1510

14ème JOURNEE D'ETUDE

9 Mars 1988

LA TRANSPLANTATION EMBRYONNAIRE CHEZ LA JUMENT

Par **D. LAGNEAUX** * **G. DUCHAMP** **
E. PALMER **

* I.T.A. Institut du Cheval - B.P. 3 - 19230 POMPADOUR
INRA Physiologie de la Reproduction - Nouzilly - 37380 MONNAIE
** I.N.R.A. - Physiologie de la Reproduction - Nouzilly - 37380 MONNAIE.

Résumé

La transplantation embryonnaire chez la jument est une succession d'étapes toutes essentielles :

* **préparation et fécondation de la jument donneuse,**
* **récolte des embryons,**
* **recherche, manipulation, stockage des embryons,**
* **choix et préparation de la jument porteuse,**
* **transfert proprement dit.**

Les solutions proposées par la littérature sont nombreuses. Leur réalisation et leurs résultats sont plus ou moins satisfaisants.

Aussi, avons-nous fait un choix parmi toutes ces méthodes. Après cinq années de mise au point, nous proposons une technique codifiée simple, facilement diffusable en élevage puisque ne faisant pas appel à la chirurgie, et qui permet d'obtenir un taux moyen de récolte d'embryon de 70 % et un taux de gestation après transfert de 64 %.

MOTS CLEFS :

JUMENT - RECOLTE D'EMBRYON - TRANSFERT D'EMBRYON.

Abstract

Embryo transfer in the mare consists of a series of stages all of which are essential:

* preparation and fertilization of the donor mares,
* collection of embryos,
* research, manipulation and stocking of the embyos,
* selection and preparation of the recipient mare,
* the transfer itself.

The solutions proposed by available litterature are numerous. Their realization and their results are more or less satisfactory.

We have therefore made a choice amongst all these methods. After spending five years at perfecting them, we propose a simple, codified technique, easily diffusable in breeding as it does not require surgery, and which permits the obtention of an average rate of embryo collection of 70% and a rate of pregnancy after transfer of 64%.

KEY WORDS :

MARE - EMBRYO COLLECTION - EMBRYO TRANSFER.

© - CEREOPA 1988

1510

INTRODUCTION

La transplantation embryonnaire est une méthode artificielle de reproduction consistant à prélever un embryon (ou plusieurs après superovulation) obtenu après fécondation *in vivo* (saillie ou insémination artificielle) d'une femelle appelée donneuse et à le transférer dans une femelle appelée receveuse où il poursuivra sa croissance et son développement jusqu'à la mise-bas.

Bien que cette technique soit moins développée chez la jument que chez d'autres espèces domestiques (vache-brebis), elle offre un certain nombre d'avantages, entre autres :

- permettre des gestations à partir de juments âgées mais de haute valeur génétique ou commerciale,
- obtenir des poulains de juments poursuivant leur carrière sportive,
- augmenter la production des juments d'élite,
- conserver des embryons (patrimoine génétique rare ou de grande valeur).

On peut la décomposer en cinq actes successifs dont nous décrirons les variantes possibles :

- préparation et fécondation de la jument donneuse,
- récolte des embryons,
- recherche, manipulation, stockage éventuel de l'embryon,
- choix et préparation de la jument porteuse,
- transfert proprement dit.

Parmi les nombreuses options possibles, nous avons codifié un protocole qui a donné satisfaction dans les conditions de notre laboratoire.

I - Les différentes étapes de la transplantation embryonnaire chez la jument

1. Préparation et fécondation de la jument donneuse

Le suivi gynécologique réalisé lors d'inséminations artificielles en sperme congelé (passage à la barre, suivi de la croissance folliculaire, I.A. moins de 48h avant l'ovulation, détection journalière de l'ovulation) s'applique également à la gestion des juments donneuses d'embryons.

Les variations de fertilité constatées en monte traditionnelle se retrouvent dans le taux de collecte ; ainsi, VOGELSANG et al. (1985) montrent que le taux de récolte n'est que de 27 % chez les juments âgées de plus de 18 ans alors qu'il est de 55 à 60% chez les juments plus jeunes.

Selon ALLEN (1982), l'une des barrières au développement de la transplantation embryonnaire chez la jument est sans doute l'absence de traitement de superovulation efficace qui permettrait d'augmenter de façon significative le taux d'embryons récoltés.

Les traitements employant les extraits hypophysaires équins totaux donnent, selon les conditions expérimentales,

1,7 ± 0,4 ovulations et 0,4 ± 0,2 embryons selon DOUGLAS (1982) ou 4,5 ± 0,5 ovulations et 2,9 ± 0,7 embryons selon WOODS & GINTHER (1984).

Les progrès, dans ce domaine, passent sans doute, selon ALLEN (1982), par de nouvelles formes de traitements et une meilleure connaissance des mécanismes de sélection et de croissance folliculaires.

2. La récolte de l'embryon

L'entrée de l'embryon dans l'utérus a lieu en moyenne à J5 (J0 = ovulation) ; il est déjà au stade jeune blastocyste.

Seules, les méthodes chirurgicales sont praticables avant J6, avec d'après ALLEN et al. (1975) un pourcentage de réussite de 75 % ; la jument subit une anesthésie générale, est placée en decubitus dorsal et incisée médio-ventralement. Pour récolter des embryons après J5, les techniques non chirurgicales unilatérale ou bilatérale empruntant la voie cervicale et consistant à irriguer la totalité ou une partie de l'utérus sont plus simples, moins traumatisantes et aussi efficaces.

Le taux de succès des collectes d'embryons varie selon le stade du cycle au moment de la récolte : il est de 0,65 à J6, de 0,75 à J7 et de 0,82 à J8 (SQUIRES et al., 1982).

La récolte, au stade J6 (jeune blastocyste), présente un taux plus faible mais ce stade est recommandé lorsque les embryons devront être congelés.

La récolte, au stade J8 (blastocyste expansé) présente un taux optimum mais à ce stade l'embryon trop volumineux (diamètre > 1mm) est beaucoup plus fragile et donc sa manipulation devient malaisée.

Pour les transferts d'embryons frais, le stade J7 (blastocyste) est le plus couramment pratiqué.

Le milieu d'irrigation utilisé doit respecter les caractéristiques de pH et de pression osmotique compatibles avec l'embryon et l'utérus de la jument . Le plus fréquemment employé (IMEL et al., 1981, SQUIRES et al., 1982, VOGELSANG et al., 1985, WOODS et al., 1984) est le "Dulbecco's phosphate buffered saline" (PBS modifié) : solution saline phosphate tampon de Dulbecco (pH = 7,2, osmolarité = 287,6 ± 0,9 m.osmols), enrichi de 1 à 2 % de sérum de veau foetal.

3. Recherche - manipulation - stockage de l'embryon

La recherche doit être rapide puisque selon SCREENAN et al. (1975), il semble qu'au-delà de deux heures passées dans le milieu de récolte, les qualités de l'embryon sont altérées. Elle doit, également, être réalisée à température constante (20-25°C) les fluctuations rapides et importantes de température étant néfastes à la survie des embryons.

L'embryon est de trop petite taille pour être vu à l'oeil nu dans le liquide de lavage de l'utérus (Tableau 1).

Tableau 1

DIAMETRE DES EMBRYONS (EN MM) EN FONCTION DU JOUR DE LA RECOLTE

Jour de récolte	Nombre d'embryons	moyenne	extrêmes
6	121	0,20	0,13-0,75
7	144	0,40	0,13-1,46
8	142	1,13	0,12-3,98
9	41	2,22	0,73-4.52

(SQUIRES et al., 1982).

Tableau 2

TAUX DE GESTATION OBTENU APRES TRANSFERT EN FONCTION DU DEGRE DE SYNCHRONISATION DONNEUSE-RECEVEUSE.

MOMENT D'OVULATION DE LA RECEVEUSE PAR RAPPORT A LA DONNEUSE	TAUX DE GESTATION	
Ovulation 1 jour avant donneuse	2/4	50 %
Ovulation le même jour	8/14	57 %
Ovulation 1 jour après donneuse	4/9	44 %
Ovulation 2 jours après donneuse	4/8	50 %

(SQUIRES et al., 1982).

Aussi faut-il le rechercher au moyen d'une loupe binoculaire dans un volume réduit obtenu, soit par décantation (l'embryon plus lourd que l'eau tombe au fond du récipient de récolte au bout de quelques minutes), soit par filtration.

La conservation à moyen et long terme de l'embryon équin n'est pas totalement maîtrisée. Les résultats des essais peu nombreux de stockage des embryons équins sont les suivants : CLARK et al. ont obtenu 7 gestations à partir de 10 embryons conservés 12h dans un milieu de culture approprié (Ham's F 10) à 24°C. Le transfert des embryons après conservation pendant 24H à 4°C dans du PBS a permis à SERTICH et al. (1987) d'obtenir un taux de gestation de 26 %. SQUIRES et al. (1982) ont obtenu 9 gestations à partir de 23 embryons congelés soit 39 %.

4. Choix et préparation de la jument porteuse

La jument porteuse est choisie pour ses qualités maternelles et ne doit pas être suspectée d'infertilité : en pratique, des jeunes juments maiden sont le plus employées ; l'utilisation de juments âgées ou multipares demande de vérifier leurs performances de reproduction antérieures et l'état de leur utérus. Pour SQUIRES et al. comme pour VOGELSANG et al., la mortalité embryonnaire (M.E.) entre 14ème et le 50ème jour de gestation est plus fréquente après transfert chez les porteuses considérées comme infertiles ou subfertiles (M.E. = 50 %) que chez les porteuses considérées comme fertiles (M.E. = 13 %) au regard de leurs performances de reproduction antérieures.

Selon IMEL et al. (1981), le transfert peut être réalisé dans une porteuse ayant ovulé 1 jour avant la donneuse, le même jour, un ou deux jours après la donneuse avec des résultats identiques (Tableau 2). Selon OGURI et TSUTSUMI (1980), ce taux diminue lorsque la porteuse a ovulé plus d'un jour avant ou plus de deux jours après la donneuse.

L'utilisation d'un troupeau de juments porteuses de taille suffisante permet de disposer à tout moment de femelles au stade rendant possible le transfert.

L'utilisation par HINRICHS et al. (1985) de juments ovariectomisées traitées à la progestérone ou au Regumate a permis d'obtenir 5 gestations après 11 transferts, soit 45 %. Le traitement avait débuté dès le deuxième jour suivant l'ovulation de la jument donneuse et jusqu'au 100ème jour de gestation. Il consistait en une injection quotidienne de 300 mg de progestérone en solution huileuse ou en l'administration orale de 22 ou 66 mg de Regumate.

L'équipe de SQUIRES en 1987 a essayé, sans succès, d'utiliser des juments non synchrones comme receveuses en leur administrant 4,4 mg/100 Kg de regumate par jour à partir du lendemain de l'ovulation de la donneuse. Aucune gestation n'a été obtenue chez 17 juments ainsi traitées.

Il reste donc nécessaire de disposer de receveuses synchrones lors de la réalisation de transfert d'embryons frais. Le problème disparaîtra lorsque la congélation des embryons sera opérationnelle.

5. Le transfert de l'embryon

Comme pour la récolte, le transfert de l'embryon peut être chirurgical ou non-chirurgical.

Les résultats du transfert chirurgical ont été longtemps plus favorables que ceux du transfert cervical. Il s'effectue soit sous anesthésie générale (jument en decubitus dorsal en accédant à l'utérus par la ligne blanche comme ALLEN et al., 1975), soit sous anesthésie locale (la jument debout et chirurgie par le flanc comme IULIANO et al., 1983). Les résultats varient selon les équipes. En 1986, en utilisant la technique du transfert par le flanc, SQUIRES, responsable d'une des meilleures équipes américaines obtient un taux de gestation de 66 % (83/126).

La méthode non-chirurgicale emprunte la voie vaginale et cervicale pour déposer l'embryon avec un minimum de liquide de transfert dans le corps de l'utérus ou à la base d'une corne. Chaque équipe (HINRICHS et al., 1985, VOGELSANG et al., 1985) possède son propre matériel de transfert (cathéter d'I.A., pipette, pistolet de transfert Cassou-IMV, munis ou non de gaine ou chemise sanitaires).

La difficulté de cette technique réside dans les risques majeurs de contamination de l'utérus en phase lutéale par le matériel de transfert qui y accède en passant par le vagin et le cervix.

Le taux de gestation par embryon transféré varie selon les équipes. VOGELSANG et al. obtiennent, ainsi, par transfert cervical 44 % (35/79). L'I.N.R.A. de Tours-Nouzilly, bien qu'avec des effectifs inférieurs, obtient en 1987, un taux de gestation de 60 % (15/25) comparable à celui de SQUIRES obtenu par la méthode chirurgicale. Cependant, ces résultats n'ont été obtenus qu'après plusieurs années d'essais infructueux. Ils demandent, pour être généralisés, de respecter un protocole très rigoureux, que nous avons codifié (annexe).

II - Mise au point d'une méthode de transplantation embryonnaire équine à l'I.N.R.A. de Tours-Nouzilly

Nos essais ont porté essentiellement sur les matériels de récolte et transfert sur les conditions sanitaires de réalisation des différentes étapes. La préparation et la fécondation de la jument donneuse, les milieux de récolte et de transfert, la synchronisation des juments donneuse et porteuse, sont ceux exposés précédemment.

En 1982, les premiers essais de récolte et de transfert, chez la jument, sont pratiqués en utilisant la totalité de l'équipement et du matériel de transplantation non chirurgicale employé chez les bovins. 2 gestations sont

TABLEAU 3 : PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS A L'I.N.R.A. DE TOURS : EVOLUTION DE LA TECHNIQUE

	ANNEE 1982	ANNEE 1983	ANNEE 1984	ANNEE 1985
MATERIEL DE RECOLTE	sonde de récolte bovine	cathéter de Foley	cathéter de F. modifié	sonde I.N.R.A.-I.M.V.
NOMBRE D'ANIMAUX	7	10	31	43
NOMBRE DE RECOLTES	7	58	42	51 ← 86 → 35
NOMBRE D'EMBRYONS	5	21	27	14 ← 33 → 19
TAUX DE RECOLTE	71 %	36 %	64 %	27 % ← 38 % → 54 %
REMARQUES	matériel traumatisant	les récoltes à répétition sont responsables d'infections utérines	matériel satisfaisant mais non commercialisé	avant | après matériel mis au point en cours d'année
MATERIEL DE TRANSFERT	pistolet bovin non stér.	pistolet bovin non stér.	pistolet d'I.A. équine avec piston non stér.	pistolet d'I.A. équine avec piston non stér.
NOMBRE DE TRANSFERTS	5	19	24	26
NOMBRE DE GESTATIONS	2	0	0	3
TAUX DE GESTATIONS	40 %	0	0	12 %
REMARQUES	le transfert cervical est réalisable	14 embryons congelés sur les 19 transférés mise en évidence des lutéolyses : 75 %	taux de lutéolyse : 49% influence de la race ? contaminations utérines	lutéolyses et / ou contaminations dans 70 %

(à suivre...)

TABLEAU 3 (suite) : PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS A L'I.N.R.A. DE TOURS : EVOLUTION DE LA TECHNIQUE

	ANNEE 1986		ANNEE 1987		
	PREMIER SEMESTRE	SECOND SEMESTRE	RESULTATS I.N.R.A	RESULTATS Le Pin	TOTAL
MATERIEL DE RECOLTE	sonde I.N.R.A.-I.M.V.	sonde I.N.R.A.-I.M.V.	sonde I.N.R.A.-I.M.V. ou matériel BIVONA (U.S.A.)		
NOMBRE D'ANIMAUX	-	19	22	12	34
NOMBRE DE RECOLTES	-	19	32	12	44
NOMBRE D'EMBRYONS	11	9	23	10	33
TAUX DE RECOLTE	-	47 %	72 %	83 %	75 %
REMARQUES	matériel de récolte satisfaisant		matériel de récolte satisfaisant		
MATERIEL DE TRANSFERT	essais de matériels chirurgie - paracerv.	pistolet de transfert stérile + protections	pistolet de transfert stérile + protections		
NOMBRE DE TRANSFERTS	11	7	23	10	33
NOMBRE DE GESTATIONS	0	2	16	5	21
TAUX DE GESTATIONS	0	29 %	69 %	50 %	64 %
REMARQUES	antibiotique vaginal sans effet	difference jument / ponette (effet race) lutéolyses : 27 %	résultats globalement satisfaisants 10 lavages des embryons avant transfert		

obtenues à partir de 5 embryons transférés (cf. résultats Tableau 3). Il paraît donc possible, de façon relativement simple, d'obtenir des gestations par transplantation embryonnaire cervicale chez la jument.

Les objectif fixés en 1983 sont ambitieux : ils visent à mettre au point un traitement de superovulation des juments donneuses. Des tentatives de récoltes à répétition sont effectuées sur des juments donneuses. Enfin, les premiers essais de congélation d'embryons sont tentés. Les résultats sont décourageants puisqu'aucune gestation n'est obtenue (Tableau 3).

Les récoltes à répétition font apparaître des problèmes de contamination et d'infection des utérus (plus de 20 % des liquides de récolte sont contaminés, 12/58).

Les juments porteuses présentent, après transfert, un phénomène de lutéolyse précoce c'est-à-dire une chute de la progestérone plasmatique dans les 48h suivant le transfert (9 cas sur 13 soit près de 70 %). Un traitement d'anti-prostaglandine à base d'aspirine semble diminuer la fréquence de ces lutéolyses.

L'objectif des travaux réalisés en 1984 est de mettre au point du matériel de récolte (en collaboration avec IMV), de modifier du matériel de transfert (cathéter équin avec piston), d'analyser le phénomène de lutéolyse après transfert chez les juments porteuses (cf. Tableau 3).

L'étude de la variation du taux de progestérone plasmatique 48h après vrai ou faux transfert montre une lutéolyse dans près de 50 % des cas (23/47) comme l'indique la Figure I. Aucun traitement anti-lutéolytique employé (aspirine - flumixine - anesthésie générale) ne semble efficace. La cause de ces lutéolyses paraît double : d'une part, une cause mécanique due à la stimulation du cervix lors de son passage, d'autre part, une cause infectieuse ou inflammatoire, l'utérus secrétant par réaction défensive des prostaglandines.

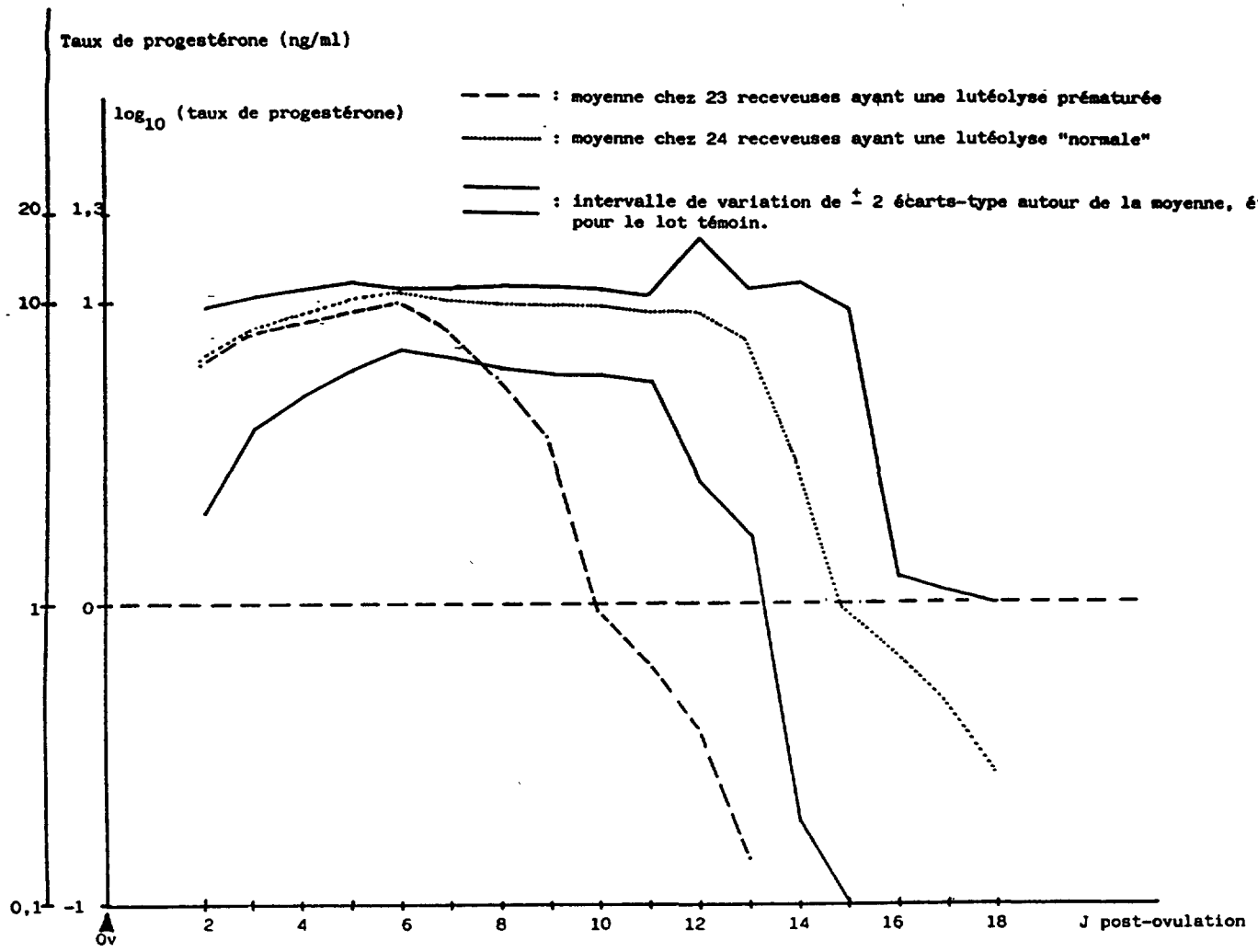
En 1985, les essais de modification du matériel de récolte, l'analyse de l'origine des lutéolyses mécanique et bactérienne apportent les conclusions suivantes :

L'amélioration de la sonde de récolte permet d'obtenir un nombre d'embryons satisfaisant. L'origine mécanique et/ou bactérienne des lutéolyses est confirmée puisque sur 20 résultats d'analyses bactériologiques des liquides utérins et de dosage de la progestérone plasmatique, 14 présentent soit des chutes précoces de progestérone, soit des analyses bactériologiques positives, soit les deux.

En 1986, pour lutter contre la contamination de l'utérus lors du transfert, des essais d'antibiotiques vaginaux avant transfert, de transfert para-cervicaux ou même chirurgicaux se sont soldés par des échecs (0 gestation après 11 transferts). La plupart étaient accompagnés de contaminations utérines par germes non-pathogènes. Les conditions sanitaires de réalisation de la récolte, de la phase intermédiaire et du transfert, la stérilité du matériel et des milieux, la propreté des laboratoires semblent essentielles. Des mesures

FIGURE I : EVOLUTION DU TAUX DE PROGESTERONE CHEZ LES RECEVEUSES ENTRE J2 ET J18 POST-OV

(d'après B. MATHIS 1984)



très strictes de propreté et de stérilité sont prises fin 1986, l'embryon ne devant impérativement être en contact qu'avec du matériel ou un milieu parfaitement stérile.

Si la lutéolyse est toujours présente (10/37), il y a une différence significative entre les porteuses poneys (8/22) et les porteuses juments (2/15) ($P<0.05$). La jument de selle est, semble-t-il, moins sujette à la lutéolyse que la ponette.

Le matériel permet un travail dans de meilleures conditions de stérilité :

- la sonde de récolte stérile est sous emballage individuel (oxyde éthylène),
- le pistolet de transfert est muni d'une gaine à sortie latérale et d'une chemise sanitaire stérile (oxyde éthylène),
- la paillette recevant l'embryon avant transfert est stérile (rayons GAMMA),
- les milieux de récolte et de transfert sont stériles (autoclave et ultrafiltration).

A suite de ces modifications, sept transferts ont donné lieu à deux gestations.

En 1987, nous avons confirmé des résultats encourageants obtenus fin 1986 en utilisant le même matériel et en renforçant les précautions sanitaires par dix lavages de l'embryon dans un milieu stérile conformément à l'arrêté sur la transplantation embryonnaire bovine.
21 gestations ont été obtenues à la suite du transfert de 33 embryons soit 64%.

Nous avons repris les essais de traitement de superovulation des juments donneuses. Les résultats obtenus au cours de différentes expérimentations figurent dans le tableau .

Parallèlement à ces résultats expérimentaux, l'I.N.R.A. de Tours-Nouzilly a réalisé, depuis 1984, 12 opérations de transplantation embryonnaire commerciale dont 8 avec succès.

CONCLUSION

Les solutions proposées par la littérature pour réaliser la transplantation embryonnaire chez la jument sont nombreuses. Elles ne sont pas toutes d'une égale facilité de mise en oeuvre et ne donnent pas toutes des résultats pleinement satisfaisants mêmes lorsqu'elles sont appliquées par ceux qui les ont mises au point.

Notre expérience nous a permis de faire un choix parmi toutes les méthodes proposées et de codifier un protocole qui peut être, aujourd'hui, diffusé en élevage.

Compte-tenu d'un taux de récolte moyen de 60 %, d'un nombre de cyclesdisponiblesde 3 (ou 4), d'un taux de succès du transfert de 60 % un calcul théorique nous permet donc d'espérer, au moins, une gestation pour 75 % des donneuses exploitées (84 % dans le cas de 4 cycles).

Ces perspectives favorables auront plusieurs développements en 1988 :

* le premier centre de transplantation embryonnaire des Haras Nationaux sera ouvert à Montier-en-Der,
* l'I.N.R.A. et la Société IMV envisagent la commercialisation, sous forme de KIT, de l'ensemble des matériels nécessaires à l'application stricte du protocole codifié.

Enfin, il semble que la règlementation évolue puisque la commission du livre généalogique des races françaises de chevaux de selle qui s'est réunie en Octobre 1987 a émis un avis favorable quant à la possibilité d'avoir plus d'un produit par an et par jument, la porteuse n'étant plus nécessairement de même race que la donneuse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALLEN W.R., 1982. Embryo transfer in the horse. In: "Mammalian Egg Transfer", 135-154, C.E. ADAMS ed., CRC Press.

ALLEN W.R., ROWSON L.E.A., 1975. Surgical and non surgical egg transfer in horses. J. Reprod. Fert., suppl. 23, 525-530.

CLARK K.E., SQUIRES E.L., Mac KINNON A.O., SEIDEL G.E., 1987. Viability of stored equine embryos. J. Anim. Sci., 65, 534-542.

DOUGLAS R.H., 1982. Some aspects of equine embryo transfer. J. Reprod. Fert., Suppl. 32, 405-408.

HINRICHS K., SERTICH P.L., CUMMINGS M.R., KENNEY R.M., 1985. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer: a preliminary study. Equine Vet. J. Suppl. 3, 74-75.

IMEL K.J., SQUIRES E.L., ELSDEN R.P., SHIDELER R.K., 1981. Collection and transfer of equine embryos. J. Am. Vet. Med. Ass., 179, 987-991.

IULIANO M.F., SQUIRES E.L., 1983. Pregnancy rates after transfer of 7- or 8-day-old equine embryos either surgically or non-surgically. Theriogenology 19, 134-Abstr.

J.O. REPUBLIQUE FRANCAISE du 27 Septembre 1986. Arrêtés relatifs aux conditions sanitaires et zootechniques exigées pour la production et la transplantation d'embryons de l'espèce bovine.

LAGNEAUX-PETIT D., 1985. Contribution à l'étude des facteurs limitants du transfert d'embryon chez la jument. INRA-Nouzilly Station de Physiologie de la Reproduction.

LAGNEAUX-PETIT D., TAINTURIER D., PALMER E., 1987. Luteolysis and bacterial contamination associated with unsuccessful cervical embryo transfer in the mare. Theriogenology (submitted).

LETISSE V.G. 1984. Induction d'ovulations multiples et transfert d'embryons chez la jument. Thèse Doctorat Vétérinaire, E.N.V. Toulouse. Stage réalisé à l'INRA de Tours-Nouzilly.

MATHIS B., 1984. Transfert d'embryons par voie cervicale et lutéolyse chez la jument. Rapport de stage ENITA DIJON réalisé à l'INRA de Tours-Nouzilly.

OGURI N., TSUTSUMI Y., 1980. Non-surgical transfer in equine embryos. Arch. embryology, 5, 108-110.

PALMER E., 1984. Monte sans détection d'oestrus : synchronisation des chaleurs. XIIIèmes Journées du Grenier de Theix. In: "LE CHEVAL" INRA, 99-111.

SCREENAN J.M., BEEHAN D., MULVEHILL P., 1975. Egg transfer in the cow: factors affecting pregnancy and twinning rates following bilateral transfers. J. Reprod. Fert., 44-77.

SERTICH P.L., LOVE L.B., HODGSON M.R., KENNEY R.M., 1987. Cooled storage of equine embryos in a commercial semen transport system. Theriogenology 27, 275.

SQUIRES E.L., IMEL K.J., IULIANO M.F., SHIDELER R.K., (1982a): Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer program. J. Reprod. Fert., Suppl. 32, 409-414.

SQUIRES E.L., IULIANO M.F., SHIDELER R.K., (1982b): Factors affecting the success of surgical and non surgical equine embryo transfer. Theriogenology 17, 35-41.

VOGELSANG S.G., BANDIOLO K.R., MASSEY J.M., 1985. Commercial application of equine embryo transfer. Equine Vet. J. Suppl. 3, 89-91.

WOODS G.L., GINTHER O.J., 1984. Collection and transfer of multiple embryo in the mare. Theriogenology, 21, 461-469.

ANNEXE : LA TRANSPLANTATION EMBRYONNAIRE EQUINE

(méthode I.N.R.A. 87)

A - MATERIELS

a) Les locaux et les équipements

L'agencement des locaux de récolte, de transfert, de recherche et de manipulation des embryons suit les règles édictées par l'arrêté du 8 Septembre 1986 relatif aux conditions sanitaires exigées pour la transplantation embryonnaire en espèce bovine.

Les opérations de collecte et de préparation des embryons sont effectuées dans un local :

- propre, salubre, en bon état, facile à nettoyer et à désinfecter,
- nettoyé et désinfecté avant l'introduction des animaux (...).

Dans le cadre du transfert embryonnaire, le laboratoire attenant est physiquement séparé (par une porte close) de la salle de manipulation des animaux (... donneuses et receveuses).

Les locaux de l'I.N.R.A. de Tours-Nouzilly destinés à la transplantation embryonnaire équine comprennent trois parties séparées :

- la salle de récolte et de transfert munie d'une barre de contention, désinfectée quotidiennement (avec paillase, étuve à eau de Javel et évier),
- le laboratoire "sale" dans lequel se trouve le matériel utilisé au contact des juments. Il fait office de sas entre la salle de contention et le laboratoire propre,
- le laboratoire "propre" utilisé exclusivement pour la recherche et la manipulation des embryons (hotte à flux laminaire, loupe binoculaire).

b) Le matériel

Collecte

Sonde de collecte
Raccord de sonde sur bouteille
seringue de 50 ml
3 Gants de fouille stériles
Lubrifiant bactériostatique JOHNSON & JOHNSON
sopalin (environ 20 feuilles)
Vétédine savon (environ 300 ml)
5 gants de fouille + lubrifiant
4 x 1 litre de PBS complet (à 1 % S.V.F. avec antibiotiques)
bouteilles graduées + 1 bouteille vide stérile
Antibiotiques pour jument donneuse

Phase intermédiaire

Tube de vidange stérile avec seringue 10 ml
5 boîtes de Petri stériles
1 boîte 12 puits stérile
20 ml milieu de transfert PBS complet (20% SVF)
seringue + aiguille 20 ml non toxique
Filtre millipore 0.2 µm
2 paillettes stériles emballage unique 0.25 ml
12 cônes pour micropipetteur à diamètre 0.8 mm - 1 mm stériles
3 pipettes fermées bout rond, stériles

Transfert

3 gants de fouille et lubrifiant
Vétédine savon (environ 100 ml)
SOPALIN (environ 10 feuilles)
2 pochettes stériles contenant chacune :
- gaine bille métallique sortie latérale
- chemise sanitaire
3 gants de fouille stériles
2 paires gants chirurgicaux stériles
Lubrifiant bactériostatique JOHNSON & JOHNSON

B. LA METHODE

a) La récolte de l'embryon

Elle a lieu 7 jours après ovulation constatée par palpation rectale et échographie. La jument donneuse est placée dans la barre de contention, vidée de son crottin, la queue est emballée dans un gant et attachée en hauteur.

La zone périnéale de la donneuse est lavée, au minimum, trois fois à l'eau et au savon iodé, puis séchée. La sonde de récolte reliée au milieu d'irrigation et remplie est introduite par le vagin et le cervix dans l'utérus de la jument donneuse par le manipulateur. La sonde est maintenue, dans cette position, grâce au ballonnet terminal gonflé à 50 ml d'air juste après le cervix.

Le milieu de récolte est introduit puis récupéré comme le montrent les figures II et III. Chaque irrigation (ou flush) est réalisée en continu avec 1 litre de milieu. Cette opération est répétée 2 ou 3 fois (3 ou 4 flushes). Afin d'améliorer l'irrigation et le retour du milieu, le manipulateur effectue pendant chaque flush un léger massage de l'utérus par voie transrectale.

b) Phase intermédiaire - recherche de l'embryon

Les 3 ou 4 bouteilles de milieu sont placées sur une paillasse dans le laboratoire "sale". Elles sont décantées pendant 10 mn par simple gravité. Puis, après siphonage de 900 ml de surnageant (pour chacune des 3 ou 4 bouteilles d'irrigation) les 100 ml de culot vont dans le laboratoire "propre" où ils sont répartis dans une boîte de Petri quadrillée stérile, placés sous la loupe binoculaire

FIGURE II: LA RECOLTE DE L'EMBRYON - L'irrigation de l'utérus

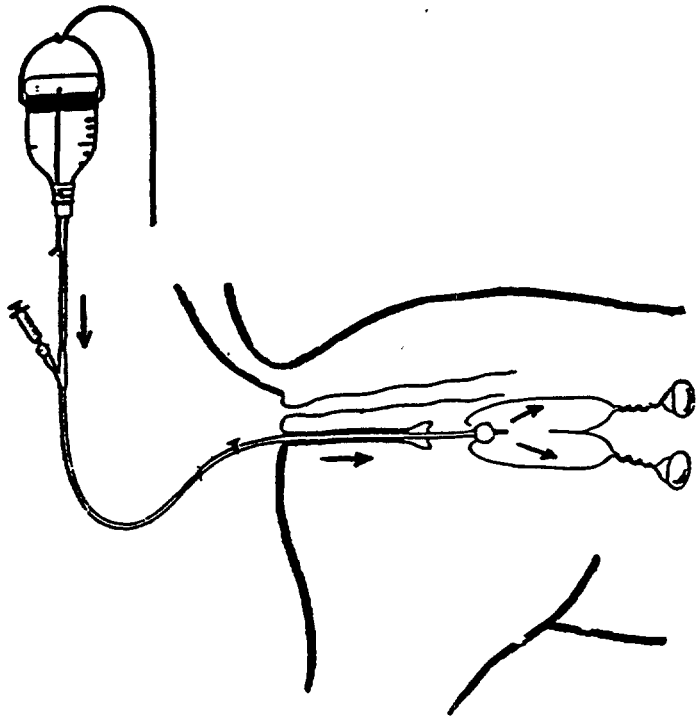
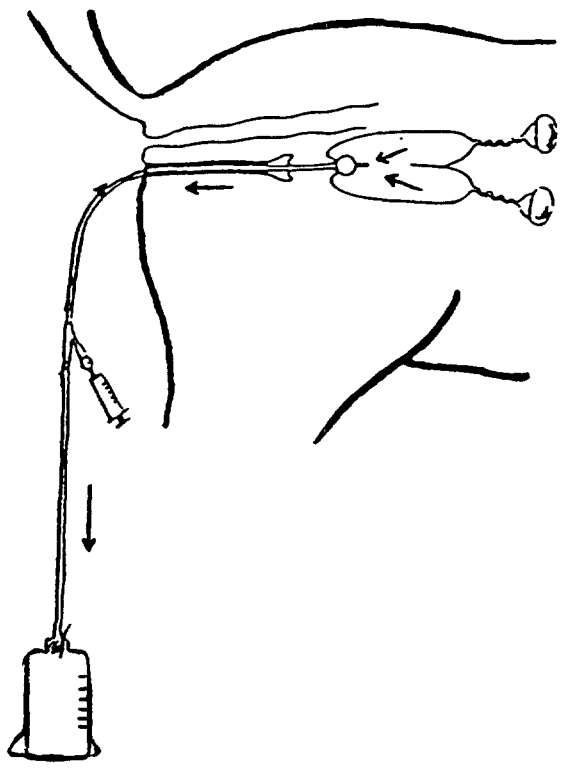


FIGURE III: LA RECOLTE DE L'EMBRYON - Récupération du milieu d'irrigation



(grossissement 10 à 50 fois) située sous la hotte à flux laminaire.

L'embryon étant visualisé dans la boîte de Petri, il est immédiatement sorti de son milieu de récolte pour être placé dans un milieu de lavage (identique au milieu de transfert) : Dulbecco's PBS stérile avec antibiotiques et 20 % sérum de veau foetal, stérilisé par ultra-filtration (0.22 µm). Il est mesuré (diamètre moyen à J7 = 450 m) et décrit de façon sommaire ; l'embryon est lavé dans dix bains successifs contenant du milieu de transfert stérile. Le taux minimum de dilution est de 1/100ème par lavage. Placé dans son 10ème bain, l'embryon est prêt à être transféré.

c) Le transfert de l'embryon

Il a lieu dans l'heure qui suit l'obtention de l'embryon.

La jument porteuse est au stade J6 ou J5 post-ovulation, plus rarement au stade J7 ou J8. Elle est placée dans la barre de contention préalablement désinfectée et préparée de la même façon que la jument donneuse.

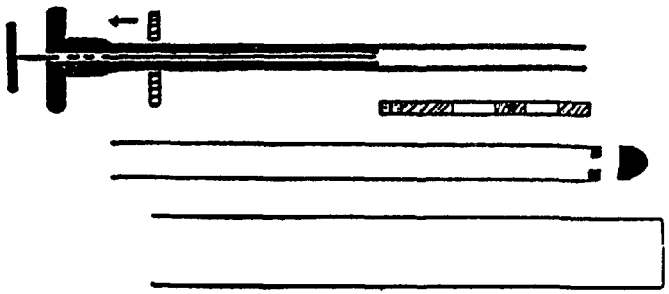
Le pistolet de transfert d'embryons (et ses différentes protections) est schématisé figure IV ; l'embryon est monté dans la paillette (0.25 ml) stérile avec le minimum de liquide, entre deux bulles d'air et deux gouttes de milieu stérile.

La paillette est placée dans le pistolet de transfert (en inox), revêtue de la gaine à bille et de la chemise sanitaire (toutes deux également stériles dans leur pochette - prête à l'emploi).

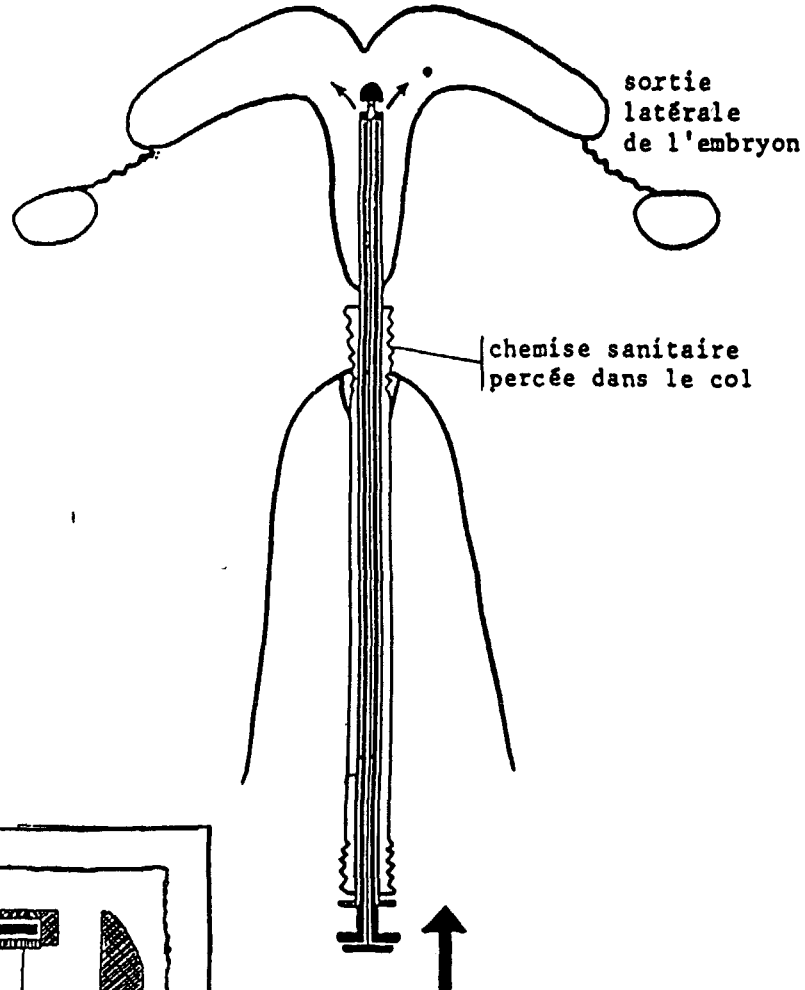
L'ensemble de cette manipulation a lieu sous hotte à flux laminaire. Le manipulateur, muni du pistolet de transfert complet se rend dans le local de contention où la jument porteuse attend. Il enfile une paire de gants de fouilles stériles et une paire de gants chirurgicaux, également stériles et permettant une meilleure sensibilité, le lubrifiant déposé en faible quantité sur le dessus de la main du manipulateur est un gel bactériostatique stérile. La paume de la main protège la partie terminale du pistolet lors de son introduction dans le vagin ; l'index sert à trouver l'ouverture du cervix, si le pistolet ne le trouve pas seul. La chemise sanitaire est percée dans le col, le pistolet est introduit dans l'utérus jusqu'à résistance puis retiré d'un à deux centimètres. L'embryon est déposé dans l'utérus grâce à une poussée lente et continue du piston. (Figure IV) la totalité du matériel de transfert est retirée, la jument porteuse retournant en box ou en stalle sans aucun autre traitement complémentaire.

FIGURE IV: LE MATERIEL DE TRANSFERT DE L'EMBRYON ET SES DIFFERENTES PARTIES

• LES DIFFERENTES PARTIES DU MATERIEL



• LE DEPOT DE L'EMBRYON DANS L'UTERUS.



• LE MATERIEL DE TRANSFERT COMPLET PRET A L'EMPLOI



• LES PROTECTIONS SUCCESSIVES DU MATERIEL PERMETTANT LA PRESERVATION DE LA STERILITE JUSQU'AU DEPOT DE L'EMBRYON DANS L'UTERUS

