

Reproduction assistée dans l'espèce équine : collecte, évaluation, maturation et utilisations d'ovocytes équins

DELEUZE S.¹, PONTHER J.¹, HANZEN C.²

1. Département des Sciences Cliniques, Clinique des Animaux de Compagnie et des Equidés, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, bâtiment B41, 4000 Liège, Belgique

2. Département Clinique des animaux de Production, Clinique des ruminants, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Boulevard de Colonster, 20, bâtiment B42, 4000 Liège, Belgique

Correspondance : Dr Stefan Deleuze

Email : S.Deleuze@ulg.ac.be

RÉSUMÉ : Malgré le faible nombre d'ovocytes équins disponibles pour la recherche, des techniques de reproduction assistée récemment développées dans cette espèce permettent maintenant de produire des embryons en utilisant des étalons et des juments subfertiles ou même de sauvegarder leur potentiel génétique après leur mort. Cette revue de littérature décrit les aspects cliniques de la collecte d'ovocytes ex vivo ou in vivo, leur évaluation, leur maturation in vitro et leur utilisation pour le transfert intra-folliculaire ou salpyngien et l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde.

1 INTRODUCTION

L'acronyme ART pour « *assisted reproduction technologies* », ou en français, « techniques de reproduction assistées » (TRA), reprend des procédures allant de la simple conduite d'une saillie à la production de clones. Les techniques de reproduction assistée permettent de nos jours de préserver le potentiel génétique d'animaux subfertiles ou même morts. Ces dernières années, ces techniques ont été utilisées avec succès dans des cas cliniques où l'obtention d'une gestation n'était pas possible.

Le succès et le développement de ces techniques reposent sur la maîtrise de la collecte et les manipulations d'ovocytes. Les premiers pas et les premiers grands succès ont été rapportés dans l'espèce bovine. Bénéficiant d'un intérêt marqué par le secteur bovin et d'une disponibilité quasi illimitée d'ovocytes provenant d'ovaires prélevés en abattoirs, les recherches ont rapidement débouché sur des techniques efficaces de production *in vitro* d'embryons reprenant la maturation *in vitro* (MIV) des ovocytes, la fécondation (FIV) et la culture *in vitro* d'embryons.

L'industrie du cheval, en refusant encore, dans bien des cas, le recours

à ces biotechnologies, et la bien moindre disponibilité d'ovaires d'abattoirs n'ont pas permis un essor aussi rapide des techniques de reproduction assistée dans cette espèce.

Cet article s'intéresse aux aspects cliniques de la récolte d'ovocytes, leur évaluation et leur usage en reproduction assistée chez la jument.

2 COLLECTE, ÉVALUATION ET MATURATION DES OVOCYTES

2.1 Collecte des ovocytes ex vivo

2.1.1 Manipulation et transport des ovaires prélevés à l'abattoir

Bien qu'aucune étude ne compare les méthodes et les milieux de transport des ovaires équins depuis l'abattoir jusqu'au laboratoire, différents milieux et conditions de transport ont été explorés. Parmi les milieux de transport utilisés, on retrouve des solutions cristalloïdes supplémentées en antibiotiques, des solutions commerciales destinées au flush d'embryons, un milieu complet de culture cellulaire (TCM-199) et du PBS (*phosphate-buffered saline*) (Hinrichs *et al.*, 1993 ; Alm et Torner, 1994 ; Del Campo *et al.*, 1995 ; Franz *et al.*, 2003 ; Preis *et al.*, 2004).

Le délai de transport des ovaires jusqu'au laboratoire ne semble pas affecter significativement la compétence méiotique des ovocytes pour autant qu'il reste inférieur à 15 heures (Shabpareh *et al.*, 1993 ; Del Campo *et al.*, 1995 ; Guignot *et al.*, 1999). Néanmoins, des taux de maturation relativement élevés ont été rapportés par des laboratoires pour lesquels le délai entre l'abattage et la récolte d'ovocytes est court, ce qui suggère que la compétence des ovocytes pourrait malgré tout être affectée par ce délai (Love *et al.*, 2003 ; Hinrichs *et al.*, 2005).

La température à laquelle sont conservés les ovaires pendant leur transport a également fait l'objet d'études. Une étude qui a évalué la morphologie du *cumulus oophorus* et l'apoptose des cellules de la granulosa suggère que les ovaires ne devraient pas être conservés plus de 3 heures entre 20 et 30°C afin d'éviter l'apoptose des cellules de la granulosa et pas plus de 2 heures à 35-37°C pour éviter les modifications morphologiques du *cumulus oophorus* (Pedersen *et al.*, 2004). Une autre étude a montré que les taux de maturation (métaphase I+II) après 24 h étaient supérieurs pour des ovocytes collectés immédiatement à l'arrivée des ovaires au laboratoire que pour des

ovocytes collectés après conservation des ovaires pendant 15 à 18 h à température ambiante ou à 4°C (Love *et al.*, 2003). Les résultats de cette même étude laissent penser que 4°C est sans doute une température trop basse pour une bonne conservation des ovaires et que leur réfrigération devrait être envisagée uniquement lorsque la durée de conservation est prolongée.

Une solution optimale serait probablement de réaliser la récolte des ovocytes sur le site même de l'abattoir (Love *et al.*, 2003) et de les placer immédiatement dans les conditions de MIV dans un incubateur portable pour les ramener au laboratoire. Cette méthode encore peu utilisée permettrait sans doute d'obtenir des taux de maturation optimaux, mais comporte des difficultés techniques évidentes (lieu et matériel de récolte des ovocytes sur place, transport des ovocytes à température et atmosphère contrôlées) (Caillaud *et al.*, 2008).

2.1.2 Collecte d'ovocytes à partir d'ovaires prélevés à l'abattoir (ex vivo)

La récolte des ovocytes équins présente certaines difficultés techniques. L'ensemble des étapes doit être réalisé avec un souci constant des conditions d'hygiène, de température, de pH et de milieu dans lequel se trouvent les ovocytes afin de les préserver au maximum. Les ovocytes peuvent être récoltés par aspiration (Desjardins *et al.*, 1985 ; Shabpareh *et al.*, 1993) à l'aide d'une aiguille 18 G et d'un système d'aspiration (± 1 bar) ou d'une pompe à vide (100-150mm Hg). L'ovaire peut également être tranché afin d'augmenter le nombre de follicules accessibles. L'ovocyte équin présente la particularité d'être fermement ancré sur un *cumulus oophorus* épais et trapus et dont les cellules présentent des extensions s'engrenant dans la couche de la thèque (Hawley *et al.*, 1995). Cette caractéristique rend difficile l'extraction de l'ovocyte hors de sa cavité. Ceci explique que la technique impliquant un grattage de la paroi interne du follicule après incision semble donner les meilleurs taux de collectes avec des valeurs d'environ 80 % (Del Campo *et al.*, 1995). Cette technique permet de récupérer des ovocytes dont la majorité ont encore un Complexe Ovocyte-Cumulus (COC) intact (Hinrichs *et al.*, 1993) alors que ceux obtenus par aspiration seule ne présentent souvent plus que les cellules de la *corona radiata* qui forment un anneau ceignant l'ovo-

cyte (Hinrichs, 1991). Après incision des follicules visibles, leur paroi est grattée à l'aide d'une curette. L'ovaire est ensuite disséqué en petits fragments afin d'accéder aux follicules qui se trouvent à l'intérieur du parenchyme ovarien. Alternativement, un grattage avec le biseau de l'aiguille peut être réalisé en cours d'aspiration des follicules. Malgré cela, le taux global de récolte d'ovocytes équins reste relativement faible (3-5 ovocytes/ovaire) étant donné que l'ovaire d'une jument comporte en moyenne 6 follicules antraux (Hinrichs, 1991 ; Del Campo *et al.*, 1995). En outre, ceci se traduit par une augmentation du temps et du personnel nécessaires pour la collecte d'ovocytes. Galli et collaborateurs (2007) considèrent, qu'en terme de temps et de personnel, la collecte d'ovocytes équins est 10 fois plus ardue que celle d'ovocytes bovins.

Toutes ces difficultés techniques constituent un frein au développement de la recherche fondamentale sur l'ovocyte équin et, naturellement, sur toutes les technologies qui en découlent.

2.2 Collecte d'ovocytes par ovum pick-up (in vivo)

Les ovocytes collectés à partir d'ovaires d'abattoirs représentent par définition une population très hétérogène et souffrent entre autre, d'un manque d'informations concernant l'âge des juments, leur phase du cycle et leur état gestatif.

Contrairement aux animaux de rente, l'application des biotechnologies pour la production d'embryons équins est limitée aux animaux souffrant de troubles de la fertilité ou aux sportifs de haut niveau. Il n'y a donc dans cette espèce, en dehors des fins de recherche que peu d'intérêt réel à produire des embryons à partir d'ovaires prélevés en abattoirs.

Pour les utilisations plus cliniques, les ovocytes sont souvent collectés *in vivo* après initiation de la maturation folliculaire et ovocytaire chez une jument en oestrus. Celle-ci peut être induite par l'administration de préparations commerciales contenant de l'hCG (effet LH), ou un analogue de GnRH (induction d'un pic endogène de LH). À des fins de recherche, des extraits hypophysaires (*Crude Equine Gonadotropin* - CEG) non disponibles commercialement, peuvent également être utilisés (Duchamp *et al.*, 1987).

Différentes approches visant à ponctionner des follicules et collecter leur ovocyte, telles que la laparotomie (Vogelsang *et al.*, 1988), la colpotomie (Hinrichs et Kenney, 1987), et la ponction à l'aveugle par le flanc (Palmer *et al.*, 1986), ont été envisagées. Les deux premières techniques chirurgicales ont assez rapidement été abandonnées pour des raisons évidentes. La ponction par le flanc nécessite très peu de matériel. Pratiquement, un trocard est placé dans la fosse sous-lombaire de la jument, l'ovaire est manipulé par voie trans-rectale et conduit en regard du trocard, une aiguille est passée au travers du trocard et le follicule est ponctionné et rincé à plusieurs reprises à l'aide de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) hépariné. Cette technique ne permet malheureusement pas de visualiser le follicule et l'aiguille d'aspiration et ne donne des résultats satisfaisants que pour la ponction de follicules de grande taille. Aussi, la ponction échoguidée par voie transvaginale est-elle devenue la technique de choix. La technique adaptée à partir de celle utilisée chez le bovin (McKinnon *et al.*, 1988 ; Bruck *et al.*, 1992) a ensuite été modifiée et utilisée par de nombreuses équipes (Bracher *et al.*, 1993 ; Cook *et al.*, 1993 ; Duchamp *et al.*, 1994 ; Carnevale et Ginther, 1995 ; Kanitz *et al.*, 1995 ; Meintjes *et al.*, 1995 ; Hinrichs *et al.*, 1998) et permet maintenant d'obtenir des taux de collectes qui vont de 51 à 86 % (Cook *et al.*, 1993 ; Bezard *et al.*, 1995 ; Meintjes *et al.*, 1995 ; Goudet *et al.*, 1997a ; Scott *et al.*, 2001).

Pratiquement, la jument est tranquilisée et une sonde échographique sectorielle est introduite dans le vagin antérieur jusqu'au niveau du col (fornix). L'ovaire est manipulé à travers la paroi rectale et positionné en regard de la sonde et une aiguille est avancée le long de la sonde et introduite dans la cavité antrale au travers de la paroi du vagin. Le liquide folliculaire est aspiré, et le follicule est rincé à plusieurs reprises. Des mouvements de rotation de l'aiguille sont réalisés en cours d'aspiration pour gratter la paroi folliculaire afin d'en détacher l'ovocyte. Le liquide folliculaire et les liquides de rinçage sont récoltés et immédiatement transmis en salle de culture pour rechercher l'ovocyte. Les follicules de plus de 25 mm sont ponctionnés à l'aide d'une aiguille à simple voie et vidangés et remplis à plusieurs reprises. Les follicules de

moins de 25 mm sont ponctionnés à l'aide d'une aiguille à double voie comme décrit par Duchamp et collaborateurs (1995).

2.3 Evaluation des ovocytes collectés

Après collecte *ex vivo* ou *in vivo*, les ovocytes peuvent être dénudés mais ils sont généralement entourés d'une quantité plus ou moins abondante de cellules de la *corona radiata* et du *cumulus oophorus*. Les couches cellulaires les plus internes présentent des projections qui traversent la zone pellucide pour établir un contact intime avec la membrane de l'ovocyte (Grondahl *et al.*, 1995). Ces cellules qui entourent l'ovocyte forment avec celui-ci l'ensemble complexe ovocyte-cumulus. Les COC's peuvent être caractérisés en fonction de leur degré d'expansion (Hinrichs *et al.*, 1993 ; Goudet *et al.*, 1997a ; Hinrichs et Williams, 1997) et celui-ci est directement corrélé au degré de maturation nucléaire de l'ovocyte (Zhang *et al.*, 1989 ; Goudet *et al.*, 1997a ; Gable et Woods, 2001). Les ovocytes immatures sont associés à des COC's compacts. Les COC's expansés sont associés à des follicules en cours d'atréxie. Ils présentent une meilleure aptitude à la reprise de la méiose après maturation *in vitro* (Hinrichs, 1991). Il est depuis longtemps établi que les follicules sont responsables du blocage de la méiose de l'ovocyte (Pincus et Enzemann, 1935). En s'atréxiant les follicules perdent leur capacité à maintenir ce blocage (Gougeon et Testart, 1986 ; Blondin et Sirard, 1995), ceci explique une reprise spontanée de la méiose des ovocytes en leur sein.

Les couches de cellules de la *corona radiata* et de la *granulosa* qui entourent l'ovocyte en limitent l'examen morphologique. En dehors de la technique d'injection intra-cytoplasmique d'un spermatozoïde (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection*, ICSI), pour l'ensemble des procédures impliquant un transfert de l'ovocyte, ces couches cellulaires sont nécessaires au bon déroulement des événements de fécondation et de développement embryonnaire précoce. Aussi, l'examen de l'ovocyte lui-même reste-t-il assez difficile et superficiel à moins de le dénuder mécaniquement ou à l'aide de trypsine. Néanmoins, l'aspect de l'ooplasm est corrélé à la viabilité des follicules, évaluée sur base de l'aspect des noyaux, le contact entre les

cellules de la granuleuse et la membrane basale. Les ovocytes présentant un ooplasm homogène sont davantage associés à des COC's compacts et à des follicules viables. Inversement, un ooplasm d'aspect granuleux et polarisé, correspondant à une distribution irrégulière de gouttelettes lipidiques et d'organelles intra-cellulaires, est davantage associé à des follicules atrétiques et à des COC's expansés (Hinrichs et Williams, 1997).

2.4 Maturation *in vitro* des ovocytes (MIV)

La maturation ovocytaire est le résultat d'un double processus de maturation, au niveau du cytoplasme d'une part et au niveau du noyau d'autre part. Les modifications morphologiques associées à la maturation de l'ovocyte ont été décrites en 6 étapes par Grondahl et collaborateurs (Grondahl *et al.*, 1995). Successivement, l'ovocyte présente : (1) un noyau sphérique au centre du cytoplasme, (2) un noyau sphérique à la périphérie de l'ooplasm, (3) un noyau aplati en périphérie de l'ooplasm, (4) la rupture du noyau de l'ovocyte, aussi appelé « vésicule germinale » d'où le terme de rupture de la vésicule germinale (*Germinal Vesicle Break Down*, GVBD), (5) métaphase I, (6) métaphase II caractérisée par la localisation périphérique des chromosomes métaphasiques et la présence d'un globule polaire dans l'espace périvitellin. Le globule polaire est généralement difficile à observer sous la loupe mais il arrive qu'occasionnellement il puisse être distingué dans l'espace périvitellin. La coloration spécifique de l'ADN des ovocytes dénudés par le bis benzamide ou Hoechst 33258 permet la classification des configurations de la chromatine en (1) vésicule germinale, (2) chromatine dense, (3) métaphase I, (4) métaphase II, (5) dégénéré (Hinrichs *et al.*, 1993 ; Goudet *et al.*, 1998b).

Les milieux utilisés pour la MIV d'ovocytes équins dérivent principalement du secteur bovin. Depuis la première MIV d'ovocytes équins (Fulka et Okolski, 1981), sur base des milieux déjà utilisés chez le bovin, la recherche s'est orientée vers des milieux de culture cellulaire synthétiques tels que le TCM-199 (Willis *et al.*, 1991 ; Dell'Aquila *et al.*, 1997 ; Galli *et al.*, 2001), ou le Ham's F10 (Okolski *et al.*, 1991 ; Willis *et al.*, 1991 ; Shabpareh *et al.*, 1993). Actuellement, la plu-

part des milieux utilisés comme base le TCM-199, le EMMI et des solutions de sels auxquels sont ajoutées du sérum de veau fœtal (FCS) et des hormones telles que la LH, la FSH, le benzoate d'oestradiol (Carnevale *et al.*, 2004) ou l'EGF (Goudet *et al.*, 1998a ; Lorenzo *et al.*, 2002). Quelques études (Hinrichs *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 2001 ; Choi *et al.*, 2002b ; Tremoleda *et al.*, 2003) ont investigué les cocultures pour la MIV des ovocytes équins mais elles ont davantage apporté d'informations sur les mécanismes d'inhibition de la méiose au sein du follicule que de bénéfice réel en terme de qualité de maturation.

La durée de maturation nécessaire a également fait l'objet de nombreuses investigations (Fulka et Okolski, 1981 ; Zhang *et al.*, 1989 ; Del Campo *et al.*, 1990 ; Willis *et al.*, 1991 ; Del Campo *et al.*, 1995 ; Bezaud *et al.*, 1997). Il est communément admis maintenant que l'on peut espérer un taux de maturation jusqu'au stade de métaphase II de l'ordre de 50 à 80 % après 30 heures d'incubation sous atmosphère contrôlée (39°C et 5 % de CO₂) (Scott *et al.*, 2001) et qu'une durée prolongée d'incubation n'améliore pas ce résultat (Shabpareh *et al.*, 1993). Les durées de maturation optimales dépendent du degré de maturation initial des ovocytes qui est corrélé à l'aspect de leur COC. Les taux de maturation maximum pour des ovocytes issus de COC's expansés et compacts ont été obtenus respectivement après 24 h et 32 h de MIV pour Hinrichs et collaborateurs (1993) et 24 h et 30 h pour l'équipe de Zhang (Zhang *et al.*, 1989).

Pour qu'un ovocyte puisse être fécondé, il doit achever sa maturation nucléaire et cytoplasmique. La maturation cytoplasmique repose principalement sur l'accumulation de protéines et d'ARNm dans l'ovocyte (Grondahl *et al.*, 1993). La maturation nucléaire repose sur la reprise de la méiose et le développement jusqu'au stade de métaphase II, ce qui peut être facilement évalué par des colorations spécifiques de l'ADN. En l'absence de technique de FIV conventionnelle efficace, la plupart des études portant sur la MIV des ovocytes se sont intéressées à leur maturation nucléaire, d'avantage qu'à leur maturation cytoplasmique pour laquelle le seul critère fiable est leur aptitude à produire un embryon. Lorsque des modifications cytoplasmiques au cours de la matura-

tion, comme par exemple la migration des granules corticaux ou des mitochondries ont été décrites (Grondahl *et al.*, 1995 ; Goudet *et al.*, 1997a ; Aguilar *et al.*, 2002 ; Carneiro *et al.*, 2002), leur importance en matière de compétence ovocytaire n'a pas été explorée.

Lorsque l'ovocyte est soustrait à l'environnement folliculaire, la méiose reprend spontanément, la chromatine des ovocytes se condense ce qui bloque la transcription ; il serait évidemment préférable que le stock de protéines et d'ARNm soit complet avant que la méiose ne reprenne (Sirard, 2001). C'est dans cette logique que des conditions de milieu qui maintiennent le blocage méiotique tout en maintenant la transcription avant culture d'ovocytes bovins permettent d'améliorer les taux d'embryons produits (Fouladi Nashta *et al.*, 1998 ; Hashimoto *et al.*, 2002). Cette même piste permettra peut-être de mieux comprendre les mécanismes du blocage de la méiose de l'ovocyte équin et d'améliorer leur maturation cytoplasmique.

3 UTILISATIONS DES OVOCYTES : TECHNIQUES DE REPRODUCTION ASSISTÉE

Au cours des dix dernières années, les techniques de reproduction assistée chez le cheval ont été largement développées. Cependant, la plupart de ces techniques requièrent des équipements spécifiques et une expertise particulière ce qui explique qu'elles restent principalement mises en œuvre dans des laboratoires spécialisés.

La fécondation *in vitro* (FIV) conventionnelle reste actuellement peu utilisable chez la jument et aucune technique reproductible de FIV n'a encore été mise au point. Les raisons invoquées concernent principalement l'absence d'une méthode efficace de capacitation des spermatozoïdes équins (Alm *et al.*, 2001), les changements dans la zone pellucide (Dell'Aquila *et al.*, 1999 ; Hinrichs *et al.*, 2002) ou une maturation *in vitro* des ovocytes imparfaite (Li *et al.*, 2001). À ce jour, le seul traitement qui induise la capacitation, la réaction acrosomiale des spermatozoïdes équins et qui permette leur pénétration dans l'ovocyte est l'ionophore calcique A23187 (Zhang *et al.*, 1990 ; Alm *et al.*, 2001 ; Hinrichs *et al.*, 2002). C'est par ailleurs le traitement de capacitation qui a été utilisé

pour produire les deux seuls poulains nés après FIV d'ovocytes maturés *in vivo* (Palmer *et al.*, 1991 ; Bezar *et al.*, 1992). Pour contourner ces difficultés, différentes approches pour produire des embryons à partir d'ovocytes soit *in vitro*, soit *in vivo* ont été explorées. Parmi celles-ci, le transfert intra-folliculaire d'ovocytes, le transfert intra-salpingien d'ovocytes et l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes.

3.1 Transfert d'ovocyte intra-folliculaire

La technique de transfert d'ovocyte intra-folliculaire (TOIF) consiste à injecter un ou plusieurs ovocytes dans le follicule préovulatoire d'une receveuse afin que ceux-ci trouvent les conditions favorables à leur maturation et soient ovulés en même temps que l'ovocyte du follicule préovulatoire. Le transfert intra-folliculaire a été initialement tenté chez le babouin, le bovin et le porc mais toujours sans succès, probablement suite aux dommages subis par les follicules lors des manipulations (Fleming *et al.*, 1985 ; Hinrichs et Digiorgio, 1991). Grâce à l'anatomie particulière de son ovaire présentant une médullaire périphérique et une tunique albuginée épaisse et résistante la jument constitue un modèle privilégié pour l'étude du TOIF. Pratiquement, la procédure s'apparente à celle décrite pour l'*ovum pick-up*. Le follicule préovulatoire est ponctionné et quelques millilitres de liquide folliculaire sont aspirés. Les ovocytes sont injectés dans le follicule et le circuit est flushé avec le liquide folliculaire initialement prélevé. Hinrichs et Di Giorgio (Hinrichs et Digiorgio, 1991) ont développé la technique et ont été les premiers à obtenir des embryons équins après transfert d'ovocytes immatures dans des follicules préovulatoires. La technique a été ensuite utilisée pour l'étude endocrinologique de la liqueur folliculaire au cours de la maturation folliculaire et celle des taux de maturation ovocytaire (Goudet *et al.*, 1997b). Plus récemment, des embryons ont été obtenus après TOIF d'ovocytes préalablement maturés *in vitro* (Deleuze *et al.*, 2009). Les taux rapportés d'embryons en excès par rapport aux ovocytes des receveuses varient de 12,8 % (6 embryons en excès/45 ovocytes transférés) après transfert d'ovocytes immatures et 5,5 % (3/55) après

transfert d'ovocytes maturés 30 h *in vitro* pour Deleuze et collaborateurs (Deleuze *et al.*, 2009) et 12 embryons en excès récoltés après transfert de 135 ovocytes immatures (8,9 %) pour Hinrichs et Di Giorgio (Hinrichs et Digiorgio, 1991). Le TOIF semble augmenter l'incidence des follicules anovulatoires mais il reste cependant une procédure relativement simple et peu invasive qui pourrait être envisagée pour contourner l'absence de protocoles efficaces de superovulation chez la jument (Deleuze *et al.*, 2009).

3.2 Transfert d'ovocytes intra-salpingien

Le transfert d'ovocytes (*Oocyte transfer* – OT) consiste à transférer chirurgicalement un ou plusieurs ovocytes d'une donneuse dans l'oviducte d'une receveuse. Brièvement, une laparotomie par le flanc permet l'accès à l'ovaire et à l'oviducte, une pipette est introduite dans sa lumière et les ovocytes y sont déposés (Deleuze *et al.*, 2008). Les ovocytes peuvent être maturés *in vivo* et récoltés à partir d'un follicule préovulatoire ou bien être obtenus à partir de follicules en dioestrus et ensuite maturés *in vitro*. La receveuse est inséminée avant et après transfert des ovocytes afin que la fécondation et le développement embryonnaire se déroulent dans l'oviducte et dans l'utérus. Alternativement, les spermatozoïdes peuvent être déposés dans l'oviducte en même temps que les ovocytes ; on parlera alors de GIFT pour « *Gamete Intra-Falopian Transfer* ». L'utilisation de sperme frais pour le GIFT donne de meilleurs résultats que le sperme congelé (Coutinho da Silva *et al.*, 2002), mais le transfert d'ovocytes seuls suivi de l'insémination de la receveuse est plus largement utilisé. L'application clinique majeure du transfert intra-salpingien d'ovocytes concerne les juments qui souffrent de pathologies utérines, cervicales ou salpyngiennes qui ne leur permettent pas de produire un embryon qui pourrait être collecté et transféré dans l'utérus d'une jument receveuse. Bien qu'il ait été démontré que des juments cycliques et non-cycliques pouvaient être utilisées comme receveuses sans affecter le taux de gestation (Carnevale *et al.*, 2005), et que certaines études rapportent l'utilisation de brebis comme receveuses (Wirtu *et al.*, 2004), la plupart des transferts utilisent des juments cycli-

ques dont l'ovocyte du follicule dominant a été retiré avant transfert afin d'éviter les manipulations hormonales des juments non-cyclées destinées à mimer la phase oestrale.

Le premier transfert d'ovocytes chez la jument a été rapporté par Mc Kinnon et collaborateurs (1988), mais leurs taux de blastocystes et ceux des études consécutives (Zhang *et al.*, 1989 ; Ray *et al.*, 1994) sont restés globalement bas. Des études plus récentes utilisant des ovocytes issus de follicules préovulatoires, maturés *in vivo* avec (Hinrichs *et al.*, 1997) ou sans (Carnevale et Ginther, 1995) maturation *in vitro* avant transfert ont permis d'obtenir des taux de blastocystes avoisinant les 85 %. Le transfert d'ovocytes dans l'oviducte d'une receveuse peut actuellement être considéré comme une solution alternative au transfert d'embryon chez les juments infertiles (Hinrichs *et al.*, 2002 ; Carnevale, 2004). Le premier poulain issu du transfert d'ovocytes récoltés à partir d'ovaires après la mort de la jument donneuse et ensuite maturés *in vitro*, est né en 2003 (Carnevale *et al.*, 2003). Les mêmes auteurs rapportent un taux de développement embryonnaire de 15 % (n = 191) après transfert d'ovocytes collectés post-mortem à partir de juments de grande valeur (Carnevale *et al.*, 2004). Les taux de développement embryonnaire après transfert intra-salpingien d'ovocytes maturés *in vitro* rapportés dans la littérature sont variables : 7 % (2/29) (Scott *et al.*, 2001), 15 % (11/73) et 18 % (13/73) (Preis *et al.*, 2004), 13 % (15/114) (Deleuze *et al.*, 2008). Même les taux les plus élevés : 24,1 % (2/29) (Zhang *et al.*, 1989) et 32,5 % (13/40) (Deleuze *et al.*, 2009) restent plus faibles que ceux obtenus après transfert d'ovocytes maturés *in vivo* et collectés à partir de follicules préovulatoires qui varient de 73 % à 83 % (Carnevale et Ginther, 1995 ; Hinrichs *et al.*, 1998 ; Scott *et al.*, 2001 ; Carnevale *et al.*, 2004). Un facteur majeur affectant le taux de succès reste l'âge de la jument donneuse. Les ovocytes de juments donneuses âgées présentent davantage d'anomalies morphologiques (Carnevale *et al.*, 1999) et produisent significativement moins de vésicules embryonnaires (Carnevale et Ginther, 1995).

3.3 Injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes

Alors que les techniques conventionnelles de FIV restent décevantes dans

l'espèce équine, l'injection intra-cytoplasmique de spermatozoïdes (*Intra-Cytoplasmic Sperm Injection* : ICSI) s'est avérée une méthode efficace pour réaliser la fécondation *in vitro* des ovocytes équins (Squires *et al.*, 2003 ; Hinrichs, 2005 ; Galli *et al.*, 2007).

La technique repose sur la micromanipulation d'un spermatozoïde qui est injecté dans l'ooplasm d'un ovocyte dénudé en métaphase II. Pratiquement, l'ovocyte est immobilisé et à l'aide d'un micro-injecteur, un spermatozoïde est déposé dans le cytoplasme. Cette technique élimine la difficulté de la capacitation du sperme équin, du passage de la zone pellucide de l'ovocyte et permet même l'usage de sperme de qualité médiocre ou d'étaçons oligospermiques. Les résultats avec du sperme frais et du sperme congelé sont comparables (Choi *et al.*, 2002a) pour autant qu'un spermatozoïde mobile soit sélectionné pour l'injection intra-cytoplasmique (Lazzari *et al.*, 2002). Une fois la fécondation obtenue, l'ovocyte peut éventuellement être activé chimiquement. Ensuite, l'embryon doit encore être cultivé jusqu'au stade morula ou blastocyste afin de pouvoir être transféré dans l'utérus d'une jument receveuse. Cette étape de culture *in vitro* reste délicate et les jeunes embryons issus de l'ICSI peuvent alternativement être transférés dans l'oviducte d'une jument receveuse afin d'y poursuivre leur développement. La culture des embryons peut également être réalisée *in vivo* dans les oviductes de brebis avant d'être transférés dans l'utérus d'une jument receveuse (Hinrichs, 2005).

Depuis la naissance en 1996 d'un premier poulain né après ICSI (Squires *et al.*, 1996), la technique n'a cessé de s'améliorer et plusieurs poulains sont nés depuis en utilisant cette méthode (Squires *et al.*, 1996 ; Mc Kinnon *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2001 ; Galli *et al.*, 2002). Des études récentes rapportent des taux de clivage après ICSI de 50-80 % (Choi *et al.*, 2002a). Malheureusement, seul un faible pourcentage de ces zygotes clivés poursuivent leur développement en culture jusqu'à former un blastocyste. Différents milieux de culture des jeunes embryons jusqu'au stade où ils peuvent être transférés ont été investigués : G1.2 (Choi *et al.*, 2002a), DMEM-F12 et CZB (Choi *et al.*, 2004a), et du SOF modifié (Galli

et al., 2002) mais les taux de développement jusqu'au stade blastocyste dans ces études sont restés faibles (4 à 16 %). D'autres ont étudié les effets de co-cultures avec différents types cellulaires : des cellules Vero (Dell'Aquila *et al.*, 1997), des cellules épithéliales de l'oviducte (Battut *et al.*, 1991), des cellules de la granulosa (Rosati *et al.*, 2002), ou des cellules du cumulus (Li *et al.*, 2001) ; mais les taux de blastocystes sont restés faibles (4 à 16 %) pour tous ces milieux. Par contre, la mise en culture des zygotes potentiels (soit les ovocytes après ICSI) *in vivo* dans l'oviducte d'une jument (Choi *et al.*, 2004b) ou d'une brebis receveuse (Galli *et al.*, 2002 ; Lazzari *et al.*, 2002) permet un meilleur taux de développement embryonnaire (approximativement 36 %) (Galli *et al.*, 2007), les meilleurs résultats ayant été obtenus après culture dans l'oviducte d'une brebis (45 %) (Galli *et al.*, 2002 ; Lazzari *et al.*, 2002). Cependant, récemment un milieu de culture *in vitro* utilisant du DMEM-F12 sous atmosphère mixte contrôlée a permis d'obtenir des taux de développement de blastocystes (27-38 %) se rapprochant de ces résultats (Choi *et al.*, 2006a ; 2006b ; Galli *et al.*, 2007).

4 CONCLUSION

La qualité de la maturation ovocytaire constitue un élément clé pour la mise en œuvre des techniques qui viennent d'être abordées. Les ovocytes maturés *in vivo* représentent les meilleurs candidats pour leur application. Malheureusement, la jument étant une espèce mono-ovulante chez qui la superovulation est décevante, ces ovocytes maturés *in vivo* restent peu nombreux et difficiles à obtenir. Le grand nombre d'ovocytes nécessaires à la recherche et à ses applications justifie les efforts pour améliorer les résultats de MIV. La compétence ovocytaire peut être mesurée par le taux de production de blastocystes après fécondation. Celui-ci dépend, non seulement du milieu de culture de l'embryon, mais aussi des conditions de maturation de l'ovocyte lui-même. Les conditions de maturation *in vitro* de l'ovocyte sont déterminantes pour son aptitude ultérieure à voir se développer un embryon. Galli et collaborateurs (2007) ont récemment mis en évidence une amélioration significative de leurs taux de clivage et de développement des blastocystes après ICSI suite au changement de leur milieu de matu-

ration sans amélioration significative de leurs taux de métaphase II. Ceci illustre l'importance de la compétence ovocytaire acquise durant la MIV.

Des progrès énormes ont été accomplis dans le domaine de la récolte et la manipulation des ovocytes équins. Ceci a conduit au développement de techniques de reproduction assistée et d'applications cliniques et commerciales qui permettent dorénavant d'obtenir des descendants d'étalons et de juments de faible fertilité ou de sauver leur potentiel génétique après leur mort.

Assisted reproduction in the equine: collection, evaluation, maturation and use of equine oocytes.

SUMMARY

Despite the paucity of equine oocytes available for research, recently developed assisted reproduction techniques can now be offered to produce embryos from subfertile stallions and mares or to salvage their gene-

tics after their death. This paper describes the clinical aspects of oocytes collection either ex vivo or in vivo, their evaluation and in vitro maturation and discusses their uses for intra-follicular and intra-oviductal oocyte transfer and intra-cytoplasmic sperm injection.

BIBLIOGRAPHIE

- AGUILAR J., LOSINNO L., KONCURAT M., MIRAGAYA M.H. Nuclear cytoplasmic and mitochondrial patterns of ovulated oocytes in young and aged mares. *Theriogenology*, 2002, **58**, 689-692.
- ALM H., TORNER H. In vitro maturation of horse oocytes. *Theriogenology*, 1994, **42**, 345-349.
- ALM H., TORNER H., BLOTTNER S., NURNBERG G., KANITZ W. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. *Theriogenology*, 2001, **56**, 817-829.
- BATTUT I., BEZARD J., PALMER E. Establishment of equine oviduct cell monolayers for co-culture with early equine embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1991, **44**, 393-403.
- BEZARD J., GOUDET G., DUCHAMP G., PALMER E. Preovulatory maturation of ovarian follicles and oocytes in unstimulated and superovulatory mares. *Biol. Reprod. Mono*, 1995, **1**, 261-271.
- BEZARD J., MAGISTRINI M., BATTUT I., DUCHAMP G., PALMER E. Fecondation in vitro chez les équidés. *Rec. Med. Vet.*, 1992, **168**, 993-1003.
- BEZARD J., MEKARSKA A., GOUDET G., DUCHAMP G., PALMER E. Timing of in vivo maturation of equine preovulatory oocytes and competence for in vitro maturation of immature oocytes collected simultaneously. *Equine Vet. J. Suppl.*, 1997, 33-37.
- BLONDIN P., SIRARD M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995, **41**, 54-62.
- BRACHERV., PARLEVIET J., FAZELI A.R., PIETERSE M.C., VOS P., DIELEMAN S.J., TAVERNE M., COLENBRANDER B. Repeated transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in the mare. *Equine Vet. J.*, 1993, **15**, 75-78.
- BRUCK I., RAUN K., SYNNESTVEDT B., GREVE T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. *Equine Vet. J.*, 1992, **24**, 58-59.
- CAILLAUD M., REIS A.P., ACHARD E., SEIGNOBOS F., PALMER E. Oocyte maturation in a portable incubator: an alternative for laboratories situated far from abattoirs. In : proceedings of the 7th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Cambridge, 2008, 10-11.
- CARNEIRO G.F., LIU I.K., HYDE D., ANDERTSON G.B., LORENZO P.L., BALL B.A. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002, **63**, 451-458.
- CARNEVALE E., COUTINHO DA SILVA M.A., PREIS K.A., STOKES J.E., SQUIRES E.L. Establishment of pregnancies from oocytes collected from ovaries of euthanized mares. In : 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP), Denver (CO), 2004, 531-533.
- CARNEVALE E., USON M., BOZZOLA J., KING S., SCHMITT S., GATES H. Comparison of oocytes from young and old mares with light and electron microscopy. *Theriogenology*, 1999, **51**, 299.
- CARNEVALE E.M. Oocyte transfer and gamete intrafallopian transfer in the mare. *Anim. Reprod. Sci.*, 2004, **82-83**, 617-624.
- CARNEVALE E.M., COUTINHO DA SILVA M.A., MACLELLAN L.J., SEIDEL G.E., JR., SQUIRES E.L. Use of parentage testing to determine optimum insemination time and culture media for oocyte transfer in mares. *Reproduction*, 2004, **128**, 623-628.
- CARNEVALE E.M., COUTINHO DA SILVA M.A., PANZANI D., STOKES J.E., SQUIRES E.L. Factors affecting the success of oocyte transfer in a clinical program for subfertile mares. *Theriogenology*, 2005, **64**, 519-527.
- CARNEVALE E.M., GINTHER O.J. Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol. Reprod. Mono*, 1995, **1**, 209-214.
- CARNEVALE E.M., MACLELLAN L.J., COUTINHO DA SILVA M.A., SQUIRES E.L. Pregnancies attained after collection and transfer of oocytes from ovaries of five euthanized mares. *J.*

- Am. Vet. Med. Assoc.*, 2003, **222**, 60-62.
- CHOI Y.H., LOVE C.C., LOVE L.B., VARNER D.D., BRINSKO S., HINRICHS K. Developmental competence in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction*, 2002a, **123**, 455-465.
- CHOI Y.H., SHIN T., LOVE C.C., JOHNSON C., VARNER D.D., WESTHUSIN M.E., HINRICHS K. Effect of co-culture with theca interna on nuclear maturation of horse oocytes with low meiotic competence, and subsequent fusion and activation rates after nuclear transfer. *Theriogenology*, 2002b, **57**, 1005-1011.
- CHOI Y.H., LOVE L.B., VARNER D.D., HINRICHS K. Factors affecting developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction*, 2004a, **127**, 187-194.
- CHOI Y.H., ROASA L.M., LOVE C.C., VARNER D.D., BRINSKO S.P., HINRICHS K. Blastocyst formation rates in vivo and in vitro of in vitro-matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.*, 2004b, **70**, 1231-1238.
- CHOI Y.H., LOVE C.C., VARNER D.D., HINRICHS K. Equine blastocyst development after intracytoplasmic injection of sperm subjected to two freeze-thaw cycles. *Theriogenology*, 2006a, **65**, 808-819.
- CHOI Y.H., LOVE L.B., VARNER D.D., HINRICHS K. Holding immature equine oocytes in the absence of meiotic inhibitors: Effect on germinal vesicle chromatin and blastocyst development after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 2006b, **66**, 955-963.
- COOK N.L., SQUIRES E.L., RAY B.S., JASKO D.J. Transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration of equine oocytes. *Equine Vet. J.*, 1993, **15**, 71-74.
- COUTINHO DA SILVA M.A., CARNEVALE E.M., MACLELLAN L.J., PREIS K.A., LEO K.M., SQUIRES E.L. Use of fresh, cooled and frozen semen during gamete intrafallopian transfer in mares. *Theriogenology*, 2002, **58**, 763-766.
- DEL CAMPO M.R., DONOSO M.X., PARRISH J.J., GHINTER O.J. In vitro fertilization of in vitro matured equine oocytes. *Equine Vet. Sci.*, 1990, **10**, 18-22.
- DEL CAMPO M.R., DONOSO X., PARRISH J.J., GINTHER O.J. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. *Theriogenology*, 1995, **43**, 1141-1153.
- DELEUZE S., DUBOIS C.S., CAILLAUD M., BRUNEAU B., GOUDET G., DUCHAMP G. Influence of cysteamine on in vitro maturation, in vitro and in vivo fertilization of equine oocytes. *Reprod. Domest. Anim.*, 2008, **in press**.
- DELEUZE S., GOUDET G., CAILLAUD M., LAHUEC C., DUCHAMP G. Efficiency of embryonic development after Intra-Follicular and Intra-Oviductal transfer of in vitro and in vivo matured horse oocytes. *Theriogenology*, 2009, **72**, 203-209.
- DELL'AQUILA M.E., CHO Y.S., MINOIA P., TRAINA V., LACALANDRA G.M., MARITATO F. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 1997, **12**, 2766-2772.
- DELL'AQUILA M.E., DE FELICI M., MASSARI S., MARITATO F., MINOIA P. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro. *Biol. Reprod.*, 1999, **61**, 533-540.
- DESJARDINS M., KING W.A., BOUSQUET D. In vitro maturation of horse oocytes. *Theriogenology*, 1985, **23**, 187.
- DUCHAMP G., BEZARD J., PALMER E. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. In : proceedings of the 6th International Symposium on Equine Reproduction, Caxambu (BRA), 1994, Society for the Study of Reproduction, Ann Arbor (USA), 233-241.
- DUCHAMP G., BEZARD J., PALMER E. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. *Biol. Reprod. Monogr.*, 1995, **1**, 233-241.
- DUCHAMP G., BOUR B., COMBARNOUS Y., PALMER E. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1987, **35**, 221-228.
- FLEMING A.D., SALGADO R., KUEHL T.J. Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate dominant follicle in vivo. *Theriogenology*, 1985, **23**, 193.
- FOULADI NASHTA A.A., WADDINGTON D., CAMPBELL K.H. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development In vitro: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. *Biol. Reprod.*, 1998, **59**, 255-262.
- FRANZ L.C., CHOI Y.H., SQUIRES E.L., SEIDEL G.E., JR., HINRICHS K. Effects of roscovitine on maintenance of the germinal vesicle in horse oocytes, subsequent nuclear maturation, and cleavage rates after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction*, 2003, **125**, 693-700.
- FULKA J., JR., OKOLSKI A. Culture of horse oocytes in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 1981, **61**, 213-215.
- GABLE T.L., WOODS G.L. Confocal microscopy of germinal vesicle-stage equine oocytes. *Theriogenology*, 2001, **55**, 1417-1430.
- GALLI C., COLLEONI S., DUCHI R., LAGUTINA I., LAZZARI G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim. Reprod. Sci.*, 2007, **98**, 39-55.
- GALLI C., CROTTI G., DUCHI R., MARI G., ZAGAGLIA G., DUCHAMP G., DAELS P., LAZZARI G. Frozen-thawed embryos produced by ovum pickup

- of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancies in the horse. *Theriogenology*, 2002, **58**, 705-708.
- GALLI C., CROTTI G., NOTARI C., TURINI P., DUCHI R., LAZZARI G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 2001, **55**, 1341-1357.
- GOUDET G., BEZARD J., DUCHAMP G., GERARD N., PALMER E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic in vitro maturation: effect of follicle size and hormonal environment. *Biol. Reprod.*, 1997a, **57**, 232-245.
- GOUDET G., BEZARD J., DUCHAMP G., PALMER E. Transfer of immature oocytes to a preovulatory follicle: an alternative to in vitro maturation in the mare? *Equine Vet. J. Suppl.*, 1997b, **25**, 54-59.
- GOUDET G., BELIN F., BEZARD J., GERARD N. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Mol. Hum. Reprod.*, 1998a, **4**, 563-570.
- GOUDET G., BEZARD J., BELIN F., DUCHAMP G., PALMER E., GERARD N. Oocyte competence for in vitro maturation is associated with histone H1 kinase activity and is influenced by estrous cycle stage in the mare. *Biol. Reprod.*, 1998b, **59**, 456-462.
- GOUGEON A., TESTART J. Germinal vesicle breakdown in oocytes of human atretic follicles during the menstrual cycle. *J. Reprod. Fertil.*, 1986, **78**, 389-401.
- GRONDAHL C., GRONDAHL N., ERIKSEN T., GREVE T., HYTTEL P. In vitro fertilisation and initial embryogenesis in the mare. *Equine Vet. J. Suppl.*, 1993, **15**, 79-83.
- GRONDAHL C., HYTTEL P., GRONDAHL M.L., ERIKSEN T., GOTFREDSEN P., GREVE T. Structural and endocrine aspects of equine oocyte maturation in vivo. *Mol. Reprod. Dev.*, 1995, **42**, 94-105.
- GUIGNOT F., BEZARD J., PALMER E. Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after in vitro maturation. *Theriogenology*, 1999, **52**, 757-766.
- HASHIMOTO S., MINAMI N., TAKAKURA R., IMAI H. Bovine immature oocytes acquire developmental competence during meiotic arrest in vitro. *Biol. Reprod.*, 2002, **66**, 1696-1701.
- HAWLEY L.R., ENDERS A.C., HINRICHS K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biol. Reprod. Monogr.*, 1995, **1**, 243-252.
- HINRICHS K. The relationship of follicle atresia to follicle size, oocyte recovery rate on aspiration, and oocyte morphology in the mare. *Theriogenology*, 1991, **36**, 157-168.
- HINRICHS K. Update on equine ICSI and cloning. *Theriogenology*, 2005, **64**, 535-541.
- HINRICHS K., CHOI Y.H., LOVE L.B., VARNER D.D., LOVE C.C., WALCKENAER B.E. Chromatin configuration within the germinal vesicle of horse oocytes: changes post mortem and relationship to meiotic and developmental competence. *Biol. Reprod.*, 2005, **72**, 1142-1150.
- HINRICHS K., DIGIORGIO L.M. Embryonic development after intra-follicular transfer of horse oocytes. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1991, **44**, 369-374.
- HINRICHS K., KENNEY R.M. A colpotomy procedure to increase recovery rates on aspiration of equine preovulatory follicles. *Theriogenology*, 1987, **27**, 237.
- HINRICHS K., WILLIAMS K.A. Relationships among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. *Biol. Reprod.*, 1997, **57**, 377-384.
- HINRICHS K., SCHMIDT A.L., FRIEDMAN P.P., SELGRATH J.P., MARTIN M.G. In vitro maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. *Biol. Reprod.*, 1993, **48**, 363-370.
- HINRICHS K., MARTIN M.G., SCHMIDT A.L., FRIEDMAN P.P. Effect of follicular components on meiotic arrest and resumption in horse oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 1995, **104**, 149-156.
- HINRICHS K., MATTHEWS G.L., FREEMAN D.A. Effect of oocyte maturation time on embryo development after oocyte transfer in the mare. *Theriogenology*, 1997, **47**, 392.
- HINRICHS K., MATTHEWS G.L., FREEMAN D.A., TORELLO E.M. Oocyte transfer in mares. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1998, **212**, 982-986.
- HINRICHS K., LOVE C.C., BRINSKO S.P., CHOI Y.H., VARNER D.D. In vitro fertilization of in vitro-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization in vivo after oviductal transfer. *Biol. Reprod.*, 2002, **67**, 256-262.
- KANITZ W., BECKER F., ALM H., TORNER H. Ultrasound-guided follicular aspiration in mares. *Biol. Reprod. Monogr.*, 1995, **1**, 225-231.
- LAZZARI G., CROTTI A., TURINI P., DUCHI R., MARI G., ZAVAGLIA G., BARBACINI S., GALLI A. Equine embryos at the compacted morula and blastocyst stage can be obtained by intracytoplasmic injection (ICSI) of in vitro matured oocytes with frozen-thawed spermatozoa from semen of different fertilities. *Theriogenology*, 2002, **58**, 709-712.
- LI X., MORRIS L.H., ALLEN W.R. Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction*, 2001, **121**, 925-932.
- LORENZO P.L., LIU I.K., CARNEIRO G.F., CONLEY A.J., ENDERS A.C. Equine oocyte maturation with epidermal growth factor. *Equine Vet. J.*, 2002, **34**, 378-382.
- LOVE L.B., CHOI Y.H., LOVE C.C., VARNER D.D., HINRICHS K. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *Theriogenology*, 2003, **59**, 765-774.

- MC KINNON A.O., LACHAM-KAPLAN O., TROUNSON A. Pregnancies produced from fertile and infertile stallions by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of single frozen/thawed spermatozoa into in vivo-matured mare oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 2000, **56**, 513-517.
- MCKINNON A.O., CARNEVALE E.M., SQUIRES E.L. Heterogenous and xenogenous fertilization of equine oocytes. *J. Equine Vet. Sci.*, 1988, **8**, 143-147.
- MEINTJES M., BELLOW M.S., PAUL J.B., BROUSSARD J.R., LI L.Y., PACCAMONTI D., EILTS B.E., GODKE R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for in vitro fertilization. *Biol. Reprod. Monogr.*, 1995, **1**, 281-292.
- OKOLSKI A., BEZARD J., MAGISTRINI M., PALMER E. Maturation of oocytes from normal and atretic equine ovarian follicles as affected by steroid concentrations. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1991, **44**, 385-392.
- PALMER E., DUCHAMP G., BEZARD J., MAGISTRINI M., KING A., BOUSQUET D., BETTERIDGE K. Recovery of follicular fluid and oocytes of mares by non-surgical punctures of the preovulatory follicle. *Theriogenology*, 1986, **25**, 178.
- PALMER E., BEZARD J., MAGISTRINI M., DUCHAMP G. In vitro fertilization in the horse: a retrospective study. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 1991, **44**, 375-384.
- PEDERSEN H.G., WATSON E.D., TELFER E.E. Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. *Theriogenology*, 2004, **62**, 468-480.
- PINCUS G., ENZEMANN E.V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J. Exp. Med.*, 1935, **62**, 665-675.
- PREIS K.A., CARNEVALE E.M., COUTINHO DA SILVA M.A., CARACCILO DI BRIENZA V., GOMES G.M., MACLELLAN L.J., SQUIRES E.L. In vitro maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22 degrees C. *Theriogenology*, 2004, **61**, 1215-1223.
- RAY B.S., SQUIRES E.L., COOK N.L. Pregnancy following gamete intrafallopian transfer in the mare. *J. Equine Vet. Sci.*, 1994, **14**, 27-30.
- ROSATI I., BERLINGUER F., BOGLIOLO L., LEONI G., LEDDA S., NAITANA S. The effect of co-culture on the development of in vitro matured equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Equine Vet. J.*, 2002, **34**, 673-678.
- SCOTT T.J., CARNEVALE E.M., MACLELLAN L.J., SCOGGIN C.F., SQUIRES E.L. Embryo development rates after transfer of oocytes matured in vivo, in vitro, or within oviducts of mares. *Theriogenology*, 2001, **55**, 705-715.
- SHABPAREH V., SQUIRES E.L., SEIDEL G.E., JASKO D.J. Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro. *Theriogenology*, 1993, **40**, 1161-1175.
- SIRARD M.A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, 2001, **55**, 1241-1254.
- SQUIRES E.L., CARNEVALE E.M., MCCUE P.M., BRUEMMER J.E. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, 2003, **59**, 151-170.
- SQUIRES E.L., WILSON J.M., KATO H., BLASZCZYK A. A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 1996, **45**, 306.
- TREMOLEDA J.L., THARASANIT T., VAN TOL H.T., STOUT T.A., COLENBRANDER B., BEVERS M.M. Effects of follicular cells and FSH on the resumption of meiosis in equine oocytes matured in vitro. *Reproduction*, 2003, **125**, 565-577.
- VOGELSANG M.M., KREIDER J.L., BOWEN M.J., POTTER G.D., FORREST D.W., KRAEMER D.C. Methods for collecting follicular oocytes from mares. *Theriogenology*, 1988, **29**, 1007-1018.
- WILLIS P., CAUDLE A.B., FAYRER-HOSKEN R.A. Equine oocyte in vitro maturation: influences of sera, time, and hormones. *Mol. Reprod. Dev.*, 1991, **30**, 360-368.
- WIRTUG., BAILEY T.L., CHAUHAN M.S., PARKER N.A., DASCANIO J.J., GWAZDAUSKAS F.C., LEY W.B. Xenogenous fertilization of equine oocytes following recovery from slaughterhouse ovaries and in vitro maturation. *Theriogenology*, 2004, **61**, 381-391.
- ZHANG J.J., BOYLE M.S., ALLEN W.R. Recent studies on in vitro fertilization of equine oocytes. *Equine Vet. J.*, 1989, **21**, 101-104.
- ZHANG J.J., MUZS L.Z., BOYLE M.S. In vitro fertilization of horse follicular oocytes matured in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, 1990, **26**, 361-365.