

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES	9
LISTE DES TABLEAUX, FIGURES ET PHOTOGRAPHIES	10
INTRODUCTION	11
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	13
1 – PARTICULARITES DE LA FONCTION DE REPRODUCTION CHEZ LA JUMENT	13
11 - STRUCTURE DE L'OVAIRE	13
12 - OVOGENESE ET FOLLICULOGENESE	14
121 - Ovogenèse	14
122 - Croissance folliculaire basale gonadotrophines-indépendante	15
123 - Croissance folliculaire gonadotrophines-dépendante	15
124 – Vagues folliculaires	16
125 - Follicule préovulatoire et maturation finale de l'ovocyte	17
1241 - <i>Maturation nucléaire ou méiotique</i>	17
1242 - <i>Maturation cytoplasmique</i>	17
1243 - <i>Expansion du cumulus</i>	18
13 - ENDOCRINOLOGIE ET CINETIQUE DE LA FOLLICULOGENESE CHEZ LA JUMENT CYCLEE	19
2 – LES NOUVELLES TECHNIQUES DE REPRODUCTION ASSISTEE DANS L'ESPECE EQUINE	22
21 – FECONDATION IN VITRO CONVENTIONNELLE	22
22 – AUTRES TECHNIQUES DE PROCREATION ASSISTEE	23
23 – ALTERNATIVES A LA FECONDATION IN VITRO	24
3 - INDICATIONS, AVANTAGES ET LIMITES DU TRANSFERT D'OVOCYTE DANS L'OVIDUCTE	26
31 - INDICATIONS ET AVANTAGES DU TRANSFERT D'OVOCYTE DANS L'OVIDUCTE	26
311 - Intérêt comme alternative au transfert d'embryon chez les juments subfertiles	26
3111 - <i>Absence d'ovulation</i>	26
3112 - <i>Anomalies de l'infundibulum et de l'oviducte</i>	26
3113 - <i>Anomalies utérines</i>	27
3114 - <i>Problèmes divers</i>	27
312 - Intérêt en recherche	27
32 - LIMITES DU TRANSFERT D'OVOCYTE DANS L'OVIDUCTE	28
4 – METHODES DE GIFT DECRITES ET RESULTATS OBTENUS DANS L'ESPECE EQUINE	29
41 - STADE DE MATURATION DES OVOCYTES COLLECTES	29
411 – Collecte d'ovocytes immatures	29
412 – Collecte d'ovocytes ayant repris leur méiose	30

413 – La superovulation chez la jument	31
4131 – Injection d'hormones à activité FSH	31
4132 – Immunisation anti-inhibine	32
42 – INDUCTION DE L'OVULATION	33
421 – Nécessité d'induire l'ovulation	33
422 – Hormones utilisées pour induire l'ovulation dans l'espèce équine	33
423 – Délai entre l'induction de l'ovulation et la collecte de l'ovocyte préovulatoire	36
43 – ETAPES DU TRANSFERT D'OVOCYTE PEOVULATOIRE DANS L'OVIDUCTE	36
44 – RESULTATS OBTENUS PAR TRANSFERT D'OVOCYTE PEOVULATOIRE DANS L'OVIDUCTE	38
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	47
1 - ANIMAUX, MATERIELS ET METHODES	49
11 - ANIMAUX	49
12 - PREPARATION ET GESTION DES DONNEUSES ET DES RECEVEUSES	49
121 - Induction de l'ovulation	49
122 - Gestion des donneuses	50
123 - Gestion des receveuses	50
13 - COLLECTE DE L'OVOCYTE PEOVULATOIRE DES DONNEUSES	54
131 - Matériel	54
132 - Préparation et médication	55
133 - Déroulement de la ponction folliculaire transvaginale échoguidée	55
14 - COLLECTE DE L'OVOCYTE PEOVULATOIRE DES RECEVEUSES	60
15 - PREPARATION DE L'OVOCYTE PEOVULATOIRE AVANT TRANSFERT	60
151 - Préparation de l'ovocyte préovulatoire dans le lot 35h	61
152 - Préparation de l'ovocyte préovulatoire dans le lot 24h	61
16 - TRANSFERT DE L'OVOCYTE PEOVULATOIRE	61
161 - Insémination artificielle des receveuses	62
162 - Préparation des receveuses	62
163 - Technique chirurgicale	63
17 - GESTION DES RECEVEUSES APRES TRANSFERT	65
18 - DIAGNOSTIC DE GESTATION	65
2 - RESULTATS	67
21 - TAUX D'OVULATION DES DONNEUSES AVANT LA COLLECTE	67
22 - NOMBRE DE PONNETTES UTILISEES ET REPARTITION PAR LOT	67
23 - COLLECTE DE L'OVOCYTE PEOVULATOIRE DES DONNEUSES	68
231 - Taux de collecte global	68
232 - Taux de collecte dans le lot 35h	68
233 - Taux de collecte dans le lot 24h	68

24 - TRANSFERT DES OVOCYTES COLLECTES	69
241 - Taux de transfert global	69
242 - Taux de transfert dans le lot 35h	69
243 - Taux de transfert dans le lot 24h	69
244 - Nombre de transferts pour chaque lot	69
25 - COLLECTE DE L'OVOCYTE PREEVULATOIRE DES RECEVEUSES	70
251 - Receveuses du lot 35h	70
252 - Receveuses du lot 24h	70
26 - TAUX DE COLLECTE OBTENU POUR L'ENSEMBLE DES PONCTIONS EFFECTUEES	70
27 - TAUX DE GESTATION	71
271 - Lot 35h	71
272 - Lot 24h	71
273 - Taux de gestation global	73
3 – DISCUSSION	75
31 - TAUX D'OVULATION AVANT LA COLLECTE	75
32 - COLLECTE DES OVOCYTES	76
321 – Choix du moment et de la technique de collecte	76
3211 – <i>Pour les donneuses</i>	76
3212 – <i>Pour les receveuses</i>	77
322 - Taux de collecte	78
3221 – <i>Taux de collecte par ponction folliculaire transvaginale</i>	78
3222 – <i>Comparaison des taux de collecte des deux lots de donneuses</i>	79
3223 - <i>Taux de collecte par ponction du follicule préovulatoire après laparotomie</i>	79
33 - TAUX DE TRANSFERT	80
34 - TAUX DE GESTATION	84
341 – Taux de gestation global	84
342 – Comparaison des taux de gestation obtenus dans chaque lot	84
343 – Hypothèses pouvant expliquer le taux de gestation obtenu	85
3431 – <i>Qualité des ovocytes avant leur collecte</i>	86
3432 - <i>Stade de maturation des ovocytes</i>	86
3433 – <i>Effet de la collecte sur les ovocytes</i>	86
3434 – <i>Effet de la conservation in vitro sur les ovocytes</i>	87
3435 – <i>Nombre et moment des inséminations artificielles</i>	89
3436 - <i>Synchronisation des cycles de la receveuse et de la donneuse</i>	91
3437 - <i>Etat progestatif des receveuses</i>	92
3438 – <i>Déroulement de la chirurgie de transfert</i>	94
3439 – <i>Effet secondaire de la médication des receveuses</i>	95

CONCLUSION	97
BIBLIOGRAPHIE	99

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

BSA : Bovine Serum Albumine
CEG : Crude Equine Gonadotropin
D : Donneuse d'ovocyte
DG : Diagnostic de gestation
eCG : equine Chorio-Gonadotrophin
FIV : Fécondation *In Vitro*
FSH : Follicle Stimulating Hormone
GIFT : Gamete Intra Fallopian Transfer
GnRH : Gonadotropin Releasing Hormone
h : heure
hCG : human Chorionic Gonadotropin
Hi : Heure de l'induction de l'ovulation
HGLL : Hank Glucose Lactose
IA : Insémination Artificielle
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
IM : Intra-Musculaire
IV : Intra-Veineuse
LH : Luteinizing Hormone
ND : Nom Déposé
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PGF_{2α} : Prostaglandines F_{2α}
PMSG : Pregnant Mare Serum Gonadotrophin
PTF : Ponction folliculaire transcutanée par le flanc
PTV : Ponction folliculaire transvaginale
PVC : Polychlorure de vinyle
PZD : Partial zona dissection
R : Receveuse d'ovocyte
SJO : Sérum de jument en œstrus
SUZI : Subzonal sperm injection
SVF : Sérum de veau fœtal
TCM 199 : Tissue Culture Medium 199
TOIF : Transfert d'ovocytes intra-folliculaire
UI : Unité Internationale
ZD : Zona drilling

LISTE DES TABLEAUX, FIGURES ET PHOTOGRAPHIES

Tableau I : Taux de collecte, degré d'expansion du cumulus et stade méiotique d'ovocytes préovulatoires équins selon l'intervalle entre la collecte et l'induction de l'ovulation

Tableau II : Etudes sur le GIFT par transfert d'ovocytes issus de follicules préovulatoires

Tableau III : Répartition des effectifs

Tableau IV : Taux de collecte des ovocytes des donneuses

Tableau V : Taux de transfert des ovocytes collectés et nombre de transfert par lot

Tableau VI : Collecte de l'ovocyte préovulatoire des receveuses, diagnostic de gestation et taux de gestation

Tableau VII : Taux de gestation

Figure 1 : Ovaire de jument

Figure 2 : Vagues folliculaires au cours du cycle chez la jument

Figure 3 : Profil des concentrations plasmatiques moyennes de LH et FSH au cours du cycle chez la jument (GOUDET, 1998)

Figure 4 : Profil des concentrations plasmatiques moyennes de LH et FSH au cours du cycle chez la jument (GINTHER et BERGFELT, 1993)

Figure 5 : Profils hormonaux au cours du cycle chez la jument

Figure 6 : Gestion des donneuses

Figure 7 : Gestion des receveuses

Figure 8 : Principe de la ponction folliculaire transvaginale échoguidée

Figure 9 : Arbre décisionnel en cas de diagnostic de gestation positif

Photographies 1 : Ovocyte équin entouré d'un cumulus compact (a) et d'un cumulus expansé (b) observé au microscope inversé au grossissement x 100

Photographies 2 : Matériel d'échographie pour la ponction folliculaire transvaginale

Photographies 3 : Ponction folliculaire transvaginale

Photographies 4 : Images échographiques au cours d'une ponction folliculaire

Photographie 5 : Vue d'ensemble d'une laparotomie par le flanc

Photographie 6 : Recherche de l'ovaire dans l'abdomen

Photographie 7 : Extériorisation de l'ovaire par taxis

Photographie 8 : Insertion de la pipette Pasteur dans l'oviducte

INTRODUCTION

Alors qu'elles avaient été quasiment abandonnées depuis la fin du 19^{ème} siècle et l'avènement de la mécanisation, les recherches zootechniques sur le cheval ont repris en France au début des années 1970 : la fonction de reproduction a été privilégiée par l'instauration d'un programme de recherche mené par l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) et les Haras Nationaux. Ces recherches ont permis de caractériser les particularités de cette fonction chez le cheval par rapport aux autres espèces ; toutefois, le retard des connaissances en physiologie de la reproduction et sur sa maîtrise, par rapport aux avancées réalisées pour les autres Ongulés domestiques, n'a pas été totalement comblé.

Dans l'espèce équine, le transfert d'embryon est une technique de reproduction assistée développée depuis 1972 et désormais utilisée commercialement : il permet d'obtenir un produit d'une jument de valeur ne pouvant mener une gestation à terme, pour des raisons médicales ou sportives. Mais le transfert d'embryon ne peut être utilisé que pour des juments capables de fournir un embryon ; or la collecte d'embryon est souvent infructueuse chez les juments subfertiles (HINRICHS *et al.*, 1998a). Pourtant ces juments, dites subfertiles car incapables de mener une gestation après saillie, sont la plupart du temps capables de fournir un ovocyte fécondable (CARNEVALE, 1996). Leur fertilité peut être améliorée en collectant leur ovocyte avant l'ovulation avant que celui-ci ne passe dans les voies génitales altérées. Les techniques pour obtenir un poulain à partir d'un ovocyte d'une jument donneuse incluent la fécondation *in vitro* (FIV) ou le transfert d'ovocyte ; ces techniques sont en cours d'élaboration dans l'espèce équine. La FIV conventionnelle et la FIV assistée ne sont pas encore suffisamment au point chez le cheval car les conditions d'environnement appropriées pour la maturation ovocytaire, pour la pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte et pour le développement embryonnaire précoce jusqu'à un stade transférable ne sont pas encore bien définies : seuls deux poulains sont nés après FIV conventionnelle (PALMER *et al.*, 1991 ; BEZARD *et al.*, 1992) et un après ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection) (SQUIRES *et al.*, 1996). Le transfert d'ovocyte dans le follicule préovulatoire d'une receveuse inséminée, décrit par HINRICHS (1998), et le transfert d'ovocyte dans l'oviducte d'une femelle d'une autre espèce (fécondation xénogène, MCKINNON *et al.*, 1987, 1988), sont des techniques encore non répétables.

Ainsi la technique de reproduction assistée alternative au transfert d'embryon la plus propice au succès pour obtenir un poulain à partir d'un ovocyte d'une jument donneuse est le

transfert d'ovocyte dans l'oviducte d'une jument receveuse, ou GIFT (Gamete Intrafallopian Transfer), ou encore fécondation hétérogène. Il consiste à collecter un ovocyte d'une femelle donneuse par ponction folliculaire puis à le placer chirurgicalement dans l'oviducte d'une femelle receveuse, inséminée artificiellement ou saillie, et dont le propre ovocyte préovulatoire a été préalablement retiré. La fécondation et le développement embryonnaire et foetal ont lieu dans les voies génitales de la receveuse.

Le GIFT a été développé avec succès d'abord chez l'homme à partir de 1984, puis chez les porcs et les bovins (RAY *et al.*, 1994). Dans l'espèce équine, différentes méthodes de GIFT ont été utilisées dans plusieurs programmes de recherche et ont donné lieu à des gestations avec plus ou moins de succès. Les résultats récents obtenus par certains laboratoires sont encourageants, mais il faut encore déterminer les facteurs influençant les résultats (HINRICHS *et al.*, 1998a).

L'objectif de notre expérience, menée dans l'Unité *Reproduction équine* de l'INRA de Tours dans le cadre de la mise au point d'une technique de GIFT dans ce laboratoire, est d'étudier un de ces facteurs : le délai entre l'induction de l'ovulation et la collecte de l'ovocyte préovulatoire transféré. Celui-ci n'est pas le même selon les équipes de recherche et pourrait expliquer les différences de résultats obtenus. L'expérience vise à comparer le transfert d'ovocytes préovulatoires collectés 35 h après induction de l'ovulation et transférés immédiatement, au transfert d'ovocytes préovulatoires collectés 24 h après induction de l'ovulation et dont la maturation finale a lieu *in vitro* avant le transfert.

Les particularités de la fonction de reproduction chez la jument et les nouvelles techniques de reproduction assistée développées dans l'espèce équine seront abordées. Les indications, les avantages et les limites du GIFT seront énoncés et les différentes méthodes de GIFT et les résultats obtenus présentés. Enfin notre expérience sera décrite et ses résultats discutés.

PREMIERE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE PARTICULARITES DE LA REPRODUCTION ET REPRODUCTION ASSISTEE CHEZ LA JUMENT

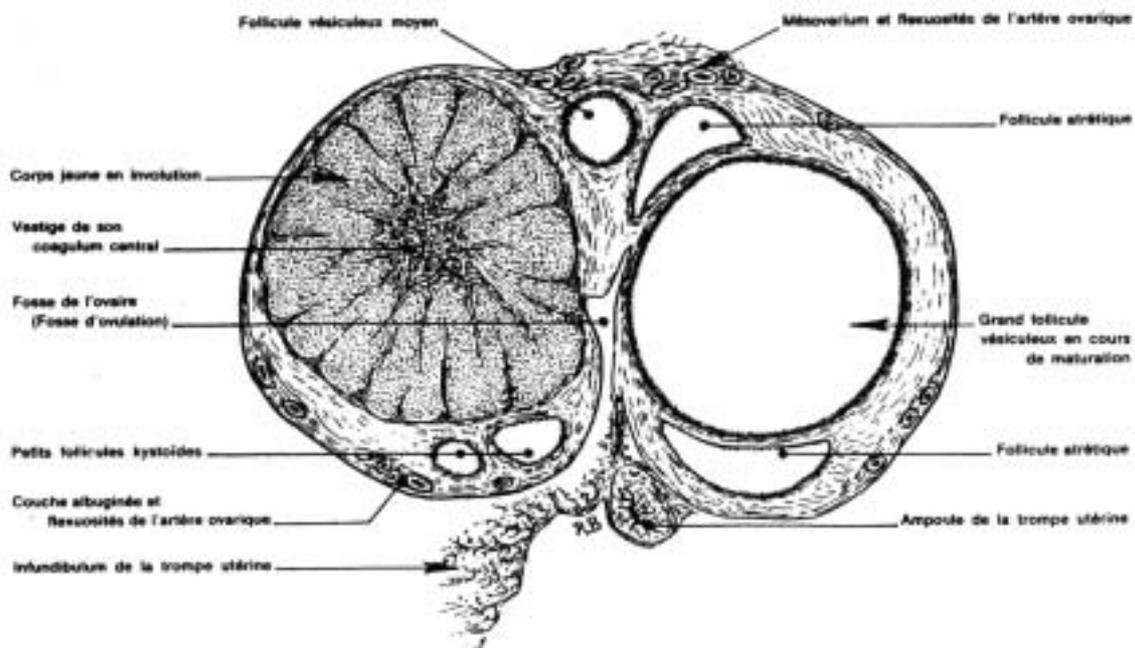
1 – PARTICULARITES DE LA FONCTION DE REPRODUCTION CHEZ LA JUMENT

La jument est une espèce monoovulante à polyœstrus saisonniers et de jours longs, dont GOUDET (1998) a présenté les principales particularités de la fonction de reproduction.

11 - STRUCTURE DE L'OVAIRE

Un ovaire de jument est représenté à la figure 1.

Figure 1 : Ovaire de jument (d'après BARONE, 1990)



Les ovaires permettent la production d'hormones ovariennes, œstrogènes et progestérone, responsables du comportement sexuel et des modifications des voies génitales au cours du cycle sexuel, et la production des gamètes femelles au sein des follicules ovariens. L'ovaire de jument présente des singularités anatomiques : les follicules sont produits au

centre de l'ovaire et non dans le cortex comme dans l'ovaire des autres femelles domestiques ; le site des ovulations est restreint à la fosse ovulatoire et non pas étendu sur toute la surface de l'ovaire. Enfin une tunique fibreuse vascularisée entoure l'ovaire, hormis au niveau de la fosse ovulatoire.

12 - OVOGENESE ET FOLLICULOGENESE

L'activité sexuelle de la jument est saisonnière, principalement sous l'influence de la photopériode. Trois phases d'activité ovarienne se succèdent au cours de l'année :

- au printemps et en été, l'activité est cyclique : la croissance folliculaire aboutit à l'ovulation qui a lieu environ tous les 21 jours ;
- en automne, il s'agit d'une période de transition : la fréquence des corps jaunes persistants augmente, ceux-ci se maintiennent pendant 2 à 3 mois au lieu de régresser au bout de 14 jours environ et des croissances folliculaires peuvent se produire ;
- en hiver, 60 % des juments et 100 % des ponettes présentent une période d'inactivité ovarienne où la croissance folliculaire s'arrête.

L'ovulation est le résultat d'une maturation et d'une croissance folliculaire (la folliculogénèse) et d'une maturation ovocytaire (l'ovogénèse) débutant dès la vie embryonnaire ; ces processus, semblables chez la plupart des femelles de mammifères domestiques, présentent certaines particularités propres aux équins.

121 - Ovogénèse

Il s'agit d'une succession de transformations aboutissant à la production d'un ovocyte mature. Dans l'embryon, entre 50 et 160 jours de gestation, les cellules germinales primordiales se divisent par mitoses en de nombreuses ovogonies, cellules diploïdes à 64 chromosomes. Entre 70 et 150 jours de gestation, suite à l'intervention de facteurs de déclenchement non étudiés chez la jument, les ovogonies entament la première division méiotique jusqu'en prophase de première division méiotique (ou prophase I) où l'ovocyte reste bloqué : c'est le stade vésicule germinale. Une couche de cellules de la granulosa entoure alors chaque ovocyte : l'ensemble, enveloppé dans une membrane basale, constitue un follicule primordial. Le stock de follicules primordiaux se trouvant à la naissance dans chaque ovaire représente la réserve d'ovocytes de la jument tout au long de sa vie. Ce stock est relativement limité dans cette espèce par rapport à celui des autres femelles domestiques (36000 follicules primordiaux par ovaire chez la jument contre 120 000 chez la vache par exemple).

122 - Croissance folliculaire basale gonadotrophines-indépendante

Elle se met en place après la naissance, sous l'influence de facteurs mal connus chez les mammifères en général et non étudiés chez la jument. Les follicules croissent de façon continue jusqu'à un diamètre de 10 mm ; cette croissance ayant lieu aussi bien chez la jument non pubère qu'en période d'anœstrus, elle semble indépendante des gonadotrophines. D'autre part, en parallèle de cette croissance folliculaire, le diamètre de l'ovocyte croît également.

Les étapes de cette croissance folliculaire basale sont similaires chez la jument et chez les autres femelles domestiques : suite à la multiplication des cellules de la granulosa, à la formation de la zone pellucide et à la différenciation de la thèque autour de la membrane basale, le follicule primordial devient follicule primaire. Puis la thèque se divise en thèque externe et thèque interne et deux couches de cellules de la granulosa sont présentes : le follicule primaire devient follicule secondaire. Le follicule tertiaire, ou cavitaire, apparaît chez la jument à environ 300 µm de diamètre et atteindra 10 mm : il correspond à l'apparition d'une cavité, ou antrum, au sein des cellules de la granulosa qui se sont multipliées.

123 - Croissance folliculaire gonadotrophines-dépendante

Son mécanisme chez la jument est similaire à celui décrit chez les autres femelles domestiques mais la jument s'en distingue par la grande taille atteinte par les follicules préovulatoires.

A chaque cycle œstrien, plusieurs follicules tertiaires de 10 mm entrent en croissance sous l'influence des hormones gonadotropes : la FSH (Follicle Stimulating Hormone) et la LH (Luteinizing Hormone). Les cellules folliculaires se multiplient et la taille de l'antrum augmente considérablement : le follicule d'une jument atteint 50 mm au stade préovulatoire. Cette croissance se produit en plusieurs phases :

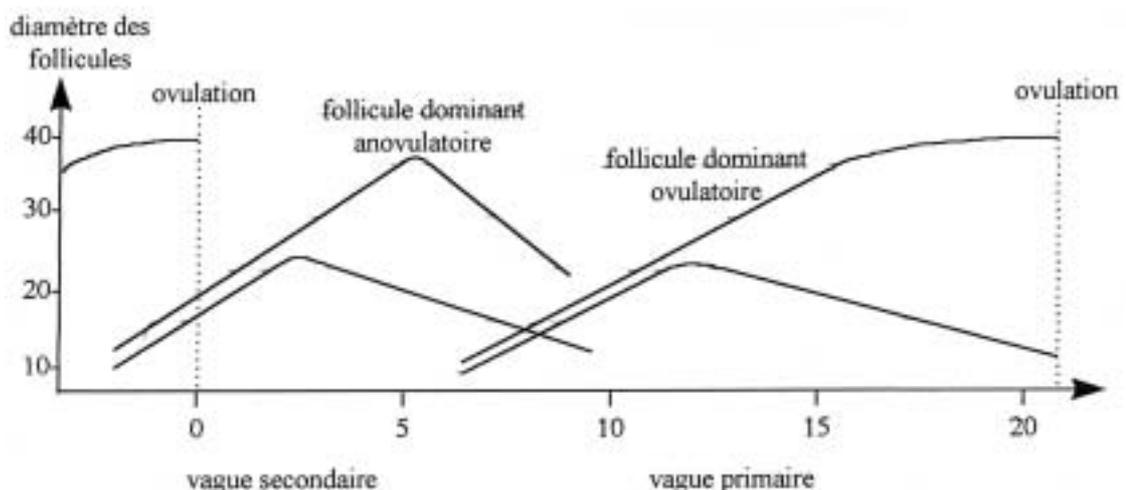
- Lors du recrutement, un groupe de 5 ou 6 petits follicules tertiaires de 10 mm entre en croissance gonado-régulée à une vitesse d'environ 3 mm par jour (BERNARDEAU *et al.*, 1998). C'est la FSH qui est responsable du recrutement chez la plupart des mammifères dont la jument, avec la présence indispensable d'un niveau basal de LH qui n'a pas été étudié chez la jument.
- Un seul des follicules recrutés va achever sa croissance et sa maturation jusqu'au stade préovulatoire, alors que les autres vont régresser. Cette sélection existe chez tous les mammifères domestiques monoovulants, selon le même mécanisme : au cours de la phase folliculaire, le follicule dominant produit jusqu'à l'ovulation des quantités croissantes d'inhibine, protéine exerçant un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de FSH hypophysaire.

Lorsque le follicule dominant atteint 20 mm de diamètre, les taux de FSH circulants sont fortement déprimés, ce qui induit l'atrésie des autres follicules recrutés. Seul le follicule dominant atteint la taille préovulatoire et peut ovuler. La capacité du follicule dominant à se développer dans un milieu pauvre en FSH n'a pas été étudiée chez la jument. La croissance simultanée de deux follicules dominants aboutissant à une double ovulation est possible dans 8 % à 44 % des cas selon des facteurs raciaux, familiaux, saisonniers et d'âge. Les triples et quadruples ovulations sont dix fois moins fréquentes que les doubles. Ainsi les ovulations multiples sont plus fréquentes chez les Pur-Sangs et les Trotteurs américains (15 à 25 %), que chez les Selle-Français (14%) ; elles sont rares chez les Arabes et les poneys. Elles sont répétables chez un même individu et plus fréquentes chez les juments non suitées que chez les juments suitées (26 % vs 18 %). Elles sont plus fréquentes entre 6 et 10 ans qu'entre 2 et 5 ans. Enfin, leur fréquence augmente de février à juillet (BERNARDEAU *et al.*, 1998).

124 – Vagues folliculaires

Lors du cycle, la jument présente une ou deux vagues de croissance folliculaire majeure, caractérisées par le recrutement et la croissance de plusieurs follicules, puis par la sélection d'un follicule dominant. Ces vagues correspondent à la courbe de sécrétion de LH qui comporte un ou deux pics. La vague primaire est présente à chaque cycle et aboutit à l'ovulation, elle commence en moyenne 7 jours après l'ovulation précédente. La vague secondaire n'est pas toujours présente, surtout en fin de saison de reproduction ; elle se produit pendant la phase lutéale et aboutit soit à la sélection d'un follicule dominant anovulatoire qui régresse, soit à une ovulation de phase lutéale, qui est une spécificité des équidés. Les vagues folliculaires au cours du cycle sont présentées à la figure 2.

Figure 2 : Vagues folliculaires autour du cycle de la jument (GOUDET, 1998)



125 - Follicule préovulatoire et maturation finale de l'ovocyte

D'après BEZARD (1997a), la maturation ovocytaire est l'acquisition par l'ovocyte de son aptitude à être normalement fécondé par un spermatozoïde et à assurer un développement embryonnaire normal.

Le follicule dominant croît jusqu'à 45-50 mm. En fin de croissance, se produit une maturation du follicule dominant et de son ovocyte sous l'influence de LH, qui intervient dans l'espèce équine d'une façon particulière par rapport aux autres mammifères domestiques : le taux de LH ne présente pas de pic de courte durée et de forte amplitude juste avant l'ovulation mais une augmentation progressive sur plusieurs jours atteignant un maximum le lendemain de l'ovulation ; cela empêche de prédire le moment de l'ovulation chez la jument par le dosage de la LH et rend difficile l'étude de la maturation folliculaire et ovocytaire dans cette espèce. Cette maturation a tout de même pu être étudiée après induction de l'ovulation par traitement avec des gonadotrophines exogènes.

Le profil des hormones stéroïdes dans le liquide folliculaire au cours de la maturation finale du follicule dominant est semblable aux autres espèces domestiques : le taux d'œstradiol diminue et le taux de progestérone augmente.

La maturation finale de l'ovocyte comprend la maturation nucléaire ou méiotique, la maturation cytoplasmique et l'expansion du cumulus.

1241 - Maturation nucléaire ou méiotique

Dans les 36 heures précédant l'ovulation, l'ovocyte, bloqué en prophase I, reprend la méiose sous l'influence de LH et de facteurs mal connus dans l'espèce équine. Les étapes sont identiques à celles décrites chez les autres mammifères domestiques : après rupture de l'enveloppe nucléaire, la métaphase de première division méiotique (ou métaphase I) conduit à l'émission du premier globule polaire ; puis la méiose se poursuit jusqu'en métaphase de deuxième division méiotique (ou métaphase II), stade auquel l'ovulation se produit. Jusqu'à sa fécondation, l'ovocyte reste bloqué en métaphase II. Ainsi, rappelle BEZARD (1997a), comme chez la plupart des autres mammifères, les ovocytes ovulés chez la jument ont complètement achevé leur maturation nucléaire.

1242 - Maturation cytoplasmique

BEZARD (1997a) explique qu'une maturation nucléaire complète ne suffit pas à garantir la qualité de l'ovocyte destiné à être fécondé pour donner un embryon ; la maturation cytoplasmique finale doit également être achevée ; la migration des granules corticaux vers

l'oolemme est un critère d'évaluation de la maturation cytoplasmique dans l'ovocyte des mammifères : dans les ovocytes équins juste avant l'ovulation, la plupart des granules corticaux sont alignés en périphérie le long de l'oolemme.

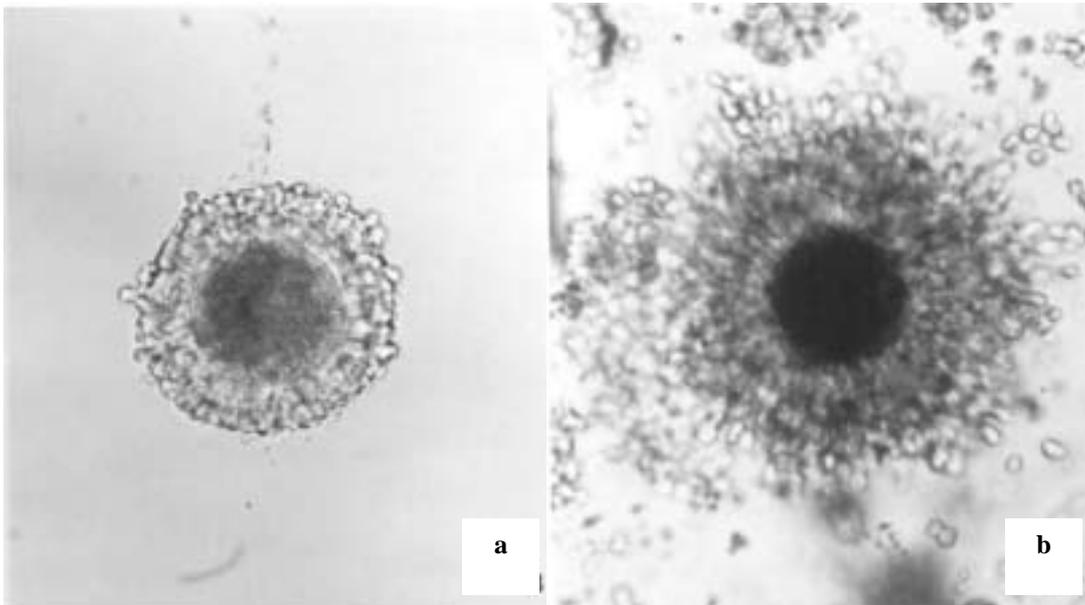
1243 - Expansion du cumulus

Les ovocytes immatures au stade vésicule germinale dans les stades précoces de follicules préovulatoires sont complètement entourés par des cellules du cumulus compactes. Juste avant le moment attendu de l'ovulation, les ovocytes en métaphase II sont entourés par un gros complexe jaune : le cumulus oophorus expansé, mesurant en moyenne 2,5 mm de diamètre ; cette structure gélatineuse collante est composée de matériel cellulaire et acellulaire tel que l'acide hyaluronique (BEZARD, 1997a).

HINRICHS *et al.* (1998a) considèrent l'expansion du cumulus comme un signe que le follicule a répondu à la stimulation par les gonadotrophines et est prêt à ovuler.

Les photographies 1a et 1b montrent la morphologie d'un ovocyte entouré d'un cumulus compact (1a) et celui d'un ovocyte entouré d'un cumulus expansé (1b).

Photographies 1 : Ovocyte équin entouré d'un cumulus compact (a) et d'un cumulus expansé (b) observé au microscope inversé au grossissement x 100



13 - ENDOCRINOLOGIE ET CINÉTIQUE DE LA FOLLICULOGENÈSE CHEZ LA JUMENT CYCLÉE

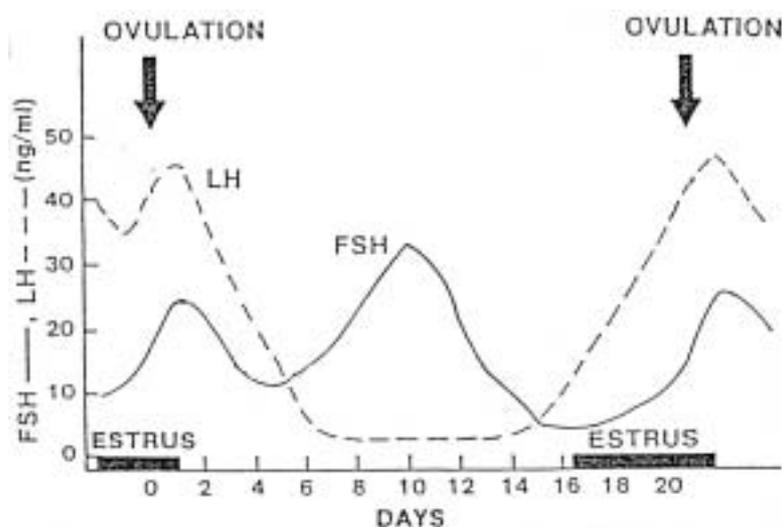
En période d'activité cyclique, l'ovulation se produit tous les 21 jours environ, mais une des particularités de la jument est la grande variabilité de la longueur des cycles : 21,5 jours +/- 2,5 jours (BERNARDEAU *et al.*, 1998). Le cycle est classiquement divisé en 2 phases :

- La phase folliculaire correspond à la croissance du follicule préovulatoire jusqu'à l'ovulation.
- La phase lutéale s'étend de l'ovulation à la régression fonctionnelle du corps jaune.

L'hormone stimulant la fonction ovarienne est la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) sécrétée par l'hypothalamus, qui stimule la synthèse des gonadotrophines hypophysaires FSH et LH.

La principale particularité du profil hormonal du cycle de la jument réside dans l'évolution du taux de LH qui ne présente pas de pic de courte durée et de forte amplitude juste avant l'ovulation mais présente une augmentation progressive sur plusieurs jours atteignant un maximum le lendemain de l'ovulation et atteignant une valeur minimale 4 à 5 jours après l'ovulation. Les figures 3, 4 et 5 montrent la cinétique de FSH et LH au cours du cycle chez la jument.

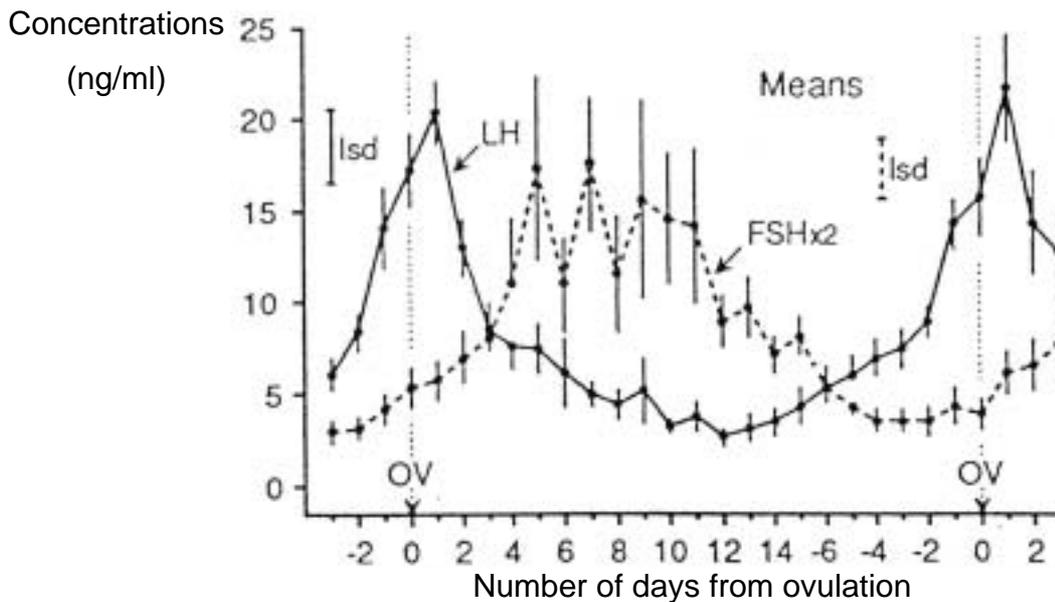
Figure 3 : Profils des concentrations plasmatiques moyennes de LH et FSH au cours du cycle de la jument (GOUDET, 1998)



L'évolution du taux de FSH au cours du cycle est controversée : certains auteurs ont montré la présence de 2 pics, l'un juste après l'ovulation et le second en fin de phase lutéale, comme le montre la figure 3 ; d'autres auteurs ont observé un seul pic juste avant que le

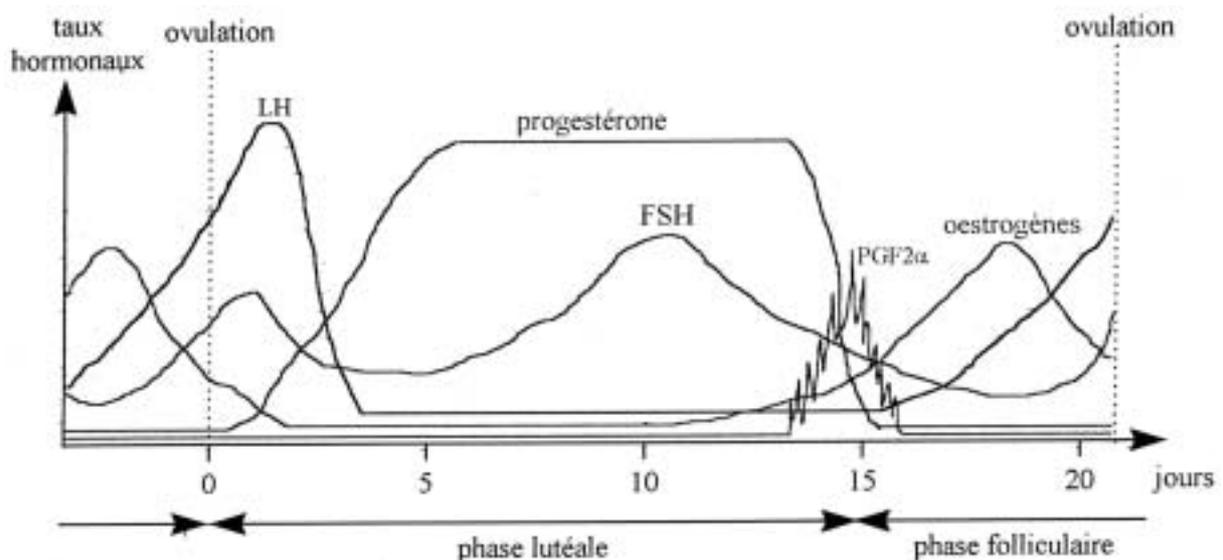
follicule dominant atteint 20 mm, avec une inhibition de la sécrétion au cours de la croissance du follicule dominant, un minimum au stade préovulatoire, et une augmentation après l'ovulation lorsque l'inhibition par le follicule dominant est levée, comme présenté à la figure 4. En fait, il semble que la courbe de sécrétion de FSH présente 2 pics en début de saison de reproduction et un seul en fin de saison.

Figure 4 : Profils des concentrations plasmatiques moyennes de LH et FSH au cours du cycle de la jument (GINTHER et BERGFELT, 1993)



Les cinétiques des taux d'œstrogènes et de progestérone au cours du cycle sont présentées à la figure 5.

Figure 5 : Profils hormonaux au cours du cycle de la jument (GOUDET, 1998)



Les taux plasmatiques d'œstrogènes augmentent 10 jours avant l'ovulation jusqu'à un pic 1 ou 2 jours avant l'ovulation, puis diminuent jusqu'à leur taux basal 2 jours plus tard. La concentration en progestérone augmente rapidement après l'ovulation jusqu'à un maximum 6 jours après ; elle reste élevée pendant toute la phase lutéale et baisse rapidement après la régression du corps jaune, environ 14 jours après l'ovulation. Les prostaglandines $F_{2\alpha}$, secrétées par l'utérus non gravide, sont le premier facteur lutéolytique chez la jument.

Rapport-Gratuit.com

2 – LES NOUVELLES TECHNIQUES DE REPRODUCTION ASSISTEE DANS L'ESPECE EQUINE

Le transfert d'embryon après collecte d'embryon *in vivo* est désormais couramment utilisé pour des juments de haute valeur génétique ou ne pouvant mener une gestation à terme. Mais certaines juments ne sont pas candidates à cette collecte car elles sont incapables, pour diverses raisons, de fournir de jeunes embryons. Pour permettre la production d'embryons par de telles juments, de nouvelles techniques de reproduction assistée ont été développées depuis 15 ans (BEZARD et GUIGNOT, 1999). La fécondation *in vitro* (FIV) est la fusion, dans un tube ou une boîte de culture, de l'ovule et du spermatozoïde, dont on a préalablement assuré la maturation nucléaire et cytoplasmique. Les résultats rapportés sont les taux de pénétration des ovocytes, les taux de formation des pronuclei et plus rarement les taux de clivage.

21 – FECONDATION IN VITRO CONVENTIONNELLE

Il s'agit d'incuber un ovocyte, collecté chez une jument donneuse, avec des spermatozoïdes capacités par un agent chimique, puis de transférer l'embryon obtenu chez une jument receveuse.

Cette technique a été tentée avec succès chez le cheval à la fin des années 1980 : des embryons étaient produits *in vitro* à partir d'ovocytes collectés au stade préovulatoire mis à incuber avec des spermatozoïdes capacités par un ionophore calcique ; puis les embryons étaient mis en culture courte et transférés chirurgicalement dans l'oviducte de la receveuse au stade 4 à 8 cellules : 2 gestations sur 14 transferts d'embryons ont été obtenues et 2 poulains sont nés (PALMER *et al.*, 1991 ; BEZARD *et al.*, 1992).

Depuis, les taux de fécondation *in vitro* rapportés restent faibles : ils varient de 4 à 33 % selon les études ; les meilleurs ont été obtenus en utilisant des spermatozoïdes capacités par un ionophore et des ovocytes ayant subi une maturation *in vitro*, mais aucune gestation n'a été obtenue après transfert des embryons ainsi produits (BEZARD et GUIGNOT, 1999). L'utilisation de caféine ou d'héparine comme cela pratiqué chez les bovins pour capaciter les spermatozoïdes n'a pas amélioré les résultats (BEZARD, 1999). La survie après transfert intra-utérin non chirurgical d'embryons obtenus *in vitro* et mis en culture longue jusqu'au stade morula n'est pas rapportée (BEZARD *et al.*, 1992).

Les mauvais taux de fécondation et de développement embryonnaire *in vitro* obtenus dans l'espèce équine sont certainement dus à la méconnaissance de toutes les étapes du processus

de fécondation *in vitro*, du développement du jeune embryon avant son entrée dans l'utérus chez la jument, et des conditions de culture optimales pour la FIV (BEZARD, 1997a).

22 – AUTRES TECHNIQUES DE PROCREATION ASSISTEE

En raison de la dureté de la zone pellucide de l'ovocyte équin empêchant le spermatozoïde de pénétrer dans l'ovocyte, et de la difficulté de mise au point d'une méthode de capacitation des spermatozoïdes d'étalon, la FIV conventionnelle a un succès limité chez le cheval et n'est plus étudiée ces dernières années (BEZARD et GUIGNOT, 1999 ; BEZARD, 1999). D'autres techniques de procréation assistée, ou FIV assistée, sont expérimentées chez le cheval depuis une dizaine d'années et en cours de mise au point ; elles visent à faciliter la pénétration du spermatozoïde dans l'ovule, qui doit pour le féconder franchir la zone pellucide puis la membrane plasmique. Ces techniques reposent sur la micromanipulation des gamètes et nécessitent l'emploi d'un microscope avec micromanipulateurs et de micropipettes (BEZARD et GUIGNOT, 1999). Toutes nécessitent le retrait préalable du cumulus et de la corona radiata de l'ovocyte (BEZARD, 1997a).

- Les techniques de PZD (partial zona dissection) et de ZD (zona drilling) consistent à faire une brèche dans la zone pellucide, respectivement mécaniquement et chimiquement, avant de mettre à incuber dans un tube ovocytes et spermatozoïdes, préalablement capités ; ces techniques optimisent les chances qu'au moins un des spermatozoïdes franchisse la zone pellucide et entre dans l'espace péri-vitellin (c'est-à-dire entre la zone pellucide et la membrane plasmique) : le taux de pénétration est de 12 % après PZD alors qu'il est de 4 % quand la zone pellucide est laissée intacte (CHOI *et al.*, 1994). Les taux de clivage obtenus avec ces techniques sont assez élevés : ils varient de 30 à 80 % après ZD, selon le traitement de capacitation utilisé (GUIGNOT, 1999) : de jeunes embryons ont ainsi été obtenus jusqu'aux stades morula et blastocyste mais aucune gestation n'est rapportée après transfert de tels embryons.

- La technique de SUZI (subzonal sperm injection) consiste à déposer avec une pipette

l'ooplasmе à l'aide d'une micropipette biseautée, sans capacitation préalable nécessaire ni risque de polyspermie ; l'ovocyte microinjecté est ensuite mis en culture. SQUIRES *et al.* (1996) ont obtenu un premier poulain en transférant chirurgicalement dans l'oviducte l'œuf clivé 3 jours après ICSI. Les taux de fécondation obtenus après ICSI sur des ovocytes ayant subi une maturation *in vitro* sont élevés (68 % : GUIGNOT *et al.*, 1998). Des taux de clivage après ICSI élevés sont rapportés (46 % : GUIGNOT *et al.*, 1998) et de nombreux jeunes embryons ont été produits avec cette technique ; aucune gestation n'est rapportée après transfert intra-utérin d'embryons issus d'ICSI cultivés *in vitro* jusqu'au stade morula ; un poulain est né par transfert chirurgical dans l'oviducte d'œufs clivés, 3 jours après ICSI sur des ovocytes ayant subi une maturation *in vitro* (SQUIRES *et al.*, 1996).

L'ICSI est la technique de procréation assistée la plus délicate mais qui donne les meilleurs résultats dans l'espèce équine. Cependant des recherches sont encore nécessaires pour poursuivre le développement *in vitro* des embryons obtenus jusqu'à 6 jours, stade auquel ils sont transférables directement dans l'utérus (GUIGNOT, 1999). Le développement de techniques comme la bissection embryonnaire, déjà tentée avec succès dans l'espèce équine (ALLEN, 1984), dépend de l'amélioration du rendement des techniques de procréation assistée pour produire de jeunes embryons équins (BEZARD, 1997a).

23 – ALTERNATIVES A LA FECONDATION IN VITRO

La FIV conventionnelle a eu des succès très limités dans l'espèce équine ; les taux fécondation par procréation assistée et le taux de développement *in vitro* des jeunes embryons obtenus sont encore bas, malgré l'amélioration du taux de clivage avec l'ICSI. Des techniques alternatives à la FIV ont donc été développées chez la jument. Il s'agit du transfert d'un ovocyte, prélevé chez une jument donneuse par une des différentes voies de collecte disponibles, chez une jument receveuse inséminée, soit dans son follicule préovulatoire, soit dans son oviducte.

- Le transfert d'ovocyte intra-folliculaire (ou TOIF) est possible dans l'espèce équine grâce à la grande taille du follicule préovulatoire et à l'épaisse tunique fibreuse entourant l'ovaire de la jument, qui limite les fuites de liquide folliculaire après injection. Cette technique est développée dans l'espèce équine depuis 1987. Actuellement, l'ovocyte de la donneuse, collecté au stade préovulatoire ou subissant une maturation *in vitro*, est transféré sous échoguidage transvaginal dans le follicule préovulatoire de la receveuse, dont on doit préalablement enlever le propre ovocyte. Si 50 % des ovocytes transférés sont capables de produire un embryon, 81 % des propres ovocytes préovulatoires des juments receveuses

donnent un embryon s'ils ne sont pas retirés. Des gestations simples ont été obtenues et la technique semble prometteuse (BEZARD et GUIGNOT, 1999). Elle a l'intérêt, par rapport au GIFT, d'être non chirurgicale.

- Le transfert d'ovocyte dans l'oviducte (ou GIFT) a été tenté dans l'espèce équine à partir de 1987 (McKINNON *et al.*, 1987) et est désormais utilisé commercialement aux États-Unis. Cette technique consiste à transférer un ovocyte d'une jument donneuse, après un passage *in vitro* plus ou moins long selon les méthodes, dans l'oviducte d'une jument receveuse inséminée. Les meilleurs taux de gestation rapportés sont comparables à ceux obtenus par transfert d'embryon collecté *in vivo* (92 % : CARNEVALE et GINTHER, 1995 ; 6/8 : HINRICHS *et al.*, 1998a ; 5/8 : HINRICHS *et al.*, 1998b ; 8/14 : CARNEVALE *et al.*, 2000).

Les indications, les avantages et les limites de cette technique, puis les résultats obtenus jusqu'à présent avec les différentes méthodes décrites seront exposés dans les prochaines parties.

3 - INDICATIONS, AVANTAGES ET LIMITES DU TRANSFERT D'OVOCYTE DANS L'OVIDUCTE

31 - INDICATIONS ET AVANTAGES DU TRANSFERT D'OVOCYTE DANS L'OVIDUCTE

311 - Intérêt comme alternative au transfert d'embryon chez les juments subfertiles

Les juments dont on ne peut obtenir un embryon viable pour être transféré sont des candidates pour le don d'ovocytes. Plusieurs causes, énoncées par CARNEVALE (1996), peuvent faire échouer la collecte embryonnaire.

3111 - Absence d'ovulation

Deux types d'anovulation sont décrits chez la jument :

- Les follicules hémorragiques : le follicule croît au-delà de 70 mm de diamètre, jusqu'à ce que du sang remplisse l'antrum, et n'ovule pas. Cela se produit plus fréquemment à l'automne et chez les vieilles juments.
- Dans le second type, également plus fréquent chez les vieilles juments, le diamètre du follicule n'augmente pas ; le follicule préovulatoire devient flasque, son aspect échographique laisse supposer que l'ovulation est imminente : la forme est irrégulière, le bord est épaissi et plus échogène ; puis le follicule se lutéinise sans ovuler et un centre anéchogène liquidien demeure, correspondant à un liquide hémorragique contenant un ovocyte mature ou atrétique.

Pour les juments ayant présenté de tels types de follicules sans ovulation sur plusieurs cycles successifs, le GIFT permet d'obtenir un ovocyte, à condition que celui-ci soit collecté avant qu'il ne vieillisse ou ne dégénère et avant que le liquide folliculaire ne soit contaminé par du sang, donc avant que les changements échographiques n'interviennent.

3112 - Anomalies de l'infundibulum et de l'oviducte

Une inflammation de l'infundibulum, voire des adhérences, peuvent empêcher la réception et le transport du complexe ovocyte-cumulus vers l'ampoule après l'ovulation. Ce problème serait plus fréquent chez les juments âgées ou subfertiles pour lesquelles les taux de collecte d'embryons ou d'ovocytes dans l'oviducte sont bas.

Des inflammations de l'oviducte seraient plus fréquentes chez les juments présentant une endométrite et chez les juments non gestantes mais la corrélation de ces inflammations avec une subfertilité n'est pas établie.

Différentes anomalies (notamment des masses collagéniques) pourraient provoquer l'obstruction de la lumière de l'oviducte empêchant le passage de l'ovocyte, des spermatozoïdes et de l'embryon ; elles seraient plus fréquentes chez les juments âgées mais il n'est pas prouvé que ces obstructions de l'oviducte font partie des causes de subfertilité.

Ainsi le GIFT évite le passage de l'ovocyte, des spermatozoïdes et de l'embryon dans un oviducte altéré, incapable de les transporter ou de leur apporter un environnement convenable, conduisant à une absence de fécondation ou à une mortalité embryonnaire précoce.

3113 - Anomalies utérines

La cause majeure d'infertilité chez la jument a une origine utérine, comme le rappellent CARNEVALE et GINTHER (1995). Les inflammations de l'utérus, en particulier les endométrites chroniques et post-partum, sont corrélées à un mauvais taux de gestation car elles exposent les spermatozoïdes et l'embryon à un milieu défavorable.

Le GIFT empêche le passage des spermatozoïdes et le séjour de l'embryon dans un utérus altéré qui peut provoquer une mortalité embryonnaire précoce voire un défaut de fécondation.

3114 - Problèmes divers

Les lacérations cervicales et les rétentions urinaires dans le vestibule du vagin peuvent diminuer les chances de collecte d'un embryon : le GIFT permettrait de pallier ces problèmes. Même si l'intervention d'anticorps anti-sperme n'est pas établie dans les problèmes de reproduction dans l'espèce équine, le GIFT éviterait l'intervention de ces anticorps en empêchant que les spermatozoïdes entrent en contact avec les voies génitales de la donneuse.

312 - Intérêt en recherche

CARNEVALE (1996) considère le GIFT comme une méthode de recherche pour évaluer la fertilité avant l'entrée de l'embryon dans l'utérus : il permet l'étude de la viabilité et de la maturation de l'ovocyte, de la fécondation et du développement embryonnaire précoce. CARNEVALE *et al.* (2000), HINRICHS *et al.* (1998a) et GOUDET (1998) ajoutent que le GIFT est un moyen alternatif à la fécondation *in vitro*, dont le succès est encore limité chez le cheval, pour tester la qualité des ovocytes utilisés en recherche : le meilleur critère d'une maturation *in vitro* adéquate de l'ovocyte est sa capacité à être fécondé *in vivo* après transfert dans l'oviducte.

32 - LIMITES DU TRANSFERT D'OVOCYTE DANS L'OVIDUCTE

CARNEVALE (1996) et CARNEVALE et GINTHER (1995) définissent aussi les limites de cette méthode de reproduction assistée : des ovocytes de mauvaise qualité peuvent être une cause d'infertilité chez la jument, et le GIFT n'apporte alors aucune solution. La viabilité des ovocytes peut être affectée par des anomalies chromosomiques (propres à l'ovocyte ou provoquées par un environnement folliculaire inadéquat), des anomalies endocriniennes, un vieillissement préovulatoire de l'ovocyte excessif, et par l'âge de la jument. CARNEVALE et GINTHER (1995) rappellent qu'il existe un déclin de la fertilité avec l'âge, bien décrit chez la jument, quelque soit le mode de reproduction : l'incidence des ovocytes anormaux augmente avec l'âge, notamment, on constate une fréquence d'aneuploïdie plus élevée (MANTEN, 2000) ; il semble qu'une période plus longue soit nécessaire aux ovocytes de juments âgées pour achever leur maturation jusqu'en métaphase II. CARNEVALE et GINTHER (1995) expliquent que les ovocytes de juments âgées ne sont pas aussi viables que ceux des jeunes, mais on ignore si cela est dû à un défaut intrinsèque de l'ovocyte ou à un environnement altéré dans le follicule ou dans l'oviducte ; ces auteurs ont montré que le transfert d'ovocytes de donneuses âgées dans l'oviducte de jeunes receveuses n'élimine pas la subfertilité liée à l'âge : ainsi le GIFT n'est pas une solution dans les cas de subfertilité due à un défaut intrinsèque de l'ovocyte, notamment chez les juments âgées.

Le transfert d'ovocytes dans l'oviducte connaît aussi des limites techniques, à cause des contraintes liées à l'intervention chirurgicale indispensable à cette méthode (BEZARD et GUIGNOT, 1999).

L'étude de CARNEVALE *et al.* (1999) permet d'objectiver l'intérêt du GIFT pour obtenir des gestations de juments infertiles atteintes d'une affection grave de l'appareil reproducteur : des transferts d'ovocytes ont été réalisés chez 18 juments âgées (16 à 30 ans) ayant une longue histoire d'infertilité suite à de nombreuses mises à la reproduction, même avec transfert d'embryon ; chez ces juments, une ou plusieurs des affections suivantes avaient été diagnostiquées : endométrite ou pyomètre persistant, anovulation avec follicules hémorragiques, col non fonctionnel, pathologie ovarienne ; chez 5 juments, l'infertilité n'était pas expliquée. 23 % des transferts d'ovocytes ont été suivis d'une gestation ; cependant, la plupart des juments de cette étude ayant plus de 20 ans, il est probable que la viabilité des ovocytes transférés était réduite, limitant le taux de succès des GIFT.

4 – METHODES DE GIFT DECRITES ET RESULTATS OBTENUS DANS L'ESPECE EQUINE

Plusieurs équipes de recherche ont réalisé des transferts d'ovocyte dans l'oviducte équin : McKINNON *et al.* (1987), McKINNON *et al.* (1988), RAY *et al.* (1994), CARNEVALE et GINTHER (1995), HINRICHS *et al.* (1998a), HINRICHS *et al.* (1998b), HINRICHS *et al.* (1999) et CARNEVALE *et al.* (2000). Les méthodes de GIFT utilisées par ces différentes équipes diffèrent quant au stade de maturation des ovocytes collectés, à l'induction ou non de l'ovulation des donneuses, et au délai entre l'induction de l'ovulation et la collecte de l'ovocyte. Ensuite, les étapes techniques du GIFT décrites dans la littérature sont assez similaires. Les résultats obtenus sont variables.

41 - STADE DE MATURATION DES OVOCYTES COLLECTES

Pour être fécondés, les ovocytes transférés dans l'oviducte de la receveuse doivent être matures c'est-à-dire à un stade le plus proche possible de celui d'ovocytes ovulés *in vivo* : en métaphase II, avec une maturation cytoplasmique avancée et un cumulus expansé (MANTEN, 2000).

Tous les follicules présents sur l'ovaire de jument contiennent des ovocytes, mais seul le follicule préovulatoire dominant contient un ovocyte apte à suivre une maturation *in vivo* (HINRICHS, 1997) ; cet ovocyte reprend la méiose en réponse à la LH ou à une stimulation hormonale exogène, alors que les autres ovocytes restent en arrêt méiotique.

Pour obtenir des ovocytes matures prêts à être transférés, deux solutions existent : collecter des ovocytes immatures puis procéder à une maturation *in vitro* avant le transfert, ou collecter des ovocytes ayant repris leur méiose et prêts ou presque à être transférés.

411 – Collecte d'ovocytes immatures

Cette solution consiste à ponctionner tous les follicules cavitaires d'une jument cyclée ou encore, dans le cadre de la recherche, à isoler des ovocytes d'ovaires d'abattoir. En effet, l'ovaire de jument contient de nombreux follicules cavitaires constituant une réserve d'ovocytes immatures (GOUDET, 1998) ; une voie de production d'un grand nombre d'ovocytes matures transférables est donc la collecte d'ovocytes immatures puis leur maturation *in vitro*. Théoriquement, tous les follicules visibles sur l'ovaire d'une jument pourraient être ponctionnés fournissant ainsi un grand nombre d'ovocytes immatures (HINRICHS, 1997) ; ces ovocytes sont *a priori* toujours en pause méiotique et

incapables d'être fécondés : ils sont cultivés *in vitro* jusqu'en métaphase II avant d'être transférés. Mais cela impose de maîtriser les conditions de milieu nécessaires à la maturation, notamment d'apporter les hormones permettant la reprise de la méiose. Malheureusement, chez le cheval, la meilleure méthode pour la maturation des ovocytes *in vitro* n'est pas encore bien déterminée ; la viabilité d'ovocytes équins après maturation *in vitro* et leur aptitude à être fécondés et à assurer le développement embryonnaire reste aléatoire (HINRICHS, 1997 ; RAY *et al.*, 1994 ; CARNEVALE *et al.*, 2000).

De plus, le taux de collecte (nombre d'ovocytes collectés rapporté au nombre de follicules ponctionnés) par ponction de follicules immatures est faible (environ 35 %) par rapport à celui obtenu par ponction de follicules préovulatoires (HINRICHS, 1997 ; RAY *et al.*, 1994) ; d'après HINRICHS *et al.* (1998a), ceci est peut-être dû au fait que le cumulus expansé est déjà détaché de la paroi folliculaire juste avant l'ovulation dans le follicule mature ce qui augmente la chance de collecte de l'ovocyte, tandis que l'ovocyte équin immature est fermement lié à la paroi folliculaire par un large cumulus.

Ainsi, parce que la maturation *in vitro* n'est pas encore au point, le transfert d'ovocytes dont la maturation s'effectue *in vivo* reste préférable (HINRICHS, 1997 ; CARNEVALE *et al.*, 2000).

412 – Collecte d'ovocytes ayant repris leur méiose

Cette deuxième solution pour obtenir des ovocytes matures prêts à être transférés consiste à collecter des ovocytes préovulatoires. Contrairement à la collecte d'ovocytes immatures qui peut se faire sur des ovaires de donneuses vivantes ou d'abattoir, la collecte d'ovocytes préovulatoires ne peut se faire que par ponction du follicule préovulatoire d'une jument vivante prête à ovuler : on obtient ainsi un ovocyte ayant repris la méiose, car il a subi l'influence de LH, et prêt ou presque à être transféré selon le délai entre la collecte et le moment attendu de l'ovulation. Les conditions de culture *in vitro* d'un tel ovocyte sont mieux maîtrisées et l'apport d'hormones dans le milieu de culture n'est pas nécessaire puisque l'ovocyte a déjà repris la méiose.

Cette solution présente d'autres avantages : en raison de la grande taille du follicule préovulatoire chez la jument (environ 40 mm de diamètre), il est relativement facile de le ponctionner et les taux de collecte sont élevés (HINRICHS, 1998). De plus, on obtient un ovocyte immédiatement apte à être fécondé. CARNEVALE *et al.* (2000) ont obtenu un taux de gestation supérieur en transférant des ovocytes collectés juste avant l'ovulation qu'en transférant des ovocytes dont la maturation a eu lieu *in vitro*, qu'ils soient collectés sur un ovaire d'abattoir ou sur une donneuse en diœstrus (82 % [9/11] vs 7 % [2/29] et 10 % [4/40]).

Cependant, un seul ovocyte mature par jument à chaque cycle ne peut être obtenu en général car dans l'espèce équine, la double ovulation est rare et les traitements de superovulation sont très peu efficaces.

413 – La superovulation chez la jument

La superovulation vise à provoquer la croissance simultanée de plusieurs follicules préovulatoires au cours d'un même cycle, ceci afin d'augmenter la productivité des juments après transfert de leurs ovocytes ou de leurs embryons. Les traitements de superovulation consistent à compenser la diminution des taux de FSH circulants provoquée par l'inhibine produite par le follicule dominant. Il existe pour cela deux solutions (BRIANT, 1999).

4131 – Injection d'hormones à activité FSH

L'eCG (equine Chorionic Gonadotrophin), anciennement dénommée PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin), et la FSH porcine sont des hormones gonadotropes à activité FSH disponibles commercialement en France mais inefficaces dans l'espèce équine en raison de l'inadéquation hormone / récepteur (BRIANT, 1999).

Seule la FSH équine ou des extraits hypophysaires équins bruts permettent d'obtenir une polyovulation : HOFFERER *et al.* (1993) ont montré que la FSH équine purifiée par chromatographie à partir d'extraits hypophysaires équins est efficace pour induire une polyovulation, (1,9 +/- 0,4 ovulations par cycle vs 1,1 +/- 0,0 chez les juments non traitées), mais pas plus efficace que les extraits hypophysaires bruts (2,2 +/- 0,6 ovulations par cycle). Des préparations de FSH équine provenant d'extraits hypophysaires équins ont été testées expérimentalement : en les injectant quotidiennement par voie intramusculaire, le nombre d'ovulations par cycle augmente de façon répétable (2 à 4 ovulations par cycle traité vs 1 ovulation par cycle chez les témoins). Cependant, le taux de collecte d'embryons à 7 jours n'est pas répétable selon les animaux, les cycles et les expériences : 2 embryons par cycle ont été obtenus dans plusieurs expériences (BRIANT, 1999). Dans l'étude de PALMER et HAJMELI (1992), les juments étaient traitées avec des extraits hypophysaires équins bruts ou des extraits enrichis en FSH ; en saison de reproduction comme en anœstrus, quel que soit le cycle, le résultat du traitement de polyovulation était le même : 3 ovulations par cycle mais seulement 0,6 embryon par cycle (vs 1 ovulation par cycle et 0,6 embryon par cycle pour les témoins en saison de reproduction et 0 ovulation et 0 embryon pour les témoins en anœstrus) ; ainsi la FSH équine permet d'augmenter le nombre d'ovulations par cycle mais pas le nombre d'embryons par cycle en saison de reproduction : les ovocytes produits pourraient être de

mauvaise qualité, et ce traitement de polyovulation n'assurerait pas les conditions propices à la remontée des spermatozoïdes, à la fécondation, ou au développement simultané de plusieurs embryons.

De plus la FSH équine, d'origine hypophysaire, n'est pas disponible commercialement : seule est envisageable la commercialisation de FSH équine de synthèse ou recombinante, qui n'a pas encore été développée (BRIANT, 1999).

4132 – Immunisation anti-inhibine

Elle peut être active (vaccination anti-inhibine) ou passive (injection d'anti-corps anti-inhibine) et a pour intérêt d'utiliser la FSH endogène. Le nombre d'ovulations augmente jusqu'à en moyenne 4 par cycle et le nombre d'embryons à 1,6 par cycle avec l'immunisation active (BRIANT, 1999). Mais des recherches sont encore nécessaires, notamment pour décrire la régulation de la monoovulation.

Les traitements de superovulation restent donc du domaine expérimental car ils ne permettent d'augmenter le nombre de follicules préovulatoires que de manière limitée (GOUDET, 1998 ; HINRICHS, 1998 ; PALMER et HAJMELI, 1992) et pourraient altérer la qualité des ovocytes (MANTEN 2000, PALMER et HAJMELI, 1992). L'incapacité de la jument à superovuler limite le nombre de follicules préovulatoires disponible à un moment donné. Il s'agit du facteur limitant de l'utilisation d'ovocytes matures par ponction folliculaire chez la jument car seul un ovocyte mature est disponible par jument par période de 21 jours (GOUDET, 1998).

HINRICHS (1998) a donc effectué des collectes d'ovocytes préovulatoires en début de gestation où une période de superovulation naturelle a lieu, au moment où des vagues de croissance folliculaire se produisent pour former le corps jaune secondaire. Les follicules d'une jument gestante peuvent alors être ponctionnés par voie transvaginale sans menacer la gestation, avec des taux de collecte supérieurs à ceux obtenus avec des juments cycliques. Cette méthode reste anecdotique.

Ainsi dans la plupart des essais de GIFT réalisés dans l'espèce équine, l'ovocyte préovulatoire est collecté sur une jument cyclée. Pour que l'ovocyte collecté ait repris la méiose, la collecte doit avoir lieu juste avant l'ovulation dont on doit connaître le moment précis. Pour cela, l'ovulation est souvent induite artificiellement.

42 – INDUCTION DE L'OVULATION

421 – Nécessité d'induire l'ovulation

La palpation et l'échographie transrectales ne sont pas des méthodes assez sensibles pour prévoir le moment précis de l'ovulation chez la jument ; différencier un follicule préovulatoire, un gros follicule anovulatoire, une ovulation récente ou un corps jaune hémorragique par palpation transrectale de l'ovaire est difficile ; l'apparition d'images échographiques particulières, comme une augmentation de l'échogénicité et de l'épaisseur de la paroi folliculaire et des points hyperéchogènes dans l'antrum, n'est pas non plus un critère assez fiable : ces modifications sont visualisées respectivement dans 100 % et 54 % des cas avant l'ovulation mais ne permettent pas d'en prédire précisément le moment (CARNEVALE *et al.*, 1988). Le diamètre du follicule, mesuré précisément par échographie, est le critère le plus simple et le plus utilisé : le follicule dominant croît régulièrement d'environ 3 mm/jour jusqu'à sa taille maximale mais la taille du follicule préovulatoire la veille de l'ovulation est très variable suivant les juments et on peut observer ou non un ralentissement de la croissance dans les quelques jours précédant l'ovulation : ainsi BERNARDEAU *et al.* (1998) considèrent le diamètre folliculaire comme un bon indicateur de mise à la reproduction mais ne permettant pas de prévoir le moment de l'ovulation à 48 h près.

Dans beaucoup d'espèces, l'intervalle entre l'ovulation et le pic de LH qui la précède est constant et permet de prédire le moment de l'ovulation ; au contraire, chez la jument, la sécrétion de LH est peu pulsatile, son augmentation est progressive à partir de 3 à 4 jours avant l'ovulation, et le pic de LH se produit 24 h après l'ovulation : cela empêche de prévoir de moment précis de l'ovulation grâce à ce dosage.

Ainsi, prévoir précisément le moment de l'ovulation, donc prévoir quand la collecte de l'ovocyte préovulatoire doit avoir lieu, est difficile chez la jument ; la collecte d'ovocyte préovulatoire peut se faire en se fiant aux signes d'ovulation imminente mais on risque de collecter l'ovocyte trop tôt alors qu'il n'a pas repris la méiose, ou de ne pas pouvoir le collecter car il a déjà été ovulé ; c'est pourquoi l'ovulation est le plus souvent induite artificiellement pour la prévoir plus précisément et optimiser le moment de la collecte.

422 – Hormones utilisées pour induire l'ovulation dans l'espèce équine

Quelle que soit l'hormone utilisée, la démarche d'induction de l'ovulation est la même (MANTEN, 2000) : une fois le comportement d'œstrus observé, la croissance folliculaire est suivie quotidiennement par échographie transrectale ; lorsque la jument présente un ou

plusieurs follicules de plus de 30 mm de diamètre (voire 35 mm selon les auteurs), elle reçoit un traitement d'induction de l'ovulation produisant un pic de LH, soit d'origine exogène par injection d'hormone gonadotropes à activité LH, soit d'origine endogène par administration d'analogues de GnRH.

- L'hCG (human Chorionic Gonadotropin) est la molécule la plus fréquemment utilisée pour induire l'ovulation chez la jument chez laquelle elle possède un effet LH : DUCHAMP *et al.* (1987) ont montré que l'injection d'hCG (2000 à 2500 UI IV) à des juments lorsqu'un follicule atteint 35 mm de diamètre induit l'ovulation en 24 h à 48 h chez 73 % [106/145] des juments traitées. Les stades métaphase I et métaphase II sont atteints respectivement 24 h et 35 h après induction de l'ovulation par injection d'hCG (BEZARD, 1997a). Cependant, HINRICHS *et al.* (1998a) ont constaté une non-réponse de plusieurs follicules (6/9) à la stimulation par l'hCG en fin de saison de reproduction (août et septembre), qui pourrait être due à une entrée en transition automnale, surtout chez les ponettes qui sont plus saisonnées que les juments. De plus, des injections répétées d'hCG induisent une immunisation par production d'anticorps anti-hCG (DUCHAMP *et al.*, 1987) : une fois les juments immunisées contre l'hCG, elles répondent moins au traitement que les juments non immunisées (0/10 *vs* 9/9).

- Les analogues de synthèse de la GnRH sont, selon HINRICHS *et al.* (1998a), une alternative pour induire l'ovulation. Les résultats sont différents selon les analogues utilisés : le Fertagyl ND (Janssen, Issy-Les-Moulineaux, France) injecté par voie IM lorsque le follicule dominant dépasse 34 mm de diamètre n'induit l'ovulation que chez 40 % [12/30] des juments traitées (DUCHAMP *et al.*, 1987) ; la buséréline (Réceptal ND, Intervet, Angers, France), injectée par voie IM toutes les 12 heures dès que le follicule dominant atteint le diamètre préovulatoire et jusqu'à l'ovulation, permet d'obtenir 67 % d'ovulations dans les 48 h (*vs* 20 % dans les 80 h chez les témoins) (BRIANT, 1999) ; la desloréline, non disponible en France, existe sous forme d'un implant sous-cutané posé quand le follicule dominant atteint 35 mm de diamètre ; son efficacité est semblable à celle des hormones gonadotropes (90 % d'ovulations obtenues dans les 48 h), et l'implant est bien toléré sans perte d'efficacité dans le temps (BRIANT, 1999).

- La CEG (Crude Equine Gonadotropin) sont des extraits hypophysaires développés par DUCHAMP *et al.* (1987) contenant de grandes quantités de LH équine et des quantités variables de FSH équine. Cet extrait induit l'ovulation chez 86 % [12/14] des juments traitées, et chez 78 % [7/9] des juments traitées et immunisées contre l'hCG, sans diminution de la fertilité (DUCHAMP *et al.*, 1987) : elle offre une bonne alternative à l'hCG pour induire

l'ovulation chez la jument. Les doses efficaces sont entre 25 et 60 mg IV ou IM. Cependant ce produit n'est pas disponible commercialement.

BEZARD (1997b) a étudié chez des ponettes le taux de collecte par ponction transvaginale, le degré d'expansion du cumulus et le stade méiotique de l'ovocyte préovulatoire équin selon le délai entre la collecte et l'induction de l'ovulation par la CEG (tableau I) : l'expansion du cumulus se produit en moyenne 12 h après l'induction de l'ovulation par de la CEG injectée lorsqu'un follicule atteint 33 mm de diamètre, tandis que la maturation nucléaire est plus tardive (métaphase I atteinte 24 h après l'induction et métaphase II 35 h après). L'intervalle entre l'injection de CEG et la collecte n'a pas d'effet significatif sur le taux de collecte. Ces résultats confirment l'efficacité de la CEG pour induire la maturation folliculaire et l'ovulation dans l'espèce équine. Ils suggèrent la nécessité de poursuivre la maturation d'ovocytes collectés 24h après induction de l'ovulation avec la CEG pour qu'ils atteignent la métaphase II et que leur fécondation après transfert soit possible ; ils montrent que la maturation est achevée à 35 h après l'injection de CEG. Ils indiquent que la progression de la maturation ovocytaire après administration de CEG est similaire à celle suivant l'administration d'hCG.

Tableau I : Taux de collecte, degré d'expansion du cumulus et stade méiotique d'ovocytes préovulatoires équins selon l'intervalle entre la collecte et l'induction de l'ovulation (d'après BEZARD, 1997b)

Délai entre collecte et CEG		CEG + 0h	CEG + 6h	CEG + 12h	CEG + 24h	CEG + 35h
Taux de collecte		6/9	6/11	6/9	11/14	6/12
Expansion du cumulus		0/6	1/6	5/6	10/11	6/6
Stade nucléaire	Vésicule germinale	4/6	3/6	1/6		
	Chromatine dense	1/6	1/6	2/6		
	Métaphase I	1/6	1/6	2/6	8/11	
	Télophase I					1/6
	Métaphase II					4/6
	Dégénéré		1/6	1/6	3/11	1/6

423 – Délai entre l'induction de l'ovulation et la collecte de l'ovocyte préovulatoire

Une fois l'ovulation induite, la collecte doit avoir lieu assez tôt avant que la donneuse n'ovule, mais assez tard pour que l'ovocyte ait repris la méiose sous l'influence du traitement hormonal. Deux solutions ont été essayées par les équipes de recherche. La collecte peut avoir lieu :

- 35 h après l'induction de l'ovulation : l'ovocyte a alors complètement achevé sa maturation, il est en métaphase II et est prêt à être transféré. Il est simplement conservé très momentanément *in vitro* avant le transfert. Il s'agit de la « méthode 35 h » (HINRICHS *et al.* 1998b).
- 24 h après l'induction de l'ovulation : l'ovocyte a alors repris la méiose sous l'influence de la décharge hormonale exogène ; il est en métaphase I, sa maturation n'est donc pas terminée ; il est mis en culture *in vitro* pendant 20 h environ avant le transfert afin d'avoir atteint la métaphase II au moment du transfert. Il s'agit de la « méthode 24 h » (HINRICHS *et al.* 1998b).

43 – ÉTAPES DU TRANSFERT D'OVOCYTE PREOVULATOIRE DANS L'OVIDUCTE

Que l'ovulation de la donneuse ait été induite artificiellement ou non, et quel que soit le délai entre cette induction et la collecte ovocytaire, les étapes suivies par les différentes équipes de recherche pour réaliser un GIFT dans l'espèce équine sont similaires :

- D'abord, un ovocyte est collecté par ponction du follicule préovulatoire d'une donneuse. Collecter des ovocytes est toujours invasif car cela exige de pénétrer dans l'abdomen. Plusieurs techniques sont disponibles ; toutes reposent sur une ponction à l'aiguille du follicule préovulatoire puis une aspiration du liquide folliculaire, mais différent par leur voie d'abord :
 - La ponction folliculaire directe par laparotomie par le flanc est la technique de collecte la plus invasive. Elle l'est trop pour ponctionner des follicules préovulatoires dont la visualisation directe n'est pas nécessaire. Parmi les équipes ayant réalisé des GIFT, elle est utilisée uniquement par McKINNON *et al.* (1987) pour une partie de l'effectif expérimental.
 - La ponction folliculaire transcutanée par le flanc en maintenant l'ovaire par voie transrectale a été décrite par SQUIRES et COOK (1996) et HINRICHS (1997). Il s'agit, d'après HINRICHS *et al.* (1998a), de la technique de collecte la plus aisée pour les follicules préovulatoires. HINRICHS *et al.* (1998a et b) et McKINNON *et al.* (1987 et 1988) utilisent cette technique de collecte dans le cadre du GIFT.
 - La ponction folliculaire transcutanée par le flanc avec ovaire maintenu par colpotomie est semblable à la technique précédente : l'ovaire est maintenu contre la paroi paralombaire non

pas par voie transrectale mais directement par une incision dans le vagin (colpotomie) effectuée au bistouri et élargie manuellement. D'après HINRICHS (1997), cela diminue le risque de lacération et de ponction du rectum et augmente la précision lors de la ponction. Les complications, comme l'incision du tube digestif, de l'aorte, ou de l'artère iliaque interne lors de l'incision vaginale, l'éviscération et la péritonite, sont rares mais fatales. Aucune équipe n'utilise cette technique dans le cadre du GIFT.

- La ponction folliculaire transvaginale échoguidée a été décrite par CARNEVALE et GINTHER (1993) et par DUCHAMP *et al.* (1995) ; c'est la plus utilisée, selon CARNEVALE (1996) : dans le cadre du GIFT, elle est utilisée par RAY *et al.* (1994), CARNEVALE et GINTHER (1995) et CARNEVALE *et al.* (2000). Selon ces équipes, c'est la technique de collecte ovocytaire la plus rapide, la plus précise, la plus répétable et la mieux tolérée car la moins invasive et la seule à pouvoir être fréquemment renouvelée, les autres provoquant la formation d'adhérences et de tissu cicatriciel. Elle permet de ponctionner aussi bien des follicules préovulatoires chez une jument en œstrus que des follicules cavitaires de petite taille chez une jument en diœstrus, en obtenant une population d'ovocytes mieux caractérisée car le diamètre des follicules ponctionnés est mesuré par échographie. Cette technique est très bien tolérée cliniquement, même de façon répétée : CARNEVALE (1996) indique que seules de fines adhérences séreuses et de petites zones hémorragiques peuvent être retrouvées à la surface des ovaires ponctionnés. SQUIRES et COOK (1996) ont répété environ 5 ponctions folliculaires transvaginales sur 30 juments pendant au minimum 4 cycles consécutifs ; aucune complication (fièvre, infection, abcès) n'a été constatée.

- Après sa collecte, l'ovocyte subit une maturation ou une conservation *in vitro* plus ou moins longue, selon le stade de maturation auquel il est collecté, dans un milieu de culture d'une composition variant sensiblement selon les équipes.

- Puis l'ovocyte est transféré dans l'oviducte d'une receveuse, par laparotomie par le flanc sous neuroleptanalgie debout ou sous anesthésie générale en décubitus latéral. Dans la plupart des études, la receveuse est cyclée et subit ou non un traitement de synchronisation avec la donneuse, et le propre ovocyte de la receveuse est collecté avant le transfert. Cependant HINRICHS *et al.* (1999) ont maintenu une gestation à terme et obtenu la naissance d'un poulain après un transfert d'ovocyte dans une receveuse dont l'activité ovarienne avait été supprimée par un traitement hormonal puis qui avait reçu de la progestérone.

- En général, la receveuse est saillie ou inséminée artificiellement avant et/ou après le transfert, bien que CARNEVALE *et al.* (2000) aient obtenu des gestations par transfert des

spermatozoïdes dans l'oviducte. Un traitement progestatif est éventuellement administré aux receveuses après le transfert.

44 – RESULTATS OBTENUS PAR TRANSFERT D'OVOCYTE PREOVULATOIRE DANS L'OVIDUCTE

Les taux de gestation obtenus dans l'espèce équine par transfert d'ovocyte préovulatoire dans l'oviducte varient beaucoup selon les études.

Un premier groupe d'auteurs, entre 1987 et 1994, rapporte des taux de gestation décevants. Dans leurs études, la collecte de l'ovocyte avait lieu 24 h à 36 h après induction de l'ovulation ou lorsque les signes d'ovulation imminente apparaissaient et le transfert avait lieu immédiatement après la collecte :

- Dans l'étude de McKINNON *et al.* (1987), 6 ovocytes furent collectés dans des follicules préovulatoires 35 h après induction de l'ovulation et transférés immédiatement dans des receveuses préalablement inséminées : aucun embryon ne fut collecté 8 jours après le transfert.
- McKINNON *et al.* (1988) ont obtenu la naissance du premier foal après GIFT : sur 15 ovocytes collectés dans des follicules préovulatoires 35 h après induction de l'ovulation et transférés immédiatement dans des receveuses préalablement inséminées, 3 embryons furent récupérés dans l'oviducte des receveuses 2 jours après le GIFT, soit un taux de gestation de 20 % [3/15] ; ces 3 embryons furent transférés dans l'utérus d'autres receveuses : 2 gestations furent diagnostiquées après le transfert, dont 1 menée à terme.
- RAY *et al.* (1994) collectèrent 26 ovocytes dans des follicules préovulatoires 24 h après induction de l'ovulation et les transfèrent immédiatement dans l'oviducte de 8 receveuses ; 2 gestations furent obtenues, soit un taux de gestation de 8 % [2/26].

Ainsi les taux de gestation obtenus par transfert d'ovocytes collectés 35 h après induction de l'ovulation et transférés immédiatement après la collecte étaient bas.

A partir de 1995, les résultats rapportés par un deuxième groupe d'études sont meilleurs. Dans ces études, l'ovocyte est collecté 24 h après induction de l'ovulation puis la maturation ovocytaire est poursuivie *in vitro* pendant 20 h environ avant le transfert.

- CARNEVALE et GINTHER (1995) ont obtenu un fort taux de gestation en mettant pendant 20 h en culture 12 ovocytes préovulatoires collectés chez de jeunes donneuses (6 à 10 ans) environ 24 h après l'induction de l'ovulation par injection d'hCG. Aucune hormone exogène n'est ajoutée au milieu de culture puisque la reprise de la maturation a déjà été provoquée en induisant l'ovulation avec l'hCG. 11 ovocytes sur 12 donnèrent des vésicules embryonnaires soit un taux de gestation de 92 % [11/12]. Toutes ces gestations furent maintenues au-delà de

30 jours, suggérant que la viabilité de l'ovocyte n'a pas été affectée par le GIFT. Dans cette méthode, le temps de maturation ovocytaire entre administration d'hCG et transfert était de 40 à 44 h, donc plus long que dans le premier groupe d'études où il était de 30 à 36 h. En outre, CARNEVALE et GINTHER (1995) ont aussi transféré selon la même méthode 26 ovocytes de donneuses âgées (20 à 26 ans) dans l'oviducte de jeunes receveuses et obtenu un taux de gestation de 31 % [8/26]. Ce résultat, moins bon que celui obtenu avec de jeunes donneuses, confirme que la technique de GIFT n'élimine pas l'infertilité liée à l'âge.

- L'étude d'HINRICHS *et al.* (1998a) visait à déterminer si le taux de gestation élevé obtenu avec la méthode 24 h par CARNEVALE et GINTHER (1995) était dû à la longue durée de maturation des ovocytes dans cette méthode : elle est de 44 h au total (24 h entre l'induction de l'ovulation et la collecte puis 20 h entre la collecte et le transfert) alors qu'avec la méthode 35 h elle est d'environ 35 h (35 h entre l'induction de l'ovulation et la collecte puis transfert quasiment immédiat) ; pour cela, HINRICHS *et al.* (1998a) ont mis en culture des ovocytes collectés 24 h après induction de l'ovulation soit pendant 12 h, soit pendant 18 h ; de bons taux de gestation furent obtenus globalement (6/8) et aucune différence significative ne fut observée : 4/5 avec un temps de maturation de 24 h + 12 h = 36 h vs 2/3 avec un temps de maturation total de 24 h + 18 h = 42 h. Ainsi, les meilleurs résultats semblant être obtenus avec la méthode 24 h ne seraient pas dus au long temps de maturation : un taux de gestation satisfaisant (4/5) a été obtenu avec les ovocytes de cette expérience mis en culture pendant 12 h, alors qu'ils n'avaient pas bénéficié d'un temps de maturation supérieur à celui des ovocytes transférés dans les premières études utilisant la méthode 35 h. Cette expérience suggère donc que les meilleurs résultats semblant être obtenus avec la méthode 24 h ne seraient pas dus à la longue durée de maturation. Cependant, les effectifs de HINRICHS *et al.* (1998a) sont trop faibles pour tirer des conclusions définitives.

- HINRICHS *et al.* (1998b) et CARNEVALE *et al.* (2000), toujours avec une méthode similaire (collecte ovocytaire 24 h après induction de l'ovulation et transfert après 12 h de culture *in vitro*), ont obtenu des taux de gestation très satisfaisants (5/8 et 57 % [8/14]).

Le transfert d'ovocytes collectés 24 h après induction de l'ovulation puis mis en culture 12 h semble donc donner de meilleurs résultats que le transfert immédiat d'ovocytes collectés 35 h après induction de l'ovulation. Les raisons ne sont pas claires ; plusieurs hypothèses sont avancées :

- L'étude d'HINRICHS *et al.* (1998a) a montré que la supériorité de la méthode 24 h n'est pas dû au plus long temps total de maturation ovocytaire (44 h par rapport à 35 h dans la méthode 35 h).

- CARNEVALE *et al.* (2000) ont comparé le transfert, dans l'oviducte d'une receveuse préalablement inséminée, d'ovocytes collectés 24 h après induction de l'ovulation puis cultivés *in vitro* pendant 12 à 14 h, au transfert de tels ovocytes immédiatement après leur collecte dans l'oviducte d'une receveuse inséminée 14 à 16 h après le transfert : les taux de gestation obtenus n'étaient pas significativement différents (57 % [8/14] vs 43 % [6/14]), indiquant qu'*a priori* des ovocytes collectés alors qu'ils avaient déjà repris mais pas terminé leur méiose et transférés immédiatement sont capables de l'achever dans l'oviducte de la receveuse.

- Cette étude est compatible avec l'hypothèse d'HINRICHS *et al.* (1998a) et de CARNEVALE et GINTHER (1995) qui attribuent les meilleurs résultats obtenus avec la méthode 24 h à la plus grande résistance aux manipulations des ovocytes en métaphase I, stade atteint par les ovocytes lors de leur collecte dans la méthode 24 h, par rapport aux ovocytes en métaphase II, stade atteint par les ovocytes lors de leur collecte dans la méthode 35 h.

Enfin, la supériorité de la méthode 24 h est désormais discutée car de bons résultats ont récemment été obtenus avec la méthode 35 h :

- CARNEVALE *et al.* (2000) ont obtenu un taux de gestation de 82 % [9/11] avec la méthode 35 h, indiquant que d'autres facteurs que le délai entre l'induction de l'ovulation et la collecte des ovocytes interviennent sur les bons résultats désormais rapportés dans la littérature.

- HINRICHS *et al.* (1998b) ont directement comparé les méthodes 24 h et 35 h : les taux de gestation obtenus n'étaient pas significativement différents, mais sur de faibles effectifs (5/8 vs 4/9).

Les études rapportant des essais de transfert d'ovocyte préovulatoire équin dans l'oviducte sont récapitulées dans le tableau II.

Tableau II : Etudes sur le GIFT par transfert d'ovocytes issus de follicules préovulatoires

(IA : insémination artificielle, SVF : sérum de veau fœtal, TCM199 : Tissue Culture Medium 199, PBS : phosphate buffered saline, SJO : sérum de jument en œstrus, PTF : ponction folliculaire transcutanée par le flanc, PTV : ponction folliculaire transvaginales, DG : diagnostic de gestation, D : donneuse, R : receveuse).

Etudes	Préparation des donneuses	Préparation des receveuses	Méthode de collecte ovocytaire pour la donneuse	Préparation de l'ovocyte	Transfert (toujours par laparotomie par le flanc)	Traitement progestatif après transfert	Taux de collecte	Taux de transfert	Taux de gestation
							(ovocytes collectés / follicules ponctionnés)	(ovocytes transférés / ovocytes collectés)	(ovocytes fécondés / ovocytes transférés)
McKINNON <i>et al.</i> (1987)	HcG ou rien Ponction quand signes d'ovulation imminente	hCG ou rien IA juste avant ou après le GIFT	PTF ou laparotomie Rinçage folliculaire : PBS + SVF + héparine ou solution de Tyrode	Conservation à 37°C dans PBS + SVF	Transfert dans milieu conservation, ipsilatéral à l'ovulation.	Aucun traitement	PTF : 1/5 Laparotomie : 38 % [5/13] Pas de différence entre donneuses induites avec hCG et les autres	6/6 (dont 3 matures et 3 immatures)	0/6
McKINNON <i>et al.</i> (1988)	hCG ou rien Ponction 36 h après hCG ou sur critères d'ovulation imminente	Ponction folliculaire pendant le GIFT IA juste avant ou moins d'1h après le GIFT	PTF Rinçage folliculaire : PBS + SVF + héparine	Conservation à 37°C dans PBS + SVF + liquide folliculaire pendant moins d'1h	Transfert dans PBS + SVF Ipsilatéral à l'ovulation si l'ovocyte de la R est collecté Controlatéral sinon	Aucun traitement	71 % [45/63] Pas de différence entre donneuses induites avec hCG et les autres	33 % [15/45] 27 % [12/45] d'ovocytes fragmentés	DG 2 j après le GIFT : 20 % [3/15]

Tableau II (suite)

RAY <i>et al.</i> (1994)	PGF _{2α} à mi-œstrus Collecte 24 h à 36 h après hCG	Stade lors du transfert : 3 ^{ème} jour œstrus à quelques h avant ovulation ; IA : 3 h à 0,5 h avant ; collecte ovocyte : PTV ou laparotomie	PTV Rinçage folliculaire : PBS + héparine + SVF	Lavage + incubation pendant 0,5 à 3 h, à 39°C, avec 5 % CO ₂ dans TCM199 + SJO ou SVF Retrait cellules du cumulus en excès	Ovocyte dans 1/3 milieu + 2/3 liquide folliculaire de la R. Côté du transfert non précisé. 2 à 3 ovocytes transférés / R	Altrenogest 14j à partir de 1 ou 2j après GIFT	84 % [26/31]	100 % [26/26] dont 88 % [23/26] de bons, 8 % [2/26] de moyens et 4 % [1/26] de mauvais	8 % [2/26] Gestations interrompues à 52 et 60 jours
CARNEVALE et GINTHER (1995)	Synchronisation : PGF _{2α} Collecte 21 h à 26 h après hCG Lot «jeunes» : 6 à 10 ans Lot «âgées» : 20 à 26 ans	Collecte 21 h à 26 h après hCG par PTV Receveuses jeunes IA 12 h avant et juste après GIFT	PTV Rinçage folliculaire : PBS + SVF + héparine	Conservation à 39°C dans lactate de Tyrode sans glucose + tampon de Hepes + BSA + SVF Culture 16-20 h à 39°C sous 5 % CO ₂ dans TCM199 + SVF + pyruvate + gentamicine Cellules granulosas et cumulus en excès retirées	Transfert dans lactate de Tyrode + tampon de Hepes Transfert dans l'oviducte ipsi ou controlatéral à l'ovulation de la receveuse	Progestérone huileuse dans les 15 jours suivant le transfert	89 % [66/74]	26 % [26/66] d'ovocytes fragmentés	Lot «jeunes» : 92 % [11/12] Lot «âgées» : 31 % [8/26] 90 % des gestations maintenues jusqu'à 30 jours

Tableau II (suite)

HINRICHS <i>et al.</i> (1998a)	Synchronisation œstrogène / progestérone / PGF _{2α} 5 jours après ovulation Collecte 24 h après hCG	IA 1 jour avant GIFT et 2 h à 5 h après	PTF Pas de rinçage folliculaire	Conservation à 37°C dans TCM199 + Sels de Hank + Hepes + ticarcilline + SVF + héparine ; Incubation 12 h ou 18 h à 38,8°C dans TCM199 + Sels de Earle + gentamicine + SVF Cellules cumulus en excès retirées	Transfert dans milieu de conservation Transfert dans l'oviducte ipsi ou controlatéral à l'ovulation	Progestérone huileuse quand échogénicité du corps jaune anormale	48 % [11/23]	73 % [8/11] 27 % [3/11] d'ovocytes non transférés dont 9 % [1/11] immature 9 % [1/11] abîmé 9 % [1/11] perdu	6/8 Pas de différence entre 12 h ou 18 h de culture Gestations interrompues à 14 jours
HINRICHS <i>et al.</i> (1998b)	Collecte : Lot 24h : 24 h après hCG Lot 35h : 35 h après hCG	R = D Collecte 24 h ou 36 h après hCG IA 1 jour avant transfert et juste après transfert	PTF	TCM199 + 10 % SVF, sous 5 % CO ₂ à 39,9°C Lot 24h : 12 h Lot 35h : < 1 h	Pas de précision	Pas de précision	lot 24h : 66 % [10/15] lot 35h : 73 % [11/25] Pas de différence significative	Non précisé	DG à 12-14 jours Lot 24h = 5/8 Lot 35h = 4/9 Pas de différence significative

Tableau II (suite)

<p align="center">CARNEVALE <i>et al.</i> (2000)</p>	<p>Ponction 24 h à 26 h après hCG</p>	<p>Lot 1 : IA 2 h après transfert. Lot 2 : IA 14 h à 16 h après transfert. Lot 3 : spermatozoïdes transférés dans l'oviducte</p>	<p>PTV</p>	<p>TCM199 + Hepes Lots 1 et 3 : culture <i>in vitro</i> 12 h à 14 h Lot 2 : transfert dans l'heure suivant la collecte</p>	<p>Transfert chirurgical 1 à 4 ovocytes transférés par receveuse</p>	<p>Non précisé</p>	<p>Non précisé</p>	<p>Non précisé</p>	<p>Lot 1 : 57 % [8/14] Lot 2 : 43 % [6/14] Lot 3 : 27 % [3/11] Pas de différence significative</p>
<p align="center">CARNEVALE <i>et al.</i> (2000)</p>	<p>Ponction 32 h à 36 h après hCG</p>	<p>IA 12 h à 14 h avant</p>	<p>PTV</p>	<p>TCM199 + Hepes Transfert immédiat après ponction</p>	<p>Pas de précision</p>	<p>Non précisé</p>	<p>Non précisé</p>	<p>Non précisé</p>	<p>82 % [9/11]</p>

Ainsi peu d'études sont disponibles sur le transfert dans l'oviducte d'ovocytes préovulatoires dans l'espèce équine et les résultats publiés sont variables. Les conditions de collecte et de conservation de l'ovocyte avant transfert varient selon les études, notamment quant au moment de la collecte par rapport à l'induction de l'ovulation et quant à la durée de mise en culture *in vitro* avant transfert. Sur ces points, deux méthodes de GIFT sont le plus souvent rapportées : dans la « méthode 35 h », les ovocytes sont collectés 35 h après l'induction de l'ovulation et transférés immédiatement après un passage de très courte durée *in vitro* ; dans la « méthode 24 h », les ovocytes sont collectés 24 h après induction de l'ovulation et transférés après 20 h de culture *in vitro*. Avec la « méthode 35 h », les taux de gestation rapportés étaient décevants (McKINNON *et al.*, 1987 ; McKINNON *et al.*, 1988 ; RAY *et al.*, 1994) puis se sont améliorés (CARNEVALE *et al.*, 2000 ; HINRICHS *et al.*, 1998b), devenant comparables aux taux de gestation obtenus avec la « méthode 24 h » (CARNEVALE et GINTHER, 1995 ; HINRICHS *et al.*, 1998a ; HINRICHS *et al.*, 1998b ; CARNEVALE *et al.*, 2000). Il semble donc nécessaire de comparer directement ces deux méthodes dans le cadre d'une même expérience afin de savoir quelle méthode utiliser pour optimiser les résultats du GIFT. Cette expérience est présentée dans la deuxième partie.

DEUXIEME PARTIE

ETUDE EXPERIMENTALE

EFFET DU DELAI ENTRE L'INDUCTION DE L'OVULATION ET LA COLLECTE DE L'OVOCYTE PEOVULATOIRE SUR LES RESULTATS DU GIFT.

Dans l'espèce équine, plusieurs équipes de recherche ont donc réalisé des transferts d'ovocyte préovulatoire dans l'oviducte, avec des résultats variables. Deux méthodes sont décrites :

- La « méthode 35 h » : elle consiste à transférer des ovocytes immédiatement après leur collecte en métaphase II, c'est-à-dire 35 h après l'induction de l'ovulation par injection hormonale. Les premiers taux de gestation rapportés étaient bas (0/6 : McKINNON *et al.*, 1987 ; 20 % [3/15] : McKINNON *et al.*, 1988 ; 8 % [2/26] : RAY *et al.*, 1994) puis ont été plus élevés (82 % [9/11] : CARNEVALE *et al.*, 2000 ; 4/9 : HINRICHS *et al.*, 1998b).
- La « méthode 24 h » : dans ce cas, les ovocytes sont collectés en métaphase I, 24 h après induction de l'ovulation par injection hormonale puis mis en maturation finale *in vitro* avant d'être transférés. C'est avec cette méthode que les meilleurs taux de gestation ont été obtenus (92 % [11/12] avec de jeunes donneuses : CARNEVALE et GINTHER, 1995 ; 6/8 : HINRICHS *et al.*, 1998a ; 5/8 : HINRICHS *et al.*, 1998b ; 57 % [8/14] : CARNEVALE *et al.*, 2000).

Il semble ainsi que le stade de maturation de l'ovocyte au moment de sa collecte influence le taux de gestation après transfert ; seule l'étude d'HINRICHS *et al.* (1998a) a comparé directement ces deux méthodes sans obtenir des taux de gestation significativement différents, mais sur de faibles effectifs (5/8 vs 4/9).

Dans le cadre de la mise au point d'une technique de GIFT à la Jumenterie de l'INRA de Tours (37), nous avons mené une expérience visant à comparer le taux de gestation obtenu par transfert d'ovocytes collectés 24 h après induction de l'ovulation et mis en culture *in vitro* pendant 20 h, avec le taux de gestation obtenu par transfert d'ovocytes immédiatement après collecte 35 h après induction de l'ovulation.

Le propos de cette étude est donc d'évaluer si la maturation finale de l'ovocyte transféré influence le taux de gestation après un GIFT, mais aussi de comparer les avantages et inconvénients de la méthode 24 h et de la méthode 35 h selon d'autres critères que le taux de gestation.

1 - ANIMAUX, MATERIELS ET METHODES

11 - ANIMAUX

Les ponettes donneuses et receveuses d'ovocyte font partie d'un troupeau de 80 ponettes cyclées de race Welsh. Les donneuses sont choisies au hasard tandis que pour les receveuses, on privilégie les ponettes les moins grasses, avec un flanc large et n'ayant pas été opérées récemment, ceci afin de faciliter la chirurgie de transfert.

Les ponettes pèsent de 200 à 300 kg ; elles sont âgées de 2 à 21 ans, en bonne condition physique, n'ont pas d'affection gynécologique connue et ont une fertilité normale (elles sont toutes inséminées artificiellement ou saillies régulièrement lors de différents programmes de recherche sur la reproduction mâle ou femelle et déclarées plusieurs fois par saison de reproduction gestantes à 12 jours avant l'interruption de la gestation ; la plupart ont déjà mené au moins une gestation à terme afin de renouveler le troupeau expérimental). Elles vivent en boxe par lot de 3 à 5 et sont sorties en paddock environ 3 h par jour. Leur ration alimentaire est constituée de 2 kg de concentrés et de 1,5 kg de paille par animal et par jour.

Le suivi de l'activité ovarienne est réalisé par palpation et échographie transrectales (échographe Aloka 210 ND muni d'une sonde linéaire 5 MHz).

La date de la dernière ovulation est connue pour chaque ponette. La lutéolyse est soit naturelle, soit induite par injection IM de 5 mg PGF_{2α} naturelles (dinoprost, Dinolytic ND, Pharmacia & Upjohn, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) le 6^{ème} jour après ovulation ou le 7^{ème} jour après une ponction folliculaire. Pendant la phase folliculaire, la croissance folliculaire est suivie tous les deux jours ou quotidiennement, l'évolution de la consistance et de l'échogénicité de l'utérus est notée pour déterminer l'apparition de l'œstrus.

12 - PREPARATION ET GESTION DES DONNEUSES ET DES RECEVEUSES

121 - Induction de l'ovulation

Lorsque le plus gros follicule ovarien d'une ponette en œstrus atteint 35 mm, elle est retenue comme donneuse : son ovulation est induite par une injection IV de 25 mg de CEG contenant environ 6 % de LH pure, 3 % de FSH pure et 91 % de produits non identifiés, d'après DUCHAMP *et al.* (1987).

A chaque donneuse dont l'ovulation a été induite, on attribue une à trois receveuses potentielles, selon le nombre de ponettes du troupeau qui sont en œstrus et portent un follicule de plus de 35 mm au même moment que la donneuse ; c'est la grande taille du troupeau qui

permet de disposer fréquemment de plusieurs ponettes au même stade de leur cycle. On induit l'ovulation des receveuses de la même façon que pour la donneuse.

122 - Gestion des donneuses

La figure 6 indique la façon dont les donneuses sont gérées.

Elles sont réparties en deux lots selon le délai entre l'induction de l'ovulation et la collecte de l'ovocyte.

- **Donneuses du « lot 35h »** : 11 h et 35 h après l'induction de l'ovulation, on vérifie que ces ponettes n'ont pas ovulé. Si elles n'ont pas ovulé, elles subissent une ponction folliculaire transvaginale 35 h après induction de l'ovulation pour collecter leur ovocyte préovulatoire ; s'il est trouvé dans le liquide folliculaire aspiré lors de la ponction et non dégénéré, il est transféré dans une receveuse dans les 2 h suivant la collecte.

- **Donneuses du lot « 24h »** : 24 h après l'induction de l'ovulation, on vérifie que ces ponettes n'ont pas ovulé. Si elles n'ont pas ovulé, elles subissent une ponction folliculaire transvaginale 24 h après l'induction de l'ovulation pour collecter leur ovocyte préovulatoire ; s'il est trouvé et non dégénéré, il est transféré dans une receveuse après 20 h de culture *in vitro*.

Pour les deux lots, les donneuses ayant ovulé avant la ponction sont bien sûr éliminées du protocole pour ce cycle.

123 - Gestion des receveuses

La figure 7 indique la façon dont on a géré les receveuses dans cette expérience.

Chaque receveuse est attribuée à une donneuse dont elle reçoit l'ovocyte ; les receveuses sont aussi réparties en deux lots :

- **Receveuses du « lot 35h »** : elles reçoivent l'ovocyte d'une donneuse du lot 35h collecté 35 h après l'induction de l'ovulation et transféré immédiatement.

On vérifie si ces receveuses ont ovulé 11 h après l'induction de l'ovulation :

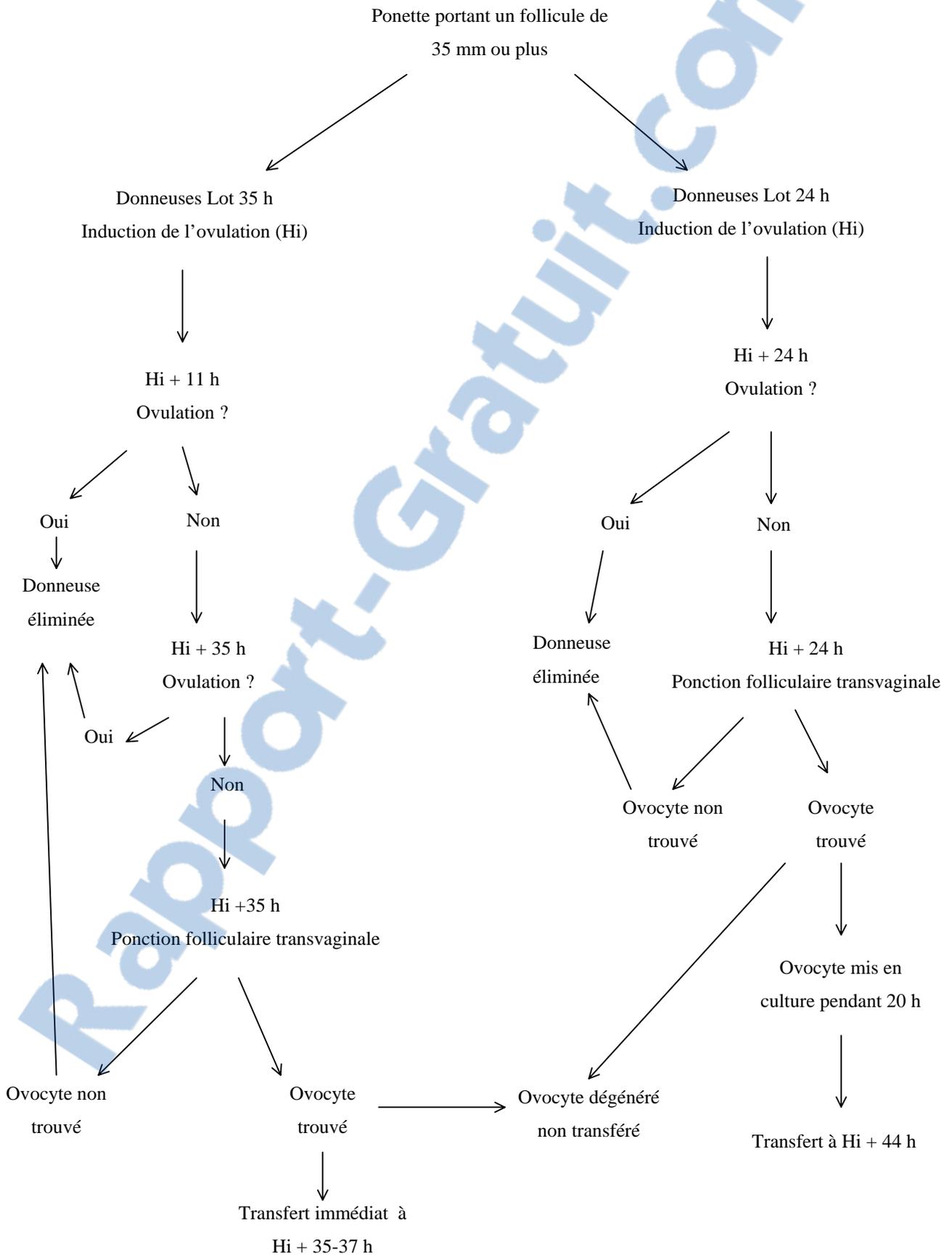
- si elles ont ovulé, elles sont éliminées du protocole pour ce cycle.

- si elles n'ont pas ovulé, on vérifie à nouveau si elles ont ovulé 35 h après induction de l'ovulation :

- ♦ Si elles ont ovulé, elles sont tout de même utilisées pour un transfert à condition que l'ovocyte d'une donneuse soit disponible ; si l'ovocyte de la donneuse n'a pas été trouvé, elles sont éliminées du protocole pour ce cycle.

Figure 6 : Gestion des donneuses

(Hi : heure de l'induction de l'ovulation)



◆ Si elles n'ont pas ovulé et que l'ovocyte d'une donneuse est disponible, leur propre ovocyte sera collecté par ponction folliculaire pendant la chirurgie de transfert afin d'éviter qu'il ne soit fécondé.

◆ Si elles n'ont pas ovulé et que l'ovocyte de la donneuse n'a pas été trouvé, leur propre ovocyte est collecté 35 h après l'induction de l'ovulation par ponction folliculaire transvaginale puis transféré dans cette même receveuse ; cet « autotransfert » ne peut avoir lieu que si la ponction de la receveuse est fructueuse. Sinon, la receveuse est éliminée du protocole pour ce cycle.

• **Receveuses du « lot 24h »** : elles reçoivent l'ovocyte d'une donneuse du lot 24h collecté 24 h après induction de l'ovulation et transféré après 20 h de culture *in vitro*.

On vérifie si ces receveuses ont ovulé 24 h après l'induction de l'ovulation :

- si elles ont ovulé, elles sont éliminées du protocole pour ce cycle.

- si elles n'ont pas ovulé, leur ovocyte est collecté 24 h après induction de l'ovulation par ponction folliculaire transvaginale :

◆ Si leur ovocyte n'est pas trouvé et si l'ovocyte de la donneuse n'a pas non plus été trouvé, elles sont éliminées du protocole pour cycle.

◆ Si leur ovocyte n'est pas trouvé et si l'ovocyte d'une donneuse est disponible, elles reçoivent l'ovocyte de la donneuse 44 h après induction de l'ovulation.

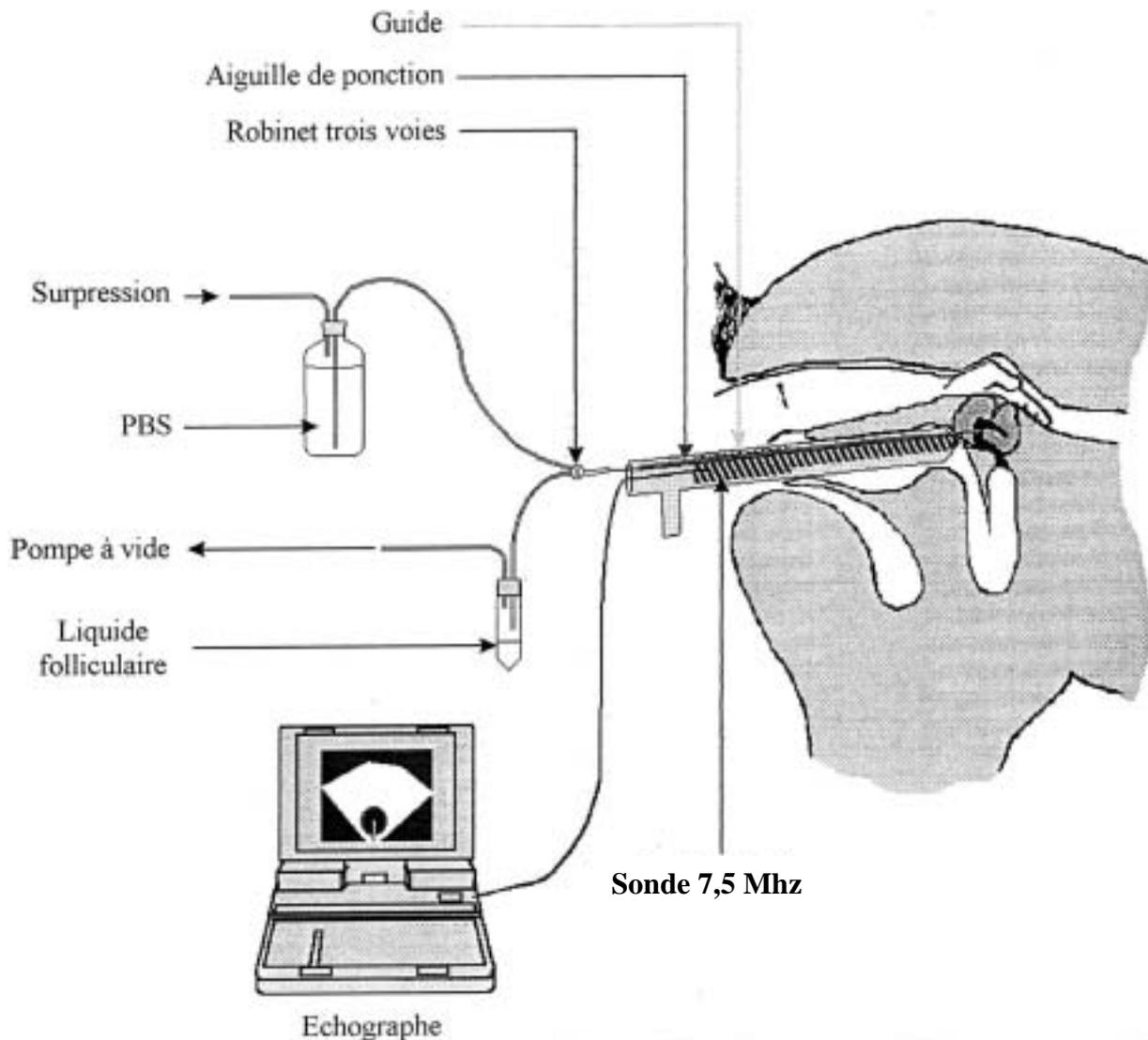
◆ Si leur ovocyte est trouvé et si l'ovocyte d'une donneuse est disponible, elles reçoivent l'ovocyte de la donneuse 44 h après induction de l'ovulation.

◆ Si leur ovocyte est trouvé et si l'ovocyte de la donneuse n'a pas été trouvé, l'ovocyte de la receveuse est mis en culture pendant 20 h et transféré dans cette même receveuse (« autotransfert »).

13 - COLLECTE DE L'OVOCYTE PÉROVULATOIRE DES DONNEUSES

La technique utilisée est la même pour les lots 35h et 24h : il s'agit d'une ponction transvaginale échoguidée du follicule préovulatoire. Le principe de cette technique est représenté à la figure 8. Elle a été décrite par DUCHAMP *et al.* (1995).

Figure 8 : Principe de la ponction folliculaire transvaginale échoguidée



131 - Matériel

Une sonde sectorielle à balayage mécanique de 7,5 MHz reliée à un échographe (Kretz ND) équipé d'un ordinateur (Combrison 310A ND, Soframed, Truchtersheim, France) est utilisée. Cette sonde est protégée par un guide en PVC sur lequel est fixé un guide métallique pour l'aiguille de ponction. La position du guide de l'aiguille étant fixe par rapport à la sonde,

la trajectoire de l'aiguille peut être matérialisée sur l'écran de l'échographe par une ligne en pointillés. Pour ponctionner les follicules préovulatoires, on utilise une aiguille simple voie de 1,8 mm de diamètre externe et de 600 mm de long (Thiébaud Frères, Jouvenex Margencel, France). Cette aiguille est branchée sur un robinet à trois voies (Vygon, Ecouen, France).

La deuxième voie est reliée à un tube de collecte stérile de 50 ml de type Falcon ND pour recueillir les liquides folliculaire et de rinçage, aspirés à l'aide d'une pompe à vide ; la pression de vide appliquée varie de 230 à 300 mm Hg ; une bouteille de trop-plein est intercalée entre le tube de collecte et la pompe.

La troisième voie permet de rincer le follicule en y injectant une solution de PBS (Phosphate Buffered Saline, Dulbecco A, Unipath, Dardilly, France) héparinée à 50 UI/ml (héparine sodique, Léo, Saint-Quentin, France) maintenue à 37°C. Grâce à du gaz sous pression, la solution de rinçage est injectée à une pression constante (500 mm Hg).

Le matériel est représenté aux photographies 2a et 2b.

132 - Préparation et médication

La ponette est contenue debout dans un travail. La sédation et l'analgésie sont assurées par une injection IV de 1 mg de chlorhydrate de détomidine (Domosédan ND, Pfizer, Paris, France). La queue entourée d'un plastique est maintenue suspendue. Le rectum est vidé, la région périnéale nettoyée avec de la povidone iodée (Vétédine savon ND, Vétquinol, Lure, France) ; une sonde urinaire est mise en place. Après cette préparation et juste avant la ponction, une deuxième injection IV de 2 mg de chlorhydrate de détomidine (Domosédan ND) est administrée, ainsi qu'une injection IV de 60 mg de bromure de propanthéline (Sigma P-8891, Saint-Quentin Fallavier, France) qui permet une relaxation de la musculature rectale. Après la ponction folliculaire, la ponette reçoit une injection IM de 4 millions d'UI de benzylpénicilline procaine et de 4 g de sulfate de dihydrostreptomycine (Intramicine ND, CEVA, Libourne, France).

133 - Déroulement de la ponction folliculaire transvaginale échoguidée

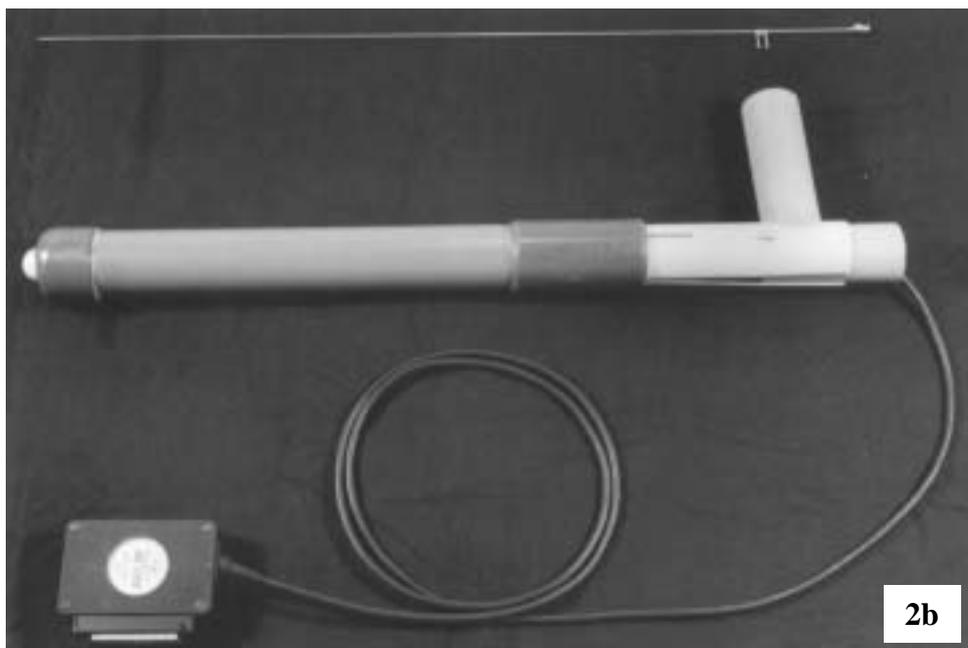
Lors de la ponction, le follicule considéré comme préovulatoire est le plus gros follicule échographié au moment de l'induction, qui mesurait alors au minimum 35 mm ; s'il a régressé, il est tout de même considéré comme préovulatoire, sans limite de taille (une régression du diamètre du follicule préovulatoire équin dans les 30 mn précédant l'ovulation a en effet été décrite par CARNEVALE, 1988). Si deux follicules mesurent plus de 35 mm lors de l'induction de l'ovulation, les deux sont considérés comme préovulatoires et ponctionnés.

Photographies 2 : Matériel d'échographie pour la ponction folliculaire transvaginale

2a : Matériel démonté : **a** : aiguille ; **ga** : guide de l'aiguille ; **g1, g2, g3** : guide de la sonde ; **s** : sonde échographique.



2b : Sonde et guide assemblés avec aiguille hors de son guide



Les photographies 3a et 3b montrent l'organisation de la salle de ponction et le déroulement de la ponction.

Un opérateur positionne l'ovaire, par voie transrectale, devant la sonde échographique introduite dans le vagin à l'intérieur du guide en PVC. Il place le follicule à ponctionner sur la trajectoire de l'aiguille en se repérant sur l'écran de l'échographe. Un autre opérateur introduit l'aiguille de ponction dans le guide jusqu'à ce qu'elle apparaisse sur l'image échographique au centre du follicule préovulatoire.

Le liquide folliculaire est aspiré et recueilli jusqu'à vidange complète du follicule ; pour le rinçage, 20 ml de PBS hépariné sont injectés puis aspirés, ceci à minimum 5 reprises ; les liquides de rinçage sont collectés. Lors de chaque aspiration, une rotation permanente de l'aiguille permet de gratter la paroi du follicule. Le follicule est laissé vide après le dernier rinçage. Les photographies 4 montrent les images échographiques de l'ovaire lors d'une ponction folliculaire.

Les liquides folliculaire et de rinçage recueillis sont transmis immédiatement de la salle de ponction à la salle de culture attenante par un passe-plat dont la température est maintenue à 37°C.

Photographies 3 : Ponction folliculaire transvaginale

3a : Salle de ponction : ec : échographe ; s : stalle de contention ; pe : pédale d'action de la pompe à vide ; po : pompe à vide ; et : étuve.



3b : Déroulement de la ponction folliculaire transvaginale : O1, O2 : opérateurs ; g : guide de la sonde ; a : aiguille ; t : tube de collecte.



Photographies 4 : Images échographiques au cours d'une ponction folliculaire

4a : Quatre follicules sont visibles à l'écran ; le follicule à ponctionner (en bas à droite) est placé en face de l'aiguille, dont le trajet est symbolisée par une ligne en pointillés ; l'aiguille (**a**) est alors introduite dans le follicule.

4b : Le follicule est vide car le liquide folliculaire a été aspiré.

4c et 4d : Le follicule est rempli progressivement par la solution de PBS hépariné.



14 - COLLECTE DE L'OVOCYTE PEOVULATOIRE DES RECEVEUSES

Si les ponettes receveuses n'ont pas encore ovulé 24 h ou 35 h après l'induction de l'ovulation, leur ovocyte préovulatoire est collecté. Le moment et la façon de collecter l'ovocyte des receveuses diffèrent selon les 2 lots :

- Pour les receveuses du lot 24h : on ponctionne leur follicule préovulatoire 24 h après l'induction de l'ovulation, soit 20 h avant le transfert, par voie transvaginalement conformément à la technique employée pour les donneuses.
- Pour les receveuses du lot 35h : leur ovocyte est collecté 35 h après l'induction de l'ovulation au début de la chirurgie de transfert en ponctionnant directement le follicule préovulatoire sur l'ovaire extériorisé par laparotomie par le flanc : le liquide folliculaire est aspiré à l'aide d'une aiguille courte de 100 mm de long et de diamètre 15G branchée à une seringue de 50 ml par un tuyau souple de 20 cm ; le follicule est rincé à 5 reprises avec des seringues de 20 ml de PBS hépariné.
- Pour les receveuses du lot 35h candidates à l'autotransfert de leur propre ovocyte : il est collecté, comme celui des donneuses du lot 35 h, par ponction transvaginalement 35 h après l'induction de l'ovulation et juste avant son transfert chirurgical.

L'ovocyte préovulatoire des receveuses n'est pas utilisé, sauf en cas d'autotransfert. Dans ce cas il est considéré et préparé comme l'ovocyte d'une donneuse.

15 - PREPARATION DE L'OVOCYTE PEOVULATOIRE AVANT TRANSFERT

Les liquides folliculaire et de rinçage sont transvasés dans des boîtes de Pétri stériles. L'ovocyte préovulatoire y est recherché sous loupe binoculaire au grossissement x 10 à x 50. La morphologie du cumulus (compact ou expansé) est systématiquement examinée juste après la ponction. Tout aspect anormal de l'ovocyte est noté : la forme de la cellule, la couleur et l'aspect de l'ooplasm sont examinés ; pour être transféré, un ovocyte doit être symétrique, avec un ooplasm homogène, lisse ou régulièrement granuleux (MANTEN, 2000) ; les ovocytes fragmentés ou avec un ooplasm foncé ou hétérogène ne sont pas transférés. Aucune classification standardisée n'a été utilisée dans l'expérience car les classifications des ovocytes équin sont très différentes selon les laboratoires de recherche, sans nomenclature internationale reconnue (MANTEN, 2000).

La préparation de l'ovocyte diffère selon les deux lots.

151 - Préparation de l'ovocyte préovulatoire dans le lot 35h

L'ovocyte est lavé dans 4 puits contenant chacun 500 µl de milieu composé de 450 µl de Tissue Culture Medium 199 avec sels de Earle (Gibco, Eragny, France) et 50 µl de sérum de veau fœtal inactivé (Gibco, Eragny, France).

Il est conservé dans le 4^{ème} puits sous atmosphère humide enrichie à 5 % de CO₂, à 38,5°C jusqu'au transfert dans les 2 h.

152 - Préparation de l'ovocyte préovulatoire dans le lot 24h

L'ovocyte est lavé dans 4 puits contenant chacun 500 µl de milieu composé de 450 µl de Tissue Culture Medium 199 avec sels de Earle, 50 µl de sérum de veau fœtal inactivé et 25 µg de gentamicine (Gentalline ND, Schering-Plough, Levallois-Perret, France).

Il est mis en culture dans le 4^{ème} puits sous atmosphère humide enrichie à 5 % de CO₂, à 38,5°C pendant 20 h environ puis transféré.

Pour les deux lots, la décision de transférer l'ovocyte est prise si :

- une ponette receveuse est disponible ;
- le cumulus est expansé ;
- l'ovocyte a un aspect normal.

Avant transfert, l'ovocyte est aspiré dans moins de 500 µl de milieu (c'est-à-dire TCM 199 + sels de Earle + SVF dans le lot 35h, TCM 199 + sels de Earle + SVF + gentamicine dans le lot 24h) entre deux bulles d'air, dans une pipette Pasteur stérile rodée reliée à une seringue de 1 ml par un tuyau souple. La pipette Pasteur est conservée sous atmosphère humide enrichie à 5 % de CO₂, à 38,5°C.

16 - TRANSFERT DE L'OVOCYTE PREOVULATOIRE

Le transfert des ovocytes du lot 35h dans les 2 h après la collecte, soit 35 à 37 h après l'induction de l'ovulation.

Le transfert des ovocytes du lot 24h a lieu 44 h après l'induction de l'ovulation, c'est-à-dire après 20 h de culture suivant la collecte 24 h après l'induction de l'ovulation.

Pour les deux lots, le transfert est chirurgical : l'ovocyte est placé dans l'oviducte après une laparotomie par le flanc.

Dans les deux lots, lorsque plusieurs ovocytes sont disponibles le même jour (parce qu'une donneuse a deux follicules préovulatoires ou parce qu'il y a plusieurs donneuses le même jour), ils sont tous transférés dans l'oviducte d'une même receveuse, car ne peut avoir lieu

quotidiennement qu'une seule chirurgie de transfert. La préparation simultanée de plusieurs receveuses permet simplement de disposer d'une receveuse même si une autre des femelles prévues a ovulé.

161 - Insémination artificielle des receveuses

Elles sont inséminées artificiellement deux fois : 24 h avant le transfert et juste après, avec de la semence fraîche ; on utilise une dose inséminante de $600 \cdot 10^6$ spermatozoïdes dans 10 ml de dilueur HGLL constitué d'une solution de sels de Hank, de glucose et de lactose, supplémenté avec 1 % de BSA (MEA-BATELLIER, 1997).

Trois étalons dont la concentration en spermatozoïdes dans le sperme est normale (plus de $200 \cdot 10^6$ spermatozoïdes par ml de semence) ont été utilisés au cours de l'étude.

L'étalon est choisi en fonction de ses origines génétiques, de celles de la donneuse et de celles de la receveuse de façon à permettre un éventuel contrôle de filiation maternelle.

162 - Préparation des receveuses

24 h avant l'intervention chirurgicale, la receveuse est mise à la diète.

Elle reçoit une injection IM de 6 millions d'UI de benzylpénicilline procaine et de 6 g de sulfate de dihydrostreptomycine (Intramicine ND) la veille du transfert et immédiatement après.

Le transfert a lieu dans l'oviducte ipsilatéral au follicule préovulatoire de la receveuse (ou à son corps jaune si elle vient d'ovuler).

La ponette est contenue debout dans un travail. La sédation et l'analgésie sont assurées par une injection IV de 1 mg de chlorhydrate de détomidine (Domosédan ND).

Le flanc est tondu et rasé. Une palpation transrectale permet de déterminer la position exacte de l'ovaire sur le flanc pour marquer au feutre indélébile le futur trait d'incision et ainsi optimiser l'extériorisation ultérieure de l'ovaire. Une sonde urinaire est posée. Une désinfection classique du flanc est réalisée avec de la povidone iodée (Vétédine savon ND et Vétédine solution ND) et de l'alcool à 70°. Une anesthésie locale est faite le long du futur trait d'incision par injection sous-cutanée traçante de 50 ml de chlorhydrate de procaine (Sylvocaïne ND, Merial, Lyon, France).

Une perfusion IV de Lactate de Ringer (Ringer Lactate, Braun medical, Boulogne, France) contenant 5 mg de chlorhydrate de détomidine (Domosédan ND) par litre et 10 mg de tartrate de butorphanol (Torbugesic ND, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, Etats-Unis) par litre est administrée à la vitesse de 0,05 ml/10 sec. Puis 2 g de phénylbutazone sodique

(Phénylarthrite ND, Vétquinol, Lure, France) sont injectés par la perfusion IV. Juste avant l'incision, la vitesse de la perfusion est accélérée à 15 x 0,05 ml/10 secondes. Elle est arrêtée en fin d'intervention au moment des sutures. La ponette reçoit entre 500 et 750 ml de solution sédatrice pendant l'intervention.

163 - Technique chirurgicale

Une laparotomie par le flanc est réalisée par incision cutanée verticale (photographie 5) ; après dissection du tissu sous-cutané, les fibres des muscles oblique externe, oblique interne et transverse de l'abdomen sont séparées plan par plan. Après perforation du péritoine, la main du chirurgien pénètre dans l'abdomen et extériorise progressivement l'ovaire par taxis (photographies 6 et 7). La pipette Pasteur contenant l'ovocyte est conservée à 38,5°C sous 5 % de CO₂ tant que l'ovaire n'est pas extériorisé.

Pour le transfert de l'ovocyte, l'ovaire est tenu de façon à optimiser la présentation du pavillon à un second chirurgien : celui-ci rentre l'extrémité de la pipette Pasteur dans le pavillon, tendu par une pince, puis la fait progresser délicatement dans l'oviducte aussi loin que possible (2 à 5 cm) (photographie 8) ; l'ovocyte, dans le milieu de transfert, est déposé dans l'oviducte en poussant le piston de la seringue ; la pipette Pasteur est rincée avec du milieu, où l'on vérifie l'absence d'ovocyte pour s'assurer qu'il a bien été transféré.

Les muscles sont suturés plan par plan par des points simples avec du fil résorbable ; un surjet sous-cutané au fil résorbable et un surjet cutané à points passés avec fil irrésorbable sont réalisés. Un pansement collé est posé.

Photographie 5 : Vue d'ensemble de la laparotomie par le flanc



Photographie 6 : Recherche de l'ovaire dans l'abdomen



Photographie 7 : Extériorisation de l'ovaire par taxis



Photographie 8 : Insertion de la pipette Pasteur dans l'oviducte



Les temps chirurgicaux sont identiques en tous points pour les deux lots. Cependant, le follicule préovulatoire des receveuses du lot 35h n'ayant pas encore ovulé au moment du transfert et ne recevant pas leur propre ovocyte est ponctionné en début d'intervention. La ponction a lieu juste après l'extériorisation de l'ovaire selon la technique décrite dans le paragraphe 14.

17 - GESTION DES RECEVEUSES APRES TRANSFERT

La ponette reçoit *per os* 20 mg d'altrenogest (Régumate ND, Intervet, Angers, France) une fois par jour jusqu'au diagnostic de gestation, le 12^{ème} jour suivant le transfert.

18 - DIAGNOSTIC DE GESTATION

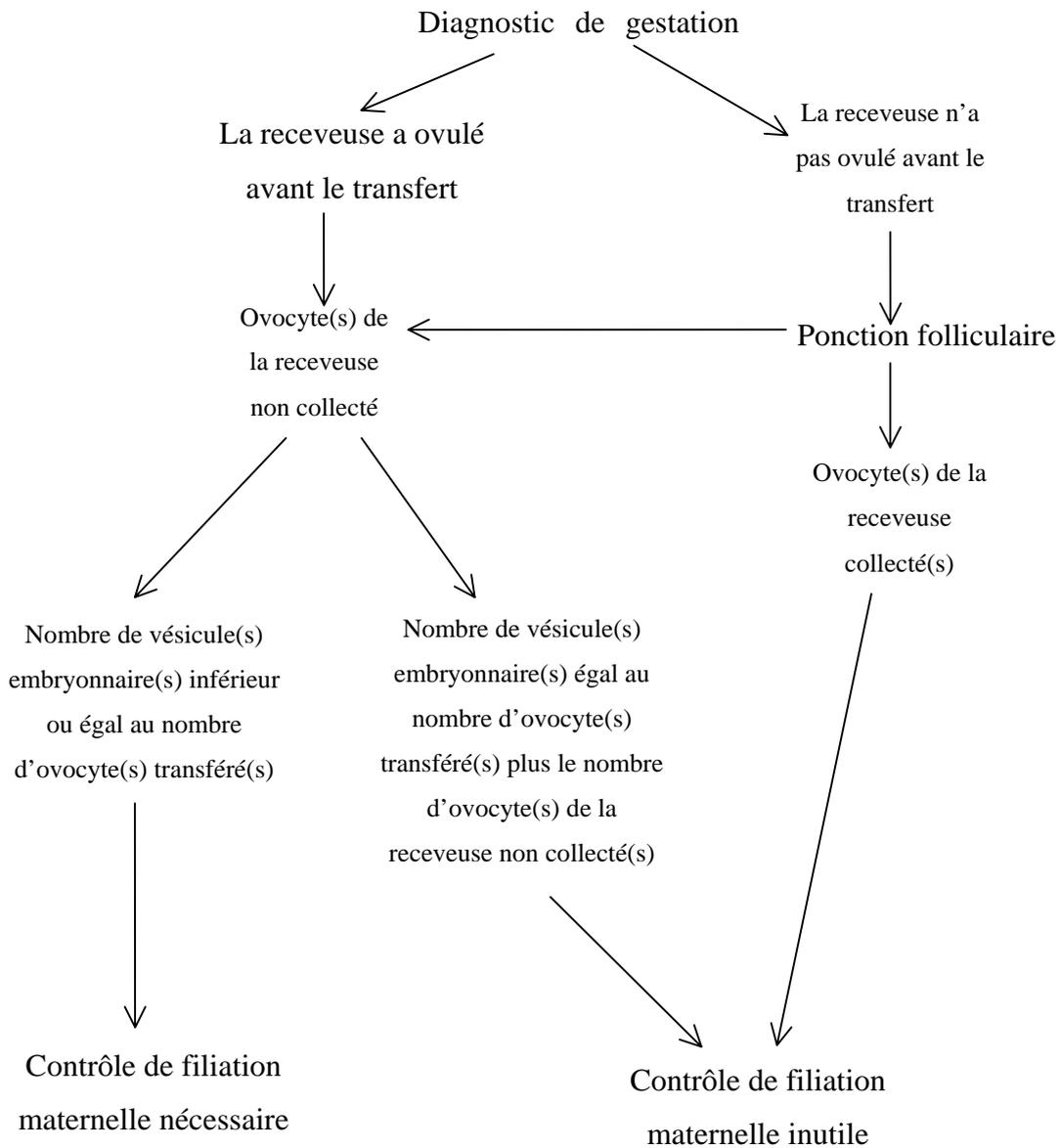
Le diagnostic de gestation est réalisé 12 jours après le transfert par échographie transrectale en recherchant une vésicule embryonnaire dans l'utérus ; lorsqu'il est négatif, il est réitéré quotidiennement jusqu'au 15^{ème} jour après transfert par échographie transrectale puis par vérification du retour en chaleurs.

Lorsque le diagnostic de gestation est positif, c'est-à-dire lorsqu'une vésicule embryonnaire au moins est visualisée, différents cas, représentés à la figure 9, sont possibles :

- Si le ou les ovocyte(s) de la ponette receveuse n'a (n'ont) pas été collecté(s) (parce qu'elle a ovulé avant le transfert ou parce que la collecte a échoué) et que le nombre de vésicule(s) embryonnaire(s) est inférieur ou égal au nombre d'ovocyte(s) transféré(s), un contrôle de filiation maternelle est requis pour savoir si l'embryon est issu de l'ovocyte de la donneuse ou de celui de la receveuse : l'embryon est collecté par rinçage - siphonnage de l'utérus 12 jours après le transfert, selon la technique décrite par TAINURIER *et al.* (1989). Puis il est rincé plusieurs fois dans une solution de NaCl isotonique et conservé à sec dans un tube de 15 ml à -20°C. Un échantillon sanguin est prélevé sur le père, connu, sur la donneuse et sur la receveuse, mères potentielles. Le contrôle de filiation maternelle de l'embryon est effectué par analyse de microsatellites amplifiés par PCR, d'après la technique développée par GUERAND *et al.* (1997) pour le contrôle de filiation paternelle.

- Si l'ovocyte de la receveuse n'a pas été collecté et que le nombre de vésicules embryonnaires est égal au nombre d'ovocyte(s) de la receveuse non collecté(s) plus le nombre d'ovocyte(s) transféré(s), ou si l'ovocyte de la donneuse a été collecté, le contrôle de filiation maternelle n'est pas nécessaire (car on est sûr qu'un embryon provient de l'ovocyte transféré). Dans ce cas, l'avortement est induit le jour où le diagnostic de gestation est positif par une injection IM de 5 mg de PGF_{2α} naturelles (Dinoprost).

Figure 9 : Arbre décisionnel en cas de diagnostic de gestation positif



2 - RESULTATS

21 - TAUX D'OVULATION DES DONNEUSES AVANT LA COLLECTE

Le nombre de ponettes dont on a induit l'ovulation mais qui n'ont pas été utilisées car elles avaient ovulé n'a pas été comptabilisé ; seul a été comptabilisé le nombre de ponettes effectivement utilisées, c'est-à-dire ayant subi une ponction folliculaire transvaginale pour les donneuses ou une chirurgie de transfert pour les receveuses.

Ainsi, le taux d'ovulation avant ponction pour notre expérience n'est pas connu, ni pour le lot 35h ni pour le lot 24h.

Cependant, on a retenu de cette expérience certains résultats non chiffrés concernant le taux d'ovulation avant ponction. La majorité des ponettes ovule entre 24 h et 35 h après induction de l'ovulation : un nombre important de ponettes dont on avait induit l'ovulation pour le lot de donneuses 35h a été éliminé car elles avaient déjà ovulé au moment de la ponction ; au contraire, toutes les ponettes dont on avait induit l'ovulation pour le lot de donneuses 24h ont pu être utilisées car aucune n'avait ovulé au moment de la ponction.

22 - NOMBRE DE PONETTES UTILISEES ET REPARTITION PAR LOT

On entend par « ponettes utilisées » celles ayant effectivement subi une ponction folliculaire transvaginale pour les donneuses et celles ayant effectivement subi une chirurgie de transfert pour les receveuses.

47 ponettes différentes ont été utilisées dans cette étude à 75 reprises car certaines ponettes ont été utilisées plusieurs fois : dans les effectifs suivants, le nombre de ponettes correspond en fait au nombre de cycles exploités, supérieur au nombre de ponettes différentes effectivement utilisées.

La répartition des ponettes utilisées figure dans le tableau III :

- 49 ponettes ont subi une ponction folliculaire transvaginale en tant que donneuses, dont 31 pour le lot 35h et 18 pour le lot 24h.
- 26 ponettes ont été utilisées comme receveuses, dont 16 pour le lot 35h et 10 pour le lot 24h.
- 3 receveuses du lot 35h ont reçu leur propre ovocyte (autotransfert) ; elles sont incluses à la fois dans les donneuses du lot 35h et dans les receveuses du lot 35h.

Tableau III : Répartition des effectifs

	Donneuses	Receveuses	
Lot 35 h	31	16	
Lot 24 h	18	10	
Total	49	26	75

23 - COLLECTE DE L'OVOCYTE PEOVULATOIRE DES DONNEUSES (tableau IV)

231 - Taux de collecte global

Les 49 donneuses ont permis de ponctionner 56 follicules préovulatoires, 7 donneuses portant 2 follicules préovulatoires. On a collecté 38 ovocytes soit un taux de collecte global de 68 % [38/56].

232 - Taux de collecte dans le lot 35h

Les 31 donneuses du lot 35h ont permis de ponctionner 34 follicules préovulatoires du lot 35h, 3 donneuses portant 2 follicules préovulatoires. On a collecté 24 ovocytes soit un taux de collecte pour le lot 35h de 71 % [24/34].

233 - Taux de collecte dans le lot 24h

Les 18 donneuses du lot 24h ont permis de ponctionner 22 follicules préovulatoires du lot 24h, 4 donneuses portant 2 follicules préovulatoires. On a collecté 14 ovocytes soit un taux de collecte pour le lot 24h de 64 % [14/22].

Il n'y a pas de différence significative entre les taux de collecte des lots 35h et 24h (test du khi deux, $p > 0,05$).

Tableau IV : Taux de collecte des ovocytes des donneuses

	Nombre de follicules préovulatoires ponctionnés	Nombre d'ovocytes collectés	Taux de collecte
Total	56	38	68 %
Lot 35 h	34	24	71 %
Lot 24 h	22	14	64 %

24 - TRANSFERT DES OVOCYTES COLLECTES (tableau V)

241 - Taux de transfert global

Sur les 38 ovocytes collectés, 32 ont été effectivement transférés car 6 étaient dégénérés, soit un taux de transfert global de 84 % [32/38].

242 - Taux de transfert dans le lot 35h

Sur les 24 ovocytes collectés pour le lot 35 h, 18 ont été effectivement transférés car 6 étaient dégénérés, soit un taux de transfert pour le lot 35h de 75 % [18/24].

243 - Taux de transfert dans le lot 24h

Sur les 14 ovocytes collectés pour le lot 35 h, tous ont été effectivement transférés, soit un taux de transfert pour le lot 24h de 100 % [14/14].

Il n'y a pas de différence significative entre les taux de transfert des lots 35h et 24h (test du khi deux corrigé de Yates, $p > 0,05$).

244 - Nombre de transferts pour chaque lot

Les 18 ovocytes du lot 35h ont été transférés dans 16 receveuses, 2 des 16 receveuses ayant reçu chacune 2 ovocytes. Les 14 ovocytes du lot 24h ont été transférés dans 10 receveuses, 4 des 14 receveuses ayant reçu chacune 2 ovocytes.

Tableau V : Taux de transfert des ovocytes collectés et nombre de transferts par lot

	Nombre d'ovocytes collectés	Nombre d'ovocytes transférés	Taux de transfert	Nombre de transferts
Total	38	32	84 %	26
Lot 35 h	24	18	75 %	16
Lot 24 h	14	14	100 %	10

25 - COLLECTE DE L'OVOCYTE PREEVULATOIRE DES RECEVEUSES (tableau VI)

251 - Receveuses du lot 35h

Sur les 16 receveuses du lot 35h :

- 8 avaient ovulé entre 11 h et 35 h après l'induction de l'ovulation. Leur ovocyte n'a donc pas été collecté.
- 3 ont reçu leur propre ovocyte collecté par ponction transvaginale (ces ponctions sont répertoriées dans les ponctions des donneuses du lot 35h).
- 5 ont subi une ponction folliculaire per-chirurgicale. Pour 4 d'entre elles, dont une avait deux follicules préovulatoires, la ponction a été fructueuse : 5 ovocytes ont été collectés pour 6 follicules ponctionnés, soit un taux de collecte par ponction folliculaire après laparotomie de 5/6.

252 - Receveuses du lot 24h

Sur les 10 receveuses aucune n'a reçu son propre ovocyte.

12 follicules préovulatoires ont été ponctionnés par voie transvaginale 24 h après induction de l'ovulation, une receveuse portant 2 follicules préovulatoires : 9 ovocytes ont été collectés, soit un taux de collecte par ponction folliculaire transvaginale de 75 % [9/12].

26 - TAUX DE COLLECTE OBTENU POUR L'ENSEMBLE DES PONCTIONS EFFECTUEES

La technique de ponction folliculaire transvaginale a été utilisée pour les donneuses des deux lots (taux de collecte global de 68 % [38/56]), les receveuses du lot 24h (taux de collecte de 75 % [9/12]) et les receveuses du lot 35h ayant subi un autotransfert. Ces dernières sont comptabilisées dans le groupe des donneuses du lot 35h.

Ainsi le taux de collecte obtenu en tenant compte de toutes les ponctions folliculaires transvaginales réalisées lors de notre expérience est de 69 % [47/68].

27 - TAUX DE GESTATION (tableaux VI et VII)

271 - Lot 35h

Sur les 16 receveuses du lot 35h :

- 10 receveuses, dont les 2 ayant reçu chacune 2 ovocytes, ont eu un diagnostic de gestation négatif.
- 6 receveuses, qui avaient toutes reçu un seul ovocyte, ont eu un diagnostic de gestation positif dont :
 - 3 avaient ovulé avant le transfert :
 - ◆ pour 1, une seule vésicule embryonnaire était visible : le contrôle de filiation maternel a montré que l'embryon était issu de la donneuse.
 - ◆ pour 2, deux vésicules embryonnaires étaient visibles : le contrôle de filiation n'était donc pas utile.
 - 3 n'avaient pas ovulé avant le transfert puis leur ovocyte avait été collecté : le contrôle de filiation n'était donc pas utile.

Au total, 6 des 18 ovocytes transférés pour le lot 35h ont donc donné lieu à une gestation à J₁₂₋₁₅ soit un taux de gestation de 33 % [6/18] pour le lot 35h.

272 - Lot 24h

Sur les 10 receveuses du lot 24h :

- 8 receveuses, ayant reçu 11 ovocytes, ont eu un diagnostic de gestation négatif. Sur ces 8 receveuses, une n'avait pas été inséminée 24 h avant transfert ; pour une autre, l'entrée du pavillon n'a pas été trouvée pendant l'intervention et l'ovocyte a dû être injecté dans l'oviducte en le perçant avec une aiguille.
- 2 receveuses, ayant reçu 3 ovocytes, ont eu un diagnostic de gestation positif dont :
 - 1 avait eu son ovocyte collecté avant le transfert : le contrôle de filiation n'était donc pas utile.
 - 1 n'avait pas eu son ovocyte collecté avant le transfert : le contrôle de filiation a montré que l'embryon était issu de la receveuse.

Au total, 1 seule gestation a donc été obtenue pour 14 ovocytes transférés pour le lot 24h soit un taux de gestation de 7 % [1/14].

Il n'y a pas de différence significative entre les taux de gestation à J₁₂₋₁₅ des lots 35h et 24h (test du khi deux corrigé de Yates, $p > 0,05$).

Tableau VI : Collecte de l'ovocyte préovulatoire des receveuses, diagnostic de gestation et taux de gestation

(Nb : nombre, D : donneuses, R : receveuses, DG : diagnostic de gestation)

		Nb de R du lot 35 h												Nb de R du lot 24 h																
		16												10																
Nb de R ayant ovulé entre 11h et 35h après l'induction de l'ovulation		Nb de R ayant subi une ponction transvaginale puis un autotransfert			Nb de R ayant subi une ponction perchirurgicale [Nb de follicules]									Nb de R ayant subi une ponction transvaginale [Nb de follicules]																
8		3			5 [6]						10 [12]																			
					Nb de R ayant eu leur ovocyte collecté [Nb d'ovocytes collectés]				Nb de R n'ayant pas eu leur ovocyte collecté [Nb d'ovocytes non collectés]		Nb de R ayant eu leur ovocyte collecté [Nb d'ovocytes collectés]						Nb de R n'ayant pas eu leur ovocyte collecté [Nb d'ovocytes non collectés]			Taux de gestation										
Détail des R		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₁	R ₂	R ₃	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₁	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	R ₁	R ₂	Lot 35 h	Lot 24 h	Global
Nb d'ovocytes transférés par R		2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	18	14	32
DG		-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+			
Nb d'embryons							1	2	2					1	1	1				1							1			
Contrôle de filiation Oui / Non							O	N	N					N	N	N				N							O			
Nb de gestations issues d'ovocytes de D							1	1	1					1	1	1				1							0	6	1	7

273 - Taux de gestation global

Sur les 32 ovocytes transférés, 7 ont permis une gestation à J₁₂₋₁₅, soit un taux de gestation global de 22 % [7/32].

Tableau VII : Taux de gestation

	Nombre d'ovocytes transférés	Nombre d'ovocytes ayant permis une gestation à J ₁₂₋₁₅	Taux de gestation
Lot 35 h	18	6	33 %
Lot 24h	14	1	7 %
Total	32	7	22 %

3 – DISCUSSION

31 - TAUX D'OVULATION AVANT LA COLLECTE

Dans notre expérience, l'ovulation a été induite par injection de CEG. DUCHAMP *et al.* (1987) ont démontré que cette préparation homologue n'induit pas la production d'anticorps lorsqu'elle est utilisée à répétition, contrairement à l'hCG utilisée pour induire l'ovulation par d'autres équipes (CARNEVALE et GINTHER, 1995 ; CARNEVALE *et al.*, 2000 ; McKINNON *et al.*, 1987 et 1988 ; HINRICHS *et al.*, 1998a ; RAY *et al.*, 1994). Cette diminution progressive d'efficacité serait problématique si l'hCG était utilisé façon réitérée pour induire les ovulations dans notre troupeau expérimental.

Notre protocole n'a pas permis de recenser le nombre de ponettes non utilisées parce qu'elles avaient ovulé. En effet, dans le troupeau de l'INRA, l'ovulation de toutes les ponettes disponibles est induite pour les utiliser dans plusieurs expériences, ce qui représente plus de ponettes que celles nécessaires à la nôtre ; les ponettes non utilisées car elles ont ovulé trop précocement ne sont pas attribuées spécifiquement à notre expérience et ne sont donc pas dénombrées. En revanche, on a retenu qu'aucune ponette donneuse n'avait ovulé dans les 24 h après l'injection de CEG donc aucune n'a été éliminée du lot 24h pour cette raison ; au contraire, un nombre important de ponettes donneuses avait ovulé dans les 35 h après l'injection de CEG : elles n'ont pas pu être utilisées dans le lot 35h. On sait aussi que 8 des 16 receveuses du lot 35h avaient déjà ovulé au moment du transfert, soit un taux d'ovulation dans les 35 h après l'injection de 25 mg de CEG de 50 %. Ces résultats sont compatibles avec ceux d'une expérience non publiée réalisée à l'INRA de Tours lors de laquelle 35 % [22/63] des ponettes ayant reçu une injection de CEG avaient ovulé dans les 35 h suivant l'injection. L'étude de DUCHAMP *et al.* (1987) ne va pas à l'encontre de ces résultats mais ne permet pas de les confirmer : 55 % [14/26] des ponettes ovulent entre 24 h et 48 h après injection de 25 mg de CEG, sans préciser combien ovulent avant 35 h et combien entre 35 h et 48 h. Il aurait été intéressant de répertorier les ponettes non utilisées parce qu'elles avaient ovulé trop tôt afin de mieux comparer la méthode 35 h et la méthode 24 h.

Le fait que de nombreuses ponettes ovulent entre 24 h et 35 h après induction de l'ovulation est une contrainte de la méthode 35 h par rapport à la méthode 24 h, pour plusieurs raisons :

- Il y a un grand risque que les donneuses ovulent avant la collecte 35 h après induction de l'ovulation donc de perdre un cycle. Dans un cadre expérimental, ce problème peut être

contourné en induisant l'ovulation d'un grand nombre de ponettes et en n'utilisant que celles qui n'ont pas ovulé dans les 35 h, comme dans notre protocole. Mais cette difficulté devient plus importante si l'on s'adresse à une femelle en particulier.

- Pour les receveuses, l'ovulation avant 35 h conduit au risque que la receveuse ovule avant la collecte en début de chirurgie de transfert donc que le produit ne soit pas issu de l'ovocyte transféré mais de l'ovocyte de la receveuse, imposant un contrôle de filiation maternelle en cas de diagnostic de gestation positif. De plus, le fait que certaines receveuses avaient déjà ovulé lors du transfert peut avoir affecté la validité du taux de gestation obtenu, car on peut suspecter un effet positif pour le maintien de la gestation de la présence simultanée dans l'oviducte de l'ovocyte ovulé et de l'ovocyte transféré. D'autre part, l'ovulation de la receveuse peut être à l'origine de gémellité, problématique dans l'espèce équine. Cette situation, habituellement résolue par la réduction embryonnaire, serait plus complexe ici car il faudrait éliminer sélectivement le produit de la receveuse en conservant celui issu de l'ovocyte de la donneuse.

32 - COLLECTE DES OVOCYTES

321 – Choix du moment et de la technique de collecte

3211 – Pour les donneuses

Le moment de la collecte était imposé par les objectifs de l'expérience : 24 h après induction de l'ovulation pour le lot 24h et 35 h après induction de l'ovulation pour le lot 35h. Ces délais sont inspirés de ceux rapportés par les autres équipes, bien que l'hCG soit employé pour induire l'ovulation et non la CEG ; en effet, l'étude de BEZARD (1997b) indique que la progression de la maturation ovocytaire après administration de CEG est similaire à celle suivant l'administration d'hCG (métaphase I atteinte en 24 h et métaphase II atteinte en 35 h).

La technique de ponction folliculaire transvaginale échoguidée a été choisie : notre équipe en avait l'expérience, et il s'agit de la technique de collecte ovocytaire la plus rapide, la plus précise et la plus répétable d'après CARNEVALE et GINTHER (1993 et 1995), RAY *et al.* (1994), CARNEVALE (1996), CARNEVALE *et al.* (2000) et SQUIRES et COOK (1996). Notre expérience a confirmé que cette technique est très bien tolérée cliniquement, même effectuée de façon répétée : il n'y a eu aucune complication chez les ponettes ayant subi une ou plusieurs ponctions transvaginales.

Lors d'un GIFT, l'ovocyte du follicule dominant de la receveuse doit être retiré avant l'ovulation pour prévenir sa fécondation et s'assurer que l'embryon obtenu provient de la donneuse. Cependant, il est à noter que dans l'étude d'HINRICHS *et al.* (1999), l'ovulation de la receveuse était supprimée par un traitement hormonal (progestérone et œstrogène) dont l'efficacité était contrôlée par échographie par l'absence de gros follicule sur les ovaires : le retrait de l'ovocyte préovulatoire de la receveuse n'était donc pas effectuée dans cette étude.

La nécessité et la façon de retirer l'ovocyte préovulatoire de la receveuse sont controversées : McKINNON *et al.* (1987) et HINRICHS *et al.* (1998a) considèrent qu'une simple aspiration du liquide folliculaire ne suffit pas toujours à empêcher l'ovulation, donc la fécondation de l'ovocyte de la receveuse ; mais ils estiment qu'une aspiration plus vigoureuse, provoquant une hémorragie folliculaire, réduit probablement la possibilité d'ovulation. HINRICHS *et al.* (1998b) ont obtenu un taux de gestation après transfert significativement supérieur chez des receveuses ayant ovulé avant la collecte par rapport à des receveuses dont le liquide folliculaire avait été vigoureusement aspiré avant transfert mais dont la collecte avait échoué (4/4 vs 0/6) : l'aspiration complète du follicule même sans collecte de l'ovocyte pourrait suffire à éviter sa fécondation. Au contraire, notre expérience a montré qu'aspirer le liquide folliculaire même vigoureusement ne suffit pas à éliminer le risque de fécondation de l'ovocyte de la receveuse : une des 3 receveuses pour lesquelles la collecte avait échoué a eu son propre ovocyte fécondé. Cela confirme l'expérience de McKINNON *et al.* (1987) qui ont obtenu un embryon provenant de la receveuse dont la collecte ovocytaire avait échoué. Ainsi, comme pour HINRICHS (1997), il nous semble préférable d'identifier l'ovocyte de la receveuse dans le liquide folliculaire aspiré pour s'assurer qu'il a bien été collecté et qu'il ne sera pas fécondé : lorsque l'ovocyte de la receveuse n'est pas collecté, sa fécondation n'est jamais exclue.

Plusieurs techniques de collecte ovocytaire ont été utilisées chez les receveuses de notre expérience :

Pour les receveuses du lot 35h, la collecte ovocytaire avait lieu 35 h après induction de l'ovulation par ponction folliculaire directe après laparotomie par le flanc (sauf pour les receveuses recevant leur propre ovocyte) : même si cette technique de collecte est la plus invasive, une intervention chirurgicale était de toute façon nécessaire pour le transfert intratubaire de l'ovocyte 35 h après induction de l'ovulation.

Pour les receveuses du lot 35h qui recevaient leur propre ovocyte (autotransfert), la collecte était réalisée par ponction folliculaire transvaginale échoguidée 35 h après induction de l'ovulation afin de ne pas réaliser une laparotomie en vain si la collecte échouait.

Pour les receveuses du lot 24h, la collecte a été effectuée par ponction folliculaire transvaginale échoguidée, 24 h après induction de l'ovulation ; en effet, on ne pouvait pas attendre le début de la chirurgie de transfert, 44 h après l'induction de l'ovulation, pour collecter l'ovocyte des receveuses, car trop de receveuses auraient déjà ovulé à ce moment là.

322 - Taux de collecte

3221 – Taux de collecte par ponction folliculaire transvaginale

Le taux de collecte obtenu en tenant compte de toutes les ponctions transvaginales effectuées dans notre expérience est de 69 % [47/68]. Il est satisfaisant au regard des taux de collecte par ponction transvaginale de follicules préovulatoires rapportés par différentes équipes de recherche : MANTEN (2000) rapporte un résultat de 51 % sans rinçage folliculaire et de 84 % avec ; SQUIRES et COOK (1996) ont obtenu un taux de collecte de 84 % avec une aiguille double voie permettant un rinçage continu du follicule ; CARNEVALE et GINTHER (1995) de 89 % [66/74] ; RAY *et al.* (1994) obtiennent un résultat de 84 % [26/31].

BEZARD (1997a) estime que les techniques des différentes équipes n'étant pas exactement identiques, leurs taux de collecte sont difficiles à comparer : notamment, d'après MANTEN (2000), l'aspiration du liquide folliculaire avec un système de pompe à vide plutôt qu'à la seringue et le rinçage du follicule après ponction améliorent le taux de collecte, ce qui conforte l'emploi de ces techniques dans notre expérience. SQUIRES et COOK (1996) ont montré que le taux de collecte par ponction transvaginale de follicules préovulatoires est supérieur avec une aiguille double voie qu'avec une aiguille simple voie (84 % vs 51 %) : dans notre expérience, le taux de collecte par ponction folliculaire transvaginale aurait peut-être été supérieur avec une aiguille double voie.

Quant à l'influence des traitements d'induction de l'ovulation sur le taux de collecte d'ovocytes par ponction de follicules préovulatoires, elle est controversée (MANTEN, 2000) : PALMER *et al.* (1987) ont obtenu des taux de collecte par ponction folliculaire transcutanée par le flanc supérieurs chez les juments dont l'ovulation avait été induite par l'hCG, par rapport aux juments n'ayant pas reçu de traitements inducteurs de l'ovulation ; au contraire, HINRICHS *et al.* (1990) n'ont trouvé aucune différence entre les taux de collecte par ponction de follicule préovulatoire, par le flanc et par colpotomie, chez les juments traitées avec hCG et

chez les juments non traitées ; selon SQUIRES et COOK (1996), les taux de collecte par ponction transvaginale de follicules préovulatoires sont équivalents après induction de l'ovulation avec hCG, ou avec des analogues de GnRH, ou encore avec des extraits hypophysaires équins bruts. Dans notre expérience, il n'est pas possible de dire si l'induction de l'ovulation avec la CEG a favorablement influencé le taux de collecte. Le fait que les ovulations aient été induites par la CEG et non par l'hCG, comme dans la plupart des autres équipes, rend également difficile la comparaison des taux de collecte que nous avons obtenus avec ceux rapportés dans la littérature.

3222 – Comparaison des taux de collecte des deux lots de donneuses

Le taux de collecte pour les donneuses du lot 24h est de 64 % [14/22] et le taux de collecte pour les donneuses du lot 35h est de 71 % [24/34]. La différence n'est pas significative. Cela confirme les résultats de BEZARD (1997b) montrant que l'intervalle de temps entre l'injection de CEG et la collecte ovocytaire par ponction folliculaire transvaginale n'a pas d'effet sur le taux de collecte : elle a obtenu des taux de collecte de 6/9 avec un intervalle de 0 h, 6/11 s'il est de 6 h, 6/9 s'il est de 12 h, 11/14 s'il est de 24 h, 6/12 s'il est de 35 h, les différences n'étant pas significatives. De même, avec la technique de ponction folliculaire transcutanée par le flanc avec ovaire maintenu par voie transrectale, HINRICHS *et al.* (1998a) rapportent que le taux de collecte n'est pas influencé par l'intervalle de temps entre l'induction de l'ovulation et la collecte : il est de 66 % 24 h après l'administration d'hCG, et de 70 à 75 % 30 à 36 h après l'administration d'hCG. Il est cohérent que le taux de collecte ne varie pas significativement entre 24 h et 35 h après induction de l'ovulation. En effet, d'après BEZARD (1997b), l'expansion du cumulus se produit en moyenne 12 h après induction de l'ovulation et provoque le détachement du complexe ovocyte-cumulus de la paroi folliculaire ; c'est ce détachement qui augmente les chances de collecter l'ovocyte ; c'est donc à partir de 12 h après induction de l'ovulation que le taux de collecte augmente significativement, comme l'ont montré HINRICHS *et al.* (1998a). Ainsi, en ce qui concerne le taux de collecte, aucune des deux méthodes comparées (24 h et 35 h) n'apporte d'avantage.

3223 - Taux de collecte par ponction du follicule préovulatoire après laparotomie

D'après CARNEVALE (1996), lorsqu'on attend le moment du transfert chirurgical pour collecter l'ovocyte de la receveuse, le follicule préovulatoire est souvent gros et flasque et risque de se rompre avant d'être aspiré, avec possibilité que l'ovocyte de la receveuse atteigne l'oviducte et soit fécondé. Cela ne s'est pas produit dans notre expérience : le taux de collecte

avec cette technique, qui concerne les receveuses du lot 35h n'ayant pas subi d'autotransfert, est de 5/6. Il est satisfaisant. McKINNON *et al.* (1987) rapportent un taux de collecte de 38 % [5/13] avec cette même technique.

Avec la méthode 35 h, outre le risque élevé d'ovulation de la receveuse avant transfert, il existe donc tout de même une possibilité d'échec de la collecte par ponction directe lors de la laparotomie. Ainsi, la collecte de l'ovocyte préovulatoire des receveuses du lot 35h aurait pu être réalisée par voie transvaginale 24 h après induction de l'ovulation plutôt qu'en début de chirurgie. Cela aurait évité de réaliser un transfert sur une receveuse qui a ovulé ou dont la collecte a échoué, même si ce n'était pas rédhibitoire dans un cadre expérimental où un contrôle de filiation est possible en collectant l'embryon. La synchronisation entre les cycles des donneuses et des receveuses aurait de ce fait été moins étroite, mais *a priori* suffisante : des receveuses du lot 35h dont l'ovocyte aurait été collecté 24 h après induction de l'ovulation auraient été dans le cas des receveuses du lot 35h qui avaient déjà ovulé 24 h après induction de l'ovulation et qui ont tout de même été utilisées dans notre expérience.

33 - TAUX DE TRANSFERT

Dans notre expérience, les ovocytes ayant un aspect anormal ou un cumulus non expansé juste avant le transfert n'ont pas été utilisés. En effet pour être fécondés, les ovocytes transférés doivent répondre à deux caractéristiques.

D'une part, les ovocytes transférés doivent être matures, comme des ovocytes ovulés naturellement, c'est-à-dire avoir repris la méiose sous l'influence de la décharge de gonadotrophines exogènes, avec un cumulus expansé et une maturation cytoplasmique achevée. Pour le lot 35h, la métaphase II doit donc être atteinte dès la collecte et ces ovocytes en métaphase II sont prêts à être transférés. Pour le lot 24h, les ovocytes doivent avoir atteint la métaphase I au moment de la collecte puis atteindre la métaphase II lors de la maturation finale pendant 20 h *in vitro* avant d'être transférés. Il est néanmoins à noter que CARNEVALE *et al.* (2000) ont montré que des ovocytes collectés 24 h après induction de l'ovulation, donc *a priori* en métaphase I, puis transférés immédiatement, poursuivent leur méiose dans l'oviducte, puisque leur transfert a donné lieu à des gestations.

Cependant, il arrive que l'induction de l'ovulation, qu'elle soit naturelle ou artificielle, ne soit pas suivie d'une reprise de la maturation ovocytaire, ce qui rend impossible la fécondation d'un tel ovocyte s'il est transféré après la collecte sans maturation *in vitro* avec des hormones pendant 40 h (HINRICHS *et al.*, 1998a).

D'autre part, les ovocytes transférés doivent avoir un aspect normal, c'est-à-dire, être symétriques, avec un ooplasme homogène lisse ou régulièrement granuleux (MANTEN, 2000). Mais il arrive que les ovocytes soient dégénérés, notamment à cause de la collecte. McKINNON *et al.* (1988) considèrent que les 27 % [12/45] d'ovocytes fragmentés dans leur expérience ont peut-être été abîmés par une petite ouverture dans leur matériel ayant créé des remous dans les circuits de collecte. CARNEVALE et GINTHER (1995) estiment que jusqu'à 26 % des ovocytes collectés peuvent être détériorés par l'aspiration. Les ovocytes détériorés sont parfois facilement reconnaissables par leur aspect fragmenté ou leur ooplasme foncé (CARNEVALE, 1996 et CARNEVALE et GINTHER, 1995), mais ils peuvent rester intacts ou légèrement ovales. D'après CARNEVALE (1996), ces ovocytes ont peu de chance d'être fécondés et ne doivent pas être transférés.

C'est pourquoi le stade de maturation et la qualité de l'ovocyte doivent être caractérisés avant de le transférer. Il est possible d'observer cette structure d'environ 150 µm de diamètre à l'aide d'une loupe binoculaire ou d'un microscope inversé (MANTEN, 2000). Cependant, la description précise de la morphologie de l'ovocyte équin mature est difficile : un matériel cellulaire abondant l'entoure et le cytoplasme est rendu granuleux par des vésicules lipidiques inégalement réparties ; cela dissimule les détails de maturation nucléaire et la présence du premier globule polaire (McKINNON *et al.*, 1987 et CARNEVALE, 1996) ; d'après MANTEN (2000), la configuration nucléaire n'est donc déterminable que par des techniques de coloration incompatibles avec la survie de l'ovocyte. Quant aux critères de maturation cytoplasmique connus, ils sont peu nombreux (il s'agit principalement de la migration périphérique des granules corticaux) et tout aussi difficilement discernables (BEZARD, 1997a). Donc pour s'assurer que l'ovocyte collecté a repris la méiose en réponse à l'injection de CEG et est donc prêt à être transféré, directement pour le lot 35h ou après une maturation finale *in vitro* pour le lot 24 h, le seul critère utilisable tout en préservant l'ovocyte est l'expansion du cumulus. BEZARD (1997b) a montré qu'elle est un témoin de reprise de la méiose, mais qu'elle a lieu avant que l'ovocyte n'atteigne la métaphase I : elle se produit en moyenne 12 h après injection de CEG, alors que le stade métaphase I est atteint à 24 h et le stade métaphase II à 35 h. Ainsi, les ovocytes provenant de follicules immatures sont entourés de couches compactes de cellules de la granulosa. Les cellules du cumulus sont disposées en couches serrées autour de la zone pellucide (CARNEVALE, 1996). Il arrive que les ovocytes immatures soient séparés de la masse du cumulus pendant la collecte et ne soient entourés que de peu de couches de cellules autour de la zone pellucide. Au contraire, les ovocytes collectés 24 h après induction de l'ovulation (12 h avant le moment attendu de l'ovulation) sont de gros

disques sombres entourés d'un cumulus avec une expansion modérée ; le cumulus est visible mais semble flou, les cellules de la granulosa forment de grosses couches granuleuses. En fin de maturation, 35 h après induction de l'ovulation, le cumulus devient clair et son expansion est maximum (CARNEVALE, 1996).

L'état de maturation peut être aussi évalué grossièrement par l'observation macroscopique du liquide folliculaire : pour les follicules immatures, le liquide folliculaire est typiquement jaune avec une faible contamination sanguine ; pour les follicules matures, le liquide folliculaire est souvent hémorragique (CARNEVALE, 1996). Ce critère n'a pas été retenu dans notre expérience.

Les classifications des ovocytes sont très différentes selon les laboratoires de recherche, sans nomenclature internationale reconnue. MANTEN (2000) en a présenté deux :

- Dans la première, les ovocytes sont classés en 4 groupes selon la nature du cumulus et celle de l'ooplasme : dans le groupe A, 2 couches ou plus de cellules du cumulus compactes entourent l'ovocyte dont l'ooplasme est circulaire et régulièrement granulé ; dans le groupe B, 2 couches de cellules du cumulus compactes entourent l'ovocyte dont l'ooplasme est semi-circulaire ; dans le groupe C, les cellules du cumulus sont expansées ; dans le groupe D, l'ovocyte est dépourvu de cellules du cumulus ou l'ooplasme est hétérogène.
- Dans la seconde, il y a 3 catégories : dans la catégorie « excellent », l'ooplasme est symétrique, homogène et lisse, entouré de plusieurs couches de cellules du cumulus expansé (ovocyte mature) ou compact (ovocyte immature) ; dans la catégorie « bon », l'ooplasme est asymétrique, irrégulier ou granuleux et entouré par peu ou pas de cellules du cumulus, lequel est expansé ou compact ; dans la catégorie « mauvais », l'ooplasme et le cumulus ont un aspect dégénéré.

Dans notre expérience, ces classifications n'ont pas été utilisées. Sur les 38 ovocytes collectés, 32 avaient un aspect normal et un cumulus expansé au moment du transfert, soit un taux de transfert global de 84 %. 6 avaient un aspect dégénéré, soit 16 % d'ovocytes dégénérés. McKINNON *et al.* (1988), CARNEVALE et GINTHER (1995) et HINRICHS *et al.* (1998a) rapportent des pourcentages d'ovocytes dégénérés de 27 % [12/45], 26 % [17/66] et 9 % [1/11] respectivement. RAY *et al.* (1994) n'ont observé un pourcentage d'ovocytes dégénérés que de 4 % [1/26], et dans l'expérience de McKINNON *et al.* (1987), aucun ovocyte dégénéré n'a été noté avant transfert mais sur un faible effectif (0/6). Ainsi, le pourcentage d'ovocytes dégénérés dans notre expérience est raisonnable et il est impossible de savoir si ces ovocytes abîmés l'étaient déjà avant leur collecte. *A priori*, notre technique de collecte n'a pas provoqué plus d'altérations visibles sur les ovocytes que celle d'autres équipes ; la

pression de vide utilisée pour aspirer les liquides folliculaire et de rinçage joue certainement un rôle déterminant sur la détérioration des ovocytes ; il n'y a pas d'étude portant sur l'influence de cette pression sur le pourcentage d'ovocytes détériorés lors de leur collecte chez la jument vivante ; il est difficile de comparer les pressions de vide d'une expérience à l'autre et de déterminer une pression adéquate, car elle dépend des diamètres de l'aiguille et des tubes du système de collecte ; dans notre expérience, elle est du même ordre de grandeur que celles rapportées par différents auteurs pour la ponction de follicules préovulatoires : elle est de 230 à 300 mm Hg, avec une aiguille simple voie de diamètre externe 1,8 mm, c'est-à-dire identique à celle utilisée par DUCHAMP *et al.* (1995) avec les mêmes aiguilles et avec des aiguilles double voie de 2,9 mm de diamètre externe, alors qu'avec une aiguille double voie de diamètre externe 2,7 mm, des pressions de 150 mm Hg (RAY *et al.*, 1994 et Mc KINNON *et al.*, 1987), ou de 100 à 300 mm Hg (SQUIRES et COOK, 1996) sont utilisées.

Tous les ovocytes dégénérés faisaient partie du lot 35h, dans lequel le taux de transfert est de 75 % [18/24]. Cependant, il n'est pas significativement différent du taux de transfert dans le lot 24h qui est de 100 % [14/14]. La mise en culture pendant 12 h des ovocytes du lot 24h n'a donc pas provoqué d'altération visible au microscope. Aucune des deux méthodes 24 h ou 35 h ne semble permettre de transférer une plus grande partie des ovocytes collectés par rapport à l'autre.

Dans notre expérience, les 32 ovocytes non dégénérés avaient un cumulus expansé au moment du transfert. D'autres équipes rapportent une faible proportion d'ovocytes dont le cumulus n'est pas expansé après la collecte pratiquée 24 à 35 h après l'induction de l'ovulation par l'hCG : 12 % [3/26] pour RAY *et al.* (1994), 9 % [1/11] pour HINRICHS *et al.* (1998a), 3/6 pour McKINNON *et al.* (1987). Notre expérience témoigne de l'efficacité de la CEG pour provoquer l'induction de l'ovulation, avec reprise de la maturation ovocytaire et expansion du cumulus, confirmant les résultats de DUCHAMP *et al.* (1987). Pour le lot 24 h, les cumulus de tous les ovocytes étaient déjà expansés avant la mise en culture. Cela confirme que l'expansion du cumulus a lieu dans les 24 h suivant l'injection de CEG, comme l'a montré BEZARD (1997b).

HINRICHS *et al.* (1998a), McKINNON *et al.* (1988) et CARNEVALE et GINTHER (1995) ne transfèrent ni les ovocytes dégénérés ni ceux dont le cumulus n'est pas expansé, comme dans notre expérience : l'expansion du cumulus est selon ces équipes un facteur déterminant de réussite du GIFT puisque c'est le signe que le follicule a répondu à la stimulation par les gonadotrophines exogènes et s'est préparé pour l'ovulation avec une reprise de la méiose par l'ovocyte. En revanche, RAY *et al.* (1994) ont transféré 26 ovocytes

dont 3 n'avaient pas leur cumulus expansé (soit 12 %), parmi lesquels 1 était dégénéré (soit 4 %) ; aucun de ces 3 ovocytes n'a été fécondé après transfert ; cependant, le taux de gestation global dans cette expérience était faible (8 % [2/26]). McKINNON *et al.* (1987) ont transféré 6 ovocytes dont 3 n'avaient pas leur cumulus expansé mais n'a obtenu aucune gestation. Ainsi le choix fait dans notre expérience de ne transférer que les ovocytes normaux dont le cumulus est expansé semble raisonnable puisque aucune fécondation après transfert de tels ovocytes n'est rapportée dans la littérature.

34 - TAUX DE GESTATION

La plupart des receveuses n'ont reçu qu'un ovocyte mais il est arrivé que deux ovocytes soient transférés dans l'oviducte d'une même receveuse. Sans l'avoir étudié, CARNEVALE (1996) envisage un éventuel effet positif par synergie pour la fécondation lors du transfert simultané de plus d'un ovocyte. Si tel est le cas, cela affecte la validité des résultats concernant le taux de gestation dans notre expérience car toutes les receveuses n'ont pas reçu le même nombre d'ovocytes, aussi bien dans le lot 35h que dans le lot 24h.

341 – Taux de gestation global

Le taux de gestation à J₁₂₋₁₅ global de 22 % [7/32] obtenu dans notre expérience est supérieur aux premiers résultats rapportés dans la littérature (0/6 : McKINNON *et al.*, 1987 ; 20 % [3/15] : McKINNON *et al.*, 1988 ; 8 % [2/26] : RAY *et al.*, 1994), mais les résultats rapportés plus récemment par d'autres équipes sont meilleurs (92 % [11/12] par CARNEVALE et GINTHER (1995) avec de jeunes donneuses ; 6/8 par HINRICHS *et al.* (1998a) ; 4/9 et 5/8 par HINRICHS *et al.* (1998b) ; 82 % [9/11] et 57 % [8/14] par CARNEVALE *et al.* (2000)).

La comparaison et l'explication des différences de résultats obtenus sont rendues difficiles par les nombreuses variations de protocole entre équipes, qui toutes participent aux taux de gestation obtenus.

342 – Comparaison des taux de gestation obtenus dans chaque lot

Dans notre expérience, il n'y a pas de différence significative entre le taux de gestation dans le lot 35h et le taux de gestation dans le lot 24h, mais sur de faibles effectifs (33 % [6/18] vs 7 % [1/14]).

Ainsi, les observations faites par plusieurs équipes n'ont pas été confirmées : l'amélioration des résultats rapportés dans les travaux de CARNEVALE et GINTHER (1995), d'HINRICHS *et al.* (1998a), d'HINRICHS *et al.* (1998b) et de CARNEVALE *et al.* (2000)

semblait concomitante de l'abandon de la méthode 35 h au profit de la méthode 24 h par ces équipes. Plusieurs hypothèses ont été formulées par ces auteurs qui considèrent que la méthode 24 h donne de meilleurs résultats :

- Le temps total de maturation ovocytaire avant transfert est plus long dans la méthode 24 h que dans la méthode 35 h (24 h *in vivo* suivie de 20 h *in vitro* vs 35 h *in vivo*) ; HINRICHS *et al.* (1998a) ont démontré que cela n'explique pas les meilleurs résultats obtenus avec la méthode 24 h : en effet des ovocytes ont été collectés 24 h après administration d'hCG et mis en culture soit pendant 12 h (donc un temps total de maturation de 24 h + 12 h, c'est-à-dire équivalent à celui de la méthode 35 h), soit pendant 18 h (donc un temps total de maturation d'environ 42 h comme dans la méthode 24 h) avant le transfert : les taux de gestation étaient équivalents dans les 2 lots (4/5 vs 2/3), même si la portée de cette expérience doit être relativisée en raison de la faiblesse des effectifs.
- CARNEVALE et GINTHER (1995) et HINRICHS *et al.* (1998a) considèrent que l'ovocyte en métaphase I manipulé dans la méthode 24 h est plus résistant que l'ovocyte en métaphase II manipulé dans la méthode 35 h, ce qui n'est pas vérifiable par notre expérience.
- CARNEVALE *et al.* (2000) ont montré que le transfert d'ovocytes immédiatement après la collecte 24 h après induction de l'ovulation donne un aussi bon taux de gestation que le transfert de tels ovocytes après 12 h à 14 h de culture *in vitro* (43 % [6/14] vs 57 % [8/14]) : des ovocytes collectés en métaphase I seraient en fait capables de poursuivre la méiose une fois transférés dans l'oviducte. Cela est compatible avec l'hypothèse de moindre fragilité des ovocytes en métaphase I.

Cependant, HINRICHS *et al.* (1998b) rapportent de bons taux de gestation équivalents avec les deux méthodes - sur de faibles effectifs - (5/8 avec la méthode 24 h et 4/9 avec la méthode 35 h) : selon cette équipe, le moment de la collecte par rapport à l'induction de l'ovulation n'est donc pas un déterminant majeur du taux de gestation après transfert et les raisons de l'amélioration des résultats avec l'adoption de la méthode 24 h restent obscures. L'étude de CARNEVALE *et al.* (2000), où de très bons taux de gestation ont été obtenus avec la méthode 35 h et avec la méthode 24 h (57 % [8/14] et 82 % [9/11]), suggère aussi que d'autres facteurs que le stade ovocytaire au moment de la collecte interviennent sur le taux de gestation.

343 – Hypothèses pouvant expliquer le taux de gestation obtenu

Il est difficile de déterminer les facteurs responsables du taux de gestation global assez bas obtenu dans notre expérience. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées, qu'ils

s'agissent de facteurs propres aux ovocytes et à leur conservation et ou de facteurs propres à la receveuse et à sa gestion.

3431 – Qualité des ovocytes avant leur collecte

D'après CARNEVALE (1996) et CARNEVALE et GINTHER (1995), il existe une infertilité due à une mauvaise qualité des ovocytes chez la jument. L'incidence des anomalies ovocytaires, notamment l'aneuploïdie, augmente avec l'âge (MANTEN, 2000). Les donneuses utilisées dans notre expérience avaient entre 2 et 21 ans ; même si aucune n'avait de problème gynécologique connu, on ne peut exclure que certaines, en particulier les plus âgées, aient fourni des ovocytes défectueux ; ces ovocytes peuvent avoir été tout de même transférés, car l'observation à la loupe binoculaire ne permet pas de détecter toutes les anomalies, mais ne pas avoir été fécondés, ce qui pourrait avoir défavorablement influencé le taux de gestation global.

3432 - Stade de maturation des ovocytes

Comme vu précédemment, l'expansion du cumulus est un témoin de la réponse à l'induction de l'ovulation et de reprise de la méiose (BEZARD, 1997b) ; cependant, l'expansion du cumulus précède la fin de la maturation nucléaire : elle se produit en moyenne 12 h après injection de CEG, alors que le stade métaphase I est atteint à 24 h et le stade métaphase II à 35 h. Ainsi en ne se fiant qu'à l'expansion du cumulus pour juger de l'état de maturation des ovocytes, il est possible de considérer comme directement transférable un ovocyte qui ne l'est pas car il a repris la méiose mais n'a pas atteint la métaphase II. Cet ovocyte risque de ne pas être fécondé.

Cela pourrait participer au faible taux de gestation obtenu dans notre expérience, mais est inhérent à toute technique de GIFT et ne peut donc expliquer l'infériorité de nos résultats par rapport à ceux d'autres équipes.

3433 – Effet de la collecte sur les ovocytes

Dans notre expérience, il se peut que les 16 % [6/38] d'ovocytes ayant un aspect dégénéré aient été abîmés lors de la collecte. Mais cela n'explique pas le faible taux de gestation car ces ovocytes n'ont pas été transférés.

D'après CARNEVALE (1996) et CARNEVALE et GINTHER (1995), les ovocytes détériorés par l'aspiration, qui ont peu de chance d'être fécondés, sont parfois facilement discernables, mais peuvent également paraître intacts ou être légèrement ovales donc ne pas

être reconnaissables. Ainsi, dans notre expérience, un certain nombre d'ovocytes détériorés lors de la ponction folliculaire ont peut-être tout de même été transférés mais non fécondés, affectant le taux de gestation. Cependant, d'autres équipes utilisent une technique de collecte par ponction folliculaire transvaginale similaire à la nôtre et obtiennent des taux de gestation très satisfaisants : jusqu'à 82 % [9/11] pour CARNEVALE *et al.* (2000) et 92 % [11/12] pour CARNEVALE et GINTHER (1995) avec de jeunes donneuses. *A priori*, l'infériorité de nos résultats n'est donc pas attribuable à une détérioration des ovocytes par notre technique de ponction transvaginale.

3434 – Effet de la conservation *in vitro* sur les ovocytes

Dans les deux lots, les ovocytes collectés ont été conservés *in vitro*, momentanément avant le transfert pour le lot 35h, ou lors d'une mise en culture de 20 h pour le lot 24h. Ainsi un effet du milieu de culture sur la qualité des ovocytes peut être suspecté, notamment en regard du très faible taux de gestation obtenu avec le lot 24h dont les ovocytes ont séjourné plus longtemps dans le milieu, même si la différence sur nos faibles effectifs n'est pas significative. Notons cependant que dans les deux lots, les ovocytes ayant un aspect anormal avant transfert l'avaient déjà juste après la collecte ; aucune altération visible n'a donc été provoquée par le séjour *in vitro*.

La composition des milieux de culture de l'ovocyte équin est empirique et propre à chaque équipe de recherche (MANTEN, 2000). Elle est inspirée de la composition du sérum et adaptée d'après celle des sécrétions tubaires où baigne l'ovocyte. Dans notre expérience, certaines caractéristiques de la composition du milieu et des conditions de culture pourraient expliquer le faible taux de gestation global obtenu :

- le milieu est à base de TCM 199, milieu commercial complexe riche en acides aminés, en vitamines, en bases puriques et pyrimidiques, en AMP cyclique et en cholestérol ; il est couramment utilisé pour la culture et la conservation d'ovocytes *in vitro* dans de nombreuses espèces ; ainsi il est utilisé par HINRICHS *et al.* (1998a) et par CARNEVALE et GINTHER (1995) qui ont obtenu des taux de gestation après GIFT respectivement de 6/8 et de 92 % [11/12] avec de jeunes donneuses. Le TCM 199 ne semble donc pas avoir eu d'effet néfaste sur les ovocytes.
- Les sels de Earle constituent la source en minéraux qui déterminent le pH, l'osmolarité et interviennent comme catalyseurs et comme coenzymes (MANTEN, 2000). Ces sels entrent couramment dans la composition de milieux de culture ovocytaire ; ainsi HINRICHS *et al.*

(1998a) les utilisent également dans leur milieu de culture. Il est donc peu probable que les sels de Earle aient eu un effet néfaste sur les ovocytes.

- Le sérum de veau fœtal inactivé apporte les facteurs de croissance macromoléculaires protéiques nécessaires à la protéosynthèse intense pendant la méiose. Ainsi ce composant n'est en fait indispensable que dans le milieu de culture du lot 24h puisque les ovocytes du lot 35h ont achevé la méiose. Ce composant a été tout de même incorporé dans le milieu de culture du lot 35h afin de ne pas induire un paramètre de variation supplémentaire entre les deux lots. De plus le sérum de veau fœtal est un produit complexe dont on ne connaît pas la composition exacte et qui peut donc avoir de nombreuses influences sur les ovocytes (action des facteurs de croissance par exemple). Le sérum de veau fœtal est utilisé par de nombreuses équipes réalisant des GIFT avec un bon taux de gestation (HINRICHS *et al.*, 1998a et 1998b ; CARNEVALE et GINTHER, 1995), mais s'agissant d'un produit d'origine biologique de composition variable, on ne peut exclure que le sérum de veau fœtal j12 0 0 12252 Tm9.92 5

HINRICHS *et al.* (1998a), 39°C pour CARNEVALE et GINTHER (1995), 39°C pour HINRICHS *et al.* (1998b)).

- La gentamicine est un composant du milieu de culture du lot 24h uniquement : un éventuel effet néfaste de cet antibiotique sur les ovocytes n'a pas été étudié. Cependant cet antibiotique est utilisé par CARNEVALE et GINTHER (1995) et par HINRICHS *et al.* (1998a) qui ont obtenu des taux de gestation après GIFT très satisfaisants, respectivement de 92 % [11/12] avec de jeunes donneuses et de 6/8.

Un antibiotique est indispensable dans le milieu de culture du lot 24h car les ovocytes séjournent pendant 20 h *in vitro* : d'après MANTEN (2000), la contamination bactérienne est un facteur de toxicité pour les cellules par modification de pH, par sécrétion de toxines, ou par compétition envers les éléments nutritifs du milieu. La gentamicine n'a pas été incorporée dans le milieu de culture du lot 35h parce qu'elle n'y est pas indispensable, le temps de séjour *in vitro* étant court pour les ovocytes de ce lot. Cependant, cela affecte la validité des résultats car par ce biais un paramètre supplémentaire de variation entre les deux lots est introduit.

3435 – Nombre et moment des inséminations artificielles

Le choix du nombre et du moment des inséminations artificielles des receveuses résulte de la confrontation de trois contraintes :

- la viabilité des spermatozoïdes après insémination artificielle en sperme frais est d'environ 48 h.
- L'ovocyte a une viabilité de 12 h après l'ovulation (CARNEVALE, 1996). Le transfert a lieu environ au moment où l'ovocyte aurait été ovulé naturellement s'il n'avait pas été transféré (entre 35 h et 44 h après induction de l'ovulation selon les équipes). Dans l'hypothèse où la durée de vie de l'ovocyte n'est pas affectée par la collecte, elle est donc d'environ 12 h après le transfert.
- L'insémination artificielle doit être réalisée suffisamment tôt pour permettre la remontée et la capacitation des spermatozoïdes dans les voies génitales de la jument avant que l'ovocyte transféré ne soit trop vieux.

Dans l'expérience, on a choisi de concilier ces contraintes en inséminant les receveuses deux fois : 24 h avant transfert et immédiatement après. Des taux de gestation satisfaisants ont été obtenus par HINRICHS *et al.* (1998a) (6/8) par HINRICHS *et al.* (1998b) (53 % [9/17]) qui ont également inséminé les receveuses 24 h avant et juste après transfert, et par CARNEVALE et GINTHER (1995) (92 % [11/12] avec de jeunes donneuses) qui ont inséminé les receveuses 12 h avant et juste après transfert.

Cependant, HINRICHS *et al.* (1998a) considèrent que l'insémination après transfert pourrait favoriser le développement d'endométrites, notamment lorsque la flunixin méglumine, qui diminuerait la motilité de l'oviducte et de l'utérus, est administrée pendant la chirurgie de transfert. Ces endométrites diminuent le taux de gestation : dans l'expérience de HINRICHS *et al.* (1998b), les receveuses étaient inséminées avant et après transfert ; 82 % [14/17] avaient du liquide dans l'utérus 24 h après transfert. Le taux de gestation était significativement supérieur pour les receveuses qui avaient éliminé ce liquide dans les 2 jours après le transfert par rapport aux receveuses l'ayant conservé au-delà de 2 jours (6/7 vs 3/10). Ainsi rechercher et traiter les endométrites après un GIFT est important et l'insémination après transfert pourrait s'avérer défavorable pour le succès. Il semble possible de la supprimer : RAY *et al.* (1994), McKINNON *et al.* (1988) et CARNEVALE *et al.* (2000) ont obtenu des gestations (taux de gestation respectifs de 8 % [2/26] ; 20 % [3/15] et 82 % [9/11]) en n'inséminant la receveuse qu'avant transfert, sans déterminer si éliminer l'insémination après transfert diminue les chances de succès.

CARNEVALE (1996) considère au contraire que l'insémination avant transfert ne serait pas utile car la capacitation et la migration des spermatozoïdes déjà dans l'oviducte au moment de l'intervention chirurgicale pourraient être affectées par sa manipulation et par l'injection de milieu lors du transfert ; CARNEVALE *et al.* (2000) ont obtenu des gestations en n'inséminant les receveuses que 2 h après transfert avec un taux de gestation de 57 % [8/14].

Enfin, on peut noter que dans l'étude de CARNEVALE *et al.* (2000), la fécondation des ovocytes d'un des lots de receveuses est faite par transfert des spermatozoïdes dans l'oviducte : un taux de gestation de 27 % [3/11] a été obtenu , non significativement différent de celui obtenu pour les lots de receveuses inséminées artificiellement avec dépôt du sperme dans l'utérus avant ou après transfert (43 % [6/14] et 57 % [8/14]). Il semble donc que le transfert de spermatozoïdes dans l'oviducte aurait pu être envisagé dans notre expérience.

Ainsi, le protocole d'insémination artificielle choisi dans notre expérience semble compatible avec des taux de gestation satisfaisants, conformément aux résultats des autres équipes. Il ne s'agit donc pas *a priori* d'un facteur d'explication des faibles taux de gestation obtenus. Il n'est pas exclu que l'insémination artificielle après transfert ait favorisé l'apparition d'endométrites ayant pu créer des conditions défavorables à la fécondation et à la gestation. L'apparition d'endométrites entre le transfert et le diagnostic de gestation à 12 jours n'a pas été recherchée et aurait dû l'être pour éventuellement les traiter. Cependant aucune endométrite n'ayant été diagnostiquée chez les receveuses lors des diagnostics de gestation, il reste hypothétique que des endométrites secondaires à l'insémination après transfert aient

affecté le taux de gestation obtenu dans notre expérience. Enfin, dans notre expérience, une des receveuses du lot 24h n'a été inséminée qu'après transfert ; cela ne suffit probablement pas à expliquer l'échec du GIFT chez cette receveuse puisque CARNEVALE *et al.* (2000) ont obtenu un très bon taux de gestation (57 % [8/14]) en n'inséminant les receveuses que 2 h après transfert.

L'effet étalon n'a pas été totalement supprimé dans l'expérience puisque trois étalons différents ont été utilisés ; même si leur fertilité était connue et normale, la validité des résultats aurait été améliorée si un seul étalon avait été utilisé pour toutes les receveuses.

3436 - Synchronisation des cycles de la receveuse et de la donneuse

HINRICHS *et al.* (1998a), HINRICHS (1998) et CARNEVALE (1996) considèrent que le degré de synchronisation idéal pour le GIFT n'a pas été établi. Des gestations ont été obtenues en utilisant des receveuses, qui au moment du transfert :

- étaient au 3^{ème} jour de l'œstrus (par RAY *et al.*, 1994),
- étaient à quelques heures avant leur ovulation (par RAY *et al.*, 1994 et McKINNON *et al.*, 1988),
- venaient de subir une ponction folliculaire transvaginale 24 h après induction de l'ovulation, simultanément aux donneuses (par HINRICHS *et al.*, 1998b et CARNEVALE et GINTHER, 1995),
- venaient de subir une ponction folliculaire transvaginale 35 h après induction de l'ovulation, simultanément aux donneuses (par McKINNON *et al.*, 1988 et par HINRICHS *et al.*, 1998b).

D'après HINRICHS *et al.* (1998a), une synchronisation étroite est prudente. En effet, pour plusieurs raisons, la receveuse doit être prête à ovuler juste avant transfert : pour ne pas être fécondé, l'ovocyte du follicule dominant de la receveuse doit être collecté, ce qui est plus facile dans un follicule préovulatoire ; de plus, d'après HINRICHS (1998), la lutéinisation du follicule préovulatoire de la receveuse doit se produire au même moment que celle de la donneuse afin que les concentrations en progestérone soient compatibles avec le développement embryonnaire.

Dans notre expérience, le grand nombre de receveuses disponibles a permis de synchroniser les cycles de chaque donneuse et de chaque receveuse sans traitement :

- d'une part en choisissant la receveuse, au moment où le follicule préovulatoire de la donneuse dépasse 35 mm, parmi les receveuses potentielles ayant aussi un follicule de plus de 35 mm,

- d'autre part en induisant l'ovulation des receveuses en même temps que celle des donneuses du lot correspondant,
- enfin en éliminant les receveuses si elles avaient ovulé trop tôt par rapport au moment prévu du transfert : pour le lot 35h, les receveuses ayant déjà ovulé 11 h après induction de l'ovulation devaient être éliminées ; pour le lot 24h, les receveuses ayant déjà ovulé 24 h après induction de l'ovulation devaient être éliminées. En fait, ces deux cas de figure ne se sont jamais produits : les receveuses du lot 24 h n'ont jamais ovulé avant 24 h ; les receveuses du lot 35 h qui ont ovulé avant transfert l'ont fait entre 24 h et 35 h après induction de l'ovulation, et ont donc été tout de même utilisées car leur ovulation était assez proche de la collecte de l'ovocyte de la donneuse à 35 h : leurs cycles semblaient suffisamment synchronisés.

Ainsi dans les deux lots, au moment du transfert, les receveuses avaient depuis moins de 24 h, soit ovulé, soit subi une ponction folliculaire transvaginale. Le degré de synchronisation entre les cycles des donneuses et des receveuses était *a priori* suffisant et ne semble pas avoir contribué au faible de gestation global obtenu.

3437 - Etat progestatif des receveuses

Dans notre expérience, certaines receveuses avaient déjà ovulé au moment du transfert : *a priori*, leur taux en progestérone circulante était donc suffisant pour l'instauration d'une gestation. Les receveuses qui n'avaient pas encore ovulé au moment du transfert ont subi une ponction folliculaire afin d'éviter que leur propre ovocyte ne soit fécondé. Cette ponction d'un follicule préovulatoire en provoque la lutéinisation. On peut se demander si le cycle œstrien et l'état progestatif de la receveuse après ponction folliculaire sont similaires à ceux suivant une ovulation naturelle et conviennent à l'instauration d'une gestation.

lutéal : la lutéinisation du follicule ponctionné et la production de progestérone sont normales quelle que soit la technique de collecte utilisée.

Cependant, lors de la ponction, des cellules de la granulosa sont enlevées du follicule, ce qui pourrait affecter les concentrations en progestérone circulante, comme cela a été montré chez les primates (CARNEVALE, 1996) ; McKINNON *et al.* (1988) ont constaté qu'un nombre important de cellules de granulosa dans le liquide de rinçage du follicule est corrélé à des concentrations basses en progestérone. Les techniques de collecte ovocytaire où le follicule est rincé vigoureusement pour augmenter les chances de succès, comme dans notre expérience, seraient donc susceptibles de favoriser un dysfonctionnement lutéal.

McKINNON *et al.* (1988) ont montré que les concentrations en progestérone sont plus faibles chez les receveuses pour lesquelles le GIFT a échoué par rapport aux receveuses ayant produit un embryon : l'échec de la fécondation est peut-être le reflet du dysfonctionnement lutéal du follicule ponctionné de certaines receveuses ; la ponction prématurée du follicule préovulatoire de la receveuse pourrait, si le cumulus n'est pas encore expansé, augmenter le nombre de cellules de la granulosa aspirées, cellules qui constituent certainement la principale source de progestérone en début de phase lutéale, et ainsi retarder l'augmentation de sécrétion de progestérone qui se produit normalement en début de phase lutéale. La majorité des juments ponctionnées produisent des concentrations en progestérone normales, mais avec un certain retard par rapport à une phase lutéale normale, ce qui peut nécessiter un contrôle du taux de progestérone et un apport exogène si ces juments sont receveuses d'ovocyte ; cela est pratiqué par de nombreuses équipes ayant réalisé des GIFT équins avec succès.

De nombreux auteurs (HINRICHS, 1997 ; HINRICHS *et al.*, 1998a ; CARNEVALE et GINTHER, 1995 et RAY *et al.*, 1994) apportent en prévention de la progestérone exogène aux receveuses après le transfert (progestérone en suspension huileuse IM ou altrenogest *per os* jusqu'au diagnostic de gestation et/ou jusqu'à la formation du corps jaune secondaire, systématiquement ou uniquement lorsque l'échogénicité du corps jaune est anormale).

Dans notre expérience, le taux de progestérone endogène des receveuses aurait pu être contrôlé en début de gestation ; toutefois elles ont reçu en prévention un apport exogène en progestérone similaire aux traitements employés par les autres équipes. Ainsi l'état progestatif des receveuses était assuré dans notre expérience.

Il faut noter que DAELS *et al.* (1992) ont montré qu'une fois la supplémentation en altrenogest initiée en début de gestation, elle ne devrait pas être interrompue avant le 80^{ème} jour de gestation sans avoir au préalable vérifié si la concentration plasmatique en progestérone endogène est adéquate : en effet entre le 16^{ème} et le 80^{ème} jour de gestation, des

juments traitées avec de l'altrenogest ont des concentrations plasmatiques en progestérone endogène inférieures à celles de juments non traitées ; de plus les juments traitées ont tendance à avoir moins de corps jaunes secondaires de gestation et ils apparaissent plus tardivement que chez des juments non traitées.

3438 – Déroutement de la chirurgie de transfert

L'insertion dans l'oviducte de la pipette Pasteur contenant l'ovocyte est une étape très délicate de la chirurgie de GIFT : elle requiert une certaine expérience. Dans notre étude, elle a souvent été laborieuse ; il est possible que cela ait provoqué des lésions et une inflammation du pavillon modifiant les conditions locales nécessaires à la survie et au transport de l'ovocyte puis de l'œuf ; de plus, cette étape ayant été longue, le temps de séjour de l'ovocyte à température et atmosphère ambiantes, néfastes pour sa survie, a été long également. Ainsi cette étape est certainement en partie responsable du mauvais taux de gestation global obtenu. Pour un GIFT du lot 24h, cette étape a même échoué, obligeant le manipulateur à percer l'oviducte avec une aiguille pour y injecter l'ovocyte. Il est possible que la lésion induite explique l'échec du GIFT pour cette receveuse, diminuant le taux de gestation pour ce lot.

L'extériorisation de l'ovaire a parfois aussi été difficile dans notre expérience. D'après CARNEVALE (1996) et HINRICHS *et al.* (1998a), cette étape peut être facilitée en maintenant une compresse imprégnée d'anesthésique local sur le ligament large pour favoriser sa relaxation. Dans notre expérience cela aurait permis de raccourcir la durée de l'intervention. Cependant la longueur de cette étape n'a probablement pas affecté la survie de l'ovocyte car celui-ci est maintenu à 38,5°C sous atmosphère modifiée tant que l'ovaire n'est pas extériorisé.

HINRICHS *et al.* (1998a), McKINNON *et al.* (1988) et CARNEVALE et GINTHER (1995) ont obtenu des gestations chez la jument en transférant l'ovocyte aussi bien dans l'oviducte controlatéral au follicule préovulatoire de la receveuse que dans l'oviducte ipsilatéral ; chez la femme, le GIFT a un meilleur taux de succès lors de transfert dans l'oviducte ipsilatéral au follicule dominant par rapport au transfert dans l'oviducte controlatéral (CARNEVALE, 1996). Ainsi, le choix fait dans notre expérience de transférer l'ovocyte dans l'oviducte ipsilatéral au follicule dominant n'a probablement pas affecté le taux de gestation, au contraire.

Pour la chirurgie, les receveuses ont reçu de la benzylpénicilline, du sulfate de dihydrostreptomycine, du chlorhydrate de détomidine, du chlorhydrate de procaïne, du tartrate de butorphanol et de la phénylbutazone sodique. Un éventuel effet néfaste de ces médicaments sur la fécondation et le développement embryonnaire, notamment par modification de la motricité de l'oviducte, n'est pas exclu mais n'a pas été étudié.

HINRICHS *et al.* (1998a) considèrent que la flunixin méglumine pourrait diminuer la motilité de l'oviducte et de l'utérus, donc favoriser le développement d'endométrites après l'insémination artificielle. La phénylbutazone sodique utilisée dans notre expérience appartenant à la même classe pharmaceutique (anti-inflammatoires non stéroïdiens inhibiteurs des prostaglandines), un même effet pourrait être envisagé.

HINRICHS *et al.* (1998a) rappellent aussi que la xylazine augmente la motilité utérine chez la jument et pourrait également modifier la motilité de l'oviducte, donc influencer le résultat du GIFT. Le chlorhydrate de détomidine utilisé dans notre expérience appartenant à la même classe pharmaceutique que la xylazine (α_2 -agonistes), un même effet peut être suspecté.

Cependant, ces médicaments sont administrés dans de nombreux protocoles de GIFT où de bons résultats ont été rapportés, et ne sauraient donc expliquer le mauvais taux de gestation obtenu.

CONCLUSION

Le taux de gestation de 22 % [7/32] obtenu dans notre expérience par GIFT chez la jument est inférieur à certains résultats récents rapportés. Plusieurs hypothèses l'expliquent : certains ovocytes provenant des donneuses les plus âgées ont pu être défectueux ; les ovocytes peuvent avoir été détériorés par le passage dans le milieu de culture non tamponné ; des endométrites non diagnostiquées ont pu survenir suite à l'insémination artificielle après transfert ; l'insertion de la pipette dans l'oviducte peut l'avoir lésé et augmenté le temps de séjour des ovocytes sous atmosphère ambiante.

Les techniques de collecte ovocytaire utilisées sont bien maîtrisées : les taux de collecte, par ponction folliculaire transvaginale échoguidée de 69 %, et par ponction folliculaire directe par laparotomie de 5/6, sont satisfaisants par rapport aux résultats d'autres équipes.

Le pourcentage d'ovocytes dégénérés de 16 % est normal par comparaison à d'autres études : notre technique de collecte n'a pas altéré visiblement les ovocytes.

Cette expérience avait pour objectif de comparer les résultats du transfert d'ovocytes collectés 24 h après induction et mis en culture pendant 20 h au transfert d'ovocytes collectés 35 h après induction de l'ovulation et transférés immédiatement.

Comme plusieurs auteurs l'avaient déjà constaté, le délai entre l'induction de l'ovulation et la collecte n'influence pas les taux de collecte, équivalents avec les méthodes 35 h et 24 h.

Le taux de gestation obtenu avec la méthode 24 h est inférieur à celui obtenu avec la méthode 35 h, mais sans différence significative. L'infériorité du taux de gestation avec la méthode 24 h, même si elle n'est pas significative sur ces faibles effectifs, pourrait être expliquée par l'effet majoré du milieu de culture non tamponné sur les ovocytes du lot 24h qui y séjournent plus longtemps ; un effet délétère de la gentamicine du milieu de culture des ovocytes du lot 24h ne peut être exclu. Ces résultats ne confirment pas les constatations récentes de plusieurs équipes de recherche qui ont amélioré leurs taux de gestation en optant pour la méthode 24 h et considèrent que l'ovocyte en métaphase I manipulé dans la méthode 24 h est moins fragile. Mais ils confirment les études de HINRICHS *et al.* (1998b) et de CARNEVALE *et al.* (2000) qui ont obtenu de bons taux de gestation équivalents avec les deux méthodes.

Le taux d'ovulation important entre 24 h et 35 h après induction de l'ovulation remet en question l'intérêt de la méthode 35 h : le cycle de nombreuses donneuses qui ovulent avant la collecte est perdu ; quant aux receveuses, leur ovulation avant la collecte oblige à réaliser des contrôles de filiation lors des diagnostics de gestation.

Ainsi, dans la perspective d'un usage commercial du GIFT, le protocole devrait être adapté et amélioré :

- Si un grand nombre de receveuses n'est pas disponible, il faudrait réaliser un traitement de synchronisation entre la donneuse et la receveuse. La CEG, non disponible commercialement, ne serait pas utilisée et remplacée par l'hCG pour induire les ovulations.
- La collecte des ovocytes des donneuses 35 h après induction de l'ovulation semble favoriser le taux de gestation selon notre méthode, mais le cycle de nombreuses donneuses pourrait être ainsi perdu à cause des nombreuses ovulations entre 24 h et 35 h ; la collecte des ovocytes des donneuses à 24 h pourrait donc lui être préférée.
- Afin d'éviter que les receveuses n'ovulent avant la collecte, ou que la collecte lors de la laparotomie échoue, la collecte de l'ovocyte des receveuses pourrait être réalisée par ponction folliculaire transvaginale 24 h après induction de l'ovulation plutôt qu'à 35 h, les contrôles de filiation étant incompatibles avec la poursuite de la gestation.
- La gémellité étant hautement indésirable dans l'espèce équine, le transfert de plusieurs ovocytes par receveuse en cas de double ovulation de la donneuse serait exclu.
- Afin d'augmenter le taux de gestation, un tampon devrait être ajouté dans le milieu de culture, l'insertion de la pipette Pasteur dans l'oviducte devrait être mieux maîtrisée ; d'éventuelles endométrites devraient être recherchées dès le lendemain du transfert par échographie quotidienne.
- Dans l'expérience, les gestations étaient précocement interrompues. Cependant, le développement embryonnaire et fœtal après un GIFT est normal et les gestations peuvent être menées à terme : HINRICHS *et al.* (1998a et 1999) ont respectivement obtenu la naissance d'un et de quatre poulains par GIFT.

Ainsi appliqué, le GIFT demeurerait une technique de reproduction assistée complexe dans sa gestion, mais aussi la plus indiquée pour des juments de valeur jeunes ou d'âge moyen ne pouvant pas fournir d'embryon. Les meilleurs taux de gestation rapportés sont comparables avec ceux du transfert d'embryon et suggèrent que le GIFT pourrait devenir un outil clinique dans l'espèce équine.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN (1984) Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J. Reprod. Fert.*, **71**, 607-613.
- BARONE R (1990) *Anatomie comparée des mammifères domestiques, Tome quatrième Splanchnologie II*. 2^{ème} éd. Paris : Vigot ed, 951 p.
- BERNARDEAU P, CHAVATTE P, CLEMENT F, ECOT P, NOUE P, PLONGERE G, VIDAMENT M, VINCENT P, LENORMAND A, LAGNEAUX D, COLLOBERT C, MOUSSU C, HOFFERER S, CLOUET D'ORVAL P, CHAFFAUX S (1998) *Gestion de la Jument*. Paris : Institut du cheval ed, 289 p.
- BEZARD J (1997a) Aspects of *in vivo* and *in vitro* fertilization of the equine oocyte. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, Porto Alegre, **25**, n°1, (Supl.), 36-61.
- BEZARD J (1997b) Timing of *in vivo* maturation of equine preovulatory oocytes and competence for *in vitro* maturation of immature oocytes collected simultaneously. *Equine vet. J., Suppl.* **25**, 33-37.
- BEZARD J (1999) De la collecte des ovocytes à la production d'embryons. *INRA Prod. Anim.*, **12**, n°5, 339-341.
- BEZARD J, GUIGNOT F (1999) Les techniques de reproduction assistée en élevage équin. *In : 25^{ème} journée d'étude de l'Institut du Cheval*. Paris, 3 mars 1999. 51-60.
- BEZARD J, MAGISTRINI M, BATTUT I, DUCHAMP G, PALMER E (1992) La fécondation *in vitro* chez les équidés. *Rec. Med. Vét.*, **168** (11/12), 993-1003.
- BRIANT C (1999) Maîtrise de l'activité ovarienne chez la jument. *INRA Prod. Anim.*, **12**, n°5, 334-336.
- CARNEVALE EM (1996) Gamete intrafallopian transfer. *Vet. Clin. North. Am : Equine Pract.*, **12**, n°1, 47-60.
- CARNEVALE EM, GINTHER OJ (1993) Use of a linear ultrasonic transducer for the transvaginal aspiration and transfer of oocytes in the mare. *J. Equine Vet. Sci.*, **13**, n°6, 331-333.
- CARNEVALE EM, GINTHER OJ (1995) Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. *Biol. Reprod.*, Monograph **1**, 209-214.
- CARNEVALE EM, Mc KINNON AO, SQUIRES EL, VOSS JL (1988) Ultrasonographic characteristics of the preovulatory follicle preceding and during ovulation in mares. *J. Equine Vet. Sci.*, **8**, n°6, 428-431.

- CARNEVALE EM, ALVARENGA MA, SQUIRES EL (1999) Use of oocyte transfer in a commercial breeding program to obtain pregnancies from mares with reproductive pathologies. *In : Proceedings of 45th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Albuquerque, New Mexico, USA, 5-8 December 1999, vol. 45. 200-202.
- CARNEVALE EM, MACLELLAN LJ, SCOTT TJ, COUTINHO DA SILVA MA, SCOGGIN CF, SQUIRES EL (2000) Effects of oocyte maturity and methods of collection, culture and insemination on equine oocyte transfer. *In : Proceedings of the 5th international symposium on equine embryo transfer*. Saari, Finland, 6-9 July 2000. 28.
- CHOI YH, OKADA Y, HOCHI S, BRAUN J, SATO K, OGURI N (1994) In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae. *Theriogenology*, **42**, 795-802.
- DAELS PF, JORGE DE MORAES M, STABENFELDT GH, HUGHES JP (1992) The effect of altrenogest on the development of secondary corpora lutea and progesterone secretion in pregnant mares. *In : Proceedings of the 12th international congress on Animal reproduction*. The Hague, The Netherlands, 23-27 August 1992. 1855-1857.
- DUCHAMP G, BOUR B, COMBARNOUS Y, PALMER E (1987) Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, **35**, 221-228.
- DUCHAMP G, BEZARD J, PALMER E (1995) Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimeters in mares. *Biol. Reprod.*, Mono **1**, 233-241.
- GINTHER OJ, BERGFELT DR (1999) Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.*, **99**, 105-111.
- GOUDET G (1998) *Ovocytes équins : optimisation de la production et évaluation de la qualité*. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie, Université François Rabelais, Tours, 196 p.
- GUERAND M, MAHLA R, LAGNEAUX D, AMIGUES Y, PALMER E, BEZARD J (1997) Parentage testing of day 10 equine embryos by amplified PCR analysis of microsatellites. *Equine Vet. J. Suppl.*, **25**, 69-71.
- GUIGNOT F (1999) Micromanipulation des gamètes. *INRA Prod. Anim.*, **12**, n°5, 341-343.
- GUIGNOT F, OTTOGALLI M, YVON JM, MAGISTRINI M (1998) Preliminary observations in in vitro development of equine embryo after ICSI. *Reprod. Nutr. Dev.*, **38**, 653-663.
- HINRICHS K (1997) Assisted reproductive techniques in the mare. *In : EDWARD ROBINSON N. Current therapy in equine medicine*. 4thed., Philadelphia, Saunders eds, 565-571.

- HINRICHS K (1998) Production of embryos by assisted reproduction in the horse. *Theriogenology*, **49**, 13-21.
- HINRICHS K, KENNEY DF, KENNEY RM (1990) Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. *Theriogenology*, **34**, 107-112.
- HINRICHS K, MATTHEWS GL, FREEMAN DA, TORELLO EM (1998a) Oocyte transfer in mares. *JAVMA*, **212**, n°7, 982-986.
- HINRICHS K, BETSCHART RW, McCUE PM, SQUIRES EL (1998b) Effect of time of follicle aspiration on pregnancy rate after oocyte transfer. In : *Proceedings of the 7th international symposium on equine reproduction*. University of Pretoria, South Africa, 1998. 129-130.
- HINRICHS K, PROVOST PJ, TORELLO EM (1999) Birth of a foal after oocyte transfer to a nonovulating, hormone treated recipient mare. *Theriogenology*, **51**, 1251-1258.
- HOFFERER S, LECOMPTE F, MAGALLON T, PALMER E, COMBARNOUS Y (1993) Induction of ovulation and superovulation in mares using equine LH and FSH separated by hydrophobic interaction chromatography. *J. Reprod. Fertil.*, **98**, 597-602.
- MANTEN M (2000) *La fécondation in vitro dans l'espèce équine : bilan bibliographique*. Thèse Mèd. Vét., Nantes, n°50, 151 p.
- MEA-BATELLIER F (1997) *Identification, purification et mécanisme d'action d'éléments contenus dans le lait, agissant sur les spermatozoïdes équins*. Thèse de Doctorat en Sciences de la Vie, Université François Rabelais, Tours, 138 p.
- McKINNON AO, WHEELER MB, CARNEVALE EM, SQUIRES EL (1987) Oocyte transfer in the mare – preliminary observations. *J. Equine Vet. Sci.*, **6**, 306-309.
- McKINNON AO, CARNEVALE EM, SQUIRES EL, VOSS JL, SEIDEL GE (1988) Heterogenous and xenogenous fertilization of *in vivo* matured equine oocytes. *J. Equine Vet. Sci.*, **8**, n°2, 143-147.
- PALMER E, HAJMELI G (1992) Essais de superovulation chez la jument. *Rec. Méd. Vét.*, **168**, 897-905.
- PALMER E, DUCHAMP G, BEZARD J, MAGISTRINI M, KING WA, BETTERIDGE KJ (1987) Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. *J. Reprod. Fert.*, **Suppl. 35**, 689-690.
- PALMER E, BEZARD J, MAGISTRINI M, DUCHAMP G (1991) In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J. Reprod. Fert.*, **Suppl. 44**, 375-384.

- RAY BS, SQUIRES EL, COOK NL, TARR SF, JASKO DJ, HOSSNER KL (1994) Pregnancy following gamete intrafallopian transfer in the mare. *J. Equine Vet. Sci.*, **14**, n°1, 27-30.
- SQUIRES EL, COOK NL (1996) Transvaginal aspiration. *Vet. Clin. North. Am : Equine Pract.*, **12**, n°1, 13-29.
- SQUIRES EL, WILSON JM, KATO H, BLASZCZYK A (1996) A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, **45**, 306.
- TAINTURIER D, BRUYAS JF, DUMONT P, FIENI F, ESCOUFLAIRE P (1989) La transplantation embryonnaire chez la jument. *Rev. Med. Vet.*, **140**, 1109-1115.

**TRANSFERT DANS L'OVIDUCTE D'OVOCYTES PEOVULATOIRES EQUINS :
EFFET DU DELAI ENTRE L'INDUCTION DE L'OVULATION
ET LA COLLECTE DE L'OVOCYTE**

NOM et Prénom : GOUY Isabelle

RESUME : Le transfert d'ovocyte dans l'oviducte (GIFT : Gamete Intrafallopian Transfer) consiste à placer l'ovocyte d'une jument donneuse dans l'oviducte d'une jument receveuse. Le but de l'étude, réalisée avec 47 ponettes, est de comparer deux méthodes de GIFT : la collecte de l'ovocyte préovulatoire de la donneuse 35h après induction de l'ovulation puis son transfert immédiat (lot 35h), et la collecte de l'ovocyte préovulatoire de la donneuse 24h après induction de l'ovulation puis sa culture 20h *in vitro* avant transfert (lot 24h) ; cette deuxième méthode donne de meilleurs résultats dans de récentes études.

L'ovocyte de la donneuse est collecté par ponction folliculaire transvaginale (PTV) et transféré par laparotomie. L'ovocyte de la receveuse, inséminée, est prélevé : en cas d'échec de cette collecte, ou si la receveuse a ovulé, un contrôle de filiation établie si l'embryon provient de la donneuse.

Le taux de collecte global par PTV (69%, 47/68) est bon : la technique de collecte est maîtrisée et n'a pas abîmé les ovocytes, le pourcentage d'ovocytes dégénérés (16%, 6/38) étant normal.

Le taux de gestation global (22%, 7/32) est inférieur à des résultats rapportés récemment : il se peut que les ovocytes aient été abîmés *in vitro*, le milieu ne contenant pas de tampon, ou que l'oviducte ait parfois été lésé lors du transfert.

Les taux de collecte par PTV sont équivalents dans les deux lots (71% [24/34], lot 35h vs 64% [14/22], lot 24h) : le délai entre induction de l'ovulation et collecte ovocytaire n'influence pas le taux de collecte.

Le taux de gestation avec la méthode 24h est inférieur, non significativement, à celui obtenu avec la méthode 35h (7% [1/14] vs 33% [6/18]) : l'effet délétère du milieu de culture a pu être majoré dans le lot 24h.

Le grand nombre de ponettes ovulant entre 24h et 35h après induction de l'ovulation limite l'intérêt de la méthode 35h : le cycle des donneuses est perdu et cela oblige à faire un contrôle de filiation, impossible dans un but commercial.

Mots-Clés : jument, cheval, ovocyte, transfert, GIFT, reproduction assistée, ponction folliculaire.

JURY :

Président : Pr

Directeur : Mme CHASTANT-MAILLARD

Assesseur : Mme CREVIER-DENOIX

Adresse de l'auteur : 27, avenue de la Forêt d'Othe 89300 JOIGNY

**OVIDUCTAL TRANSFER OF PREOVULATORY EQUINE OOCYTES :
EFFECT OF THE DELAY BETWEEN OVULATION INDUCTION
AND OOCYTE COLLECTION**

SURNAME : GOUY

Given name : Isabelle

SUMMARY : The oocyte transfer in the oviduct (GIFT, Gamete Intrafallopian Transfer), involves the placement of a donor mare's oocyte into a recipient mare's oviduct. The aim of the study, conducted with 47 pony mares, is to compare two methods of GIFT : the recovery of the donor's preovulatory oocyte 35h after induction of ovulation and its instant transfer (35h group) and the recovery of the donor's preovulatory oocyte 24h after ovulation induction and its *in vitro* culture for 20 h before transfer (24h group). This second method gives better results in recent studies.

The donor's oocyte is recovered by ovum pick up then transferred by laparotomy. The recipient is inseminated and its oocyte is removed : if this recovery failed, or if the recipient has ovulated, a parentage testing checks if the embryo originates from the donor.

The global recovery rate by ovum pick up (69%, 47/68) is good : the recovery procedure is well realised and didn't damage the oocytes, because the rate of degenerated oocytes (16%, 6/38) is normal.

The global pregnancy rate (22 %, 7/32) is below several results recently reported : oocytes might have been damaged *in vitro*, because the medium didn't contain any buffer, or the recipients' oviduct may have been injured during some transfers.

Recovery rates by ovum pick up are equivalent in both groups (71% [24/34], 35h group vs 64% [14/22], 24h group) : the delay between ovulation induction and oocyte collection doesn't influence the recovery rate.

The pregnancy rate for the 24h method is lower than that for the 35 h method, but not significantly (7%, 1/14 vs 33 %, 6/18) : the deleterious effect of the culture medium might have been exacerbated in the 24h group.

The large number of pony mares which ovulated between 24h and 35h after ovulation induction limits the benefit of the 35h method : the donors' cycle is lost and a parentage testing has to be performed, what couldn't be done from a commercial point of view.

KEY WORDS : mare, horse, oocyte, transfer, GIFT, assisted reproduction, follicular puncture.

JURY :

President : Pr

Director : Mrs CHASTANT-MAILLARD

Assessor : Mrs CREVIER-DENOIX

Author's Adress : 27, avenue de la Forêt d'Othe 89300 JOIGNY