



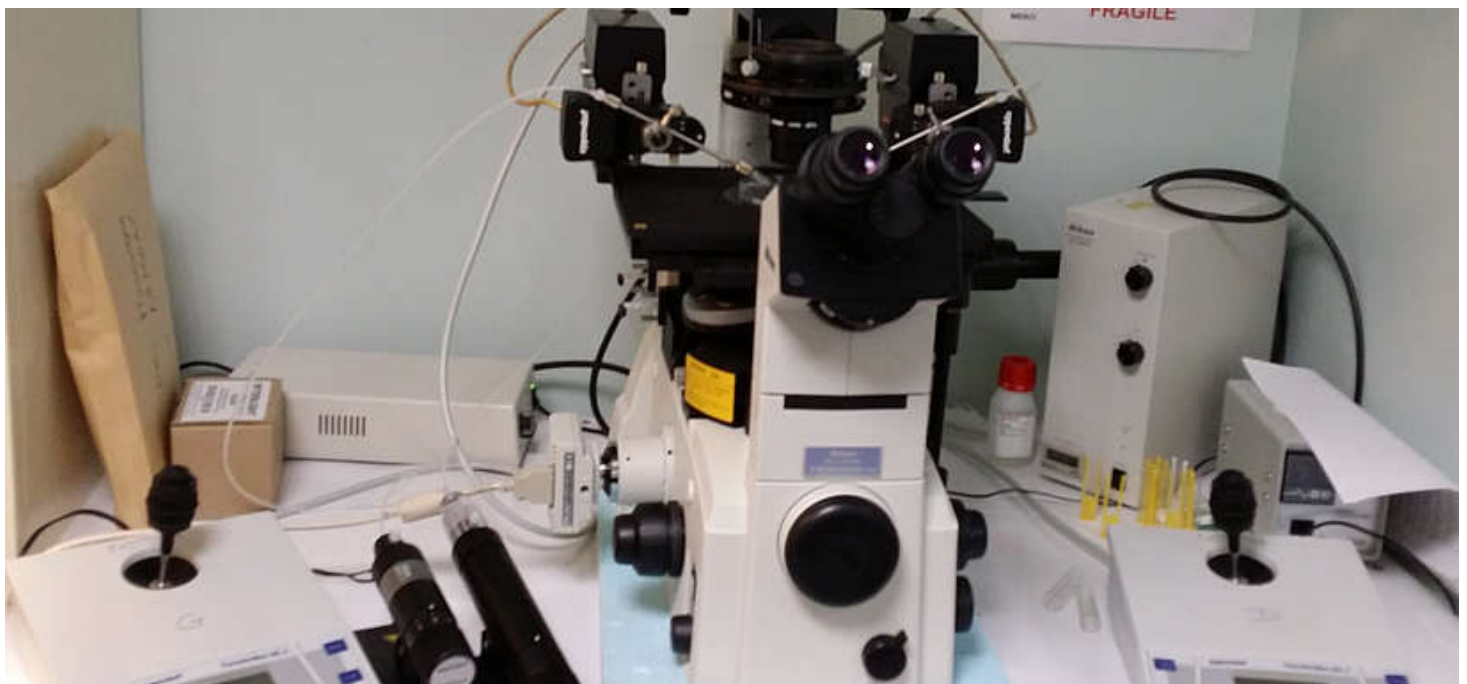
## L'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) chez la jument

Ponction d'ovocytes d'une jument donneuse, maturation des ovocytes *in vitro*, injection d'un spermatozoïde dans un ovocyte mature, développement de l'ovocyte fécondé *in vitro*, transfert d'embryon... zoom sur l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde (*intra-cytoplasmic sperm injection* en anglais ou ICSI), une biotechnologie de la reproduction certes coûteuse mais prometteuse, de plus en plus demandée dans la filière équine.

par Maud CAILLAUD - Laurie BRIOT - | 02.03.2020 |



Niveau de technicité :



## Qu'est-ce que l'ICSI ?

---

L'*intra-cytoplasmic sperm injection* (ICSI) est une biotechnologie de la reproduction qui consiste à injecter un spermatozoïde directement dans un ovocyte mature (c'est-à-dire apte à la fécondation). Ce dernier, ainsi fécondé, est mis en développement *in vitro* pendant une semaine jusqu'à atteindre le stade blastocyste. L'embryon est ensuite réimplanté immédiatement dans une jument receveuse ou congelé dans l'azote liquide pour un transfert ultérieur.

Cette technique n'est pas spécifique à l'espèce équine. Elle est notamment utilisée en médecine humaine lorsque la fécondation *in vitro* (FIV) classique n'est pas utilisable (faible qualité de semence). Dans l'espèce équine, la **FIV classique** ne fonctionne pas, d'où l'intérêt de développer cette technique pour la filière, qui est depuis quelques années très demandeuse au vu des résultats.

## Quelles sont les différentes étapes de l'ICSI ?

---

# 1) Récolte des ovocytes de la jument donneuse

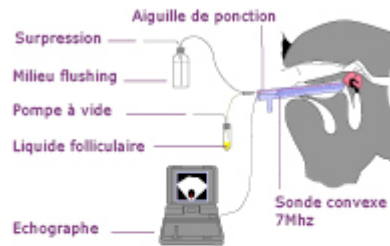
## Les étapes de l'Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)

### Récupération des ovocytes par ponction transvaginale échoguidée

1

Taux de collecte des ovocytes *in vivo* : 50 à 60%

Nombre moyen d'ovocytes prélevés : de 1 à une 12<sup>ème</sup>



### Recherche des ovocytes sous loupe binoculaire

2

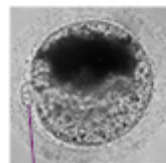


Présence de 5 ovocytes

### Maturation des ovocytes *in vitro* pour atteindre le stade fécondable (métaphase II)

3

Taux de maturation des ovocytes *in vitro* : 60 à 70%



Globule polaire



28 à 30 heures  
38,5°C  
5% CO<sub>2</sub>

### Injection d'un spermatozoïde directement dans l'ovocyte sous microscope

4



Aspiration du spermatozoïde



Injection du spermatozoïde



Retrait de l'aiguille



Fécondation terminée

### Développement *in vitro* des ovocytes fécondés

5

17 à 20 % des ovocytes fécondés mis en développement atteignent le stade blastocyste

Environ 1,2 blastocystes obtenus par séance de ponction



7 jours minimum  
38,5°C  
5% CO<sub>2</sub> et 5% O<sub>2</sub>

### Transfert immédiat de l'embryon dans une jument receveuse ou congélation dès la sortie de l'incubateur

6

Taux de gestation après transfert : environ 60%



Les ovocytes sont récoltés par **ponction transvaginale écho-guidée**. La jument donneuse est placée dans une barre de contention et est tranquilisée et analgésiée afin d'éviter toute douleur. Un premier opérateur introduit dans le vagin une **sonde échographique** et va en parallèle, via le rectum, maintenir l'ovaire et le placer devant cette sonde de manière à pouvoir voir les tissus ovariens sur l'échographe.

Un second opérateur va introduire, dans un guide situé le long de la sonde échographique, une **aiguille permettant de transpercer les follicules et d'aspirer le liquide folliculaire** pour récupérer les ovocytes. Les ovocytes équinés étant attachés à la paroi du follicule, il est nécessaire de procéder par **rinçages successifs de la cavité folliculaire** et, par des mouvements rotatifs de l'aiguille, l'opérateur va gratter la paroi du follicule.

Un troisième opérateur s'assure du confort de la jument et reste vigilant au moindre signe de souffrance de l'animal. Il pourra être amené à réaliser de nouvelles injections de tranquilisant et/ou analgésiant. Cette personne peut également transmettre les fluides collectés au fur et à mesure au laboratoire.

## 2) Recherche des ovocytes sous loupe binoculaire

Une fois collectés, les liquides sont filtrés puis observés sous loupe binoculaire placée dans une hotte à flux laminaire horizontal pour rester dans un environnement stérile.

## 3) Maturation des ovocytes *in vitro*

Les ovocytes immatures récoltés sont mis en **maturation dans des conditions atmosphériques particulières** (5% de CO<sub>2</sub>, 38,5°C) pendant 28 à 30 heures. L'objectif de cette étape est l'obtention d'un **ovocyte apte à la fécondation**, correspondant au **stade métaphase II**, où une partie du matériel génétique a été expulsé dans le globule polaire.

## 4) Injection du spermatozoïde dans l'ovocyte

Grace à un système de **micromanipulateurs montés sur un microscope**, l'ovocyte est maintenu en place et un spermatozoïde est injecté directement à l'intérieur *via* une **pipette d'injection**.

Au préalable de cette injection, les spermatozoïdes sont ralentis dans un milieu visqueux et leur flagelle est immobilisé pour permettre leur aspiration dans la pipette et l'injection sans risquer de provoquer des dégâts sur le cytosquelette du cytoplasme.

## 5) Développement des ovocytes fécondés *in vitro*

Une fois l'injection du spermatozoïde dans l'ooplasmie réalisée, les ovocytes fécondés sont de nouveau placés dans un **incubateur**. La culture va durer au **minimum 7 jours dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> et 5% d'O<sub>2</sub>, à une température de 38,5°C**. Les ovocytes fécondés pourront se développer pour **atteindre le stade transférable**, c'est-à-dire le **stade blastocyste**.

## 6) Transfert de l'embryon dans une jument receveuse

L'embryon peut ensuite être **transféré dans une jument receveuse** si celle-ci est synchronisée avec la fin de la culture, soit 5 à 6 jours après sa propre ovulation.

L'autre possibilité est la **congélation de l'embryon** pour permettre de différer à la fois dans le temps et dans l'espace sa **réimplantation dans une receveuse** dans des conditions plus favorables.

# Que peut-on attendre comme résultat pour cette technique ?

---



*Chiffres publiés par le laboratoire Avantea du Pr Galli en Italie*

Le taux de collecte des ovocytes par ponction transvaginale sur des follicules immatures est en moyenne de 50%. Il peut atteindre 60% pour une équipe de ponction expérimentée avec du matériel performant.

Le taux de maturation *in vitro* des ovocytes se situe entre 65 et 70% si les ovocytes sont mis en incubateur à la suite de la collecte. Ce taux est légèrement inférieur (55-60%) si les ovocytes sont transportés 24 heures avant l'incubation.

Après la fécondation par ICSI, le taux de blastocystes obtenus lors du développement *in vitro* est beaucoup plus faible, de l'ordre de 17 à 20%.

Au final, le nombre de blastocystes obtenus en moyenne par séance de ponction est de 1,2.

## Divers facteurs influant sur la réussite de l'ICSI

Plusieurs facteurs peuvent influencer négativement les résultats. En effet, la **qualité de l'ovocyte** diminue avec l'âge de la jument donneuse. La **saison** peut également influencer. Les résultats sont diminués lors de l'**anoestrus profond** de la jument. De plus, la **qualité de la semence** de l'étalon utilisé peut aussi entrer en ligne de compte ou encore le **nombre d'étalons utilisés** sur une même séance d'ICSI, entraînant un temps de préparation de la semence plus long et donc un temps d'attente des ovocytes également plus long.

Cependant, il faut souligner qu'indépendamment de tous ces facteurs de variation, il y a un **effet « jument » inévitable**. Une jument pourra donner plusieurs embryons pour chaque séance de ponction alors qu'une autre jument n'en donnera jamais, quel que soit l'étalon utilisé.

## L'ICSI : pour quelles juments ?

---

Cette technique est dans la plupart des cas réservée :

- Aux juments ayant des problèmes d'ovulation, des problèmes au niveau de l'oviducte ou encore de l'utérus
- Aux juments âgées où le **transfert d'embryon** ne donne aucun résultat
- Aux juments mises à la reproduction avec des étalons dont la semence est de mauvaise qualité ou si l'étalon en question est mort et son stock de paillettes très restreint

# Mise en place d'un statut sanitaire spécifique pour les juments donneuses

---

Dans le centre de prélèvement, un circuit spécifique à ces juments doit être appliqué. Elles doivent être hébergées dans une écurie ou un paddock dédié(e) et ne pas être en contact avec des chevaux de statut sanitaire inférieur. Les juments donneuses doivent également répondre à plusieurs exigences sanitaires :

- Elles ne doivent pas avoir été mises à la reproduction en monte naturelle dans les 30 jours qui précèdent la ponction ovocytaire.
- Les **vaccinations** contre la **grippe** et la **rhinopneumonie** doivent être à jour.
- Le dépistage pour l'**anémie infectieuse** *via* un « test de Coggins » doit avoir été réalisé au moins 90 jours avant la période de collecte.
- Le dépistage de la **métrite contagieuse équine** doit être réalisé avec un résultat négatif sur deux écouvillons (fosses et sinus clitoridiens) *via* deux bactériologies à 7 jours d'intervalle ou une PCR.

Un certificat sanitaire conforme au modèle IIA de la directive 2015/261/UE doit accompagner les ovocytes ou les embryons.

## Où en est-on en France ?

---

Aujourd'hui, quelques centres réalisent des ponctions transvaginales écho-guidées en France. Les ovocytes sont ensuite conditionnés dans un milieu spécifique et envoyés à l'étranger, notamment en Italie, dans des laboratoires spécialisés réalisant la technique d'ICSI en routine. Les blastocystes obtenus sur place au laboratoire peuvent être soit transférés immédiatement si le centre réalise des transferts d'embryons, soit congelés et donc renvoyés en France pour leur transfert ultérieur.

En ce qui concerne la procédure d'ICSI, il n'existe pas à ce jour de laboratoire spécialisé en France. Plusieurs centres sont équipés du matériel de micromanipulation mais le geste technique d'ICSI nécessite un long apprentissage pour être totalement maîtrisé. De plus, l'équipement d'un laboratoire complet pour réaliser la procédure entière est très coûteux (environ 250 000€), auquel il faut rajouter le consommable.

Cette biotechnologie de la reproduction nécessitant des moyens matériels et des compétences techniques pointues, son coût est élevé et peut avoisiner les 7 000€ hors frais de génétique.

## Risques liés à l'utilisation de la ponction transvaginale écho-guidée

---

L'utilisation de la ponction ovocytaire est une technique assez invasive qui n'est pas sans risques. Même si ceux-ci sont faibles, il est important de noter : atteinte de l'ovaire, infection de l'ovaire ou de l'abdomen, problèmes suite aux injections médicales. Le client qui amène sa jument dans un centre de ponctions doit être averti des risques que sa jument encourt lors d'une séance.

## Administratif lié à cette technique

---

Face à l'engouement de la filière pour cette technique, les étalonniers s'organisent et proposent maintenant des contrats de vente de paillettes spécifiquement pour l'ICSI.

Du côté du SIRE, des réflexions sont menées pour pouvoir permettre de déclarer des naissances plusieurs années après la conception de l'embryon. A suivre de ce côté-là...

## Dernières publications issues du congrès de l'ISER 2018 : principaux résultats

---

Dans une étude rétrospective sur 559 embryons issus d'ICSI, il a été montré que la jument receveuse doit être à J+4 post-ovulation pour être dans les conditions optimales de réimplantation d'un embryon issu d'ICSI congelé (Cuervo-Arango *et al.*, 2019).

Une autre étude récente montre que les embryons issus d'ICSI congelés donnent un pourcentage plus faible de gestation et de poulinage par rapport aux embryons *in vivo* frais, et significativement plus de mâles. De plus, les embryons qui se développent le plus rapidement (atteinte du stade blastocyste en 7 jours) ont plus de chances de donner un poulain (et même un mâle !) (Claes *et al.*, 2018).

---

## En savoir plus sur nos auteurs

---

- **Maud CAILLAUD** Formatrice IFCE
- **Laurie BRIOT** Ingénieur de recherche IFCE

### Bibliographie

- **CLAES A., CUERVO-ARANGO J., COLLEONI S., LAZZARI G., GALLI C. and STOUT T.A.**, 2018. Production and sex ratio of foals after transfer of frozen-thawed in vitro produced embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 66, page 176.
  - **CUERVO-ARANGO J., CLAES ANTHONY A.N. and STOUT T.A.E.**, 2019. *In vitro*-produced horse embryos exhibit a very narrow window of acceptable recipient mare uterine synchrony compared with *in vivo*-derived embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 31, pages 1904-1911.
-



Pour retrouver ce document: [www.equippedia.ifce.fr](http://www.equippedia.ifce.fr)  
Date d'édition: 18 09 2020