucléaires du zygote au cours de la fécondation (Source : Modifié depuis Thibault (24))*



## Partie II : La fécondation *in vitro* : préparation des gamètes et technique de réalisation

La fécondation *in vitro* se réalise en laboratoire dans des milieux de cultures spécifiques. Elle consiste en la réunion, dans ces milieux, d'un gamète femelle et d'un gamète mâle pour former un embryon. Les étapes de la FIV sont les mêmes que la fécondation *in vivo*, c'est-à-dire la maturation de l'ovocyte, la capacitation des spermatozoïdes et la fécondation des gamètes. C'est une technique complexe qui tente de se rapprocher des conditions de fécondation *in vivo*.

### A. La maturation ovocytaire *in vitro*

La maturation *in vitro* est actuellement au cœur des recherches pour améliorer les rendements de la fécondation *in vitro*. C'est une méthode qui nécessite une connaissance poussée de la maturation pour pouvoir améliorer les milieux de cultures des ovocytes.

#### 1. La collecte des ovocytes

La première étape dans la réalisation de la maturation ovocytaire *in vitro* est le prélèvement des ovocytes. Ils peuvent être prélevés soit sur femelles mortes soit sur femelles vivantes par plusieurs méthodes. Le prélèvement *ex-vivo* a pour objectif de récolter le plus possible d'ovocytes tout en préservant le bien-être de l'animal, ainsi que l'intégrité de l'appareil reproducteur de la vache ou de la jument.

##### a. Chez la vache

##### i. Récolte des ovocytes *in vivo*

La première technique, développée dans les années 80 pour récolter les ovocytes *in vivo* chez la vache, consistait en une laparoscopie par voie paralombaire.

Cette procédure n'est pas optimale d'un point de vue des donneuses, étant donné la présence de tissus cicatriciels et d'adhérences au niveau des ovaires, mais

elle possède un rendement du nombre d'ovocytes récupérés en fonction du nombre de follicules ponctionnés de 77 % (30).

D'autres techniques moins invasives sont apparues par la suite en utilisant l'échographie. La première, décrite par Callesen et al., en 1987, consistait en une ponction par voie transabdominale au niveau de la fosse paralombaire. C'est une méthode facile à réaliser, mais qui nécessite deux opérateurs, et semble moins sécuritaire que la méthode OPU. Le rendement d'ovocytes récupérés selon le nombre de follicules ponctionnés est de 42 %.

L'OPU (Ovum Pick Up) a été mis en place par Pieterse et al. (1988) en s'appuyant sur la méthode de prélèvement des ovocytes utilisée chez la femme. La ponction se fait sous contrôle échographique par voie transvaginale avec une sonde munie d'une aiguille de prélèvement. Il est important, lors de la récolte des ovocytes, de rester propre pour éviter tout risque d'infection et de contamination du prélèvement. La première étape consiste donc à nettoyer et à désinfecter la région vulvaire de la vache.

L'opération se fait sur une femelle tranquilisée par voie intraveineuse et par voie épidurale. L'opérateur introduit la sonde par voie vaginale jusqu'au col utérin. Par voie transrectale, le manipulateur ramène les ovaires contre la tête de la sonde échographique. Lorsque le follicule à ponctionner est correctement placé dans l'alignement de l'aiguille de ponction, l'aiguille est plantée à travers le vagin dans le follicule. Le liquide folliculaire est aspiré par l'aiguille et un curetage du follicule est réalisé à l'aide de l'aiguille, à la fin du prélèvement. Chaque follicule est ponctionné de manière individuelle selon la même technique. Les ovocytes sont récupérés dans des tubes contenant un milieu de culture spécifique (31).

L'OPU est une méthode qui peut être réalisée plusieurs fois au cours d'un même cycle chez la donneuse et ne nécessite pas de réponse à la stimulation ovarienne. C'est donc un avantage majeur au transfert d'embryon qui nécessite des donneuses répondant au traitement de superovulation.

Le rendement de cette méthode est variable selon les auteurs (de 19 à 70 % de rendement). En moyenne, un rendement de 50 % peut être espéré avec cette méthode.



ii. Récolte des ovocytes par ovariectomie ou en *post mortem*

Les ovocytes peuvent également être récupérés lors d'une ovariectomie ou en *post mortem* sur des vaches à l'abattoir.

En 2019, Barberino et al. (32) ont essayé de définir les conditions optimales de transport des ovaires lors de prélèvement *post mortem*. La température joue un rôle important dans la conservation des follicules. Il semblerait que des températures basses (4 à 10 °C) permettraient de conserver entre 24 à 48 heures les follicules sans altération de leur contenu. Mais, la plupart du temps, l'acheminement des ovaires au laboratoire se fait de manière rapide et il n'est donc pas toujours nécessaire de conserver les ovaires sous couvert du froid. Un transport de moins de 4 heures à des températures variant de 22 °C à 32 °C permet de conserver la viabilité des ovocytes pour la maturation et pour la fécondation *in vitro*.

Concernant le prélèvement des ovocytes, plusieurs méthodes ont été expérimentées et les avis divergent quant à la technique idéale à adopter.

Les follicules visibles à la surface de l'ovaire (3 à 5 mm de diamètre) peuvent, dans un premier temps, être ponctionnés à l'aide d'une aiguille. Pour récupérer les ovocytes présents dans les follicules du tissu ovarien, Iwasaki et al. (33) recommande l'utilisation d'une râpe à bords fins pour récupérer le plus possible des ovocytes de type A, c'est-à-dire des ovocytes ayant une *corona radiata* et une zone pellucide intactes. Grâce à la ponction, environ 5,3 ovocytes de type A en moyenne sont récupérés par ovaire, et, grâce à la dissection, 6,3 ovocytes de type A par ovaire, soit une moyenne de 10 ovocytes capables de faire une maturation et une fécondation *in vitro*.

Une autre étude (34) compare deux méthodes : la première méthode, où seulement les follicules visibles à la surface de l'ovaire sont ponctionnés, et une autre méthode, où l'ovaire entier est découpé à l'aide de 10 lames de rasoirs espacées de 2 mm. On obtient 84,6 % d'ovocytes de rang A grâce à la méthode des rasoirs, comparé à 41,3 % pour la ponction/aspiration, soit une moyenne de 53,6 ovocytes de rang A grâce à la méthode de dissection (5 fois plus que l'étude précédente).

Malgré la grande différence d'ovocytes récupérés selon les nombreuses études qui existent, il semblerait qu'une méthode de dissection de l'ovaire permet une récupération optimum du nombre d'ovocytes.

b. Chez la jument

i. Récolte des ovocytes *in vivo*

Chez la jument, la collecte d'ovocytes *in vivo* peut se faire par ponction par le flanc. C'est une méthode sensiblement identique à la ponction transabdominale par la fosse para-lombaire réalisée chez la vache. Un trocart est placé au niveau de la fosse sous-lombaire, et un manipulateur place l'ovaire en regard du trocart par voie transrectale. Le deuxième manipulateur ponctionne le follicule à l'aide d'une aiguille et le rince plusieurs fois à l'aide de PBS (Phosphates Buffered Saline) hépariné. Cette méthode ne permet pas de visualiser le follicule et ne permet de ponctionner que des follicules de grandes tailles. De plus c'est une méthode assez invasive qui peut engendrer des adhérences et augmente le risque de péritonite étant donnée l'ouverture de la cavité abdominale (35).

L'OPU chez la jument est arrivée après l'OPU chez la vache et est devenue la technique de référence. La technique et le matériel sont les mêmes. L'aspiration se fait donc de manière échoguidée par voie transvaginale avec une donneuse sédaturée par voie générale, ainsi que par épidurale. On procède à l'aspiration de follicules immatures ayant un diamètre de 10 et 20 mm, ce qui permet de récolter plus d'ovocytes. Comme chez la vache, un grattage de la paroi folliculaire est ensuite réalisé mais il est ici un peu plus poussé car les cellules du cumulus sont fortement attachées à la paroi du follicule (36). Par ailleurs, les laboratoires français ne permettent actuellement pas de réaliser la fécondation *in vitro* chez la jument (les résultats actuels, sur la FIV chez la jument, sont décevants), les ovocytes doivent être envoyés dans un laboratoire italien. Cet envoi se fait à une température contrôlée entre 20 et 25 °C avec un papier sanitaire indiquant l'origine des ovocytes et le nom de l'étalon pour la fécondation (37).

Comme chez la vache, l'OPU peut être répété chez une même jument en ne diminuant pas sa fertilité et en limitant les adhérences ovocytaires contrairement à la ponction à l'aveugle par les flancs.

Le rendement de cette méthode peut être optimisé en ponctionnant durant l'œstrus. En effet, une moyenne de 3,2 ovocytes par ponction peut être espérée lorsque la jument est en œstrus. En ponctionnant la jument deux fois au cours d'un même cycle, une fois en fin de phase folliculaire et une autre fois en fin de phase lutéale, il est possible d'obtenir 8,9 ovocytes. Il est également envisageable de ponctionner des juments gestantes sans pour autant perturber celle-ci et obtenir en moyenne 15 ovocytes par jument en réalisant 4 ponctions entre 40 et 75 jours de gestation (38).

## ii. Récolte des ovocytes en *post mortem*

Il s'agit ici principalement de prélèvements d'ovocytes sur des ovaires issus d'abattoir. Les ovaires sont prélevés puis acheminés au laboratoire dans une solution de NaCl (Chlorure de Sodium) à 0,9 % entre 25 et 35 °C. Il est préférable que les ovaires arrivent au laboratoire dans les 6 heures suivant la mort de la jument. Les ovocytes sont prélevés à l'aide d'une aiguille 18 G (Gauge) et d'un système d'aspiration. Pour augmenter le nombre d'ovocytes, il est possible de découper finement l'ovaire dans un second temps pour accéder aux follicules plus profonds. Une fois que les follicules ont été incisés, leur paroi est grattée, soit à l'aide d'une curette, soit avec le biseau de l'aiguille, lors de la ponction pour permettre de récupérer les ovocytes qui sont ancrés par leur *cumulus oophorus* épais et trapu. En moyenne, 3 à 5 ovocytes par ovaire peuvent être obtenus, ce qui est assez peu comparé aux méthodes *in vivo* (39).

## 2. La sélection des ovocytes

### a. Chez la vache

#### i. Classification des ovocytes

Après prélèvement des ovocytes par les différentes techniques évoquées, le manipulateur doit déterminer la qualité des ovocytes par plusieurs critères morphologiques à l'aide du microscope optique. L'International Embryo Transfer Society (IETS) propose une classification en quatre classes des Cumulus Oocyte Complex (COC) :

- Classe 1 : COC d'aspect transparent. Le cumulus est compact. L'ooplasm est homogène.
- Classe 2 : Les deux premiers critères sont les mêmes que la classe 1 avec ici un ooplasm d'aspect irrégulier.
- Classe 3 : Le COC est plus sombre, le cumulus est peu compact et l'ooplasm ovocytaire est sombre et irrégulier.
- Classe 4 : Le cumulus est expansé voire absent.

#### ii. Importance des cellules du cumulus

Les cellules du cumulus jouent un rôle important pour le développement de l'ovocyte. Un des premiers rôles du cumulus est l'apport de métabolites et de nutriments nécessaires au passage de l'ovocyte de la prophase I à la métaphase II. Un des premiers signes morphologiques de la réussite de la maturation de l'ovocyte est l'expansion de la masse du cumulus autour de l'ovocyte. De plus, il existe de nombreuses interactions génomiques nécessaires à la maturation des ovocytes entre le cumulus et l'ovocyte. L'absence des cellules du cumulus entraîne une importante diminution des transcriptions des différents types cellulaires (40).

### iii. Importance de la sélection des follicules

La réussite de la maturation *in vivo* d'un ovocyte dépend également du follicule dans lequel il a été ponctionné. En effet, lors de ponctions de follicules ayant un diamètre supérieur à 6 mm, le nombre d'ovocytes de bonne qualité est augmenté (70,2 % d'ovocytes de bonne qualité avec des follicules ayant un diamètre supérieur à 6 mm contre 46,8 % pour un diamètre inférieur). Les ovocytes sont considérés de bonne qualité lorsqu'ils possèdent plusieurs couches de cellules du cumulus. De plus, les ovocytes issus de follicules ayant un diamètre supérieur à 6mm sont plus aptes à atteindre le stade blastocyste que les ovocytes issus de follicules de diamètre inférieur (65,9 % avec un diamètre de follicule supérieur à 6 mm et 39,5 % avec un diamètre de follicule inférieur) (41).

Une autre étude montre que la ponction du follicule à un certain moment de la vague folliculaire entraîne une variation dans l'obtention du nombre de blastocystes. Il serait ainsi préférable de ponctionner les follicules au moment du 2<sup>ème</sup> jour ou du 5<sup>ème</sup> jour de la vague folliculaire pour obtenir un nombre plus important d'ovocytes qui passeraient au stade de blastocyste (42).

Selon Blondin et al. (43), il serait également préférable, lors d'un traitement de superovulation à la FSH (avec un bolus de 25 mg), de prélever les ovocytes 48 heures après cette injection (dans cette étude, les prélèvements étaient réalisés après abattage de la femelle). Pour aller plus loin, une étude montre une obtention de 80 % de blastocystes à partir d'ovocytes prélevés par OPU lors d'un traitement de superovulation de six injections de FSH (soit un total de 300 mg) à 12 heures d'intervalle, et d'une injection de LH. La dernière injection de FSH et de LH était réalisée respectivement 48 heures et 6 heures avant la ponction des follicules.

## b. Chez la jument

### i. Classification des ovocytes

Comme chez la vache, les ovocytes sont classés selon les quatre catégories vues précédemment. Le degré d'expansion de l'ovocyte est en corrélation avec son degré de maturation nucléaire. Un ovocyte immature se trouve dans la catégorie 1 des COCs compacts.

### ii. La sélection des follicules

Deux possibilités doivent être envisagées lors de la ponction des follicules. Le follicule dominant, dit follicule mature, donnant un ovocyte mature bloqué en métaphase II, peut être ponctionné, ainsi que les follicules immatures, donnant des ovocytes immatures, qui feront la maturation *in vitro*. Chez la jument, contrairement à la vache, la fécondation *in vitro* donne de très mauvais résultats et la méthode de l'ICSI (Injection Intracytoplasmique de spermatozoïde) est, de nos jours, préférée d'où la récupération et le transport d'ovocytes immatures (44).

L'aspiration du follicule dominant présente néanmoins certains avantages. C'est une aspiration plus facilement réalisable par un manipulateur peu expérimenté, étant donné que le follicule est de taille supérieure à un follicule immature. De plus, il est plus facile de récupérer l'ovocyte grâce aux hormones qui favorise le détachement du COC. Néanmoins, cela nécessite un suivi rigoureux de la jument dans ses cycles avec une induction de l'ovulation à l'aide de hCG/GnRH (Human chorionic gonadotropin/ Gonadotropin Releasing Hormone). Le moment idéal pour ponctionner le follicule serait de 24 heures après l'injection d'hCG (Human chorionic gonadotropin) et de desloréline (45).

De plus, un des avantages majeurs de l'utilisation des follicules immatures est de pouvoir ponctionner la jument durant la période de non-reproduction. Il a même été montré que, pour une même jument, le nombre de follicules immatures était plus important durant les mois de décembre et de janvier que lors de la période de reproduction (46). Il est cependant beaucoup plus difficile de récupérer les ovocytes

en ponctionnant les follicules immatures à cause des cellules du cumulus qui sont encore bien accrochées à la paroi du follicule.

### 3. Réalisation de la maturation *in vitro*

#### a. Les milieux

La maturation *in vitro* est une étape clé dans l'obtention d'embryons. Le premier défi à réaliser, après la ponction des ovocytes, est l'obtention d'un milieu de culture permettant une maturation des ovocytes. De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer les différents facteurs et composants du milieu permettant une bonne maturation, et plusieurs milieux semblent convenir pour le bon développement des ovocytes.

#### i. Chez la vache

Plusieurs milieux ont été testés pour optimiser la maturation de l'ovocyte. Deux milieux sont capables à eux seuls de permettre la maturation de l'ovocyte : le milieu TCM-199 (TCM-199) et le fluide d'oviducte synthétique (SOF).

Le milieu TCM-199 est un milieu synthétique, tamponné au bicarbonate, et possède des sels minéraux, du glucose, des glutamines, des acides aminés et des vitamines. Un milieu TCM-199 additionné de 10 % de sérum de bovin fœtal, de 5 µg/mL de pLH (porcine luteinizing hormone), de 1 µg/mL de pFSH (porcine follicle-stimulating hormone), et de 1 µg/mL de 17 bêta-oestradiol, permet une augmentation de 20 à 25 % du nombre d'ovocytes atteignant le stade de blastocytes. Selon cette étude, le succès de ce milieu réside principalement dans l'addition du sérum plutôt que dans l'addition des hormones qui, à elles seules, ne permettent pas d'améliorer la qualité de la maturation. Ce milieu est un milieu de référence assez fréquemment utilisé, et ce encore de nos jours (47).

#### *Facteurs de croissance*

Certains facteurs de croissance ont montré des effets similaires au sérum, notamment l'EGF (epidermal growth factor ou facteur de croissance épidermique), en stimulant l'expansion des cellules du cumulus (48). De plus, il a été mis en évidence

que l'EGF avait une action sur la maturation nucléaire et la maturation cytoplasmique de l'ovocyte en présence ou non des cellules du cumulus, d'où son utilisation dans les milieux de maturation (18). D'autres facteurs permettent d'améliorer la maturation des ovocytes, notamment l'insulin like growth factor-1 (IGF-1) ou la transforming growth factor- $\alpha$  ou  $\beta$  ou IGF-2 (49).

### *Prostaglandine E2*

D'autres facteurs sont actuellement étudiés, notamment pour améliorer la cryotolérance des embryons. En effet, la cryoconservation devient de plus en plus fréquente, notamment pour la conservation des ressources génétiques, mais également pour le transport des embryons lors de transfert embryonnaire. L'ajout de sérum de veau fœtal, bien qu'apportant de nombreux nutriments nécessaires à la maturation, dégrade la cryotolérance des embryons au stade de blastocyte. Selon une étude de Charpigny et al. (50), l'ajout de prostaglandine E2 dans le milieu de maturation permet d'obtenir une maturation des ovocytes équivalente à un milieu contenant du sérum et permet un taux de survie des embryons meilleur après 24, 48 ou 72 heures post-décongélation (respectivement 89 %, 73 % et 70 % contre 64 %, 58 % et 55 % pour un milieu additionné de sérum). Néanmoins, d'autres études ont mis en évidence que l'utilisation de prostaglandine E2 réduirait le nombre d'ovocytes au stade de métaphase II en perturbant la ségrégation des chromosomes (51).

### *FSH et LH*

Actuellement il n'y a pas de consensus sur les conditions optimales de culture des ovocytes lors du processus de maturation.

L'utilisation de FSH semble indispensable pour la maturation, mais, chez l'homme et la souris, il a été montré que l'ajout de FSH à un taux de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  causerait des anomalies chromosomiques. Il faut donc trouver un équilibre entre la dose nécessaire à la maturation et la dose qui provoquerait des anomalies chromosomiques. Les COCs pourraient être mis en culture de manière individuelle, ce qui diminuerait la quantité de FSH, mais cela décroît le taux de métaphase II à cause du manque d'interactions entre les COCs (51).

La LH est utilisée pour permettre l'expansion des cellules du cumulus, qui est un marqueur de la réussite de la maturation. Or, des COCs avec une expansion



complète semblerait avoir une maturation nucléaire plus faible que des COCs avec une expansion intermédiaire, et la LH ne semble pas augmenter le nombre d'ovocytes fécondés après maturation *in vitro*.

### *Acides aminés*

Les acides aminés sont utilisés comme source d'énergie lors de la maturation nucléaire. Il n'est actuellement pas démontré si certains acides aminés sont nécessaires pour la maturation des ovocytes bovins. L'amélioration du milieu de la maturation *in vitro* résulte aujourd'hui dans la compréhension de l'importance des différents constituants des milieux utilisés et, notamment dans l'importance des différents acides aminés dans la maturation *in vitro*. Il semblerait que l'ajout de 12 acides aminés essentiels (L-Arginine, L-Cystine, L-Histidine, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Lysine, L-Méthionine, L-Phénylalanine, L-Thréonine, L-Tryptophane, L-Tyrosine, L-Valine), de L-Glutamine et de L-Proline à un milieu donnerait les mêmes résultats dans les taux de maturation que le milieu TCM-199 seul (52).

Le mode de culture précédent est un mode de culture isolé des ovocytes. Des cellules folliculaires différenciées peuvent être ajoutées à ces milieux et donc un système de coculture peut être ainsi utilisé pour se rapprocher au maximum des conditions de maturation *in vivo*. Des cellules de la granulosa sont rajoutées au milieu de culture, ce qui permet d'améliorer le taux de maturation des ovocytes, mais également le taux de fécondation de ces ovocytes (53).

#### ii. Chez la jument

Chez la jument, les milieux disponibles pour la maturation sont dérivés principalement des milieux utilisés pour la maturation *in vitro* chez les bovins. Ces milieux ont été retravaillés pour s'adapter à la jument. Actuellement, le milieu le plus utilisé est le milieu TCM-199, comme chez la vache, auquel a été rajouté du sérum de veau fœtal, des hormones (FSH, LH, 17 $\beta$ -œstradiol) et des facteurs de croissances (EGF, WNT (Wingless)). Les milieux de coculture en revanche sont peu utilisés chez la jument car ils n'apportent que peu de bénéfice à la qualité de la maturation *in vitro* (39).

D'autres milieux ont également été testés, notamment le milieu B2 ou encore le milieu Ham's F10. De plus, de nombreux auteurs rajoutent un antibiotique au milieu de maturation comme de la gentamicine (54), de la pénicilline (55)...

Des facteurs de croissance sont à l'étude pour améliorer la maturation *in vitro* chez la jument, comme, par exemple, les protéines WNTs, qui lorsqu'elles sont ajoutées à un milieu de maturation (par exemple TCM-199) permettent l'obtention d'un taux plus élevé d'expansion des COCs et donc d'améliorer la maturation *in vitro* (56). L'IGF-1 permet aussi l'amélioration de la maturation nucléaire mais sans présence de sérum de bovin fœtal. Il améliore également la maturation cytoplasmique en présence d'un milieu contenant des hormones et du sérum (57). L'EGF, comme chez la vache, permet, par ailleurs, l'amélioration de la maturation nucléaire (58).

#### b. Les conditions de cultures

L'importance du milieu de culture dans la maturation *in vitro*, chez la vache et chez la jument, a été décrite dans le paragraphe précédent. Il reste primordial de continuer les recherches à ce sujet pour optimiser la maturation et pour augmenter le nombre d'embryons obtenu, étant donné le coût important que représente la fécondation *in vitro*. Néanmoins, le milieu n'est pas le seul paramètre à prendre en compte. Les conditions de cultures sont aussi à envisager. Chez la vache et chez la jument, la maturation *in vitro* se fait dans des microgouttes de milieux, recouvertes d'une huile minérale permettant ainsi de fixer les paramètres d'ambiance.

#### i. Chez la vache

##### *Température*

La température est un paramètre essentiel pour la maturation *in vitro*. Une étude a été réalisée pour mettre en évidence la température optimale pour la maturation chez la vache. Les ovocytes étaient issus d'ovaires prélevés sur des animaux à l'abattoir et maturés sur un milieu TCM-199, supplémenté de sérum fœtal de bovin, de FSH, de LH et de prostaglandine E2. La réussite de la maturation de l'ovocyte a été déterminée

à l'aide de l'extrusion du premier globule polaire au bout de 22 heures de maturation. Il a ainsi été montré qu'un plus grand pourcentage d'ovocytes maturés est obtenu avec une température de maturation de 37,5 °C (55,5 % des ovocytes) ou de 38,5 °C (62,2 % des ovocytes) (59).

De plus, une élévation de température pendant la maturation entraîne un défaut de développement des ovocytes, une diminution du nombre de blastocytes et d'embryons, et alterne l'expression des gènes au cours du développement (60).

### *Conditions atmosphériques*

Les conditions atmosphériques ont un impact direct sur la maturation nucléaire des ovocytes. Il a été coutume de cultiver les ovocytes durant la maturation sous condition atmosphérique à une teneur en O<sub>2</sub> (Dioxygène) de 20 %. Or la teneur en O<sub>2</sub> du tractus reproductif varie entre 1,5 et 8 %. Il se pourrait donc que cette teneur en O<sub>2</sub> ne soit pas optimale pour la maturation. Or, plusieurs études montrent un meilleur taux de maturation pour des teneur en O<sub>2</sub> proche de 20 % (61). Mais ces études ne semblent pas prendre en compte la teneur en glucose du milieu et la relation étroite entre glucose et O<sub>2</sub> dans le métabolisme des cellules du cumulus. Une étude de Whitty et al. (62) compare l'effet de la teneur en glucose du milieu avec la teneur en O<sub>2</sub> de l'atmosphère. Un taux de maturation acceptable a été obtenu pour une teneur en O<sub>2</sub> de 7 % mais il a été montré que, pour cette teneur, les COCs étaient plus sensibles à la disponibilité en glucose du milieu que pour une teneur en O<sub>2</sub> de 20 %. Il est donc possible de cultiver les ovocytes dans un milieu avec une quantité de glucose de 5,6 mM et une teneur en O<sub>2</sub> de 7 %. L'avantage que l'on peut tirer d'un milieu pauvre en O<sub>2</sub> serait de diminuer les espèces réactives de l'oxygène produites lors des réactions d'oxydoréduction des mitochondries, du réticulum endoplasmique et du peroxysome notamment l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dioxyde de dihydrogène).

Concernant la teneur en CO<sub>2</sub> (Dioxyde de carbone), il semble qu'une teneur de 5 % en CO<sub>2</sub> soit usuellement utilisée pour maintenir le pH à une valeur physiologique entre 7,2 et 7,4 (20).

### *Durée de la maturation*

La durée de maturation la plus répandue chez la vache dans les différentes études est de 24 heures (60),(63). Néanmoins, une étude de Park et al. (64) montre que la maturation *in vitro* serait optimale pour une durée de 18 heures en mesurant le développement des embryons dans les premiers stades. Selon cette étude 30 % de blastocystes sont obtenus à 18 heures de maturation contre 13,8 % à 24 heures de maturation.

#### ii. Chez la jument

### *Conditions atmosphériques*

Concernant la teneur en CO<sub>2</sub>, une teneur à 5 % de CO<sub>2</sub> dans le milieu de maturation est utilisée pour maintenir un pH physiologique (51) (8). Aucune étude ne permet cependant de trancher sur la teneur en O<sub>2</sub> du milieu de maturation.

### *Température*

Il ne semble pas y avoir d'étude ayant comparé l'effet de la température sur le taux de maturation de ovocytes. Néanmoins, il semblerait qu'une température variant de 38,2 °C à 38,5 °C soit le plus couramment utilisée pour la maturation *in vitro*. D'autres auteurs rapportent même une température de maturation de 39 °C (39).

### *Durée de la maturation*

Le temps de maturation est corrélé au degré de maturation des ovocytes ponctionnés. Selon si le COC est expansé ou compact, le temps de maturation varie de 24 heures ou de 30 à 32 heures, suivant les auteurs. Il est néanmoins admis qu'un temps de maturation de 30 heures est nécessaire pour une maturation optimale sous atmosphère contrôlée. Au-delà de ce temps d'incubation, il ne semble pas y avoir une amélioration de la maturation (39).

### c. Les étapes de la maturation *in vitro*

Les étapes de la maturation *in vitro* sont les mêmes que celles de la maturation *in vivo*. Trois types de maturations sont distinguables : cytoplasmique, membranaire et nucléaire. La finalité de ces étapes conduit à l'obtention d'un ovocyte ayant réalisé la méiose, jusqu'à l'étape de la métaphase II et à l'extraction du globule polaire. Le succès de la maturation *in vitro* est évalué sur trois critères : la maturation cytoplasmique, la maturation nucléaire et l'expansion des cellules du cumulus.

#### i. Chez la vache

Chez la vache, la chronologie des étapes lors de la maturation *in vitro* a été décrite en 1986 par Xu et al. (65). Néanmoins, la maturation cytoplasmique reste encore difficile à évaluer.

##### *La maturation cytoplasmique*

Les étapes sont les mêmes que pour la maturation *in vivo*, mais les conditions de cultures et les incertitudes de certains paramètres tendent à diminuer la qualité de la maturation cytoplasmique *in vitro*. Contrairement à la maturation *in vivo*, le cortex de l'ovocyte ne se retrouve pas dépourvu d'organites. Des grappes ou des clusters de granules corticaux sont retrouvés alors que pour la maturation *in vivo* les granules sont tous alignés au niveau de la membrane plasmique. De plus, les gouttelettes lipidiques ne sont associées avec un réticulum endoplasmique que pour un quart des ovocytes, contrairement au modèle *in vivo* où toutes les gouttelettes sont associées au réticulum (66).

##### *La maturation nucléaire*

Au début de la maturation, les ovocytes ont une enveloppe nucléaire distincte, la chromatine se trouvant autour du nucléole. Au cours de la maturation, l'enveloppe nucléaire disparaît et les chromatines se condensent pour donner les chromosomes. Puis, les différentes étapes de la méiose se produisent pour donner un ovocyte en

métaphase II et l'extraction du globule polaire. Ces étapes ont été décrites en fixant les ovocytes à différents stades et en les colorant à l'aide d'acéto-orcéine (65).

### *L'expansion du cumulus*

Au début de la maturation, le cumulus est compact et entoure étroitement l'ovocyte. Des prolongements des cellules du cumulus pénètrent la zone pellucide et établissent des jonctions gap avec l'ovocyte. Au cours de la maturation, une diminution de ces jonctions est visible dès les trois premières heures de mise en culture. Il a été mis en évidence que la diminution de ces jonctions gap était liée à la maturation nucléaire de l'ovocyte. L'expansion des cellules du cumulus se termine au bout de 18 heures de maturation *in vitro*. Puis, au bout de 40 heures de maturation, de nouvelles jonctions se forment avec l'ovocyte, ce qui entraîne sa dégénérescence (67).

#### ii. Chez la jument

Pour évaluer la maturation cytoplasmique et la maturation nucléaire, il est nécessaire de dénuder l'ovocyte des cellules du cumulus en appliquant 80 UI/mL de hyaluronidase. Comme pour la vache, la maturation cytoplasmique n'est pas encore évaluée avec précision lors de la maturation *in vitro*.

### *La maturation cytoplasmique*

C'est le moment de la maturation où il y a accumulation de protéines et d'ARNm dans l'ovocyte (35). Il est difficile d'évaluer la maturation cytoplasmique étant donné le peu d'études publiées. Il semblerait que cette maturation puisse être évaluée en localisant les granules corticaux. Néanmoins, le critère le plus fiable de la maturation cytoplasmique reste actuellement la capacité de l'ovocyte à être fécondé (68).

### *La maturation nucléaire*

Elle correspond à la reprise de la méiose et au développement jusqu'au stade de métaphase II de l'ovocyte. Cette étape peut être évaluée grâce à la microscopie à fluorescence en appliquant une coloration à l'ADN qui permet de localiser des

chromosomes métaphasiques à la périphérie de l'ovocyte mais également la présence du globule polaire dans l'espace périvitellin (35). Plusieurs sondes fluorescentes sont utilisées pour évaluer la maturation nucléaire : des sondes perméables, comme Hoechst 33342 (HO), et des sondes imperméables, comme l'iodure de propidium (PI). Une étude de Pereira et al. (69) compare deux protocoles de coloration, à base des deux sondes vues précédemment, pour essayer d'optimiser la visualisation des chromosomes dans l'ovocyte. Après maturation *in vitro*, les ovocytes sont dénudés, puis fixés à pH 7 dans une solution contenant 4 % de formol. Les ovocytes sont ensuite colorés soit avec 10 µg/mL de HO et 50 µg/mL de PI pendant 10 minutes (Protocole 1) soit avec 2.5 µg/mL de HO et 50 µg/mL de PI pendant 5 minutes (Protocole 2). Les ovocytes sont ensuite classés selon leur grade de visibilité. Les résultats montrent 52,17 % d'ovocytes de degré de visibilité exceptionnel obtenus avec le protocole 2 contre 19,04 % avec le protocole 1. Ce protocole permet d'améliorer l'évaluation de la maturation nucléaire en améliorant la visibilité de l'ADN dans les ovocytes.

### *L'expansion du cumulus*

Comme vu précédemment, les cellules du cumulus jouent un rôle majeur dans la maturation de l'ovocyte en apportant des nutriments et des métabolites essentiels à l'ovocyte, notamment le pyruvate. C'est donc en déterminant l'expansion des COCs que la maturation de l'ovocyte peut être évaluée. C'est un critère pratique puisque facile à évaluer à la loupe binoculaire (70).

## B. Préparation des spermatozoïdes

### 1. La collecte des spermatozoïdes

Les techniques de collecte aujourd'hui utilisées ont été développées principalement pour la réalisation de l'insémination artificielle. Pour la réalisation de la fécondation *in vitro*, les échantillons de spermes sont les mêmes que pour l'insémination artificielle. Les techniques de collecte ne diffèrent pas entre le taureau et l'étalon, bien que l'électroéjaculation ne soit pas utilisée chez l'étalon pour des raisons de sécurité.

Les méthodes les plus utilisées de nos jours sont la collecte à l'aide d'un vagin artificiel ou l'électroéjaculation chez le taureau. D'autres méthodes existent mais sont obsolètes, comme, par exemple, la collecte par massage transrectal des glandes accessoires chez le taureau, où la semence est très souvent contaminée par de l'urine et des bactéries ou la récupération de semence dans l'utérus de la jument après l'accouplement (mais le risque de transmission de maladie est élevé, la qualité de la semence est diminuée puisque contaminée par les sécrétions vaginales et le risque de blessures pour l'étalon comme pour la jument n'est pas négligeable) (71).

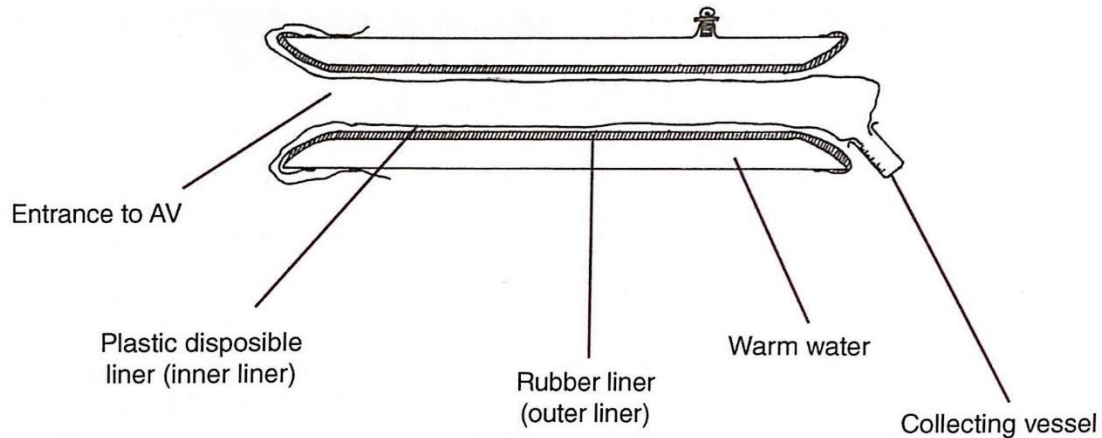
#### a. Le vagin artificiel

C'est la méthode la plus utilisée chez la vache et chez la jument. Elle est assez simple de réalisation, avec un matériel simple à commander et à utiliser. La semence collectée est généralement de bonne qualité (71).

Il existe de très nombreux modèles de vagins artificiels, qui ne seront pas détaillés ici (*Figure 29*). Le premier vagin artificiel a été conçu en Russie au 20<sup>ème</sup> siècle. Le principe est d'avoir un tube cylindrique avec une lumière stérile se terminant par un récipient qui collecte le sperme. L'enveloppe externe est solide avec deux revêtements en caoutchouc, un extérieur et un intérieur. Le revêtement extérieur et l'enveloppe forment un tube rempli d'eau chaude, ce qui permet d'appliquer une certaine pression sur le pénis. Chez le taureau, la température appliquée par le vagin artificiel doit être autour de 42 °C à 44 °C et, chez l'étalon, autour de 44 °C à 48 °C. Il est important que la température, lors de la collection, ne descende pas au-dessous de 38°C pour ne pas détériorer la qualité de la semence.

Cette méthode nécessite un conditionnement du taureau ou de l'étalon à la monte. Au départ, il faudra s'aider d'une femelle en œstrus pour les conditionner. Puis, par la suite, seul le mannequin pourra être utilisé pour la collecte. C'est une méthode qui est donc sécurisante pour le mâle, qui ne risque pas de se faire taper par la femelle, pour la femelle, qui ne risque pas des blessures lors de la monte, et pour les manipulateurs, qui ne se retrouvent pas entre le mâle et la femelle (72).





*Figure 27 : Schéma d'un vagin artificiel (Source : Davis Morel (72))*

Légendes : *Entrance to AV : Entrée du vagin artificiel ; Plastic disposable liner (inner liner) : Revêtement plastique jetable (revêtement intérieur) ; Rubber liner (outer liner) : Revêtement en caoutchouc (revêtement extérieur) ; Warm water : Eau chaude ; Collecting vessel : Récipient de collecte*

#### b. L'électroéjaculation

Comme vu précédemment, l'électroéjaculation n'est pas utilisée chez l'étalon car la méthode est peu satisfaisante et trop dangereuse pour cette espèce.

Elle consiste en l'introduction d'une sonde de stimulation par voie transrectale. Le rectum doit être au préalable vidé et la sonde est appliquée sur son plancher, contre les glandes annexes. Cette sonde délivre des électrostimulations cycliques, avec des temps de repos entre chaque stimulation. La stimulation provoque l'érection, puis l'éjaculation du taureau. Il faut donc un opérateur qui maintient la sonde dans le rectum et un opérateur qui collecte la semence. La stimulation électrique provoque au départ l'excrétion de liquide séminal avant l'éjaculation. Il faut que la collecte se fasse au moment où le liquide spermatique devient laiteux pour obtenir une meilleure concentration des spermatozoïdes.

Cette méthode semble moins efficace que la collecte à l'aide d'un vagin artificiel. L'efficacité de collecte est plus faible que pour le vagin artificiel et la qualité de la semence est diminuée. C'est une méthode qui reste intéressante pour les taureaux qui sont trop lourds ou qui sont incapables de monter sur le mannequin (73).

## 2. La sélection des spermatozoïdes

### a. Chez le taureau

Cette phase de sélection est très importante, notamment pour la réalisation de la fécondation *in vitro* chez la vache. Pour ce faire, la qualité de la semence récoltée est évaluée avant de la mettre en contact avec l'ovocyte.

La sélection des spermatozoïdes peut se faire à l'aide d'un gradient. Les spermatozoïdes étant sensibles à la température, il faut veiller à ce que la température des milieux utilisés soit de 38,5 °C. Le gradient se fait à l'aide de milieux tels que PureSperm®. C'est un milieu composé de particules de silice, colloïdales, recouvertes de silane, en suspension dans une solution saline physiologique (74). Le principe est donc de réaliser des superpositions de couches de concentrations différentes du milieu pour récupérer les spermatozoïdes. La couche inférieure est concentrée à 80 % et la couche supérieure à 40 %. Les paillettes de sperme sont décongelées, puis placées au-dessus du gradient. Le tube, contenant le sperme avec le gradient, est centrifugé pendant 10 minutes. Le culot est récupéré, puis lavé et centrifugé 5 minutes dans une solution de lavage, comme la solution HEPES-TALP® (Hepes-buffered Tyrode's albumin-lactate-pyruvate). Le culot est ensuite récupéré par élimination du surnageant (75). Ce gradient permet de sélectionner des spermatozoïdes motiles avec une morphologie normale.

L'intérêt également de l'utilisation du gradient est d'obtenir une meilleure concentration de spermatozoïdes aptes à pouvoir féconder l'ovule.

### b. Chez l'étalon

Chez l'étalon, comme il est difficile, à l'heure actuelle, d'obtenir des embryons par co-incubation des spermatozoïdes avec l'ovule, la technique de l'ICSI, qui ne sera pas décrite ici, est souvent préférée et ne nécessite ainsi que la sélection d'un spermatozoïde motile. Pour s'assurer de la qualité du spermatozoïde introduit, une technique de séparation des spermatozoïdes par gradient ou par « swim-up » est utilisée (76). La technique de « swim-up » consiste à sélectionner les spermatozoïdes sur leur motilité et sur leur capacité à nager à travers le liquide séminal. Le sperme est

déposé sur un milieu de culture puis mis en incubation pendant 60 minutes à 37 °C. Les spermatozoïdes nagent jusqu'au milieu de culture. Le surnageant est ensuite retiré et les spermatozoïdes sont récupérés sur le milieu. Cette technique est simple dans sa réalisation mais ne convient pas pour des étalons infertiles (77).

### 3. La capacitation *in vitro*

Les étapes de la capacitation *in vitro* sont les mêmes que celles *in vivo*. Chez l'étalon, la capacitation *in vitro* est peu utilisée à cause du grand nombre d'échecs obtenus pour la réalisation de la fécondation *in vitro* par co-incubation.

#### a. Chez le taureau

Les bovins ont été pris comme modèle de référence pour les différentes techniques de reproduction. Selon plusieurs études, il semble plus facile de réaliser la capacitation *in vitro* en utilisant de la semence congelée. Cela permet d'avoir un stock de semence mais également de pouvoir concentrer plus facilement les spermatozoïdes pour la réalisation de la fécondation *in vitro* par co-incubation.

##### i. Température et paramètres d'ambiance

Les spermatozoïdes sont très sensibles au changement de température. C'est donc un paramètre essentiel à maîtriser. *In vivo*, la capacitation se produit dans l'appareil génital de la vache à une température proche de 39 °C. Une étude a comparé la température d'incubation des spermatozoïdes sur la réussite de la capacitation. Cela a été jugé selon la réalisation de la réaction acrosomique. Il semblerait qu'une température entre 38 °C et 39 °C soit optimale pour la réalisation de la capacitation. Au-delà de 40 °C, les spermatozoïdes ne sont plus viables tandis qu'en dessous de 35 °C, la viabilité est conservée mais la réaction acrosomique est diminuée (78).

Les paramètres d'ambiance peuvent dépendre du milieu utilisé pour la capacitation. Selon le milieu, on pourra réaliser la capacitation sous condition atmosphérique normale (avec le milieu TL-HEPES ou Sp-TALP-H (Sperm- Tyrode's

albumin-lactate-pyruvate-Heparin)). Avec d'autres milieux, il est nécessaire d'avoir une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> pour pouvoir maintenir un pH acceptable. Ces milieux contiennent des bicarbonates pour maintenir le pH. Le temps d'incubation varie également suivant les milieux, mais il semblerait que le temps d'incubation soit de 4 heures pour un milieu seul de capacitation. Si l'héparine est rajoutée au milieu de fécondation, l'incubation varie entre 8 et 10 heures pour permettre la réalisation de la capacitation et de la fécondation (79).

## ii. Les milieux pour la capacitation

Plusieurs milieux ont été testés pour optimiser la capacitation. Les premiers milieux datent des années 70, comme le milieu High Ionic Strength (HIS), qui induit une capacitation suffisante, mais non optimale, pour la fécondation. Ce milieu est issu de l'addition de NaCl au milieu Bracket-Oliphant (BO), qui est encore utilisé de nos jours. Un milieu à base de liquide folliculaire ou des sécrétions des oviductes permet la réalisation de la capacitation. Pour optimiser ces milieux, le temps d'incubation peut être augmenté ou de la caféine, et/ou du calcium ionophore, peu(ven)t être ajouté(s) au milieu BO.

Depuis les années 2000, la connaissance de certains mécanismes de la capacitation ont permis une nette avancée dans la composition des milieux. Les milieux additionnés d'héparine sont actuellement les plus utilisés (*Tableau 1*).

### *L'héparine*

Ce composant est surtout responsable de la capacitation, et moins de la réaction acrosomique. L'héparine se fixe sur des protéines qui interagissent avec le cholestérol et les phospholipides de la membrane plasmique. Cette liaison entraîne une perte de lectines responsable de l'efflux de cholestérol. De plus, la liaison de l'héparine aux protéines entraîne un changement de pH intracellulaire du spermatozoïde, une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et une augmentation de l'activité de l'adénylate cyclase. Tous ces mécanismes contribuent à la réalisation de la capacitation. Il faut en revanche induire la réaction acrosomique, soit avec de la lysophosphatidylcholine soit avec des protéines de la zone pellucide.

### *Le glucose*

Le glucose bloque l'induction de la capacitation par l'héparine, en acidifiant le milieu de culture lors de la glycolyse. C'est pourquoi certains milieux à base d'héparine étaient inefficaces, car ils étaient supplémentés en glucose.

### *Le calcium*

C'est un élément nécessaire, avec l'héparine, notamment dans les deux premières heures d'incubation, puisqu'il augmente la réaction acrosomique.

### *Le bicarbonate*

Le bicarbonate doit être rajouté à une dose de 10 mmol/L dans le milieu pour stimuler la synthèse d'AMPc.

### *Le BSA (bovine serum albumin)*

L'importance de cet élément n'est pas encore connue, mais il semblerait favoriser la réaction acrosomique en réponse à la lysophosphatidylcholine ou aux protéines de la zone pellucide.

### *Autres composants*

L'utilisation de semence congelée entraîne une diminution de la motilité des spermatozoïdes. Cette motilité peut être stimulée en utilisant de l'hypotaurine et de l'épinéphrine dans le milieu de capacitation (80).

Actuellement, deux méthodes sont utilisées pour la réalisation de la capacitation :

- Un milieu BO avec l'ajout d'héparine et d'AMPc.

L'ajout d'héparine directement dans le milieu de fécondation comme avec le milieu IVF-TALP (*In vitro* fertilization- Tyrode's albumin-lactate-pyruvate) (75).

Tableau 1 : Compositions des différents milieux de capacitation

(Source : Parrish (79))

Component	BO <sup>b</sup>	Sp-TALP <sup>c</sup>	Sp-TALP-H <sup>d</sup>	TL-HEPES <sup>e</sup>	Fert-TALP <sup>f</sup>
NaCl (mmol/L)	112.00	100.00	87.00	114.00	114.00
KCl (mmol/L)	4.02	3.10	3.10	3.10	3.20
CaCl <sub>2</sub> (mmol/L)	2.25	2.00	2.00	2.00	2.00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mmol/L)	0.83	0.30	0.30	0.30	0.30
MgCl <sub>2</sub> (mmol/L)	0.52	0.40	0.40	0.50	0.50
NaHCO <sub>3</sub> (mmol/L)	37.00	25.00	10.00	2.00	25.00
HEPES (mmol/L)	—	10.00	40.00	10.00	—
Glucose (mmol/L)	13.90	0	0	0	0
Pyruvic acid (mmol/L)	1.25	1.00	1.00	0.20	0.20
Lactic acid (mmol/L)	—	21.60	21.60	10.00	10.00
BSA (mg/mL)	10	6	6	3	6
Penicillamine (μmol/L)	0-20	—	—	—	20
Hypotaurine (μmol/L)	0-10	—	—	—	10
Epinephrine (μmol/L)	0-1	—	—	—	1
Sodium					
Metabisulfite (μmol/L)	? <sup>g</sup>	—	—	—	2

#### b. Chez l'étalon

Seulement deux poulains sont nés grâce à la co-incubation et les résultats de cette méthode ne sont pas répétables. Plusieurs agents capacitants ont été mis à l'essai tel que le calcium, la caféine, l'héparine, la procaïne, le fluide folliculaire pré-ovulatoire et la progestérone, mais aucun n'a permis de donner un poulain. Le problème réside dans la capacité du spermatozoïde à traverser la zone pellucide et à rentrer dans l'ovocyte. Des chercheurs ont essayé d'exposer ces structures à l'acide, mais cela n'a pas permis d'obtenir de bons résultats (81). Par ailleurs, des facteurs non spécifiques de l'étalon sont essentiels pour la capacitation des spermatozoïdes, comme les bicarbonates, le calcium et l'albumine. La capacitation ne peut pas avoir lieu si ces trois composants sont absents du milieu de culture. Mais leur présence ne permet cependant pas d'accomplir la capacitation dans son intégralité (82).

#### *La procaïne*

L'utilisation de procaïne dans le traitement des spermatozoïdes a permis d'obtenir des taux de fécondation de 61 % (contre 0 à 33 % en moyenne). La procaïne induit l'hyperactivation de la motilité des spermatozoïdes. Malheureusement, elle ne permet pas d'augmenter le taux d'obtention de blastocystes ou de poulains. Il a été démontré que la procaïne induisait également le clivage cytoplasmique de l'ovocyte en l'absence de spermatozoïdes, d'où l'augmentation du taux de fécondation. Cette découverte

nécessite de redéfinir la notion de fécondation puisqu'ici le simple fait d'obtenir le clivage du zygote/ovocyte n'induit pas la fécondation des deux gamètes (83).

Les recherches actuelles se basent sur l'étude d'un modèle d'oviducte équin pour reproduire *in vitro* ce qui se passent *in vivo*. En effet, *in vivo* les spermatozoïdes se lient aux cellules de l'ampoule, réalisent la capacitation, pour ensuite s'en détacher et féconder l'ovule. Il semblerait que cette liaison permette aux spermatozoïdes une exposition plus longue aux sécrétions de l'oviducte contenant des facteurs capacitants. *In vitro*, il semble donc que cette liaison ne soit pas obligatoire, étant donné que le temps de contact, entre les spermatozoïdes et le milieu, est contrôlé. Les facteurs exacts, ainsi que les effets qu'ils peuvent avoir sur la capacitation et la fécondation, ne sont pas bien compris de nos jours. De plus, il semble que des facteurs de capacitation se trouve également dans le liquide folliculaire expulsé lors de l'ovulation (83).

### C. Obtention de l'embryon par fécondation *in vitro*

#### 1. La fécondation *in vitro* chez la vache

La fécondation *in vitro* chez la vache est réalisée suivant une co-incubation de l'ovocyte mature avec les spermatozoïdes. Cette technique est simple dans sa réalisation. L'ICSI n'est pas réalisée étant donné le bon rendement de la fécondation par co-incubation. La réussite de la fécondation se mesure au taux de clivage des ovocytes au bout de 48 heures d'incubation. Des taux de clivage allant de 70 % à 85 % sont obtenus (84).

La réussite de cette fécondation repose principalement sur la réussite de la maturation et de la capacitation. Après maturation, les COCs sont lavés plusieurs fois (par exemple dans un milieu Hepes-TALP supplémenté de BSA (85)), puis placés dans le milieu de fécondation. Les spermatozoïdes, après la capacitation, sont remis en suspension dans le milieu de fécondation, comptés dans une chambre d'hémocytomètre, puis dilués pour arriver à une concentration moyenne de  $2 \times 10^6$  spermatozoïdes par millilitre (85).

Les étapes de la fécondation *in vitro* sont les mêmes que pour la fécondation *in vivo*.

#### a. Les milieux

Les milieux utilisés pour la fécondation sont assez proches des milieux utilisés pour la capacitation, comme le milieu BO avec l'ajout d'héparine et/ou de caféine ou encore le milieu TALP (Tyrode's albumin-lactate-pyruvate) complétement, soit avec de l'héparine, et/ou du BSA (H-TALP (86) ou IVF-TALP (75)).

Des milieux de fécondation à la phosphatase alcaline, avec l'ajout de facteurs de capacitation comme l'héparine, peuvent également être utilisés. L'utilisation de ce milieu semble montrer un taux d'obtention de blastocytes inférieur aux autres milieux ci-dessus (entre 35 % et 50 %).

Le milieu TCM-199 tamponné aux bicarbonates est également employé pour la fécondation et a l'avantage de permettre également le développement du blastocyste pendant les 48 heures nécessaires pour évaluer le taux de clivage des ovocytes (87).

Une des difficultés rencontrées lors de la fécondation *in vitro* est la production des espèces réactives de l'oxygène. La production de ces espèces diminue le taux de fécondation mais contribue également à diminuer le développement de l'embryon. L'ajout d'un antioxydant, comme la cystéamine ou l'acide ascorbique, permet de limiter ce stress oxydatif et ainsi d'augmenter le taux de fécondation et la production de blastocyste (88).

#### b. Autres paramètres

##### *Nombres de spermatozoïdes*

Dans cette technique, le nombre de spermatozoïdes est essentiel pour la fécondation. Le minimum de spermatozoïdes requis par ovocyte n'est pas réellement établi à cause d'une large variation entre les taureaux et entre les races. Une concentration de 1 à 2 millions de spermatozoïdes par millilitre est communément utilisée lors de la fécondation *in vitro*. Pour des concentrations faibles (inférieures à  $0,5 \times 10^6/\text{mL}$ ), il est possible d'optimiser la réussite de la fécondation en sélectionnant des taureaux avec une haute fertilité, en ajustant la concentration des facteurs capacitants ou en augmentant la densité des ovocytes (84).



## *Paramètres d'ambiances*

Les paramètres d'ambiances actuellement sont les mêmes pour toutes les études sur la fécondation *in vitro* chez la vache. Etant donné que les ovocytes et les spermatozoïdes sont sensibles aux variations de températures, il n'est pas nécessaire de modifier la température entre la maturation, la capacitation et la fécondation. La température pour la fécondation oscille ainsi entre 38,5 °C et 39 °C (85).

Pour les conditions atmosphériques, là encore toutes les études convergent vers un même protocole soit une atmosphère à 5 % en CO<sub>2</sub>, saturée en humidité (86). Les temps d'incubations varient entre 16 heures et 22 heures pour la fécondation (89).

## 2. La fécondation *in vitro* chez la jument

La fécondation *in vitro* chez la jument n'est pas satisfaisante. En effet, depuis l'obtention de deux poulains en 1991, aucun protocole acceptable de FIV n'a abouti. Le taux de fécondation varie entre 0 % et 33 % et aucun des embryons produits est arrivé à terme. Les échecs sont principalement dus à l'incapacité d'obtenir une capacitation et une activation correcte des spermatozoïdes, qui n'arrivent pas à pénétrer la zone pellucide de l'ovocyte. Le forage ou le retrait partiel de la zone pellucide aide à la pénétration du spermatozoïde, mais est associé à un taux plus élevé de polyspermie, ce qui est problématique chez la jument. Une meilleure compréhension des facteurs capacitants, excrétés par l'oviducte, est nécessaire pour espérer obtenir de meilleurs résultats. Par ailleurs, la maturation *in vitro* ne semble pas être le facteur limitant de la fécondation *in vitro*. En effet, il a été démontré que la FIV n'était pas satisfaisante, même en utilisant un ovocyte mûré *in vivo*. De plus, l'introduction d'un ovocyte, mûré *in vitro*, dans l'oviducte d'une jument inséminée, aboutit à un taux de développement embryonnaire similaire à une ovulation spontanée (83).

De plus, il a été montré que certains facteurs de capacitation, comme la procaine, induisait le clivage de l'ovocyte sans pénétration du spermatozoïde. Pour permettre l'amélioration de la FIV, il faut donc évaluer la fécondation sur d'autres critères comme la pénétration du spermatozoïde (en visualisant la partie intermédiaire ou la queue du spermatozoïde) et l'extrusion du second globule polaire.

Enfin, le pH nécessaire à la capacitation chez l'étalon semble différer des autres espèces. Il a été mis en évidence qu'un pH alcalin (7,6-7,8) dans l'oviducte était important pour la capacitation. Mais ce pH est néfaste à la réaction acrosomique et à la fécondation *in vitro* (83).

### 3. La fécondation assistée chez la jument

En raison des mauvais résultats obtenus lors de la fécondation par co-incubation des gamètes mâle et femelle, l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) est la méthode *in vitro* la plus utilisée chez la jument. Le premier « poulain ICSI » est né en 1996. A cette époque le taux de blastocystes obtenus était seulement de 15 %. Cette méthode consiste en l'injection d'un seul spermatozoïde dans le cytoplasme de l'ovocyte. Elle permet de s'affranchir de certaines étapes telles que la capacitation des spermatozoïdes, la réaction acrosomale, l'accrochage et la pénétration de la zone pellucide, ainsi que la fusion du spermatozoïde avec l'ovule. Des spermatozoïdes immotiles prélevés en *post mortem* ou des noyaux de spermatozoïdes isolés peuvent être utilisés (81).

#### a. Les milieux

Les spermatozoïdes sont sélectionnés selon le même principe que pour la capacitation. Etant donné qu'il n'est pas nécessaire de procéder à la capacitation, ils ne sont pas conservés dans le même milieu. On trouve le milieu Earle's balanced salt solution (EBSS), supplémenté d'albumine de sérum humain (90) ou de BSA avec de la gentamicine (91), qui permet de maintenir le spermatozoïde en vie le temps de réaliser l'ICSI. Pour pouvoir maintenir le spermatozoïde, le milieu doit également contenir 6 à 10 % de polyvinylpyrrolidone (PVP) ce qui permet de réduire sa motilité (36).

Le milieu utilisé pour la réalisation de l'ICSI et post-ICSI est essentiel pour la survie des embryons. De nombreux milieux ont été utilisés, notamment les milieux pour la maturation *in vitro* comme le milieu TCM-199, le liquide folliculaire d'un follicule pré-ovulatoire, le sérum sanguin d'une jument en œstrus... Néanmoins le milieu actuel ayant le plus de succès est le milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient

Mixture F-12 Ham (DMEM/F-12) additionné de sérum de veau fœtal à 10 %. C'est un milieu avec une haute teneur en glucose, en acides aminés et en vitamines (92), mais sans protéines, lipides ou facteurs de croissances, d'où l'ajout de sérum (81).

#### b. Paramètres d'ambiances

Il est important de maintenir un pH physiologique lors de l'ICSI pour garantir un bon résultat. Avec le milieu DMEM/F12 on doit conserver une atmosphère à 5 % de CO<sub>2</sub> pour garantir un pH physiologique.

Certaines études préfèrent réaliser l'ICSI à la température de la pièce pour limiter le risque de lyse des membranes tandis que d'autres recommandent l'ICSI à 37°C. Cependant, il a été montré que le taux de clivage des embryons n'était pas affecté par la température lors de l'ICSI. En revanche, la température est essentielle pour le développement des embryons. Il faudra donc les placer sous une température de 38,5 °C pour garantir leur développement (36).

#### c. Technique de réalisation

Un spermatozoïde viable est sélectionné pour la réalisation de l'ICSI. Différentes méthodes existent comme la méthode « swim-up », le gradient de densité ou un lavage simple de l'échantillon. Le spermatozoïde peut être exposé à des pH élevés durant le processus pour stimuler la fécondation et augmenter la production d'embryons.

Les cellules du cumulus sont retirées de l'ovocyte mûré *in vitro* en utilisant de l'hyaluronidase ou encore de la trypsine (36). Les ovocytes matures sont identifiés grâce à la présence du premier globule polaire.

Les deux gamètes sont placés dans le milieu de réalisation de l'ICSI sous une goutte d'huile. Le spermatozoïde est immobilisé en lui coupant la queue et placé dans la pipette d'injection. L'ICSI seul ne permet pas l'augmentation du calcium intracellulaire nécessaire à l'activation de l'ovocyte ce qui diminue le taux de clivage des ovocytes (36). En revanche, en utilisant l'ICSI avec la méthode PiezoDrill®, le taux de formation de blastocystes augmente (entre 25 et 42 %) (81). Le PiezoDrill® génère

des impulsions mécaniques ultrasoniques le long de la pipette jusqu'à provoquer la vibration de l'embout. Cette vibration permet de déstabiliser la membrane de l'ovocyte et facilite le perçage de la zone pellucide et la pénétration de l'ovocyte (93). L'ICSI se réalise sous micromanipulation à l'aide de deux pipettes, une large (120 à 140  $\mu\text{m}$  de diamètre) pour maintenir l'ovocyte et une fine (7 à 8  $\mu\text{m}$  de diamètre), pour réaliser l'injection, équipée d'un PiezoDrill<sup>®</sup>. L'ovocyte est placé sur la pipette la plus large et bloqué sur celle-ci par aspiration. Le globule polaire est placé soit à 12 heures, soit à 6 heures, et la partie la plus claire du cytoplasme de l'ovocyte se trouve au plus près de la pipette de maintien. Une partie de la zone pellucide est retirée à l'aide de la pipette d'injection et du système PiezoDrill<sup>®</sup>. Le spermatozoïde est avancé à la pointe de la pipette d'injection. La pipette d'injection est avancée dans le cytoplasme de l'ovocyte, à l'endroit où une partie de la zone pellucide a été retirée, et la tête du spermatozoïde est injectée dans le cytoplasme (*Figure 30*) (94).

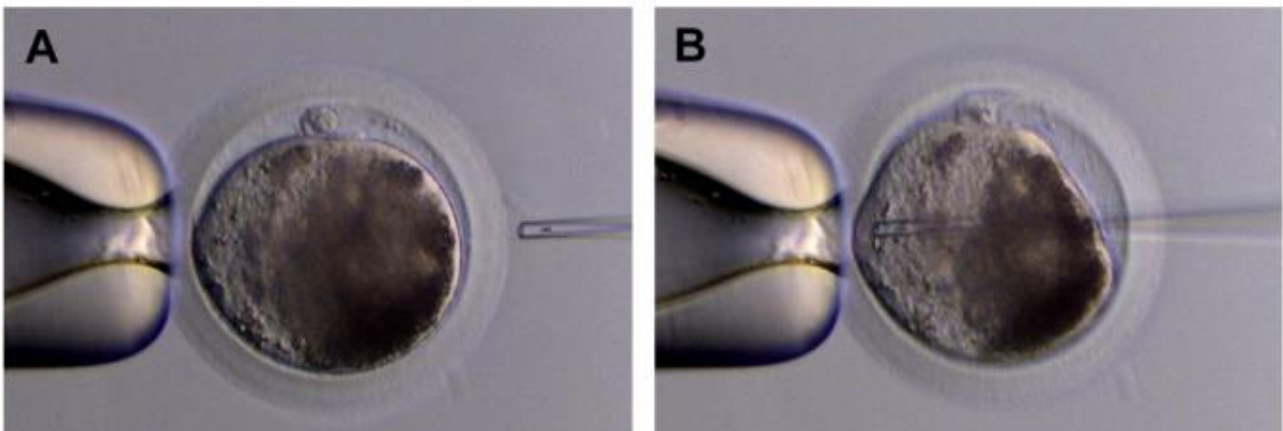


Figure 28 : Réalisation de l'ICSI par micromanipulation. A : mis en place de l'ovocyte ; B : injection du spermatozoïde dans l'ovocyte  
(Source : Rader et al. (94))

L'ovocyte fécondé n'est pas immédiatement placé dans le milieu de culture. Il est placé pendant une à deux heures dans le milieu de fécondation, pour que la membrane l'ovocyte se referme (36). Durant ces heures d'attentes, il est important de maintenir un pH constant pour ne pas nuire à la formation du blastocyte. Il faut donc utiliser un milieu tamponné comme le milieu CZB-H (Chatot-Ziomek-Bavister-Hepes) (95).

# Partie III : Développement et devenir des embryons obtenus par fécondation *in vitro*

## A. Développement et transfert des embryons

### 1. Développement des embryons en milieu de culture

Chez la vache, étant donné que l'on pratique la fécondation *in vitro* par co-incubation, il est nécessaire, avant de mettre les zygotes en culture, de laver plusieurs fois le zygote pour retirer les cellules du cumulus ainsi que les débris spermatiques. Le plus souvent le rinçage se fait à l'aide d'un milieu SOF qui garantit l'intégrité du zygote (75). Initialement, le développement embryonnaire se réalisait *in vivo* dans l'oviducte de différentes espèces comme la souris, le mouton ou encore la vache. Les premiers milieux développés pour le développement embryonnaire *in vitro* contenaient des sérums animaux. Mais l'expansion mondiale des techniques de reproduction, ainsi que les différentes importations ou exportations d'embryons à travers les pays, ont conduit au développement de milieux n'utilisant pas de sérums animaux. Ces nouvelles restrictions permettent de limiter le risque de transmission de certains pathogènes à travers les milieux de culture (84).

#### a. Les systèmes de culture des embryons

Plusieurs méthodes de culture des embryons existent. Certains auteurs utilisent un seul milieu pour toute la durée de culture d'un embryon. Ce système de milieu monoculture permet de n'utiliser qu'une seule formulation pour le milieu des embryons. De plus, cela permet de laisser à l'embryon « le choix » de ses nutriments pour son développement. D'autres développent un intérêt pour les « milieux séquentiels ». Plusieurs milieux sont utilisés au cours de la culture des embryons pour s'adapter le plus possible aux besoins des embryons, durant les huit jours de culture. Cela concerne particulièrement les besoins en glucose, puisque les embryons acquièrent progressivement la capacité à métaboliser le glucose au cours du développement (84). La question du glucose dans les milieux est centrale, surtout chez la jument. Les milieux utilisés chez la jument ont, en effet, souvent une forte teneur en glucose. Or, certains milieux commerciaux utilisés pour le développement embryonnaire d'autres

espèces, notamment l'homme, possèdent une très faible concentration en glucose dans les premiers jours de culture. Chez les autres espèces, l'exposition des embryons à des fortes concentrations en glucose dès les premiers jours est considérée comme non physiologique et préjudiciable pour le développement de l'embryon. Néanmoins, il n'a pas été démontré de différences, dans le nombre de blastocystes obtenus après culture dans un milieu initialement à faible teneur en glucose ou dans un milieu à forte teneur en glucose chez le cheval (96). De plus, il ne faut pas oublier que la culture d'embryons dans plusieurs milieux nécessite des manipulations supplémentaires des embryons et que les paramètres peuvent varier d'un milieu à l'autre, ce qui rend la culture plus complexe dans sa réalisation (84).

#### b. Culture dans un milieu unique

Chez la vache, les milieux TCM-199, TALP et SOF sont utilisés lors de système de culture dans un milieu unique. Ces milieux sont souvent modifiés avec l'ajout d'une solution tampon, pour la régulation du pH, d'acides aminés essentiels et non essentiels, d'antibiotiques, de vitamines, de glucose ou de fructose...

Chez la vache, le milieu le plus utilisé est le milieu SOF. Ce milieu et d'autres milieux comme le CR1, BECM (milieu de culture d'embryons bovins), KSOM (milieu d'optimisation simplex de potassium) ou encore IVD101 (milieu, sans sérum, améliorés) peuvent être utilisés selon deux méthodes : ils peuvent ne pas être renouvelés au cours du développement des embryons ou renouvelés toutes les 48 heures pour prévenir l'accumulation de substances toxiques et renouveler les nutriments essentiels (84).

Chez le cheval, le milieu DMEM/F12 est le milieu le plus utilisé dans les deux systèmes de cultures possibles. En milieu unique, des cultures sur des milieux SOF modifiés, comme chez la vache, peuvent être utilisés, mais aussi des milieux qui proviennent de la production d'embryons chez l'homme, comme le milieu Global® ou Sage™ (96).

### c. Culture dans plusieurs milieux

Chez la vache, plusieurs présentations de ce système avec plusieurs milieux comme Early-SOF/Late-SOF, SOFC1/SOFC2, G1<sup>TM</sup>/G2<sup>TM</sup> ou CDM-1/CDM-2 (chemically defined medium-1/2) sont utilisés. Ces combinaisons se font en réalité à l'aide d'un seul milieu, dans lequel sont rajoutés ou substitués certains composants. L'emploi de deux milieux totalement différents pour la culture des embryons peut aussi être employé, comme la combinaison des milieux KSOM/SOF (84).

Chez le cheval, ce système à plusieurs cultures est de plus en plus utilisé, le milieu DMEM/F12 étant toujours le plus fréquemment employé. Un autre milieu est souvent utilisé en début de culture pour les premiers stades de développement de l'embryon. Ce milieu initial peut être le milieu Global<sup>®</sup> ou encore le milieu SOF modifié. Ce sont des milieux pauvres en glucose, d'où leur utilisation dans les premiers stades de développement, pour ne pas plonger l'embryon dans un milieu trop riche en glucose dès le début. Un second milieu, mixant le milieu Global<sup>®</sup> avec le milieu DMEM/F12 (96), est aussi employé. Le milieu peut également être modifié au cours du développement de l'embryon, comme avec le milieu Global<sup>®</sup> qui peut être additionné de glucose au bout du 5<sup>ème</sup> jour de culture pour subvenir aux besoins de l'embryon (94).

### d. Les paramètres d'ambiances

Ce sont des paramètres essentiels. Il n'y a pas de différences fondamentales entre les différentes études, ni entre les différentes espèces. La température de culture varie entre 38,2 °C (54) et 38,5 °C (75).

Pour les conditions atmosphériques, la culture des embryons se fait sous une faible concentration en oxygène proche des conditions *in vivo*. Certains laboratoires réalisaient la culture des embryons avec une atmosphère à 20 % d'oxygène, mais il a été montré qu'une culture des embryons sous une atmosphère à 5 % en oxygène permettait l'obtention d'un meilleur taux de blastocystes, de gestation, d'implantation embryonnaire et de naissance vivante (97). Pour le reste de la composition atmosphérique, on trouve une concentration à 5 % en dioxyde de carbone et à 90 % en dioxyde d'azote.

## 2. Evaluation des embryons

La réussite de la fécondation, ainsi que du développement de l'embryon, s'évalue au cours des huit jours nécessaires à la culture des embryons. Au troisième jour, le taux de clivage des zygotes est estimé, et, au huitième jour, le nombre de blastocystes est évalué (75). L'évaluation de la qualité des embryons est la même chez la vache et chez la jument.

Le diamètre des blastocystes est mesuré à l'aide d'un microscope à lumière inversée. Puis, les blastocystes sont classés selon trois grades, d'après les critères morphologiques de l'IETS(89) :

- Le grade I correspond aux blastocystes de bonne qualité avec un blastocœle remplissant l'entièreté du blastocyste, une masse compacte de cellules internes, un trophoctoderme cohésif multicellulaire et une forme ovulaire.
- Le grade II correspond aux blastocystes de qualité modérée avec des cellules internes normales mais un trophoctoderme non optimal (fragmenté ou nécrotique).
- Le grade III correspond aux blastocystes de mauvaise qualité avec peu ou pas de cellules internes et une large vacuole à la place du blastocœle.

Les blastocystes sont ensuite fixés dans une solution saline tamponnée au formol, puis examinés à l'aide d'un microscope à fluorescence dans un milieu de montage contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole). Les embryons sont considérés comme des blastocystes s'ils contiennent plus de 64 noyaux normaux et une couche externe de trophoblaste (98).

## 3. Cryopréservation des embryons

La méthode actuelle la plus employée est la vitrification dans les deux espèces. On trouve également une autre technique de cryopréservation comme la congélation lente (84). La cryopréservation permet de conserver et de bloquer l'embryon dans son développement, le temps que celui-ci soit transféré dans la femelle receveuse. L'objectif principal de la cryopréservation est de limiter la formation de glace dans les cellules de l'embryon.



#### a. La congélation lente ou « slow freezing »

Elle a été utilisée dans les années 70, chez la vache, pour la conservation des embryons produits *in vivo*. Cette méthode consiste en un refroidissement lent des embryons. La vitesse de refroidissement doit être suffisamment lente pour permettre que l'eau intracellulaire, qui n'est pas congelée, se déshydrate par osmose jusqu'à atteindre un équilibre, avant d'obtenir la température souhaitée. Cette méthode n'est quasi pas employée pour la préservation des embryons *in vitro*, à cause de son inefficacité (99).

Les embryons sont lavés plusieurs fois, puis placés dans un milieu de congélation, par exemple un milieu contenant du PBS, de l'EG (éthylène glycol) et du CRYO3. Le CRYO3 est utilisé dans la cryopréservation des embryons humains.

Les embryons, maintenus dans leur milieu, sont placés dans des paillettes, elles-mêmes positionnées ensuite dans un congélateur programmable à -6 °C, au départ, puis déshydratées à -0,5 °C par minute jusqu'à arriver à une température de -35 °C. Les paillettes sont, par la suite, conservées dans de l'azote liquide jusqu'à utilisation de l'embryon (100).

#### b. La vitrification

La vitrification est une méthode assez simple et recommandée pour la cryopréservation des embryons produits *in vitro*. C'est une méthode qui n'est pas beaucoup utilisée chez la vache, étant donné que la majeure partie des embryons est produite à l'aide de protocoles de superovulation avec des embryons qui supportent très bien la méthode de congélation lente (99).

Les embryons sont exposés à des concentrations hautes en cryoprotecteurs perméables. Il n'y pas de formation de cristaux de glace et un état vitreux est atteint. Les solutions de vitrification peuvent être commerciales ou il est aussi possible d'utiliser un milieu contenant du PBS sans calcium ni magnésium et supplémenté en pyruvate, glucose et en sérum de veau fœtal. Durant le processus de vitrification, l'embryon est exposé à plusieurs milieux avec différentes concentrations en glycérol, éthylène glycol et cryoprotecteurs. Puis, il est conservé directement dans de l'azote liquide (101).

## 4. Transfert de l'embryon

Les embryons ainsi formés *in vitro* doivent être transférés dans une femelle receveuse. Idéalement, les receveuses doivent être des multipares, sans antécédent d'infection utérine. Les receveuses suivent un protocole hormonal et sont suivies régulièrement pour pouvoir détecter avec précision le moment de l'ovulation. Chez la jument, il semblerait qu'une double ovulation chez la receveuse augmente les chances d'obtenir une gestation (102). Le transfert de l'embryon dans la receveuse se fait quand elle en est à son septième jour post-ovulation. Une étude a montré que l'on pouvait transférer l'embryon au quatrième jours post-ovulation pour augmenter le taux de gestation chez la jument (103). La vulve est nettoyée plusieurs fois et séchée. La manipulation de l'embryon se fait de manière stérile pour éviter tout risque de contamination. L'embryon est placé dans une sonde entre deux bulles d'air. Le manipulateur introduit la sonde à travers le col de l'utérus puis remonte dans l'utérus. Une épidurale peut aussi être réalisée pour limiter la douleur et permettre une relaxation du rectum et du vagin. Idéalement, l'embryon doit être déposé dans la corne utérine ipsilatérale à l'ovaire contenant le corps jaune (104). Le diagnostic de gestation est réalisé sept jours après le transfert de l'embryon.

### B. Intérêts et inconvénients de la fécondation *in vitro* chez la vache et chez la jument

#### 1. Avantages et utilisations de la fécondation *in vitro*

La fécondation *in vitro* chez la vache, comme chez la jument a plusieurs applications. Ces espèces peuvent servir de modèle pour l'étude et l'amélioration des techniques de reproduction en humaine. L'OPU et l'ICSI ont tout d'abord été développés pour permettre aux éleveurs d'obtenir des naissances sur des mères qui ne produisaient pas d'embryons sur des transferts embryonnaires classiques, sur des inséminations artificielles ou qui présentaient des pathologies du tractus génital (105). Ces techniques permettent également de produire des veaux ou des poulains à partir de taureaux ou d'étalons peu fertiles voire infertiles.

Le développement et la réussite de ces techniques permettent aujourd'hui d'optimiser la génétique des espèces. Pour l'insémination artificielle, il est nécessaire d'avoir au moins une paillette et que celle-ci ne soit pas de trop mauvaise qualité pour permettre la fécondation. Or, avec la fécondation *in vitro*, plusieurs gestations peuvent être obtenues avec plusieurs mères différentes à l'aide d'une seule paillette.

L'OPU est une procédure bien tolérée par l'animal, avec des complications généralement mineures, comme une irritation du rectum, de la fièvre et quelques signes de coliques (moins de 1 %), mais pouvant parfois être majeures, comme la mort de l'animal (1 :1 000) (106).

Chez les bovins, on trouve sur le marché des semences sexées pour l'insémination artificielle. Chez les équidés, la semence sexée est de trop mauvaise qualité pour permettre un rendement correct pour l'insémination artificielle. L'ICSI n'utilisant qu'un nombre réduit de spermatozoïdes, elle pourrait devenir la nouvelle technologie pour la sélection du sexe des embryons (107).

De nos jours, la fécondation *in vitro* permet surtout de produire un grand nombre d'embryons par donneuse, ce qui permet de conserver la génétique de la mère. Cette génétique pourrait être croisée avec celle de taureaux ou d'étalons d'excellence sans se soucier d'un éventuel problème de fertilité. De plus, la génétique d'individus décédés pourrait perdurer en réalisant des prélèvements *post mortem* et en utilisant des paillettes congelées, même de mauvaise qualité (84).

## 2. Risques et limites de la fécondation *in vitro*

La fécondation *in vitro*, chez la vache, se réalise dans des laboratoires français. En revanche, aucun laboratoire ne la réalise en France pour la jument. Il est donc nécessaire d'envoyer les prélèvements en Italie, dans le laboratoire Avantea (108), pour la réalisation d'une FIV-ICSI, ce qui implique des manipulations supplémentaires des ovocytes et des embryons et réduit les taux de réussite (106). De plus, la fécondation *in vitro* est une méthode assez coûteuse. Chez la vache il faut compter une moyenne de 1000 euros par gestation, soit deux fois plus que le transfert d'embryon classique (109). Chez la jument la FIV n'est pas commercialisée contrairement à l'ICSI. Pour l'ICSI il faut compter en moyenne 3000 euros pour sa

réalisation et le transfert des embryons auxquels se rajoutent les frais liés à la semence de l'étalon (110). Le prix de l'ICSI peut aller jusqu'à 7000 euros ce qui représente un coût non négligeable pour le propriétaire (111). Chez la vache, la fécondation *in vitro* pourrait être optimisée en utilisant un autre donneur plus fertile, mais malheureusement, il est rare que le client permette le choix du donneur idéal pour l'obtention d'un embryon (84).

Par ailleurs, les filières bovines et équinnes ne sont pas du tout les mêmes, ainsi que les budgets utilisés et les objectifs souhaités. Chez la jument, le budget individuel pour une femelle est beaucoup plus élevé que dans la filière bovine, où il s'agit plus d'un objectif de rentabilité au niveau du troupeau. Or, actuellement, le rendement de la fécondation *in vitro* chez la vache est trop faible pour pouvoir généraliser cette méthode. Elle est essentiellement utilisée sur des vaches laitières hautes productrices en lait. Chez la vache, on trouvera principalement des protocoles de superovulation qui permettent la production d'un grand nombre d'embryons à moindre coût et avec plus de facilité (112).

Enfin, une des questions à se poser concernant la fécondation *in vitro* est de savoir si les veaux ou les poulains ainsi produits sont sains. En humaine, près de 8 millions d'enfants sont nés par procréation assistée. Certaines études ont montré une augmentation des risques d'avoir des problèmes génétiques ou épigénétiques pour un petit pourcentage de ces enfants. Ces défauts se traduisent par plusieurs traits phénotypiques qui peuvent être mineurs ou majeurs. Par exemple, il a été montré qu'il y avait plus de bébés avec un poids faible à la naissance, des complications obstétriques, des problèmes cardiovasculaires à l'âge adulte, des problèmes de fertilité, avec du sperme de faible qualité, ou encore l'apparition de syndromes complexes.

Les données concernant les méthodes de reproduction assistées chez les animaux sont assez similaires à celles utilisées chez l'homme. Chez la vache, les problèmes rencontrés sont principalement des avortements, de la mortalité néonatale et des difficultés au vêlage. En revanche, une plus grande incidence du syndrome Large Offspring Syndrome (LOS), ou syndrome de « large descendance », est observée. Les veaux ont alors un poids plus élevé à la naissance, une mortalité périnatale plus élevée ou des anomalies congénitales. Le taux d'avortements est également plus élevé, les durées des gestations sont légèrement plus longues et une

plus grande incidence de problèmes est rencontrée pendant le vêlage (113). Il est estimé que 10 % des animaux issus de la procréation assistée souffre de ce syndrome chez la vache (114). Néanmoins, ces études ne portent pas uniquement sur la fécondation *in vitro*, mais également sur le transfert embryonnaire, sur l'insémination artificielle ou encore sur le clonage (113). Une étude a tout de même montré que la production *in vitro* d'embryons altérerait la régulation énergétique hépatique et musculaire chez des veaux produits *in vitro* avec un phénotype normal (115).

Par ailleurs, peu d'études rendent compte de la fertilité des descendants issus de la fécondation *in vitro*. En effet, une des indications majeures de la FIV est l'infertilité du mâle ou un défaut au niveau du tractus génital de la femelle. La production d'embryons à partir d'individus qui initialement ne peuvent se reproduire peut poser un problème éthique avec le développement de certaines pathologies ou, du moins, la persistance de caractères pathologiques présents chez les parents et transmis à la descendance.



## Conclusion

La fécondation *in vitro* est une technique qui a été développée initialement chez l'Homme avant d'être appliquée chez la vache, puis chez la jument, afin de répondre aux problèmes d'infertilité des individus. Cette technique a aussi permis, et continue de permettre, d'accroître les connaissances sur les mécanismes biologiques de la reproduction.

Chez la vache, la fécondation *in vitro* se réalise principalement par co-incubation des gamètes mâle et femelle dans un milieu de culture adapté. Chez la jument, seulement deux poulains sont nés de la FIV par co-incubation des gamètes (37). Ces taux de résultats très faibles résultent principalement d'un manque de connaissance sur les conditions de maturation des ovocytes et de capacitation des spermatozoïdes. Pour autant, un nombre plus important de poulains sont nés grâce à la méthode d'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). C'est une méthode plus complexe qui nécessite plus de moyens que pour une FIV par co-incubation.

La FIV permet, autant chez la vache que chez la jument, de conserver un patrimoine génétique grâce au prélèvement de gamètes sur des animaux décédés, suivi d'une cryopréservation des embryons obtenus. Ces derniers pourraient également servir de support aux laboratoires pour améliorer les différentes techniques de manipulations génétiques, comme le clonage ou encore le transfert de gènes. Ces techniques, bien que controversées d'un point de vue éthique, pourraient néanmoins contribuer à la conservation des espèces et à l'amélioration de leur patrimoine génétique.

Cependant, il est nécessaire de superviser la technique de la FIV afin de ne pas favoriser une réduction de la diversité des individus dans un seul but commercial et/ou économique. En effet, peu d'études ont jusqu'à présent été publiées sur le devenir des animaux issus de la fécondation *in vitro*, notamment sur les pathologies imputables à la méthode ou sur d'éventuels problèmes de fertilité.



## Bibliographie :

1. CHANG, M. C. Fertilization of Rabbit Ova in vitro. *Nature*. [en ligne]. août 1959. Vol. 184, n° 4684, pp. 466-467. [Consulté le 31 août 2022]. DOI 10.1038/184466a0.
2. LYAMINI, N. Archives. En 1978 naissait Louise Brown, premier « bébé-éprouvette » conçu grâce à la PMA. *Ouest-France.fr*. [en ligne]. 25 juillet 2019. [Consulté le 4 octobre 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.ouest-france.fr/societe/famille/pma/archives-en-1978-naissait-louise-brown-premier-bebe-eprouvette-concu-grace-la-pma-6458791>
3. BRACKETT, B. G., BOUSQUET, D., BOICE, M. L., DONAWICK, W. J., EVANS, J. F. et DRESSEL, M. A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*. août 1982. Vol. 27, n° 1, pp. 147-158. DOI 10.1095/biolreprod27.1.147.
4. MANDELBAUM, J. Histoire de la fécondation in vitro. In : PONCELET, C. et SIFER, C. (éd.), *Physiologie, pathologie et thérapie de la reproduction chez l'humain*. [en ligne]. Paris : Springer, 2011. pp. 63-71. [Consulté le 4 octobre 2022]. ISBN 978-2-8178-0061-5.
5. BALL, P. J. H. et PETERS, A. R. Anatomy. In : *Reproduction in Cattle*. Third Edition. Blackwell Publishing, 2004. pp. 13-27.
6. BARONE, R. Chapitre III : Appareil Génital Femelle. In : *Anatomie comparée des mammifères domestiques*. Troisième édition. Association Centrale d'Entraide Vétérinaire, 2020. pp. 251-418.
7. BRINSKO, S P., BLANCHARD, T L., VARNER, D V, SCHUMACHER, J, LOVE, C C., HINRICHS, K. et HARTMAN, D. Chapitre 1 : Reproductive Anatomy of the mare. In : *Manual of Equine Reproduction*. Third Edition. MOSBY ELSEVIER, 2011. pp. 1-9.
8. DAVIS MOREL, Mina C. G. Chapitre 1: Mare Reproductive Anatomy. In : *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 5th Edition. CABI, 2021.
9. LEFEBVRE, R C. et GNEMMI, G. Chapitre 3 : Anatomie de l'appareil reproducteur chez la vache. In : *Guide pratique d'échographie pour la reproduction des ruminants*. Paris : MED'COM, 2009. pp. 31-37.
10. BALL, P. J. H. et PETERS, A. R. The ovarian cycle. In : *Reproduction in Cattle*. Third Edition. Blackwell Publishing, 2004. pp. 40-55.
11. GORDON, I. Chapitre 5: Controlling Oestrus and Ovulation. In : *Reproductive technologies in farm animals*. CABI Publishing, 2004. pp. 150-151.
12. BERGFELT, D R. Chapitre 11 : Anatomy and Physiology of the mare. In : *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. Second Edition. Saunders Elsevier, 2009. pp. 113-132.

13. MCCUE, P M. Reproductive Evaluation. In : *Equine reproductive procedures*. Second Edition. Wiley Blackwell, 2021. pp. 3.
14. MCCUE, P M. Palpation of the Reproductive Tract. In : *Equine Reproductive Procedures*. Second Edition. Wiley Blackwell, 2021. pp. 27.
15. DESCÔTEAUX, L. Chapitre 6 : Gestation bovine avant 55 jours. In : *Guide pratique d'échographie pour la reproduction des ruminants*. Paris : MED'COM, 2009.
16. MCCUE, P M. Ultrasound Evaluation. In : *Equine Reproductive procedures*. Second Edition. Wiley Blackwell, 2021. pp. 31.
17. GINTHER, O. J. Chapitre 8 : Maternal aspects of pregnancy. In : *Reproductive Biology of the mare : Basic and Applied Aspects*. Second edition. Equiservices, 1992. pp. 291.
18. MERMILLOD, P. Chapitre 16 : Croissance et maturation de l'ovocyte in vivo et in vitro. In : *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Inra Editions, 2001. pp. 348-366. ISBN 978-2-7298-0417-6.
19. FERREIRA, E. M., VIREQUE, A. A., ADONA, P. R., MEIRELLES, F. V., FERRIANI, R. A. et NAVARRO, P. A. A. S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. [en ligne]. 15 mars 2009. Vol. 71, n° 5, pp. 836-848. [Consulté le 11 juillet 2022]. DOI 10.1016/j.theriogenology.2008.10.023.
20. MAITAN, P., BROMFIELD, E G., STOUT, T A. E., GADELLA, B M. et LEEMANS, B. A stallion spermatozoon's journey through the mare's genital tract: In vivo and in vitro aspects of sperm capacitation. *Animal Reproduction Science*. [en ligne]. 14 septembre 2021. pp. 106848. [Consulté le 6 septembre 2022]. DOI 10.1016/j.anireprosci.2021.106848.
21. ANDRABI, S. M. H. Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. [en ligne]. décembre 2007. Vol. 24, n° 12, pp. 561-569. [Consulté le 11 juillet 2022]. DOI 10.1007/s10815-007-9177-y.
22. WASSARMAN, P.M. et LITSCHER, E S. Mammalian Fertilization Is Dependent on Multiple Membrane Fusion Events. In : CHEN, E H. (éd.), *Cell Fusion: Overviews and Methods*. [en ligne]. Totowa, NJ : Humana Press, 2008. pp. 99-113. *Methods in Molecular Biology*<sup>TM</sup>. [Consulté le 6 septembre 2022]. ISBN 978-1-59745-250-2.
23. TURNER, R M. Tales From the Tail: What Do We Really Know About Sperm Motility? *Journal of Andrology*. [en ligne]. 2003. Vol. 24, n° 6, pp. 790-803. [Consulté le 11 juillet 2022]. DOI 10.1002/j.1939-4640.2003.tb03123.x.
24. THIBAUT, C. Chapitre 17 : La fécondation. In : *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Inra Editions, 2001. pp. 367-381.

25. GADELLA, B. M., RATHI, R., BROUWERS, J. F. H. M., STOUT, T. A. E. et COLLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Animal Reproduction Science*. [en ligne]. 3 décembre 2001. Vol. 68, n° 3, pp. 249-265. [Consulté le 17 juillet 2022]. DOI 10.1016/S0378-4320(01)00161-0.
26. MIRIHAGALLE, S, HUGHES, J R et MILLER, D J. Progesterone-Induced Sperm Release from the Oviduct Sperm Reservoir. *Cells*. [en ligne]. janvier 2022. Vol. 11, n° 10, pp. 1622. [Consulté le 18 juillet 2022]. DOI 10.3390/cells11101622.
27. TRAVERT, C., CARREAU, S. et GALERAUD-DENIS, I. La capacitation in vitro. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité*. [en ligne]. 1 juin 2009. Vol. 37, n° 6, pp. 523-528. [Consulté le 17 juillet 2022]. DOI 10.1016/j.gyobfe.2009.04.004.
28. DENEKE, V E. et PAULI, A. The Fertilization Enigma: How Sperm and Egg Fuse. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. [en ligne]. 2021. Vol. 37, n° 1, pp. 391-414. [Consulté le 6 septembre 2022]. DOI 10.1146/annurev-cellbio-120219-021751.
29. MINA, C. G. Chapitre 3: Pregnancy. In : *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 5th Edition. CABI, 2021. pp. 39-69.
30. SCHELLANDER, K., FAYRER-HOSKEN, R. A., KEEFER, C. L., BROWN, L. M., MALTER, H., MBRIDE, C. E. et BRACKETT, B. G. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*. [en ligne]. 1 avril 1989. Vol. 31, n° 4, pp. 927-934. DOI 10.1016/0093-691X(89)90038-1.
31. PIETERSE, M. C., KAPPEN, K. A., KRUIP, Th. A. M. et TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. [en ligne]. 1 octobre 1988. Vol. 30, n° 4, pp. 751-762. [Consulté le 27 avril 2022]. DOI 10.1016/0093-691X(88)90310-X.
32. BARBERINO, R S., SILVA, JR V., FIGUEIREDO, JR. et MATOS, MH T. Transport of Domestic and Wild Animal Ovaries: A Review of the Effects of Medium, Temperature, and Periods of Storage on Follicular Viability. *Biopreservation and Biobanking*. [en ligne]. 2019. Vol. 17, n° 1, pp. 84-90. DOI 10.1089/bio.2018.0057.
33. IWASAKI, S., KONO, T., NAKAHARA, T., SHIOYA, Y., FUKUSHIMA, M. et HANADA, A. New methods for the recovery of oocytes from bovine ovarian tissue in relation to in vitro maturation and fertilization. [en ligne]. 1987. DOI 10.1262/JRD1977.33.188.
34. HAMANO, S. et KUWAYAMA, M. In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*. [en ligne]. 1 mars 1993. Vol. 39, n° 3, pp. 703-712. [Consulté le 27 avril 2022]. DOI 10.1016/0093-691X(93)90255-4.
35. DELEUZE, S. Les techniques de reproduction artificielle au secours des juments infertiles. *Nouveau Praticien Vétérinaire Canine-Féline*. [en ligne]. 2019. Vol. 12. [Consulté le 6 septembre 2022]. Disponible à l'adresse: <https://orbi.uliege.be/handle/2268/233369>

36. MORRIS, L. H. A. The development of in vitro embryo production in the horse. *Equine Veterinary Journal*. [en ligne]. 2018. Vol. 50, n° 6, pp. 712-720. [Consulté le 16 août 2022]. DOI 10.1111/evj.12839.
37. HINRICHS, K. Immature oocyte collection and maturation. *Equine reproduction, Volume 2*. [en ligne]. 2011. N° Ed.2, pp. 2931-2935. [Consulté le 5 septembre 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113059257>
38. BÉZARD, J. De la collecte des ovocytes à la production d'embryons. *INRAE Productions Animales*. [en ligne]. 1 décembre 1999. Vol. 12, n° 5, pp. 339-341. [Consulté le 18 mai 2022]. DOI 10.20870/productions-animales.1999.12.5.3905.
39. DELEUZE, S, PONTHER, J et HANZEN, C. Assisted reproduction in the equine: Collection, evaluation, maturation and use of equine oocytes. *Annales de Médecine Veterinaire*. 1 janvier 2009. Vol. 153, pp. 22-30.
40. REGASSA, A., RINGS, F., HOELKER, M., CINAR, U., THOLEN, E., LOOFT, C., SCHELLANDER, K. et TESFAYE, D. Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. *BMC Genomics*. [en ligne]. 24 janvier 2011. Vol. 12, n° 1, pp. 57. [Consulté le 27 avril 2022]. DOI 10.1186/1471-2164-12-57.
41. LONERGAN, P., MONAGHAN, P., RIZOS, D., BOLAND, M. P. et GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. [en ligne]. janvier 1994. Vol. 37, n° 1, pp. 48-53. DOI 10.1002/mrd.1080370107.
42. HENDRIKSEN, P. J. M, STEENWEG, W. N. M, HARKEMA, J. C, MERTON, J. S, BEVERS, M. M, VOS, P. L. A. M et DIELEMAN, S. J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*. [en ligne]. 1 avril 2004. Vol. 61, n° 5, pp. 909-920. [Consulté le 27 avril 2022]. DOI 10.1016/S0093-691X(03)00278-4.
43. BLONDIN, P., GUILBAULT, L. A. et SIRARD, M. -A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. *Theriogenology*. [en ligne]. 1 octobre 1997. Vol. 48, n° 5, pp. 803-813. [Consulté le 27 avril 2022]. DOI 10.1016/S0093-691X(97)00303-8.
44. HINRICHS, K. Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals*. [en ligne]. septembre 2018. Vol. 53, pp. 4-13. [Consulté le 19 mai 2022]. DOI 10.1111/rda.13259.
45. RIERA, F L., ROLDÁN, J E., GOMEZ, J et HINRICHS, K. Factors affecting the efficiency of foal production in a commercial oocyte transfer program. *Theriogenology*. [en ligne]. avril 2016. Vol. 85, n° 6, pp. 1053-1062. [Consulté le 19 mai 2022]. DOI 10.1016/j.theriogenology.2015.11.016.

46. CHOI, Y-H, VELEZ, I C., MACÍAS-GARCÍA, B, RIERA, F L., BALLARD, C S. et HINRICHS, K. Effect of clinically-related factors on in vitro blastocyst development after equine ICSI. *Theriogenology*. [en ligne]. 15 avril 2016. Vol. 85, n° 7, pp. 1289-1296. [Consulté le 19 mai 2022]. DOI 10.1016/j.theriogenology.2015.12.015.
47. LONERGAN, P., CAROLAN, C. et MERMILLOD, P. Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. *Reproduction Nutrition Development*. [en ligne]. 1994. Vol. 34, n° 4, pp. 329-339. [Consulté le 27 avril 2022]. DOI 10.1051/rnd:19940405.
48. SITHOLE, S. M., MPHAPHATHI, M. L., SEBOPELA, M. D. et NEDAMBALE, T. L. 141 Effect of different quantities of epidermal growth factor and TCM-199 medium on polar body extrusion of cattle oocytes following in vitro maturation. *Reproduction, Fertility and Development*. [en ligne]. 7 décembre 2021. Vol. 34, n° 2, pp. 308-309. [Consulté le 27 avril 2022]. DOI 10.1071/RDv34n2Ab141.
49. H. ABD EL-, A, E. MAHROUS, U, Z. KAMEL, S et A. SABEK, A. Factors Influencing in vitro Production of Bovine Embryos: A Review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. [en ligne]. 15 novembre 2016. Vol. 11, n° 12, pp. 737-756. [Consulté le 3 juin 2022]. DOI 10.3923/ajava.2016.737.756.
50. CHARPIGNY, G, MARQUANT-LE GUIENNE, B, RICHARD, C, ADENOT, P, DUBOIS, O, GÉLIN, V, PEYNOT, N, DANIEL, N, BROCHARD, V et NUTTINCK, F. PGE2 Supplementation of Oocyte Culture Media Improves the Developmental and Cryotolerance Performance of Bovine Blastocysts Derived From a Serum-Free in vitro Production System, Mirroring the Inner Cell Mass Transcriptome. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. [en ligne]. 2021. Vol. 9. Disponible à l'adresse: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.672948>
51. BAHRAMI, M. et COTTEE, P A. Culture conditions for in vitro maturation of oocytes – A review. *Reproduction and Breeding*. [en ligne]. 1 juin 2022. Vol. 2, n° 2, pp. 31-36. [Consulté le 27 mai 2022]. DOI 10.1016/j.repbre.2022.04.001.
52. BAHRAMI, M., MORRIS, M B. et DAY, M L. Amino acid supplementation of a simple inorganic salt solution supports efficient in vitro maturation (IVM) of bovine oocytes. *Scientific Reports*. [en ligne]. 13 août 2019. Vol. 9, n° 1, pp. 11739. [Consulté le 27 mai 2022]. DOI 10.1038/s41598-019-48038-y.
53. FUKUI, Y. et ONO, H. Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. *Reproduction*. [en ligne]. 1 juillet 1989. Vol. 86, n° 2, pp. 501-506. [Consulté le 27 avril 2022]. DOI 10.1530/jrf.0.0860501.
54. BROM-DE-LUNA, J G., SALGADO, R M., FELIX, M R., CANESIN, H S., STEFANOVSKI, D., DIAW, M. et HINRICHS, K. Culture protocols for horse embryos after ICSI: Effect of myo-inositol and time of media change. *Animal Reproduction Science*. [en ligne]. 1 octobre 2021. Vol. 233, pp. 106819. [Consulté le 28 mai 2022]. DOI 10.1016/j.anireprosci.2021.106819.

55. GOUDET, G, BÉZARD, J, DUCHAMP, G, GÉRARD, N et PALMER, E. Equine Oocyte Competence for Nuclear and Cytoplasmic in Vitro Maturation: Effect of Follicle Size and Hormonal Environment<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. [en ligne]. 1 août 1997. Vol. 57, n° 2, pp. 232-245. [Consulté le 28 mai 2022]. DOI 10.1095/biolreprod57.2.232.
56. HAUTOT, A. *Les protéines WNTs et la maturation ovocytaire chez la jument: implication de WNT-2B*. [en ligne]. Université Paul-Sabatier de Toulouse : ENVT, 2020. Disponible à l'adresse: <https://core.ac.uk/download/pdf/335471251.pdf>
57. CARNEIRO, G., LORENZO, P., PIMENTEL, C., PEGORARO, L., BERTOLINI, M., BALL, B., ANDERSON, G. et LIU, I. Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biology of Reproduction*. [en ligne]. septembre 2001. Vol. 65, n° 3, pp. 899-905. DOI 10.1095/biolreprod65.3.899.
58. LORENZO, P. L., LIU, I. K. M., CARNEIRO, G. F., CONLEY, A. J. et ENDERS, A. C. Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. *Equine Veterinary Journal*. [en ligne]. juillet 2002. Vol. 34, n° 4, pp. 378-382. DOI 10.2746/042516402776249065.
59. SEBOPELA, M. D., MPHAPHATHI, M. L., SITHOLE, S. M. et NEDAMBALE, T. L. 138 Effect of different temperatures on in vitro maturation rates on cattle oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*. [en ligne]. 8 janvier 2021. Vol. 33, n° 2, pp. 177-177. [Consulté le 28 mai 2022]. DOI 10.1071/RDv33n2Ab138.
60. STAMPERNA, K, GIANNOULIS, T, NANAS, I, KALEMKERIDOU, M, DADOULI, K, MOUTOU, K, AMIRIDIS, G S. et DOVOLOU, E. Short term temperature elevation during IVM affects embryo yield and alters gene expression pattern in oocytes, cumulus cells and blastocysts in cattle. *Theriogenology*. [en ligne]. 15 octobre 2020. Vol. 156, pp. 36-45. [Consulté le 30 mai 2022]. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.06.039.
61. PINYOPUMMINTR, T. et BAVISTER, B. D. Optimum gas atmosphere for in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. [en ligne]. septembre 1995. Vol. 44, n° 4, pp. 471-477. DOI 10.1016/0093-691x(95)00219-x.
62. WHITTY, A, KIND, K L., DUNNING, K R. et THOMPSON, J G. Effect of oxygen and glucose availability during in vitro maturation of bovine oocytes on development and gene expression. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. [en ligne]. 1 juin 2021. Vol. 38, n° 6, pp. 1349-1362. [Consulté le 30 mai 2022]. DOI 10.1007/s10815-021-02218-w. Company: SpringerDistributor: SpringerInstitution: SpringerLabel: Springernumber: 6publisher: Springer US
63. LUCIANO, A M., FRANCIOSI, F, BARROS, R G., DIECI, C et LODDE, V. The variable success of in vitro maturation: can we do better? *Animal Reproduction*. [en ligne]. 2018. Vol. 15, n° Suppl. 1, pp. 727-736. [Consulté le 6 septembre 2022]. DOI 10.21451/1984-3143-AR2018-0021.

64. PARK, Y-S, KIM, S-S, KIM, J-M, PARK, H-D et BYUN, M-D. The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology*. [en ligne]. juillet 2005. Vol. 64, n° 1, pp. 123-134. [Consulté le 1 juin 2022]. DOI 10.1016/j.theriogenology.2004.11.012.
65. XU, K. P., GREVE, T., SMITH, S. et HYTTEL, P. Chronological Changes of Bovine Follicular Oocyte Maturation in Vitro. *Acta Veterinaria Scandinavica*. [en ligne]. 1 décembre 1986. Vol. 27, n° 4, pp. 505-519. [Consulté le 3 juin 2022]. DOI 10.1186/BF03548130.
66. DE LOOS, F., VAN BENEDEN, T., KRUIP, T. a. M. et VAN MAURIK, P. Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. [en ligne]. 1992. Vol. 31, n° 3, pp. 208-214. [Consulté le 3 juin 2022]. DOI 10.1002/mrd.1080310308.
67. HYTTEL, P. Bovine cumulus-oocyte disconnection in vitro. *Anatomy and Embryology*. [en ligne]. 1 avril 1987. Vol. 176, n° 1, pp. 41-44. [Consulté le 3 juin 2022]. DOI 10.1007/BF00309750.
68. DELEUZE, S. Application de l'échographie à l'ovum pick up chez la jument. Effet de la cystéamine sur la maturation des ovocytes équins mesuré par coloration au bis-benzamide et par transfert d'ovocytes. [en ligne]. juin 2003. [Consulté le 3 juin 2022]. Disponible à l'adresse: <https://orbi.uliege.be/handle/2268/159164>
69. PEREIRA, B, ORTIZ, I, DORADO, J, DIAZ-JIMENEZ, M, CONSUEGRA, C, DEMYDA-PEYRAS, S et HIDALGO, M. The Effect of Different Vitrification and Staining Protocols on the Visibility of the Nuclear Maturation Stage of Equine Oocytes. *Journal of Equine Veterinary Science*. [en ligne]. 1 juillet 2020. Vol. 90, pp. 103021. [Consulté le 3 juin 2022]. DOI 10.1016/j.jevs.2020.103021.
70. DELL'AQUILA, M E., CAILLAUD, M, MARITATO, F, MARTORIATI, A, GÉRARD, N, AIUDI, G, MINOIA, P et GOUDET, G. Cumulus expansion, nuclear maturation and connexin 43, cyclooxygenase-2 and FSH receptor mRNA expression in equine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro in the presence of FSH and precursors for hyaluronic acid synthesis. *Reproductive Biology and Endocrinology*. [en ligne]. 22 juin 2004. Vol. 2, n° 1. [Consulté le 3 juin 2022]. DOI 10.1186/1477-7827-2-44.
71. SALISBURY, G. W. et VANDEMARK, N. L. Chapitre 13: Semen Collection. In : *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*. San Francisco ans London : W. H. Freeman & Compagny, 1961. pp. 312-325.
72. DAVIS MOREL, Mina C. G. Chapitre 21: Artificial Insemination. In : *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 5th Edition. CABI, 2021. pp. 343-375.
73. RIGAL, F. *Comparaison de la qualité de la semence de taureaux collectés à l'électro-éjaculateur ou au vagin artificiel*. [en ligne]. Université de Toulouse (ENVT), 2008. [Consulté le 29 juillet 2022]. Disponible à l'adresse: <https://oatao.univ-toulouse.fr/4343/>

74. FDS\_PURESPERM100\_.pdf. [en ligne]. [Consulté le 8 août 2022]. Disponible à l'adresse: [https://laboratoires-jcd.com/wp-content/uploads/2021/03/FDS\\_PURESPERM100\\_.pdf](https://laboratoires-jcd.com/wp-content/uploads/2021/03/FDS_PURESPERM100_.pdf)

75. TRÍBULO, P, RIVERA, R M, ORTEGA OBANDO, M S, JANNAMAN, E A et HANSEN, P J. Production and Culture of the Bovine Embryo. In : HERRICK, J R. (éd.), *Comparative Embryo Culture: Methods and Protocols*. [en ligne]. New York, NY : Springer, 2019. pp. 115-129. *Methods in Molecular Biology*. [Consulté le 8 août 2022]. ISBN 978-1-4939-9566-0.

76. BRINSKO, S P., BLANCHARD, T L., VARNER, D V, SCHUMACHER, J, LOVE, C C., HINRICHS, K. et HARTMAN, D. Chapitre 19 : Assisted Reproduction Technology. In : *Manual of Equine Reproduction*. Third Edition. MOSBY ELSEVIER, 2011. pp. 302-312.

77. NATALI, I. *Sperm Preparation Techniques for Artificial Insemination - Comparison of Sperm Washing, Swim Up, and Density Gradient Centrifugation Methods*. [en ligne]. IntechOpen, 2011. [Consulté le 8 août 2022]. ISBN 978-953-307-312-5.

78. LENZ, R. W., BALL, G. D., LEIBFRIED, M. L., AX, R. L. et FIRST, N. L. In Vitro Maturation and Fertilization of Bovine Oocytes are Temperature-Dependent Processes<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*. [en ligne]. 1 août 1983. Vol. 29, n° 1, pp. 173-179. [Consulté le 9 août 2022]. DOI 10.1095/biolreprod29.1.173.

79. PARRISH, J J. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology*. [en ligne]. 1 janvier 2014. Vol. 81, n° 1, pp. 67-73. [Consulté le 10 août 2022]. DOI 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005.

80. MOROTTI, F., SANCHES, B. V., PONTES, J. H. F., BASSO, A. C., SIQUEIRA, E. R., LISBOA, L. A. et SENEDA, M. M. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology*. [en ligne]. 15 mars 2014. Vol. 81, n° 5, pp. 696-701. [Consulté le 6 septembre 2022]. DOI 10.1016/j.theriogenology.2013.12.002.

81. DAVIS MOREL, Mina C. G. Chapitre 23: Advanced Reproductive Techniques. In : *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 5th Edition. CABI, 2021. pp. 389-397.

82. LEEMANS, B, STOUT, T A. E., SCHAUWER, C De, HERAS, S, NELIS, H, HOOGEWIJS, M, SOOM, A V et GADELLA, B M. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species? *Reproduction*. [en ligne]. 1 mai 2019. Vol. 157, n° 5, pp. R181-R197. [Consulté le 5 octobre 2022]. DOI 10.1530/REP-18-0541.

83. LEEMANS, B, GADELLA, B M., STOUT, T A. E., SCHAUWER, C De, NELIS, H, HOOGEWIJS, M et SOOM, A V. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. *Reproduction*. [en ligne]. 1 décembre 2016. Vol. 152, n° 6, pp. R233-R245. [Consulté le 5 octobre 2022]. DOI 10.1530/REP-16-0420.



84. FERRÉ, L. B., KJELLAND, M. E., STRØBECH, L. B., HYTTEL, P., MERMILLOD, P. et ROSS, P. J. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *animal*. [en ligne]. mai 2020. Vol. 14, n° 5, pp. 991-1004. [Consulté le 11 août 2022]. DOI 10.1017/S1751731119002775.
85. ANCHORDOQUY, J P., LIZARRAGA, R M, ANCHORDOQUY, J M, NIKOLOFF, N, ROSA, D E, FABRA, M C, PERAL-GARCÍA, P et FURNUS, C C. Effect of cysteine, glutamate and glycine supplementation to in vitro fertilization medium during bovine early embryo development. *Reproductive Biology*. [en ligne]. 1 décembre 2019. Vol. 19, n° 4, pp. 349-355. [Consulté le 11 août 2022]. DOI 10.1016/j.repbio.2019.10.002.
86. RAVINDRANATHA, Bm, NANDI, S, RAGHU, Hm et REDDY, Sm. In Vitro Maturation and Fertilization of Buffalo Oocytes: Effects of Storage of Ovaries, IVM Temperatures, Storage of Processed Sperm and Fertilization Media. *Reproduction in Domestic Animals*. [en ligne]. 2003. Vol. 38, n° 1, pp. 21-26. [Consulté le 11 août 2022]. DOI 10.1046/j.1439-0531.2003.00390.x.
87. RAHMAN, M M, RAHMAN, M M, BHUIYAN, NS J et UDDIN, M M. Optimization of in vitro fertilization technique for oocytes of indigenous zebu cows. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*. [en ligne]. 30 juin 2020. Vol. 35, n° 2, pp. 142-148. [Consulté le 12 août 2022]. DOI 10.12750/JARB.35.2.142.
88. HUSAMALDEEN, A A., IHSAN, H A. et HAIDER, A R. The Effect of Antioxidant Cysteamine With Ascorbic Acid On In Vitro Fertilization in Cows. *International Journal of Pharmaceutical Research*. [en ligne]. 7 novembre 2020. Vol. 12, n° sp2. [Consulté le 12 août 2022]. DOI 10.31838/ijpr/2020.SP2.459.
89. ŞEN, U et KURAN, M. Low incubation temperature successfully supports the in vitro bovine oocyte maturation and subsequent development of embryos. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. [en ligne]. juin 2018. Vol. 31, n° 6, pp. 827-834. [Consulté le 12 août 2022]. DOI 10.5713/ajas.17.0569.
90. DELL'AQUILA, M. E., CHO, Y. S., MINOIA, P., TRAINA, V., FUSCO, S., LACALANDRA, G. M. et MARITATO, F. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes. *Theriogenology*. [en ligne]. 15 avril 1997. Vol. 47, n° 6, pp. 1139-1156. [Consulté le 15 août 2022]. DOI 10.1016/S0093-691X(97)00095-2.
91. LANGE CONSIGLIO, A, DELL'AQUILA, M E, FIANDANESE, N, AMBRUOSI, B, CHO, Y S., BOSI, G, ARRIGHI, S, LACALANDRA, G M. et CREMONESI, F. Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. *Reproductive Biology and Endocrinology*. [en ligne]. 16 octobre 2009. Vol. 7, n° 1, pp. 113. [Consulté le 15 août 2022]. DOI 10.1186/1477-7827-7-113.
92. 11320 - DMEM/F-12 - FR. [en ligne]. [Consulté le 16 août 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/technical-resources/media-formulation.55.html>

93. *PiezoDrill\_web.pdf*. [en ligne]. [Consulté le 16 août 2022]. Disponible à l'adresse: [https://www.gmp.ch/htmlarea/pdf/PiezoDrill\\_web.pdf](https://www.gmp.ch/htmlarea/pdf/PiezoDrill_web.pdf)
94. RADER, K, CHOI, Y-H et HINRICHS, K. Intracytoplasmic Sperm Injection, Embryo Culture, and Transfer of In Vitro–Produced Blastocysts. *Veterinary Clinics: Equine Practice*. [en ligne]. 1 décembre 2016. Vol. 32, n° 3, pp. 401-413. [Consulté le 17 août 2022]. DOI 10.1016/j.cveq.2016.07.003.
95. CZB, CZB-HEPES, and CZB-Sr Media for Mouse Cloning. *Cold Spring Harbor Protocols*. [en ligne]. 8 janvier 2017. Vol. 2017, n° 8, pp. pdb.rec096552. [Consulté le 17 août 2022]. DOI 10.1101/pdb.rec096552.
96. CARNEVALE, E M., MACLELLAN, L J. et STOKES, J A E. In Vitro Culture of Embryos from Horses. In : HERRICK, J R. (éd.), *Comparative Embryo Culture: Methods and Protocols*. [en ligne]. New York, NY : Springer, 2019. pp. 219-227. *Methods in Molecular Biology*. [Consulté le 19 août 2022]. ISBN 978-1-4939-9566-0.
97. SCIORIO, R. et SMITH, G. D. Embryo culture at a reduced oxygen concentration of 5%: a mini review. *Zygote*. [en ligne]. décembre 2019. Vol. 27, n° 6, pp. 355-361. [Consulté le 23 août 2022]. DOI 10.1017/S0967199419000522.
98. SALGADO, R. M., BROM-DE-LUNA, J. G., RESENDE, H. L., CANESIN, H. S. et HINRICHS, Katrin. Lower blastocyst quality after conventional vs. Piezo ICSI in the horse reflects delayed sperm component remodeling and oocyte activation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. [en ligne]. 1 mai 2018. Vol. 35, n° 5, pp. 825-840. [Consulté le 24 août 2022]. DOI 10.1007/s10815-018-1174-9.
99. DO, V et TAYLOR-ROBINSON, A. Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos by vitrification: In pursuit of a simplified, standardized procedure that improves pregnancy rates to promote cattle industry use. *Biotechnology in Animal Husbandry*. [en ligne]. 2020. Vol. 36, n° 3, pp. 251-270. [Consulté le 29 août 2022]. DOI 10.2298/BAH2003251H.
100. GÓMEZ, E, CARROCERA, S, MARTÍN, D, PÉREZ-JÁNEZ, J J, PRENDES, J, PRENDES, J M, VÁZQUEZ, A, MURILLO, A, GIMENO, I et MUÑOZ, M. Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology*. [en ligne]. 1 avril 2020. Vol. 146, pp. 39-47. [Consulté le 29 août 2022]. DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.01.056.
101. CARNEVALE, E M. Vitrification of Equine Embryos. *Veterinary Clinics: Equine Practice*. [en ligne]. 1 décembre 2006. Vol. 22, n° 3, pp. 831-841. [Consulté le 29 août 2022]. DOI 10.1016/j.cveq.2006.08.003.
102. DAVIS MOREL, Mina C. G. Chapitre 22 : Embryo Transfer. In : *Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management*. 5th Edition. CABI, 2021. pp. 389-397.

103. CLAES, A., CUERVO-ARANGO, J., COLLEONI, S., LAZZARI, G., GALLI, C. et STOUT, T. A. Speed of in vitro embryo development affects the likelihood of foaling and the foal sex ratio\*. *Reproduction, Fertility and Development*. [en ligne]. 16 mars 2020. Vol. 32, n° 5, pp. 468-473. [Consulté le 30 août 2022]. DOI 10.1071/RD19298.

104. CARRILLO-GONZÁLEZ, D F. et MALDONADO-ESTRADA, J G. L-carnitine supplementation in culture media improves the pregnancy rate of in vitro produced embryos with sexed semen from *Bos taurus indicus* cows. *Tropical Animal Health and Production*. [en ligne]. 1 septembre 2020. Vol. 52, n° 5, pp. 2559-2565. [Consulté le 29 août 2022]. DOI 10.1007/s11250-020-02281-y.

105. SQUIRES, E. L. Perspectives on the development and incorporation of assisted reproduction in the equine industry. *Reproduction, Fertility and Development*. [en ligne]. 12 décembre 2019. Vol. 31, n° 12, pp. 1753-1757. [Consulté le 30 août 2022]. DOI 10.1071/RD19365.

106. LEWIS, N. Test tube foals: A reality, but still a lot to learn. *Veterinary ireland journal*. [en ligne]. 2022. pp. 2. Disponible à l'adresse: [https://www.veterinaryirelandjournal.com/images/2022/january2022/pdf/ucd\\_jan\\_2022.pdf](https://www.veterinaryirelandjournal.com/images/2022/january2022/pdf/ucd_jan_2022.pdf)

107. MORRIS, L H. et MACLELLAN, L J. Update on advanced semen-processing technologies and their application for in vitro embryo production in horses. *Reproduction, Fertility and Development*. [en ligne]. 12 décembre 2019. Vol. 31, n° 12, pp. 1771-1777. [Consulté le 30 août 2022]. DOI 10.1071/RD19301.

108. Home. *Avantea*. [en ligne]. [Consulté le 7 octobre 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.avantea.it/>

109. « J'accélère la génétique avec la ponction d'ovocytes ». *L Eleveur Laitier*. [en ligne]. [Consulté le 12 octobre 2022]. Disponible à l'adresse: <https://www.eleveur-laitier.fr/jaccelere-la-genetique-avec-la-ponction-dovocytes-1,0,539755449.html> Olivier Auguste expérimente, sur ses génisses, cette technique qui permet de réduire l'intervalle entre les générations et de multiplier les pères.

110. BOULOUYRE, F. Nouvelles Techniques de reproduction (OPU, ICSI, Congélation d'embryon). . Congrès Symbiovéto. Saint-Lô. 3 octobre 2021.

111. BRIOT,; Maud CAILLAUD; Laurie. L'ICSI chez la jument. [en ligne]. [Consulté le 12 octobre 2022]. Disponible à l'adresse: <https://equipedia.ifce.fr/elevage-et-entretien/elevage/reproduction/licsi-chez-la-jument> Zoom sur l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), une biotechnologie de la reproduction de plus en plus demandée dans la filière équine.

112. EALY, A D, WOOLDRIDGE, L K et MCCOSKI, S R. BOARD INVITED REVIEW: Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *Journal of Animal Science*. [en ligne]. 30 mai 2019. Vol. 97, n° 6, pp. 2555-2568. [Consulté le 30 août 2022]. DOI 10.1093/jas/skz116.

113. VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M., MULLAART, E., DE ROOS, A. P. W., MERTON, J. S., DEN DAAS, J. H. G., KEMP, B. et DE RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI, moet or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*. [en ligne]. 15 janvier 2000. Vol. 53, n° 2, pp. 575-597. [Consulté le 30 août 2022]. DOI 10.1016/S0093-691X(99)00259-9.

114. COY, P, ROMAR, R et ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, J. The embryo culture media in the era of epigenetics: is it time to go back to nature? *Animal Reproduction*. [en ligne]. 20 avril 2022. Vol. 19. [Consulté le 30 août 2022]. DOI 10.1590/1984-3143-AR2021-0132.

115. RABAGLINO, M B, SECHER, J B-M, HYTTEL, P et KADARMIDEEN, H N. In vitro- and in vivo-produced male dairy calves show molecular differences in the hepatic and muscular energy regulation. *Biology of Reproduction*. [en ligne]. 29 juin 2022. pp. ioac131. [Consulté le 30 août 2022]. DOI 10.1093/biolre/ioac131.



# LA FECONDATION *IN VITRO* CHEZ LA JUMENT ET LA VACHE

---

Auteur

---

FOULQUE Emma

Résumé

---

La fécondation *in vitro* (FIV) est une technique permettant de lutter efficacement contre l'infertilité des individus. Elle consiste en la réalisation de la fécondation, c'est-à-dire la réunion d'un gamète femelle et d'un gamète male, en dehors de l'appareil reproducteur de la femelle. Les ovocytes sont prélevés sur la femelle (par ponction folliculaire ou en *post mortem*), puis maturés en laboratoire dans des milieux de maturation adaptés à l'espèce. Les spermatozoïdes sont également capotés *in vitro* puis mis en contact avec l'ovocyte maturé pour réaliser la fécondation *in vitro*. La FIV est une technique fonctionnelle et mise en pratique chez la vache, avec des taux d'obtentions d'embryons et de veaux acceptables. Chez la jument, des difficultés sont rencontrées dans le processus de capacitation des spermatozoïdes et dans la fécondation en elle-même, ce qui en fait une technique peu utilisée car en cours d'amélioration par les chercheurs. D'autres techniques de procréation assistée sont réalisées chez la jument, permettant de lutter contre l'infertilité. Les avantages de la FIV sont majeurs. Ils permettent principalement d'améliorer la fertilité des individus, ainsi que d'accroître et d'améliorer leurs descendance. C'est aussi un très bon moyen de produire des embryons en grande quantité pour permettre des avancées dans les techniques de manipulation génétique tels que le clonage ou le transfert de gènes. Néanmoins c'est une technique assez coûteuse et moins accessible pour les vétérinaires car elle nécessite de la technicité, mais surtout des moyens de laboratoire importants.

Mots-clés

---

Reproduction, Fécondation in-vitro, jument, vache

Jury

---

Président du jury : **Professeur CALENDER Alain**

Directeur de thèse : **Docteur LEFRANC-POHL Anne-Cécile**

1er assesseur : **Docteur LEFRANC-POHL Anne-Cécile**

2ème assesseur : **Professeur CADORE Jean-Luc**