

Comparaison sur base des attentes et limites de l'éleveur entre programmes commerciaux de transfert embryonnaire et OPU-ICSI chez la jument

Auteur : Baertsoen, Manon

Promoteur(s) : Ponthier, Jérôme

Faculté : Faculté de Médecine Vétérinaire

Diplôme : Master en médecine vétérinaire

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/11976>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

**COMPARAISON SUR BASE DES ATTENTES ET LIMITES DE
L'ELEVEUR ENTRE PROGRAMMES COMMERCIAUX DE
TRANSFERT EMBRYONNAIRE ET OPU-ICSI CHEZ LA
JUMENT**

**COMPARISON BETWEEN COMMERCIAL EMBRYO TRANSFER
AND OPU-ICSI PROGRAMS IN THE MARE BASED ON BREEDER
EXPECTATIONS AND LIMITATIONS**

BAERTSOEN Manon

Travail de fin d'études
présenté en vue de l'obtention du grade
de Médecin Vétérinaire

ANNÉE ACADÉMIQUE 2020/2021

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

**COMPARAISON SUR BASE DES ATTENTES ET LIMITES DE
L'ELEVEUR ENTRE PROGRAMMES COMMERCIAUX DE
TRANSFERT EMBRYONNAIRE ET OPU-ICSI CHEZ LA
JUMENT**

**COMPARISON BETWEEN COMMERCIAL EMBRYO TRANSFER
AND OPU-ICSI PROGRAMS IN THE MARE BASED ON BREEDER
EXPECTATIONS AND LIMITATIONS**

BAERTSOEN Manon

Tuteur : Dr Jérôme Ponthier, Dipl ECAR, PhD

Travail de fin d'études
présenté en vue de l'obtention du grade
de Médecin Vétérinaire

ANNÉE ACADÉMIQUE 2020/2021

Le contenu de ce travail n'engage que son auteur

COMPARAISON SUR BASE DES ATTENTES ET LIMITES DE L'ELEVEUR ENTRE PROGRAMMES COMMERCIAUX DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE ET OPU-ICSI CHEZ LA JUMENT

OBJECTIF DU TRAVAIL

Pouvoir orienter le choix d'un éleveur vers un programme de transfert embryonnaire ou d'OPU-ICSI en fonction de ses attentes et de ses juments.

RESUME

Depuis la fin des années 1990, les techniques de reproduction assistées dans l'espèce équine se sont fortement développées. Les programmes commerciaux de transfert embryonnaire, où la jument donneuse est inséminée puis l'embryon récolté et réimplanté dans une jument receveuse qui mènera la gestation à terme, sont disponibles depuis de nombreuses années. Les avancées scientifiques récentes ont permis de développer des programmes *d'Ovum Pick Up – Intra Cytoplasmic Sperm Injection* (OPU-ICSI) qui peuvent dorénavant s'inscrire dans des programmes commerciaux viables. Cette deuxième technique se différencie du transfert embryonnaire classique du fait que les ovocytes sont récoltés chez la jument donneuse par ponction de ses follicules, puis, que tout le processus de fertilisation a lieu in vitro, avant de réimplanter l'embryon dans une jument receveuse. Un nombre moyen de 0,5 à 0,8 embryon est récolté par session de transfert embryonnaire, principalement du fait de la difficulté de superovuler la jument, avec des taux de gestations d'environ 71% par embryon récolté. En OPU-ICSI c'est une moyenne d'1,6 embryons qui est obtenu par session avec des taux de gestation autour de 53,4% par embryon. Malgré ces résultats qui peuvent paraître faibles pour l'éleveur, ces techniques permettent de contourner certaines difficultés telles que l'âge avancé de la jument, le maintien de sa carrière sportive ou une baisse de sa fertilité de manière efficace. Cela est d'autant plus vrai pour la technique d'OPU-ICSI qui permet de contourner un nombre important de ces facteurs mais aussi d'utiliser de la semence d'étalons subfertiles ou peu disponible avec de bons résultats (77% d'embryons par session après ICSI des ovocytes).

COMPARISON BETWEEN COMMERCIAL EMBRYO TRANSFER AND OPU-ICSI PROGRAMS IN THE MARE BASED ON BREEDER EXPECTATIONS AND LIMITATIONS

AIM OF THE WORK

Guide a breeder towards an embryo transfer or an OPU-ICSI commercial program according to his expectations and his mares.

SUMMARY

Since the end of the 90s, assisted reproductive techniques in the horse highly developed themselves. Commercial programs of embryo transfer, where the donor mare is inseminated, the embryo flushed and then transferred into a surrogate mare's uterus that will carry the pregnancy, are available since many years. The recent scientific advances allowed the development of *Ovum Pick Up – Intra Cytoplasmic Sperm Injection* (OPU-ICSI) viable commercial programs. This second method differentiate from classical embryo transfer because of all the fertilization process that occurs in vitro after Ovum Pick Up (OPU). A mean number of 0,5-0,8 embryos is flushed throughout embryo transfer, mostly due to the difficulty to superovulate the mare, with a pregnancy rate around 71% per flushed embryo. For OPU-ICSI, it's a mean of 1,6 embryos that is produced per session with 53,4% of pregnancy rate. Despite of these results, that may seem low for the breeder, these methods allow to bypass some issues such as advanced age of the donor mare, the pursuit of her sport carrier or a diminution of her fertility. This is all the more for OPU-ICSI that allows to bypass many of these factors and to use semen from subfertile or low-disponible stallions with still good results (77% embryos after an OPU-ICSI session).

REMERCIEMENTS

Au professeur Jérôme Ponthier, diplômé de la faculté de médecine vétérinaire de Liège et du European College of Animal Reproduction (ECAR), pour ses conseils avisés, sa disponibilité et le temps consacré à l'amélioration de ce manuscrit. Mes plus sincères et respectueux remerciements.

Au professeur Sigrid Grulke, diplômée de la faculté de médecine vétérinaire de Liège et du European College of Veterinary Surgeons (ECVS), et au Docteur Carla Cesarini, médecin vétérinaire diplômée des collèges américains et européens de médecine interne des équidés (ACVIM-LA et ECEIM), membres du jury de ce travail de fin d'études, pour leur lecture attentionnée de ce manuscrit.

A mes parents et à mon frère, merci de m'avoir soutenue toutes ces années ! Votre amour et votre bienveillance à toute épreuve m'auront donné le courage nécessaire dans les moments de doutes pour ne rien lâcher. Si j'ai pu réaliser mon rêve de devenir vétérinaire c'est en grande partie grâce à vous.

A Oma et Karen, merci d'avoir toujours été présentes. Votre soutien indéfectible m'aura toujours poussé à donner le meilleur de moi-même.

A Eloise, fantastique amie et colocataire incroyable, merci d'être qui tu es. Les études s'achèvent mais pas notre amitié.

A mes amis de promo, Séverine, toujours souriante et de bonne humeur, un vrai rayon de soleil, Giulia, ma formidable binôme, Simon, Mathilde, Jeanne, Antoine, Esther, Eva, Mélo, Agatha, Camille et à tous ceux que je n'ai pas cités mais qui se reconnaîtront, un tout grand merci à vous ! Ces années d'études auront été marquées par votre bonne humeur et laisseront de magnifiques souvenirs.

A mes amis d'enfance, Camille, Chloé et Mégan, qui malgré la distance n'étiez jamais bien loin.

Un merci tout particulier à toute l'équipe de la clinique vétérinaire de la vallée d'Auge, futurs collègues, de m'avoir si bien accueillie. Votre pédagogie et bonne humeur au quotidien m'ont donné toute la motivation et l'énergie nécessaires pour arriver au bout de ces études.

TABLE DES MATIERES

1. Introduction
2. Description des techniques
 - 2.1 Transfert embryonnaire
 - 2.2 Ovum Pick Up (OPU) – Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI)
3. Critères relatifs aux embryons produits
 - 3.1 Réfrigération / Congélation
 - 3.2 Synchronisation des juments receveuses
4. Critères relatifs à la jument donneuse
 - 4.1 Carrière sportive
 - 4.2 Âge
 - 4.3 Fertilité
5. Critères relatifs à l'étalon
 - 5.1 Semence (frais, réfrigéré, congelé)
 - 5.2 Fertilité
6. Résultats attendus
7. Conclusion

1. Introduction

Au cours de la dernière décennie, les techniques de reproduction assistée ont énormément évolué. Le désir des éleveurs d'élever avec leurs juments de concours sans que celles-ci ne soient écartées des terrains de compétition pendant de longues périodes, le souhait d'obtenir plusieurs poulains issus d'une même jument, l'utilisation de semence d'étalons sub-fertiles ont entraîné le développement de nouvelles techniques de reproduction assistées telles que le transfert d'embryons ou l'OPU-ICSI (*Ovum Pick Up – Intracytoplasmic Sperm Injection*). Ces techniques s'inscrivent dorénavant dans des programmes commerciaux, avec des contraintes, prix et résultats variables. Comment sélectionner plutôt l'une ou l'autre de ces deux techniques dans l'optique de faire reproduire sa jument ?

Que ce soit le transfert embryonnaire ou l'OPU-ICSI, il faut savoir que ce sont des actes qui imposent un certain coût financier. En effet, pour obtenir un embryon, il faut compter un minimum d'environ 300 euros pour le transfert embryonnaire et 2000 euros pour l'OPU-ICSI (*Tableau 1*). Ces frais n'incluent pas le prix de la semence et de l'insémination de la jument donneuse, variables en fonction de l'étalon choisi et du type de semence, ni le prix de location de la jument porteuse. En raison de ces prix, ces techniques restent encore souvent réservées aux juments de sport à forte valeur génétique en Europe.

Le choix de se tourner vers ces méthodes de reproduction assistées fait souvent suite à la décision de l'éleveur qui ne souhaite pas que sa jument mène sa gestation à terme ou parce que la jument n'y parvient pas. En effet, ces techniques permettent de court-circuiter certaines étapes de la reproduction naturelle chez la jument. En fonction des problèmes de conception et maintien de la gestation rencontrés avec sa jument le propriétaire pourra se tourner préférentiellement vers une des deux techniques précitées qui seront développées dans le présent travail.

2. Description des techniques

2.1 Transfert embryonnaire

Le transfert embryonnaire est une technique de reproduction assistée qui a été développée dans les années 1970 (Allen et al, 2020) mais ne s'est ancrée dans des programmes commerciaux viables que dans les années 1990. Cette technique est un outil valable pour obtenir

plusieurs descendants d'une jument pendant la même année de reproduction, de produire des poulains issus de juments qui font de la compétition ou pour permettre à des juments ne parvenant pas à mener leur gestation à terme d'obtenir une descendance (Stout et al 2010).

Le transfert embryonnaire peut se faire de manière chirurgicale ou non-chirurgicale. Cette deuxième façon de faire est la plus répandue dans les programmes commerciaux actuels car simple à réaliser sur le terrain. C'est donc essentiellement sur la technique de transfert embryonnaire non-chirurgicale que portera ce travail.

La fécondation de l'ovocyte a lieu dans l'ampoule de l'oviducte de la jument et l'embryon ainsi formé nécessite 6-7 jours pour entrer dans l'utérus. La récolte pour le transfert embryonnaire se réalise donc 7-8 jours post-ovulation. Les récoltes à 9 jours post-ovulation sont moins fréquentes car ces embryons, de taille plus importante, sont plus susceptibles d'être endommagés lors du processus de récolte. D'autre part, la super-ovulation, qui permettrait à la jument de produire plusieurs embryons en même temps, n'est pas efficace dans l'espèce équine. En effet, malgré de nombreuses recherches pour induire la super-ovulation chez la jument (extraits hypophysaires, FSH, immunisation contre l'inhibine) les résultats restent décevants (Roser et al, 2019). La jument est mise dans un travail, la queue attachée et emballée, le rectum vidé des matières fécales et une toilette vulvaire réalisée. L'opérateur qui effectue la récolte se muni d'un gant et de gel stériles pour positionner une sonde de type Foley, spécialement dédiée au transfert embryonnaire, en amont du col utérin (*Figures 1 et 2*). Le ballon situé à l'extrémité de la sonde est gonflé avec de l'air pour la maintenir en place. L'utérus est ensuite lavé avec un milieu tampon commercial à 3 ou 4 reprises. Un massage transrectal de l'utérus est réalisé avant de récupérer le liquide pour également répandre le liquide de récolte dans les cornes utérines. La totalité du liquide récupéré est ensuite filtré, soit directement derrière la jument, soit dans le laboratoire adjacent. Une loupe binoculaire est nécessaire pour chercher l'éventuel embryon présent dans le liquide récolté. Si la récolte s'avère positive et qu'un ou plusieurs embryons sont présents, ceux-ci sont prélevés via une pipette, lavés dans des milieux commerciaux spécifiques de manière à en ôter le maximum de micro-organismes, gradés en fonction de leur qualité (*Tableau 2*) et placés dans une paillette de transfert (*Figure 3*) avec un milieu pour conserver l'embryon (*Embryo holding®*) (Stout et al 2010 ; Allen et al 2020).

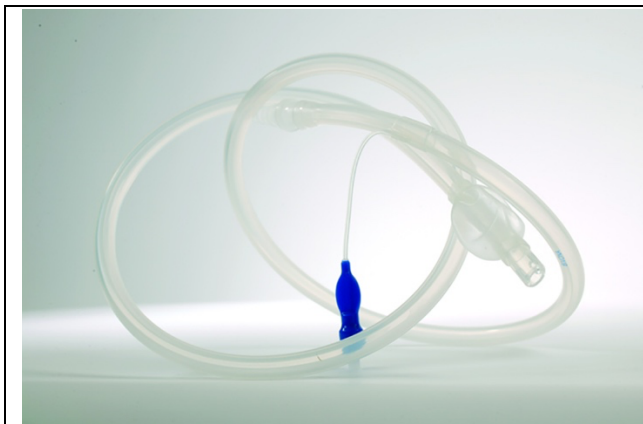


Figure 1 : sonde de transfert embryonnaire
(source IMV Technologies)

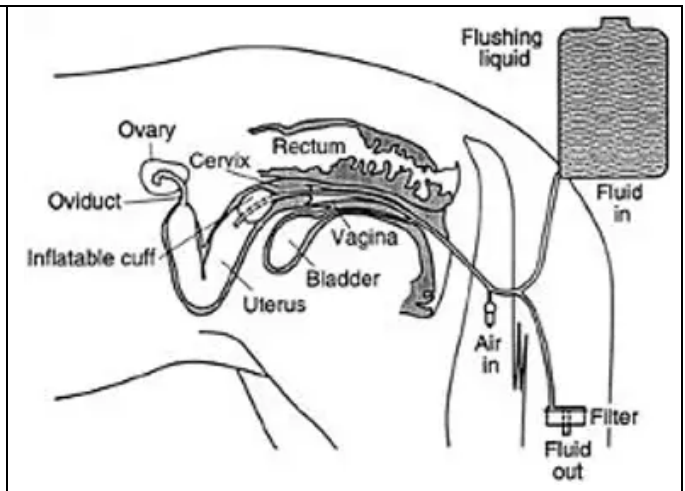




Figure 2 : mise en place du système de récolte dans la jument
(source <https://www.svaejp.com/transfert-d-embryon>)

Ensuite, l'embryon doit être ré-implanté dans une jument receveuse synchronisée (ayant ovulé entre 4 et 9 jours avant la ré-implantation de l'embryon) avec la donneuse au niveau de son cycle œstral. Cette manipulation, nécessite une expérience de l'opérateur pour transférer l'embryon à l'aide d'une seringue de transfert dans l'utérus (*Figure 4*) de la jument receveuse sans que le col utérin de celle-ci ne soit trop manipulé. En effet, une manipulation excessive du col de la receveuse en dioestrus, qui est fermé à ce moment, entraînerait une décharge de prostaglandines $\text{PGF2}\alpha$ qui mènerait à la lutéolyse et compromettrait la future gestation. Il convient par la suite d'effectuer un contrôle échographique de la receveuse, pour s'assurer d'une éventuelle gestation, aux alentours de quatorze jours après que la donneuse ait ovulé, soit six à sept jours après le transfert embryonnaire. La technique n'assurant pas une efficacité totale, un contrôle échographique de la jument donneuse est également fortement recommandé pour s'assurer que celle-ci ne soit pas restée gestante, si l'embryon n'avait pas été récupéré malgré le lavage utérin, et que la jument ne développe pas une endométrite. La gestation de la jument receveuse est ensuite régulièrement contrôlée par échographie trans-rectale et celle-ci est ensuite louée au propriétaire de la jument donneuse à partir de 45 jours de gestation et ce jusqu'au sevrage du poulain l'année suivante (Jacob et al 2010 ; Stout et al 2010 ; Lagneaux et al 1999 ; Stout et al 2006 ; Tischner et al 1980 ; Card et al 2018).

Les résultats attendus pour cette technique sont d'environ 0,5 à 0,8 embryons par récolte avec un taux de gestation de la receveuse à 45 jours d'environ 71% (par embryon ré-implanté) (McCue et al, 2015) (*Tableau 3*).

	
<p>Figure 3 : paillettes de transfert embryonnaire (source IMV Technologies)</p>	<p>Figure 4 : seringue de transfert embryonnaire (source IMV Technologies)</p>

2.2 Ovum Pick Up – Intracytoplasmic Sperm Injection

En ce qui concerne l'Ovum Pick Up (OPU) et l'Intra Cytoplasmic Sperm Injection (ICSI), la technique diffère en grande majorité du transfert embryonnaire par le fait que la fécondation de l'ovocyte n'a pas lieu dans la jument donneuse mais *in-vitro* dans un laboratoire. Cette technique était initialement considérée pour des juments subfertiles, souvent âgées, incapables de produire un embryon via les autres techniques de reproduction assistées des suites de pathologies ou d'anomalies du tractus reproducteur mais aussi pour l'utilisation de semence d'étalons subfertiles ou dont il reste très peu de paillettes. Cependant, ces dernières années la technique s'est fortement développée et s'est élargie à un plus grand panel de juments (Lazzari et al 2020 ; Stout et al 2020).

Pratiquement, pour l'OPU, qui est généralement pratiquée hors saison de reproduction, la jument sera suivie échographiquement pour s'assurer de la croissance folliculaire sur ses ovaires. Lorsqu'un nombre suffisant de follicules (>20) de petite taille (<16mm) sont observés, la jument peut être soumise à l'Ovum Pick Up. Elle est mise dans un travail, queue attachée, rectum vidé et toilette vulvaire aseptique réalisée. La jument reçoit au préalable un sédatif, des analgésiques et des antibiotiques. L'OPU peut également se réaliser de plusieurs manières mais nous nous attarderons ici à la technique la plus répandue actuellement dans les programmes commerciaux qui consiste en une ponction trans-vaginale échoguidée de follicules immatures. Elle se réalise à l'aide d'un pistolet muni d'une grande aiguille à double voie pour flusher et

gratter l'intérieur des follicules (*Figure 5*). Cette combinaison des deux actions est importante car le complexe cumulus-ovocyte est très solidaire de la paroi du follicule chez la jument. Une moyenne de 5-12 ovocytes sont récoltés par OPU (Cuervo-Arango et al 2019 ; Stout et al 2020 ; Morris et al 2018 ; Squires et al, 2020).

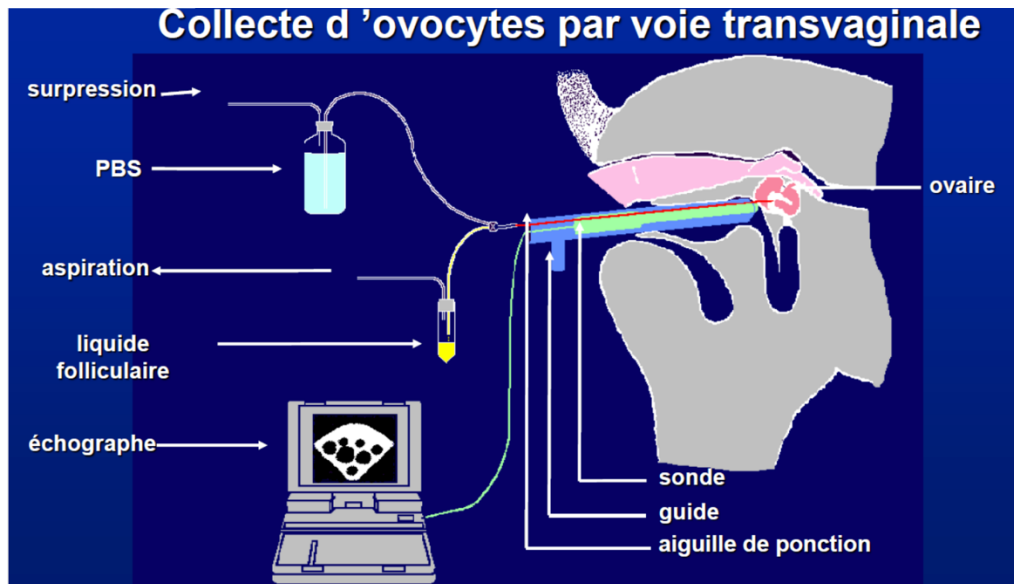


Figure 5 : OPU réalisée par voie trans-vaginale chez la jument

(source : BRUYAS J-F. , Cours Chef de centre 2017 : FIV GIFT et Clonage – d'après INRA)

Les ovocytes sont dans une majorité des cas acheminés vers un laboratoire spécialisé extérieur à la clinique où a eu lieu l'OPU. Il n'y a pas d'effet délétère décrit quant au fait de stocker les ovocytes pendant 15-18h à 20-25°C, permettant leur transfert dans un laboratoire pratiquant l'ICSI. Les ovocytes immatures récoltés doivent alors être maturés *in vitro* pendant 22 à 36h en fonction de la morphologie du cumulus (respectivement étendu ou compact) jusqu'à atteindre le stade de métaphase II. Vient ensuite l'étape de fécondation *in-vitro* où l'une des difficultés majeures rencontrées est le faible pouvoir de capacitation du sperme équin *in-vitro* (Leemans et al, 2019). L'ICSI a pour avantage de bypasser cette nécessité de capacitation en injectant directement un spermatozoïde dans l'ovocyte avec une micropipette sous microscope inversé. L'ICSI peut être réalisée avec une micropipette classique ou avec Piezo drill. La différence entre les deux méthodes d'ICSI repose sur le fait qu'avec le Piezo drill, un effet Piezo-électrique propulse un micro capillaire, avec un mouvement précis et rapide, permettant de pénétrer la membrane de l'ovocyte sans trop l'endommager. La méthode avec une micropipette classique cause une déformation de la zone pellucide de l'ovocyte et expose l'oolemme, membrane plasmique de l'ovocyte, à une pression négative pendant l'injection

(Figure 6) (Smits et al 2012). Peu de différences de résultats sont observés au niveau des taux de blastocystes obtenus (39% et 40% respectivement pour la méthode classique et le Piezo drill) mais avec une meilleure qualité de ceux obtenus par Piezo drill (Salgado et al 2018). Si la fécondation aboutie, le zygote sera encore cultivé quelques jours in vitro pour atteindre le stade de blastocyste. Enfin, le ou les embryon(s) obtenus sont transférés dans l'utérus d'une jument receveuse de manière identique à celle décrite précédemment pour le transfert d'embryon (Hinrichs 2018 ; Lazzari et al 2020 ; Galli et al 2007).

Concernant cette technique, on s'attend à des résultats d'environ 12,8 ovocytes récoltés qui vont donner une moyenne d'1,6 embryon obtenu par session d'OPU-ICSI avec un taux de gestation de la jument receveuse à 45 jours d'environ 53,4% (par embryon ré-implanté) (Tableau 3).

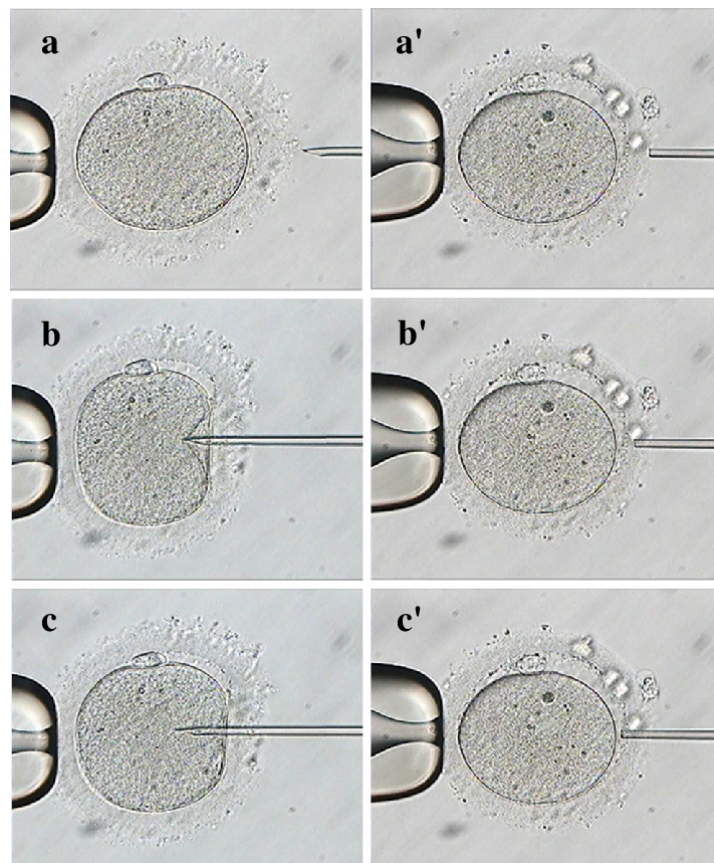


Figure 6 : traversée de la zone pellucide pour ICSI classique (à gauche) et Piezo drill (à droite) avant ICSI : (a, a') avant, (b, b') pendant et (c, c') après traversée.
(source : Hiraoka, K., & Kitamura, S. (2015). Clinical efficiency of Piezo-ICSI using micropipettes with a wall thickness of 0.625 μm . *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(12), 1827-1833.)

La technique de transfert embryonnaire est simple et aisément réalisée en routine sur le terrain contrairement à l'OPU-ICSI qui nécessite la mise en place de moyens techniques et

humains importants. Même si l'OPU se généralise au sein des cliniques vétérinaires, les manipulations *in-vitro* incluant l'ICSI restent maîtrisées par peu de laboratoires de manière efficace du fait de l'investissement financier important nécessaire pour l'acquisition du matériel, de l'importance de la qualification du personnel et des manipulations extrêmement précises et délicates qui doivent être réalisées. La possibilité de transporter les ovocytes pendant une période déterminée permet d'y remédier et rend ainsi la technique plus accessible.

3. Critères relatifs aux embryons produits

3.1 Réfrigération / Congélation

La réfrigération d'embryons équins issus de transfert embryonnaire, a permis, au cours des dernières années, de transporter les embryons récoltés vers un centre spécialisé. Le développement de techniques de réfrigération des embryons à 5°C pendant 12-24h permet ce transport sans altérer les résultats attendus concernant le taux de gestation (Squires et al, 2020). L'avantage principal en est que le transfert de l'embryon dans une jument receveuse, qui reste l'étape clé, très opérateur-dépendante, est réalisée dans des centres spécialisés avec une main d'œuvre qualifiée et un troupeau de juments receveuses important permettant d'obtenir des résultats optimaux.

Cette technique de réfrigération s'applique aux embryons issus de transfert embryonnaire classique mais également aux embryons issus d'OPU-ICSI qui sortent du laboratoire « frais », c'est-à-dire qu'ils n'ont pas été congelés, et sont envoyés vers des centres pour être transférés dans des juments receveuses au stade œstral adéquat.

La congélation est une autre technique possible pour retarder ou choisir le moment de transfert de l'embryon dans la jument receveuse. Cela a plusieurs avantages tels que la nécessité d'avoir un nombre moins important de juments receveuses (l'embryon est transféré quand la jument est au bon stade œstral), possibilité de stocker les embryons, de les importer, exporter. La congélation permet également de ré-implanter les embryons produits *in-vitro* hors période de reproduction, au cours de celle-ci. Cependant, la congélation a aussi ses inconvénients comparés aux embryons frais ou réfrigérés. Les embryons issus d'OPU-ICSI sont toujours petits, contrairement aux embryons obtenus *in vivo*, qui sont plus grands, surtout si collectés plus tard. Les taux de gestation pour les petits embryons congelés (<300µm) peuvent atteindre les 50-65%. Quant aux embryons de taille plus importante (>300µm), le taux de gestation après

congélation reste très faible aux alentours de 20-30% (Squires et al 2016). Par ailleurs, la super-ovulation n'étant pas efficace chez la jument, le nombre d'embryons issus de transfert embryonnaire classique reste faible lors de chaque récolte (0,5 à 0,8 embryon par récolte en moyenne) (McCue et al, 2015). L'usage de la congélation tel qu'il est décrit dans l'espèce bovine pour les embryons surnuméraires, issus d'une récolte embryonnaire, et pour qui une receveuse adéquate n'est pas disponible, ne s'applique pas couramment à l'espèce équine, sauf si de petits embryons sont récoltés.

Les différentes techniques de congélation d'embryons, que ce soit la congélation lente (utilisation de glycérol comme cryoprotecteur puis passage par paliers de température et de temps jusqu'à être plongés dans l'azote liquide) ou la vitrification (quantités plus importantes de cryoprotecteurs, ici toujours glycérol, et descente de température beaucoup plus rapide pour être plongé dans l'azote liquide ; technique de congélation très rapide qui permet de prévenir la formation de cristaux de glace)(Squires et al 2016), permettent une congélation efficace des embryons.

Dans l'une ou l'autre de ces techniques de congélation, la taille des embryons reste le facteur limitant de réussite. De bons résultats sont obtenus en ce qui concerne les embryons de petite taille. Dans un programme commercial de transfert embryonnaire, Lascombes and Pashen (2001) ont utilisé la méthode de congélation lente pour 43 embryons de 6-6,5 jours (<220um) avec des taux de gestation de 56%. La difficulté de cette méthode réside dans le fait que l'obtention d'embryons de la taille adéquate n'est pas aisée, que la congélation prend du temps (1-2h) et qu'elle nécessite du matériel onéreux. Dans l'étude d'Eldridge-Panuska (2005), des embryons de <300um et de >300um ont été vitrifiés, stockés puis transférés dans des juments receveuses. Les résultats concernant les embryons de petite taille (<300um) varient entre 46% et 60% de taux de gestation alors que les embryons de grande taille (>300um) n'ont produit aucune gestation (n=19). Les embryons de taille plus importante ne supportent pas bien le processus de vitrification contrairement aux embryons de <300um correspondant à des embryons récoltés 6-6,5 jours après ovulation de la jument donneuse.

Concernant les embryons produits in-vitro, ils sont pour la plupart cultivés pendant 5 à 9 jours en laboratoire avant d'être transférés dans une jument receveuse ou congelés (nécessite un stade auquel l'embryon a une densité et texture uniforme, un nombre défini de cellules trophoblastiques, entre 85% et 100% de masse embryonnaire viable) (Lazzari et al 2020). La congélation de ces embryons est plus efficace et moins coûteuse du fait que plusieurs embryons sont disponibles en même temps pour le processus. D'après Galli et al (2007), un taux de gestation de 69% a été atteint suite au transfert d'embryons issus d'OPU-ICSI congelés

lentement au sein de sa société commerciale, alors que dans la littérature des taux de gestation autour de 53,4% sont rapportés (Lazzari et al, 2020).

Le principal avantage de pouvoir réfrigérer les embryons est de pouvoir les transporter vers des centres spécialisés dans la ré-implantation dans les juments receveuses. Cette étape est opérateur-dépendante et influence fortement les résultats des taux de gestation.

Pour la congélation, outre le fait que cela permet également de transporter les embryons congelés vers ces centres, la technique permet un management plus aisé du troupeau de jument receveuses. Les embryons sont décongelés lorsqu'une jument au stade œstral souhaité est disponible. Sans congélation, un nombre important de juments receveuses doit être régulièrement suivi par échographie pour que l'une d'entre elles soit prête à recevoir l'embryon le jour de la récolte.

Cependant, le principal facteur limitant de la congélation reste le fait qu'elle n'est efficace que pour des embryons de petite taille (<300um). Elle s'applique donc plus aisément aux embryons produits in-vitro qu'aux embryons produits in-vivo chez qui un suivi échographique beaucoup plus rapproché de la jument donneuse est nécessaire pour déterminer le moment exact de l'ovulation et donc la récolte à 6-6,5 jours après ovulation pour avoir un embryon de taille compatible avec la congélation.

3.2 Synchronisation des juments receveuses

La disponibilité en juments receveuses compatibles avec le stade œstral de la jument donneuse est un des points critiques pour le succès d'un programme commercial de transfert embryonnaire dans le but de permettre l'installation et le maintien de la gestation après transfert de l'embryon (Stout et al 2006). Cette disponibilité en juments est importante lorsqu'on travaille avec des embryons frais mais l'est bien moins lorsqu'ils sont congelés puisqu'on adaptera le jour de la décongélation à la receveuse.

L'utérus de la jument receveuse doit permettre à l'embryon de s'y implanter. Il est donc primordial que suite à l'ovulation, un corps jaune sécrète de la progestérone au moment où l'embryon est transféré dans l'utérus de la receveuse.

Les embryons équins produits in-vivo, issus de transfert embryonnaire, sont capables de supporter des degrés assez larges d'asynchronisme utérin entre la jument donneuse et la jument receveuse. Une ovulation de la part de la receveuse entre 0 et 5 jours suivant l'ovulation de la donneuse compromet moins la survie de l'embryon qu'une ovulation entre 0 et 2 jours avant la

donneuse (Wisher et al 2012 ; Jacob et al, 2012). De plus, la longueur de l'œstrus a un effet positif sur la probabilité de gestation après transfert embryonnaire. Cela est probablement dû au fait que la durée du priming par les œstrogènes influence la capacité de l'endomètre à créer un environnement favorable à la survie de l'embryon (Cuervo-Arango et al 2019).

Concernant les embryons issus d'OPU-ICSI, ils ont des besoins en termes d'environnement utérin idéal différents de ceux des embryons conçus in-vivo du fait qu'ils sont transférés à un stade moins avancé (moins de cellules et se comportent comme des embryons de 5-6 jours).

L'étude de Cuervo-Arango et al (2019) vise à déterminer les caractéristiques du cycle œstral de la jument receveuse qui vont favoriser la mise en place et le maintien de la gestation après transfert de l'embryon produit in-vitro. L'étude repose sur un total de 258 embryons issus de transfert embryonnaire classique et de 264 embryons congelés issus d'OPU-ICSI. Le transfert des embryons a été effectué dans des receveuses entre 4-9 jours post-ovulation pour les embryons in-vivo et entre 3-6 jours post-ovulation pour les embryons in-vitro. Les taux de gestation lors de la première échographie de contrôle (12 jours) et celui plus tardif (juments gestantes au 1^{er} janvier de l'année suivant le transfert) sont respectivement de 92,3% et 82,4% pour les embryons in-vivo et de 72,3% et 59,1% pour les embryons produits in-vitro. Le jour post-ovulation auquel se trouve la receveuse influence significativement la probabilité de gestation à J12 pour les embryons produits in-vitro mais pas pour les embryons produits in-vivo. Pour les embryons issus d'OPU-ICSI les receveuses à J4 post-ovulation ont de meilleurs résultats sur le taux de gestation (69%) que celles à J3 (53,2%), J5 (41,3%) et J6 (23,1%). De plus, le jour post-ovulation de la receveuse influence également la taille de la vésicule embryonnaire 7 jours plus tard. Le transfert dans une receveuse à J4 résulte en une vésicule plus grande lors du contrôle échographique à 12 jours que lors d'un transfert dans une receveuse à J3 ou J5. Les échecs de gestation après transfert d'embryons produits in-vitro sont associés à une faible taille des vésicules embryonnaires lors du premier contrôle à J12. Le développement de l'embryon après transfert est lié au stade œstral de la receveuse et influence donc le taux de gestation qui en résulte. A l'opposé, les embryons produits in-vivo ont une croissance plus lente lors des 4 premiers jours après transfert dans des receveuses à J4 qu'à n'importe quel autre jour (J5, J6, J7, J8) sans toutefois influencer le taux de gestation futur. L'hypothèse retenue est que l'embryon équin est capable de ralentir sa croissance jusqu'à ce que l'utérus arrive à un stade plus favorable pour reprendre sa croissance.

La fenêtre d'asynchronisme utérin assez large entre la jument donneuse et la jument receveuse pour les embryons produits in-vivo, est confirmé par cette étude, dans laquelle aucun

changement significatif entre les taux de gestation d'embryons à J8 transférés dans des receveuses entre J4 et J9 post-ovulation n'est observé. Concernant les embryons produits in-vitro, un asynchronisme utérin moins important est toléré. En effet, un intervalle de 24h peut influencer le taux de gestation de manière considérable (cf taux de gestations pour les receveuses à J4, J5, J6 après ovulation). Cela peut être le reflet d'une qualité des embryons produits in-vitro moindre que celles des embryons produits in-vivo (pourcentage plus élevé de cellules apoptotiques) ou d'une moindre capacité de leur part à s'adapter à un environnement utérin sub-optimal (moins de mitochondries ou moindre expression de gènes importants pour le développement) (Cuervo-Arango et al 2019).

La tolérance d'asynchronisme utérin entre jument donneuse et receveuse lors d'un programme de transfert embryonnaire classique avec production d'embryons in-vivo permet un management du troupeau de juments receveuses plus aisé comparé à celui nécessaire pour les embryons produits in-vitro. Cependant, dans l'étude de Cuervo-Arango et al (2019) tous les embryons produits in-vitro ont été cryopréservés, ce qui entraîne une diminution de qualité des embryons (Pérez-Marin et al 2018) mais un management des receveuses plus aisé. Lorsque l'une d'entre elles est à un stade utérin adapté pour recevoir l'embryon (J4 dans ce cas), on décongèle ce dernier et on le transfert directement dans la receveuse.

4. Critères relatifs à la jument donneuse

4.1 Carrière sportive

L'une des principales raisons d'opter pour les techniques de transfert embryonnaire ou de ponction ovocytaire est le souhait de conserver la carrière sportive de la jument en parallèle de sa carrière de reproduction. La jument ne devant pas mener sa gestation à terme, les deux techniques conviennent pour cette raison. Toutefois, il est intéressant de savoir si le fait de continuer à soumettre la jument à un entraînement sportif pendant la période où on souhaite faire du transfert embryonnaire ou de l'OPU peut influencer sa production d'embryons.

En ce qui concerne le transfert d'embryons, des contraintes telles que le suivi gynécologique régulier, l'insémination puis la collecte de l'embryon ne peuvent être évitées. Celles-ci nécessitent un investissement du propriétaire qui doit soit faire appel à un vétérinaire venant sur place ou emmener la jument dans un centre de reproduction. Si les juments peuvent

continuer de travailler quotidiennement il faut savoir que plusieurs facteurs peuvent entrer en compte et potentiellement perturber leur cycle ainsi que la production d'embryons.

L'effet de l'exercice fait partie de ces facteurs. En effet, le taux de récoltes d'embryons positives est moindre dans les groupes de juments exercées (30min d'exercice quotidien) que chez les juments au repos (43% vs 67%) d'après une étude de Smith et al. (2012). Ces résultats sont en accord avec d'autres études qui décrivent, avec l'activité physique, une chute dans la récolte d'embryons (34% chez les juments exercées et 63% chez les juments contrôle) (Mortensen et al 2009). Dans cette deuxième étude, les juments étaient également soumises à des conditions d'humidité et de température plus élevées que dans l'étude de Smith et al (2012). Il semblerait aussi que l'exercice affecte plus la période de conception que celle du développement embryonnaire précoce puisque les résultats ne sont pas meilleurs si la jument est mise au repos après son ovulation, et ce, jusqu'au transfert (Smith et al 2012).

Le mécanisme exact menant à cette baisse dans le taux d'embryons récoltés chez les juments soumises à l'exercice n'est ici pas clairement identifié entre le stress induit par l'exercice en lui-même ou le potentiel stress thermique induit par l'exercice (Smith et al (2012)).

L'étude de Smith et al (2012) s'intéresse également à la perfusion vasculaire de la paroi du follicule pré-ovulatoire. Elle est mesurée via échographie transrectale avec Doppler et est, chez les juments, positivement corrélée au recouvrement d'un embryon. Dans l'étude, chez les juments exercées, on observe une perfusion vasculaire de cette paroi du follicule pré-ovulatoire moins importante, le jour précédant l'ovulation, que chez les juments au repos.

On constate donc que l'exercice semble défavorable pour l'obtention d'un embryon. Une des hypothèses avancées serait que l'exercice puisse causer une perturbation générale du développement et de la maturation folliculaire. Une combinaison de mécanismes, tels que l'augmentation de cortisol circulant et la diminution des concentrations plasmatiques de LH, semblerait être à l'origine de cette perturbation reflétée par la moindre perfusion vasculaire de la paroi du follicule pré-ovulatoire (Smith et al 2012).

D'autre part, si la jument ne reste pas sur place entre l'insémination et la récolte de l'embryon, celle-ci devra être transportée. La réponse au stress induit par le transport chez la jument est le plus marqué pendant le dioestrus ou l'anoestrus saisonnier. La période entre l'insémination et la collecte de l'embryon, correspondant au dioestrus, est donc critique et pourrait expliquer les moins bons résultats obtenus chez les juments qui voyagent mal et seraient déplacées à ce moment (Tischner et al 2006).

Par ailleurs, la saison de reproduction est souvent la même que la saison de compétition pour les juments donneuses ce qui peut compliquer leur management. Il est en effet plus complexe d'obtenir de bons résultats en transfert embryonnaire hors période de reproduction du fait que la jument est une poly-oestrienne saisonnière. La synchronisation de la donneuse avec une jument receveuse sera donc bien plus aisée pendant la saison de reproduction. On constate donc que le transfert embryonnaire est efficace chez les juments de sport et leur permet de ne pas devoir arrêter leur carrière sportive en parallèle de leur carrière reproductive. Cependant, un allègement du travail pendant la période de transfert ne peut être que bénéfique. Les éleveurs doivent en être conscients. De plus, si une jument échoue à produire des embryons à plusieurs reprises successives sans qu'une anomalie du tractus reproducteur ne soit clairement visible, il faut penser au fait que mis à part un problème de fertilité, l'exercice, le stress psychologique ou physique pendant la période péri-ovulatoire, qui est la plus cruciale, et entre l'insémination et la collecte de l'embryon, peuvent en être la cause. Il faudra donc lui apporter un management en conséquence. Le transfert est une technique qui peut fonctionner de manière très efficace tout comme échouer pour certaines juments. L'éleveur doit également être flexible quant à la période de réalisation du transfert embryonnaire, savoir suivre le cycle naturel de la jument et ne pas être arrêté sur un programme de concours fixe avec des périodes imposées pour la reproduction (Campbell et al 2014).

Pour l'Ovum Pick Up, très peu d'études ont été réalisées. La technique reste encore récente dans les programmes commerciaux et la standardisation des résultats obtenus en fonction de la carrière sportive n'est pas aisée. De plus, cette technique est souvent pratiquée hors saison de reproduction, d'octobre à mars, et donc souvent hors période de compétition. Il est néanmoins admis que les jeunes juments avec « stress injury » donnent des taux de gestation moindres que les juments sous management de poulinière (Frank et al 2019).

Toutefois, Mortensen et al (2010) ont mis en évidence la production de *heat shock proteins* dans des blastocystes équins après qu'ils aient été exposés à de hautes températures in vitro, ou après exercice de la donneuse in vivo. L'exposition à ces températures élevées (42°C), tardivement dans le milieu de culture in vitro, a résulté en des taux de maturation nucléaire des ovocytes réduits (44% contre 68% dans le groupe contrôle pour 2h d'exposition). De plus, cette exposition tardive à des températures élevées a réduit le développement des zygotes aux stades morula et blastocyste après ICSI (20% contre 34% pour le groupe contrôle). Ces concentrations en *heat shock proteins* ont été mesurées par RT-PCR dans les blastocystes. Par ailleurs, des

concentrations plus élevées en ces protéines sont retrouvées dans les embryons produits in-vitro et dans les embryons produits in-vivo de moins bonne qualité.

L'activité sportive de la jument donneuse semble ne pas avoir beaucoup d'influence sur les embryons équinés produits in vitro puisque tout le processus de fertilisation a lieu hors de la jument mais on constate un manque de données quant au nombre d'ovocytes récoltés chez une jument donneuse soumise à un entraînement sportif ou non. Cependant, les concentrations plus élevées en *heat shock proteins* retrouvées chez les embryons produits in vitro comparés à ceux produits in vivo suggèrent une réponse à une agression environnementale. Cela pourrait expliquer les résultats inférieurs, en termes de production d'embryons à partir d'un ovocyte, dans un programme d'OPU-ICSI (1,6 embryon pour 12,8 ovocytes récoltés en moyenne) comparé à un programme de transfert embryonnaire classique (un ovocyte donnera un embryon) (Mortensen et al 2010).

4.2 Âge

Chez la jument, on observe une diminution de la fertilité dès l'âge de 10ans et une chute de l'activité ovarienne au-delà de 20ans. Plus la jument vieillit et plus le nombre de follicules disponibles diminue du fait de l'atrésie et des ovulations successives. La déplétion de la réserve ovarienne, identique à ce qui est observé chez la femme, est donc le facteur limitant principal chez la jument vieillissante (Carnevale et al 2020).

En ce qui concerne le transfert embryonnaire, l'âge pourrait avoir une influence sur l'intervalle inter-ovulatoire, le taux d'embryons récoltés et le taux de gestation (Marinone et al, 2015). L'intervalle inter-ovulatoire varie de 16 à 25 jours avec une moyenne de 22 jours. Il est plus long chez les juments plus âgées du fait d'une phase folliculaire plus longue associé à des concentrations en œstrogène et en inhibine circulantes plus faibles que chez les jeunes juments. La durée inter-ovulations est le facteur qui va limiter le nombre de récoltes réalisables chaque année. Plus elle est allongée et moins on aura de cycles exploitables sur la saison de reproduction de la jument. Le taux d'ovulations multiples est également influencé par l'âge chez la jument, ce taux augmentant avec la jument qui avance en âge (3,4 fois plus chez les juments âgées que chez les pouliches de 3-4 ans) (Marinone et al, 2015).

L'avancement de l'âge maternel est corrélé avec une diminution de l'activité reproductrice. D'après une étude prospective de Hanlon et al. (2012), chaque année de plus

prise par la jument diminue le taux de gestation d'un facteur de 0,94 lors du premier cycle de la saison et de 0,91 en fin de saison. Les juments âgées de plus de 14 ans nécessitent plus de temps (plusieurs cycles parfois nécessaires) pour obtenir un embryon que les juments de moins de 9 ans (Marinone et al, 2015). Les résultats de l'étude de Marinone et al (2015), comportant 1207 récoltes, montrent que l'âge a un effet significatif négatif sur le taux d'embryons récoltés, avec de moins bons résultats pour les juments âgées (>13ans). Dans cette étude le choix du jour de la récolte est lié au fait qu'aucune d'entre elles n'avait lieu le dimanche.

Théoriquement, la qualité d'embryons produits par OPU-ICSI de juments âgées devrait être inférieure à celle de jeunes juments du fait que l'âge influence principalement la qualité de l'ovocyte (Carnevale et al, 1995).

De nombreuses études ont été réalisées pour déterminer l'influence de l'âge maternel sur la probabilité d'obtenir une gestation via la technique d'OPU-ICSI. D'après l'étude rétrospective de Cuervo-Arango et al. (2019), réalisée en 3ans sur un panel de 473 juments, incluses une seule fois dans l'étude, et soumises à l'OPU (Université d'Utrecht, Pays-Bas) et ICSI (Avantea, Italie), l'âge influence négativement le nombre d'ovocytes récoltés. Les juments étaient ponctionnées lorsqu'un minimum de 15-20 follicules d'au moins 1cm de diamètre étaient présents sur les ovaires. Les ovocytes récoltés, envoyés chez Avantea, en Italie, où ils sont soumis à l'ICSI. Les blastocystes, identifiés 6 à 8 jours suivant l'ICSI, ont été soumis à la cryogénisation et renvoyés à l'Université d'Utrecht aux Pays-Bas. Cette étude a montré que l'augmentation de l'âge des juments est associé avec une diminution du nombre de follicules aspirés (<20) et un nombre d'ovocytes récoltés moindre (<10) que chez de jeunes juments (<20ans). En ce qui concerne le pourcentage de clivage des zygotes après ICSI et le nombre de blastocystes obtenus par ovocyte injecté, ils ne sont pas influencés par l'âge de la jument. D'un autre côté, l'étude menée par Altermatt et al. (2009) n'a quant à elle pas démontré d'influence significative liée à l'âge. Cette étude compare les compétences de développement embryonnaire suite à l'ICSI entre jeunes (4-9ans ; n=22) et vieilles (>20ans ; n=15) juments après OPU-ICSI. Aucune différence significative au niveau de la probabilité de clivage et de la formation de blastocystes n'a été démontrée. Cependant, le nombre de juments incluses dans l'étude reste assez faible. De plus, les ovocytes étaient issus de follicules pré-ovulatoires, et de ce fait partiellement maturés in vivo.

On constate que l'âge de la donneuse influence essentiellement le nombre de follicules aspirés et donc le nombre moyen d'ovocytes récoltés. Sachant que la qualité de l'ovocyte est le reflet de sa capacité à être fertilisé et à générer un embryon viable, il n'y a pas de caractéristique

morphologique de l'ovocyte associée à l'âge qui expliquerait de potentiels moins bons résultats (Carnevale et al 2010). L'hypothèse d'une diminution de l'activité mitochondriale et d'une augmentation de l'incidence de chromosomes anormaux est une des causes possibles d'altérations structurelles et fonctionnelles des ovocytes (Losinno, 2006; Rambags, 2007). L'âge de la donneuse ne semble pas impacter la fertilisation in vitro, la capacité des ovocytes récoltés pour produire des embryons, le pourcentage de blastocystes obtenus par ovocyte injecté ou le taux de division des blastocystes.

Concernant la technique d'OPU-ICSI, on constate que l'âge plus avancé de la donneuse est associé à une diminution du nombre de follicules aspirés, et de ce fait, un nombre d'ovocytes obtenu par jument moindre. Cependant, l'âge de la jument n'influence pas les manipulations in-vitro telles que le taux de fertilisation des ovocytes et le taux de division des blastocystes. L'augmentation de l'âge de la donneuse tend donc à être associé avec une réduction du nombre de blastocystes obtenus par jument et un plus grand nombre de tentatives pour obtenir une gestation du fait du moindre nombre d'ovocytes obtenus. L'avantage de la technique se trouve donc majoritairement dans le fait que les ovocytes récoltés, même s'ils sont moins nombreux, ne sont pas soumis à des facteurs négatifs associés à l'âge de la jument lors des processus in vitro.

4.3 Fertilité

Les principales causes d'infertilité chez la jument sont l'endométrite et l'endométriose ainsi qu'une semence de mauvaise qualité et une mauvaise synchronisation saillie/ovulation.

L'endométrite est une inflammation utérine qui reste localisée à l'endomètre et qui n'induit pas ou peu de signes cliniques (sécrétions utérines plus ou moins abondantes) mis à part l'infertilité qu'elle induit. Les causes d'endométrite sont multiples (« physiologique » mais persistante ou infectieuse) (Bruyas, 2013). Après une saillie ou une insémination, une réponse inflammatoire physiologique de l'endomètre a lieu (afflux de neutrophiles, sécrétion de cytokines et libération de prostaglandines) (Morris et al, 2020). Lors de l'œstrus, cette inflammation doit se résoudre de manière spontanée de par la vidange de l'utérus du fait des contractions du myomètre (naturellement via le col et le vagin) et minoritairement par le drainage lymphatique (Morris et al, 2020). Cependant, chez certaines juments, cette inflammation persiste, s'auto-entretient et peut se compliquer en endométrite infectieuse. Cette dernière est causée par des agents pathogènes qui se rencontrent dans l'environnement classique

du cheval (*Klebsiella p.*, *Streptococcus sp.*, *E. Coli*,...) et fait souvent suite à une prédisposition de la jument de par une mauvaise conformation vulvaire, de l'anneau vestibulaire, du vagin ou du col (Bruyas 2013).

Cette inflammation persistante mène à la mort de l'embryon lors de son arrivée dans l'utérus (6-7 jours post-ovulation). En effet, si la donneuse souffre d'endométrite, le milieu utérin pour accueillir l'embryon n'est pas favorable (présence de cellules inflammatoires telles que PMN, cytokines, prostaglandines $\text{PGF2}\alpha$, causant une lutéolyse précoce) et la probabilité d'obtenir un embryon viable de bonne qualité devient moindre (LeBlanc et al, 2009 ; Morris et al, 2020). Des embryons sont régulièrement récoltés de juments atteintes d'endométrite, et ce même avec un liquide de récolte très sale, mais leur développement dans l'utérus de la jument receveuse reste difficile, et ce malgré le nombre de lavages auquel ils sont soumis (Manual of Equine Reproduction, 3rd edition). Le taux de gestation chez les juments avec endométrites sévères peut n'atteindre que 21% (Canisso et al 2016).

D'après l'étude de Günay et al. (2020) l'endométrite a, par ailleurs, une influence sur la vascularisation et l'épaisseur de la paroi du follicule pré-ovulatoire. En comparant un groupe de juments saines et un groupe de juments atteintes d'endométrite deux jours avant l'ovulation, on se rend compte que chez les juments atteintes d'endométrite le follicule pré-ovulatoire est moins vascularisé et sa paroi est plus fine. Or, comme vu précédemment, la perfusion vasculaire de la paroi du follicule pré-ovulatoire est positivement corrélée au fait d'obtenir un embryon.

On comprend donc que cette pathologie affecte de manière considérable les juments présentées pour un programme de transfert embryonnaire en diminuant la probabilité d'obtenir un embryon de la jument atteinte (Bruyas 2013 ; LeBlanc et al 2009).

L'endométrieose qui correspond à une endométrite chronique dégénérative est une autre cause d'infertilité chez la jument. Elle fait souvent suite aux inflammations utérines précédentes et correspond au remplacement des glandes endométriales par du tissu cicatriciel, diminuant la surface fonctionnelle de l'utérus, tant en surface qu'en profondeur (Hoffman et al, 2009 ; Bruyas, 2013). L'embryon dispose donc de moins de surface utérine fonctionnelle pour se nourrir par imbibition lors de sa phase de mobilité. Cela explique le fait que ces lésions dégénératives, ne pouvant être traitées, compromettent fortement la fertilité de la jument. Il est donc primordial de traiter les endométrites à temps.

Une des façons de contourner ces phénomènes serait le recours à l'OPU-ICSI. En effet, pour être soumise à l'OPU, la jument doit disposer de plusieurs follicules immatures sur ses ovaires et pas forcément de follicules pré-ovulatoires. De ce fait, l'influence de l'endométrite sur la mauvaise perfusion vasculaire du follicule pré-ovulatoire n'intervient pas et les ovocytes,

qui proviennent de follicules immatures vont maturer *in vitro*, sans subir ces dommages. De plus, l'embryon étant produit *in vitro*, aucun contact avec l'utérus de la jument atteinte d'endométrite n'a lieu. Avec cette technique, les problèmes majeurs d'infertilité rencontrés fréquemment lors de la mise à la reproduction de la jument peuvent être évités. Cependant, cette technique présente aussi ses désavantages et ne permet pas de résoudre toutes les situations problématiques rencontrées (jument avec faible croissance folliculaire par exemple) (Morris et al 2020).

5. Critères relatifs à l'étalon

5.1 Semence (frais, réfrigéré, congelé)

Différents types de semence sont disponibles quelles que soient les techniques. La semence d'un étalon peut être utilisée directement pour l'insémination en frais (IAF), stockée pendant 24-48h entre 5-8°C, permettant notamment le transport de la semence, pour une insémination en réfrigéré (IAR) ou congelée dans l'azote liquide pour une durée indéterminée et utilisée au besoin lors d'insémination en congelé (IAC). L'insémination artificielle en semence fraîche (IAF) et/ou réfrigérée (IAR) offre de meilleurs résultats (44%-54% de récoltes avec au moins un embryon) dans les programmes de transfert embryonnaire que la semence congelée (IAC) (38% de récoltes avec au moins un embryon) (Panzani et al 2014) et permet un management plus souple de la jument donneuse puisque la durée de survie du sperme frais ou réfrigéré est bien supérieure à celle du sperme congelé dans le tractus génital de la femelle (respectivement 48h, 24h et 12h). En effet, lors de l'insémination des mêmes juments avec différents types de semence de trois étalons (frais, réfrigéré, congelé) lors de plusieurs cycles, les résultats montrent un meilleur taux de gestation avec les semence fraîche et réfrigérée plutôt que congelée (respectivement 76%, 65% et 56%)(Jasko et al 1992).

Cuervo-Arango et al (2018) ont cherché à mettre en évidence une influence du type de semence utilisée sur la taille de la vésicule embryonnaire lors de la récolte et aussi sur le taux de gestation qui en découle. Les vésicules de taille moins importante lors de la récolte à un jour déterminé mènent à de moins bons taux de gestation (Cuervo-Arango et al, 2018). Leur étude incluait un nombre total de 179 embryons séparés en quatre groupes différents en fonction de la semence utilisée pour inséminer la jument donneuse (fraîche vs congelée) et en fonction du jour de la récolte (récolté à J8 (IAC) – J8,5 (IAC) – J8,5 (IAF) – J9 (IAC)). Il s'est avéré que le

type de semence n'a pas du tout influencé la taille des embryons lors des récoltes. D'un autre côté, l'âge de l'embryon et de ce fait le jour de la récolte a influencé la taille des embryons. Ceux qui ont été récoltés à J8 étaient de taille inférieure à ceux récoltés à J8,5 ou à J9. C'est donc le délai entre l'insémination et le jour de la récolte qui influence la taille de la vésicule embryonnaire plutôt que le type de semence utilisée.

Concernant l'OPU-ICSI, un seul spermatozoïde est nécessaire pour l'injection intracytoplasmique. Des données comparant l'utilisation de différents types de semences ne sont actuellement pas disponibles pour cette technique.

Il semble donc que le choix du type de semence influence peu les taux de gestation chez la jument. C'est principalement le délai entre le moment où a eu lieu l'insémination par rapport à l'ovulation et le jour de la récolte de l'embryon qui influencent le plus la taille de ce dernier et de ce fait les gestations qui en découlent lors de programme de transfert embryonnaire.

5.2 Fertilité

Les étalons ont communément un taux de conception par cycle plus faible que dans les autres espèces domestiques tels que les bovins. Cette différence est principalement dû au fait qu'ils sont essentiellement sélectionnés sur leurs capacités sportives et non sur leur fertilité (Griffin et al, 2019). D'autre part, chez toutes les espèces, la congélation entraîne une diminution de mobilité des spermatozoïdes, mais certains étalons ont un sperme qui résiste mieux à la congélation que d'autres (Griffin et al, 2019).

Malgré ces exceptions de variations de fertilité entre différents types de semences d'un étalon, la principale variation de fertilité est inter-étalons. Le degré de variation dans la morphologie des spermatozoïdes entre étalons est bien plus important (22-79% de variation avec une moyenne de 38% d'après l'étude de Love et al 2000) que celle retrouvée chez un étalon au cours de la saison de reproduction (8-56% avec une moyenne de 20%). Ces résultats se sont basés sur le pourcentage de spermatozoïdes normaux, anomalies de la tête, anomalies de la pièce intermédiaire ou de la queue comme prédicteurs significatifs de la fertilité. Ces paramètres influencent directement le taux de succès de gestation de la jument.

D'après l'étude de Cuervo-Arango et al (2019), le taux de réussite pour obtenir un embryon issu d'OPU-ICSI varie entre 7% et 100% en fonction de l'étalon. Dans cette étude, uniquement de la semence congelée a été utilisée.

L'analyse du sperme de l'étalon avant son utilisation pour inséminer la jument permet d'avoir une indication de sa fertilité et l'influence sur le taux de gestation de la jument. Lors d'un programme de transfert embryonnaire, l'insémination de la donneuse avec de la semence de pauvre qualité diminue directement les chances d'obtenir un embryon lors de la récolte (Stout et al 2010). Concernant l'OPU-ICSI, elle permet l'utilisation de semence de faible qualité ou disponible en très faible quantité (étalons morts) du fait qu'un seul spermatozoïde est sélectionné. La sélection d'un spermatozoïde morphologiquement normal se fait après centrifugation discontinue de gradient de densité (Colleoni et al 2011). Ce spermatozoïde sera injecté directement par l'opérateur dans l'ovocyte in-vitro (Lazzari et al 2020).

L'important dans les différents programmes de reproduction assistés décrits ici est d'informer le propriétaire de la jument des taux de succès d'obtenir un embryon en fonction de l'étalon et du type de semence choisie (>70% avec du frais contre 32-47% avec du sperme réfrigéré ou congelé en transfert embryonnaire ; variabilité importante (7-100%), avec une moyenne de 77% pour l'OPU-ICSI avec du sperme congelé) (*Tableau 4*).

6. Résultats attendus

Les résultats concernant les taux de gestations dépendent fortement de la gestion de l'entièreté du processus de reproduction assistée. Le suivi gynécologique approprié, du sperme de bonne qualité, des embryons de bonne qualité, une synchronisation donneuse-receveuse sont parmi les critères primordiaux pour assurer le maintien d'une gestation après transfert de l'embryon.

Les résultats auxquels on peut s'attendre après transfert embryonnaire non chirurgical d'embryons récoltés in-vivo sont aux alentours de 71% dans la littérature (Card et al 2018). Par ailleurs, les résultats communiqués par des centres de reproduction spécialisés varient entre 71% et 80% (BLH, Keros) à J50.

D'après une étude de Lazzari et al (2020) qui a analysé les résultats des gestations après transfert de 760 embryons congelés issus d'OPU-ICSI sur une période de 3 ans, les taux de gestations étaient similaires sur les trois saisons de reproduction. Les juments receveuses ont été contrôlées à 17, 30 et 50 jours, après transfert de l'embryon, avec des moyennes de taux de gestations de 70,9%, 63,2% et 53,4% respectivement. Par ailleurs, les résultats montrent des taux de gestations similaires à J17 concernant les embryons in-vitro congelés à J7 ou J8 (69% et 73%) mais de moins bons résultats concernant les embryons in-vitro congelés à J9 (52% à

62%). A J50 les embryons congelés à J7 et J8 maintiennent un taux de gestation de 60% alors que ceux congelés à J9 subissent plus de pertes avec une moyenne de 38% de gestations à J50 (Lazzari et al, 2020).

On constate donc que les résultats en termes de taux de gestation, par embryon obtenu, sont supérieurs en programme de transfert embryonnaire classique qu'en OPU-ICSI. Cette différence peut être en partie expliquée par le fait que dans les résultats de l'étude de Lazzari et al (2018) tous les embryons ont été congelés. Ces manipulations supplémentaires des embryons peuvent affecter leur capacité à se développer correctement après transfert dans l'utérus de la jument receveuse. De plus, le transfert de l'embryon dans l'utérus de la jument receveuse est une étape opérateur-dépendante, ce qui peut expliquer les différences en termes de résultats entre différents centres.

Un des phénomènes pouvant survenir après transfert d'embryons issus d'OPU-ICSI chez la receveuse et pouvant compromettre sa gestation est le phénomène *d'embryo splitting*. En effet, après avoir transféré un embryon unique dans l'utérus de la jument receveuse, celui-ci va mener, dans certains cas, à une gestation gémellaire de jumeaux monozygotiques. Ce phénomène aurait une incidence de 1,6% après transfert d'un embryon congelé issu d'OPU-ICSI et moins de 0,4% lors de transfert embryonnaire classique.

L'hypothèse retenue par Dijkstra et al (2020) est que lors de la congélation, l'embryon « s'effondre » et la masse cellulaire interne va se fixer également sur la paroi interne opposée de l'embryon, résultant en un développement de deux masses cellulaires internes lors de la ré-expansion de l'embryon une fois décongelé et ré-implanté. Une autre hypothèse est qu'une partie de la masse cellulaire interne va se hernier à travers l'ouverture créée par le Piezo drill, dans la zone pellucide, pendant l'ICSI. Le second embryon peut alors rester attaché au premier ou en être complètement séparé lors de son développement dans l'utérus de la receveuse. Cette seconde hypothèse permettrait de détecter le deuxième embryon relativement tôt lors du développement dans l'utérus de la jument. Elle était moins probable dans les cas rapportés par Dijkstra et al (2020), du fait que lors des premiers contrôles échographiques une seule vésicule embryonnaire était visible. Une troisième hypothèse de Dijkstra et al (2020) est que l'ICSI et/ou les milieux et conditions de culture in vitro affectent directement le développement de l'embryon et causent la formation de deux masses cellulaires internes distinctes au sein de la zone pellucide, ou la séparation de l'épiblaste à un stade plus avancé, et donc la formation de deux disques embryonnaires.

Un suivi régulier de la gestation de la jument receveuse est important pour détecter toute anomalie, telle que l'embryo splitting, lors du développement embryonnaire. Plus tôt une deuxième vésicule embryonnaire est détectée, au plus vite une intervention peut être envisagée pour y remédier. En effet, le développement d'une gestation chez la jument requiert l'entière surface de la surface du placenta pour un poulain. La placentation épithélio-choriale ne permet pas d'assurer les apports suffisants nécessaires au développement de deux poulains. Dans la majorité des cas un avortement aura lieu (64,5% des gestations gémellaires d'après Wolfsdorff et al 2009). Si la jument parvient à mener sa gestation à terme, elle aboutit généralement à la naissance de poulains faibles, de petite taille, ne performant par la suite pas dans le sport. On comprend donc l'intérêt de détecter la gestation gémellaire à un stade le plus précoce possible et de l'interrompre. Pour cela, plusieurs techniques sont envisageables, avec des taux de réussite variables. Avant la fixation de l'embryon dans l'utérus, soit avant J17, si deux vésicules embryonnaires sont visibles, l'écrasement de la plus petite par voie trans-rectale peut être envisagée avec des taux de maintien de gestation de l'autre vésicule excédant les 90% (Wolfsdorff et al, 2009). Après fixation de l'embryon, une réduction naturelle d'un des embryons est possible (83% des cas lors de fixation unilatérale contre seulement 4% des cas lors de fixation bilatérale) (Wolfsdorf et al, 2006). Le taux de réduction naturel d'une des deux vésicules décroît fortement à partir de 40 jours de gestation. A ce moment seule une intervention médicale ou chirurgicale peut être envisagée.

Concernant les poulains issus d'embryons congelés produits par OPU-ICSI, Claes et al (2020) ont mis en évidence un effet de la vitesse de développement embryonnaire in-vitro sur la probabilité de poulinage et sur le sexe du futur poulain. Lors de leur étude reposant sur un total de 390 embryons produits in-vitro, des taux de gestation de 62% (J14), 56% (J28) et 54% (J42) ont été décrits. Les taux de mortalité embryonnaire (avant 40 jours de gestation) et fœtale (après 40 jours de gestation) sont respectivement de 13,2% et 7% et le taux de poulinage de 49%. La probabilité d'établir une gestation et de la mener à terme a tendance à être plus élevée après transfert de blastocystes produits in-vitro à J7 (68% et 56%) plutôt qu'à J8 (59% et 46%). Cela implique que la vitesse de développement de l'embryon in-vitro reflète sa qualité et peut donc servir comme marqueur de qualité pour les blastocystes équins produits in-vitro. Parmi les 193 poulains nés dans l'étude, 190 étaient en parfaite santé, 2 sont mort-nés et un poulain a nécessité des soins intensifs. Ces résultats sont comparables avec ceux décrits pour une gestation classique sans mise en œuvre de techniques de reproduction assistées. D'autre part, le ratio mâle : femelle semble influencé en faveur des mâles (61% contre seulement 39% de

femelles) lors de cette étude. L'année lors de laquelle a eu lieu la production de l'embryon in-vitro semble avoir un effet sur le sex ratio. En effet, le pourcentage de mâles a été bien plus important lors des années 2014 à 2016 contrairement à l'année 2017. La vitesse de développement in-vitro semble également avoir un effet puisque le pourcentage de mâles est plus important pour les transferts d'embryons à J7 (70%) plutôt qu'à J8 (55%). La sélection d'embryons se développant plus vite in-vitro n'affecte donc pas seulement le taux de gestation mais également le sexe du poulain. Il est possible que le développement de l'embryon in-vitro après ICSI soit sexe-dépendant, avec des embryons mâles se développant plus vite in-vitro que les embryons femelles. Il est aussi possible que le milieu de culture in-vitro affecte le sexe du poulain. En effet, il est bien établi que les milieux de culture riches en glucose ont un impact négatif sur le clivage et la formation de blastocystes bovins femelles mais sont plus en faveur de la formation de blastocystes mâles (Peippo et al 2001). Concernant, les différences observées entre les années dans cette étude, elle n'est pas expliquée, aucun changement dans le milieu de culture n'ayant été effectué.

7. Conclusion

La technique de transfert embryonnaire classique, très répandue et facilement réalisable sur le terrain, est une des techniques de reproduction assistée couramment mise en place et ce avec des résultats atteignant les 71% de taux de gestation par embryon récolté (Card et al, 2018). La principale limitation de la technique de transfert embryonnaire est dû au fait que la jument donneuse doit disposer d'un tractus reproducteur fonctionnel capable de mener à bien la conception de l'embryon jusqu'au moment de la récolte (Hinrichs 2018). Par ailleurs, du fait que la super-ovulation dans l'espèce équine est problématique, c'est une moyenne de 0,5-0,8 embryons qui sont obtenus par récolte. De ce fait, de multiples récoltes sont nécessaires pour obtenir plusieurs descendants et ce surtout si différents étalons souhaitent être utilisés (Hinrichs 2018). Le choix de la semence utilisée, en termes de qualité et de fertilité, joue également un rôle crucial (71-88% de taux de récolte d'embryon pour une insémination en sperme frais contre 32-47% en sperme congelé). Ces manipulations répétées de l'utérus de la jument peuvent tendre à une proportion plus élevée d'endométrites (Campbell et al 2014). L'utilisation du transfert embryonnaire chez des juments en compétition peut être compliqué par les effets du stress et au niveau du management (Campbell et al 2014) car elles doivent se réaliser pendant la saison de reproduction.

Concernant la technique d'OPU-ICSI, elle s'inscrit dorénavant dans des programmes commerciaux viables avec une moyenne d'1,6 embryons par session et des taux de gestation de 53,4%. Cette technique ne semble pas influencée directement par la carrière sportive de la jument, sa fertilité ou son âge, si ce n'est pour le nombre de follicules aspirés, et ce du fait que toute la fertilisation a lieu in-vitro. Le choix de la semence, en fonction de sa qualité et de sa fertilité, est donc également d'une moindre importance (une moyenne de 77% d'embryons avec du sperme congelé). Cependant, une mortalité embryonnaire précoce d'environ 20% est observée pour ces embryons produits in-vitro. Cette technique est donc intéressante du fait qu'il est possible de la pratiquer hors période de reproduction classique et qu'elle permet de ce fait de conserver le programme de compétitions de la jument sans devoir l'interrompre. Cependant, des challenges persistent du fait que la technique reste onéreuse (environ 2000€ pour obtenir un embryon) et qu'une main-d'œuvre qualifiée et spécifiquement formée au travail en laboratoire est nécessaire pour obtenir les résultats escomptés dans un programme commercial d'OPU-ICSI.

Le choix de se tourner vers l'une ou l'autre de ces techniques se fera donc en fonction de la jument présentée à la reproduction (âge, carrière sportive) et de l'étalon choisi (qualité et fertilité du sperme). Par ailleurs, le côté financier peut également orienter le choix de l'éleveur vers une des deux techniques.

ANNEXES

	Transfert embryonnaire	OPU-ICSI
Suivi gynécologique	80€ HT / cycle	
Récolte embryon	250€ HT	
Prélèvements sanitaires		45€ HT
OPU		800€ HT
Expédition ovocytes		150€ HT
ICSI pour tous les ovocytes maturés aptes à la fécondation		380€ HT
Coût par embryon congelé réalisé		420€ HT
Transport embryons		150€ HT
Ré-implantation	150€ HT	
Location porteuse	2 800€ HT	
TOTAL	3 280€ HT	4 975€ HT

**prix pour l'obtention d'une jument porteuse pleine à 45j (BLH, France, saison de monte 2020-2021)*

	Transfert embryonnaire	OPU-ICSI
Suivi gynécologique	80€ HT / cycle	
Récolte embryon	125€ HT	
Prélèvements sanitaires		50€ HT
OPU		1 000€ HT
Expédition ovocytes		
ICSI pour tous les ovocytes maturés aptes à la fécondation		530€ HT
Coût par embryon congelé réalisé		420€ HT
Décongélation		200€ HT
Location porteuse	2800€ HT	
TOTAL	3 005 € HT	5 080€ HT

**prix pour l'obtention d'une jument porteuse pleine à 45j (Keros, Belgique, saison de monte 2020-2021)*

Tableau 1 : prix fixes moyens pour le transfert embryonnaire et l'OPU-ICSI en France et en Belgique


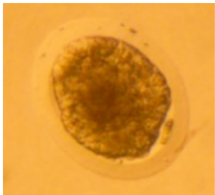
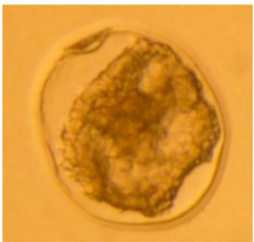
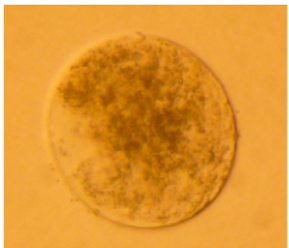
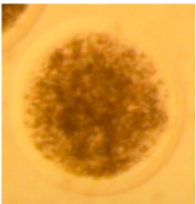
Embryons	Grade	Qualité	Commentaires
	1	Excellent	Embryon idéal, sphérique, cellules de taille, couleur et texture uniformes
	2	Bon	Imperfections légères : quelques blastomères expulsés, forme de l'embryon irrégulière, séparation du trophoblaste
	3	Correct	Problèmes bien définis mais peu sévères : blastomères expulsés, cellules dégénérées, ou blastocoele collabé (embryon contracté)
	4	Médiocre	Problèmes sévères : blastocoele collabé, nombreux blastomères expulsés, cellules dégénérées mais masse embryonnaire apparemment viable
	5	Mauvais	Oocyte non fécondé ou embryon dégénéré

Tableau 2 : Classification qualitative d'embryons équins

	Transfert embryonnaire / session	OPU-ICSI /session
Follicules aspirés		22,2
Ovocytes récoltés		12,8 (57,6%)
Ovocytes métaphase II		7,5 (58,6%)
Taux de clivage après ICSI		5,2 (68,7%)
Blastocystes par ovocytes injectés		1,6 (21,1%)
Embryons	0,5 - 0,8	1,6
Gestations (45j)	71%	53,4%

***Tableau 3 :** comparaison des résultats attendus par session de transfert embryonnaire classique ou d'OPU-ICSI pour une jument*

Type de semence	Transfert embryonnaire	OPU-ICSI
Frais	71-88%	
Réfrigéré	32-47%	
Congelé	32-47%	77% (7-100%)

***Tableau 4 :** Taux d'embryons obtenus par transfert embryonnaire ou après OPU-ICSI (% de blastocystes après ICSI par session) en fonction du type de semence (pas de données disponibles concernant les semences fraîches et réfrigérées pour l'OPU-ICSI).*

BIBLIOGRAPHIE

Allen, W. R. T., & Wilsher, S. (2020). Historical Aspects Of Equine Embryo Transfer. *Journal of Equine Veterinary Science*, 102987.

Altermatt JL, Suh TK, Stokes JE, Carnevale EM. Effects of age and equine follicle-stimulating hormone (eFSH) on collection and viability of equine oocytes assessed by morphology and developmental competency after intra- cytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil Dev* 2009;21:615e23.

Bruyas, J. F. Thérapeutique anti-infectieuse raisonnée des métrites et endométrites de la jument. *Le Point Vétérinaire* n°177, 01.01.2013.

Campbell, M. L. H. (2014). Embryo transfer in competition horses: Managing mares and expectations. *Equine veterinary education*, 26(6), 322-327.

Canisso, I. F., Stewart, J., & da Silva, M. A. C. (2016). Endometritis: managing persistent post-breeding endometritis. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 32(3), 465-480.

Card, C. (2018). Non-surgical embryo transfer technique and recipient mare pregnancy rate. *Veterinary Record*, 183(10), 320–322. doi:10.1136/vr.k3700

Carnevale, E. M., Catandi, G. D., & Fresa, K. (2020). Equine Aging and the Oocyte: A Potential Model for Reproductive Aging in Women. *Journal of equine veterinary science*, 89, 103022.

Carnevale E, Frank-Guest B, Stokes J. Effect of equine oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection. *Anim Reprod Sci* 2010;121:S258e9.

Carnevale EM, Ginther OJ. Defective oocytes as a cause of subfertility in old Mares¹. *Biol Reprod* 1995;52:209e14.

Claes A, Cuervo-Arango J, Colleoni S, Lazzari G, Galli C, Stout TA. Speed of in vitro embryo development affects the likelihood of foaling and the foal sex ratio. *Reprod Fertil Dev* 2020;32:468e73.

Colleoni, S., Lagutina, I., Lazzari, G., Rodriguez-Martinez, H., Galli, C., & Morrell, J. M. (2011). New methods for selecting stallion spermatozoa for assisted reproduction. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(9), 536-541.

Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., & Stout, T. A. E. (2018). Horse embryo diameter is influenced by the embryonic age but not by the type of semen used to inseminate donor mares. *Theriogenology*, 115, 90-93.

Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., & Stout, T. A. (2019). A retrospective comparison of the efficiency of different assisted reproductive techniques in the horse, emphasizing the impact of maternal age. *Theriogenology*, 132, 36-44.

Cuervo-Arango, J., Claes, A. N., & Stout, T. A. (2019). Mare and stallion effects on blastocyst production in a commercial equine ovum pick-up–intracytoplasmic sperm injection program. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1894-1903.

Dijkstra A, Cuervo-Arango J, Stout TA, Claes A. Monozygotic multiple pregnancies after transfer of single in vitro produced equine embryos. *Equine Vet J* 2020;52:258e61.

Eldridge-Panuska, W. D., Di Brienza, V. C., Seidel Jr, G. E., Squires, E. L., & Carnevale, E. M. (2005). Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, 63(5), 1308-1319.

Frank, B. L., Doddman, C. D., Stokes, J. E., & Carnevale, E. M. (2019). Association of equine oocyte and cleavage stage embryo morphology with maternal age and pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(12), 1812-1822.

Galli C, Colleoni S, Duchi R, Lagutina I, Lazzari G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 2007;98:39e55.

Griffin, R. A., Baker, M., Aitken, R. J., Swegen, A., & Gibb, Z. (2019). What makes a fertile sperm? Unique molecular attributes of stallion fertility. *Reproduction*, 158(4), R125-R137.

Günay Uçmak, Z., Kurban, İ., & Uçmak, M. (2020). Evaluation of vascularization in the walls of preovulatory follicles in mares with endometritis.

Hanlon, D. W., Stevenson, M., Evans, M. J., & Firth, E. C. (2012). Reproductive performance of Thoroughbred mares in the Waikato region of New Zealand: 2. Multivariable analyses and sources of variation at the mare, stallion and stud farm level. *New Zealand Veterinary Journal*, 60(6), 335-343.

Hinrichs, K. (2018). Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals*, 53, 4-13.

Hoffmann, C., Ellenberger, C., Mattos, R. C., Aupperle, H., Dhein, S., Stief, B., & Schoon, H. A. (2009). The equine endometrosis: new insights into the pathogenesis. *Animal reproduction science*, 111(2-4), 261-278.

Jacob, J.C.F., Haag, K.T., Santos, G.O., Oliveira, J.P., Gastal, M.O. and Gastal, E.L. (2012) Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology* 77, 1159-1166.)

Jacob JCF, Santos GO, Oliveira JP, Gastal MO, Gastal EL. Evaluation of reproductive parameters in a commercial equine embryo transfer program. *Anim Reprod Sci* 2010;121S:S305e6.

Lagneaux, D., & Duchamp, G. (1999). Le transfert d'embryons chez les équidés. Site de l'IFCE consulté le 28/03/2021.

Lascombes, F. A., & Pashen, R. L. (2001). Results from embryo freezing and post ovulation breeding in a commercial embryo transfer programme. *Equine Embryo Transfer, Havemeyer Foundation Monograph Series*, 3, 95-96.

Lazzari, G., Colleoni, S., Crotti, G., Turini, P., Fiorini, G., Barandalla, M., ... Galli, C. (2020). Laboratory production of equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 103097

LeBlanc, M. M., & Causey, R. C. (2009). Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 10-22.

Love, C. C., Varner, D. D., & Thompson, J. A. (2000). Intra-and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, (56), 93-100.

Marinone AJ, Losinno L, Fumuso E, Rodriguez EM, Redolatti C, Cantatore, Cuervo-Arango J. The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a commercial embryo transfer program in Argentina. *Anim Reprod Sci* 2015;158:53e9.

McCue PM, Squires EL. Equine embryo transfer. Jackson, WY: Teton New Media; 2015.

Morris, L. H. A. (2018). The development of in vitro embryo production in the horse. *Equine veterinary journal*, 50(6), 712-720.

Morris, L. H., McCue, P. M., & Aurich, C. (2020). Equine endometritis: a review of challenges and new approaches. *Reproduction*, 160(5), R95-R110.

Mortensen, C. J., Choi, Y. H., Hinrichs, K., Ing, N. H., Kraemer, D. C., Vogelsang, S. G., & Vogelsang, M. M. (2009). Embryo recovery from exercised mares. *Animal reproduction science*, 110(3-4), 237-244.

Mortensen, C. J., Choi, Y. H., Ing, N. H., Kraemer, D. C., Vogelsang, M. M., & Hinrichs, K. (2010). Heat shock protein 70 gene expression in equine blastocysts after exposure of oocytes to high temperatures in vitro or in vivo after exercise of donor mares. *Theriogenology*, 74(3), 374-383.

Peippo, J., Kurkilahti, M., and Bredbacka, P. (2001). Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. *Zygote* 9, 105–113.

Pérez-Marín, C. C., Vizuite, G., Vazquez-Martinez, R., & Galisteo, J. J. (2018). Comparison of different cryopreservation methods for horse and donkey embryos. *Equine veterinary journal*, 50(3), 398-404.

Roser, J. F., & Meyers-Brown, G. (2019). Enhancing fertility in mares: recombinant equine gonadotropins. *Journal of equine veterinary science*, 76, 6-13.

Salgado, R. M., Brom-de-Luna, J. G., Resende, H. L., Canesin, H. S., & Hinrichs, K. (2018). Lower blastocyst quality after conventional vs. Piezo ICSI in the horse reflects delayed sperm component remodeling and oocyte activation. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 35(5), 825-840.

Smith, R. L., Vernon, K. L., Kelley, D. E., Gibbons, J. R., & Mortensen, C. J. (2012). Impact of moderate exercise on ovarian blood flow and early embryonic outcomes in mares. *Journal of animal science*, 90(11), 3770-3777.

Smits, K., Govaere, J., Hoogewijs, M., Piepers, S., & Van Soom, A. (2012). A pilot comparison of laser-assisted vs piezo drill ICSI for the in vitro production of horse embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(1), e1-e3.

Stout TAE. Equine embryo transfer: a review of developing potential. *Equine Vet J* 2006;38:467e78.

Stout, T. A. E. (2020). Clinical application of in vitro embryo production in the horse. *Journal of equine veterinary science*, 89, 103011.

Stout, T. A. E. (2010). Equine embryo transfer: review of developing potential. *Equine Veterinary Journal*, 38(5), 467–478.

Squires, E. L., & McCue, P. M. (2016). Cryopreservation of equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 7-12.

Squires, E. (2020). Current Reproductive Technologies Impacting Equine Embryo Production. *Journal of equine veterinary science*, 89, 102981.

Tischner, M., & Bielański, A. (1980). Non-surgical embryo collection in the mare and subsequent fertility of donor animals. *Reproduction*, 58(2), 357-361.

Tischner, M., Niezgoda, J., & Tischner, M. (2006, August). Intensity of stress reaction in the mare during transportation at different stages of ovarian activity and pregnancy. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 94, No. 1-4, pp. 234-237).