

20ème Journée d'Etude



2 Mars 1994

Bilan provisoire des essais de superovulation appliqués à des juments donneuses d'embryons

Attempts of superovulation in embryo transfer programmes - Synthesis of ten different experiments

par D. Lagneaux (1), G. Duchamp (1), Christine Gaillot (1), Sabine Hofferer (2), D. Domerg (3), J.F. Bruyas (4), J.F. Beckers (5), G. Hajmeli (1), et E. Palmer (1)

(1) *Unité de Reproduction Equine, Haras-INRA - 37 380 Nouzilly - FRANCE.*

(2) *Elle Génétique - 50 680 Moon-sur-Elle - FRANCE.*

(3) *Haras National - 54 110 Rosières-aux-Salines - FRANCE.*

(4) *Service Pathologie Reproduction E.N.V. - 44 087 Nantes Cedex 03 - FRANCE.*

(5) *Faculté de Médecine Vétérinaire, Salt Tilman - B 4 000 Liège - BELGIQUE*

Résumé

L'objectif de la superovulation est l'augmentation du nombre d'embryons lors de programmes de transplantation embryonnaire. Au cours de plusieurs expériences, différents paramètres ont pu être testés : race des animaux, dose, type et durée de traitement, période de l'année et du cycle ... Une dose seuil, une durée minimale et maximale de traitement ont été définies. Ces traitements permettent une augmentation du nombre d'ovulations mais sans augmentation du nombre d'embryons, les traitements actuels de superovulation ont pour effet d'induire une perte de la qualité des ovocytes (GOUDET et al, 1994).

Mots-clés : superovulation - essais - embryons - paramètres - fertilité

Summary

One of the most important advantage of superovulation is to increase the number of embryos in equine embryo transfer practice. Different factors affecting superovulation were improved. These experiments allowed to define parameter : minimal dose, minimal duration of treatment, better synchrony of ovulations. But these results are unefficient for embryo transfer programme because they didn't allowed to major the number of embryo collected per donor. It appeared that present treatments of superovulation induced a loss of the "quality" of ovulations (GOUDET et al, 1994).

Key-words : superovulation - attempts - embryos - factors - fertility

INTRODUCTION

En 1972, OGURI et TSUTSUMI ont réalisé les premières collectes d'embryons chez la jument. Ils ont obtenu un taux de collecte (nombre d'embryons/nombre de collectes) de 0,45. En 1993, les 443 collectes réalisées en France dans le cadre des différents programmes de transplantations embryonnaires commerciales ont permis d'obtenir un taux de collecte de 0,53 (235 embryons). Après plus de vingt ans de recherche, le taux de collecte n'a pas connu d'amélioration considérable.

Sortie des laboratoires de recherche depuis le début des années 1970, la transplantation embryonnaire en espèce bovine a rapidement bénéficié de l'efficacité des traitements de superovulation. Actuellement, avec un taux de collecte par ovulation de 0,6 mais avec un nombre moyen de 12 ovulations par vache et par cycle, la production moyenne d'une vache est de 9 embryons dont 5,5 transférables (CHUPIN et al, 1983).

Chez les équins, LAPIN et GINTHER en 1977, DOUGLAS en 1979 ont émis plusieurs hypothèses face aux faibles taux de collectes : la surévaluation du nombre des ovulations, l'absence de fosse ovulatoire pour certains follicules, l'augmentation du nombre d'ovocytes anormaux à cause du traitement d'extraits hypophysaires. En 1982, WOODS *et al*, comparant différentes expérimentations concluaient ainsi leur article de synthèse : *Le nombre réduit d'embryons et l'écart entre le nombre d'ovulations et le nombre de gestations multiples est décourageant quant aux perspectives de la technique de superovulation en transplantation embryonnaire équine*. En 1984, WOODS et GINTHER ont obtenu, après transfert d'embryon, un taux de gestation à 21 jours de 0,47 (9/19) avec des embryons superovulés (9/19) vs 0,87 (7/8) avec des embryons issus d'ovulations naturelles ($p < 0,05$). Face à ces perspectives inquiétantes, les travaux de superovulation chez la jument vont se faire de plus en plus rares. Cette même année (1984), PALMER débute ses premiers essais de superovulation chez la jument. Ils se poursuivent aujourd'hui encore avec un double objectif : l'un cognitif pour comprendre les mécanismes intervenant dans la croissance et la sélection folliculaires, l'autre, appliqué (c'est celui qui nous intéresse ici) pour tenter d'augmenter la production d'ovocytes et d'embryons.

OBJECTIFS

Depuis près de dix ans, des études ponctuelles ont été menées par les différents co-auteurs de cet article. Parce qu'elles s'échelonnent dans le temps, ces études sont difficilement comparables entre elles. L'objectif est de dégager quelques conclusions pratiques pour la transplantation embryonnaire. Les différents protocoles expérimentaux sont dénommés du nom de la personne responsable (chercheur ou étudiant) suivi de la date de réalisation.

MATERIELS ET METHODES

Le suivi gynécologique.

Le suivi gynécologique par échographie se fait à des fréquences allant d'un examen tous les trois jours au moins pour des follicules de petite taille, à des examens quotidiens pour des follicules d'un diamètre plus important (17 mm à 25 ou 30 mm selon les expérimentations).

Les collectes d'embryons.

Les collectes d'embryons sont réalisées généralement à J7 (J0 = jour de l'ovulation) selon la méthode standard classique décrite par LAGNEAUX et al en 1988. Le milieu de collecte est toujours un liquide physiologique approprié, Dulbecco's PBS enrichi en sérum de veau foetal ou en BSA (sérum albumine bovine).

Expérimentation LAFAILLE-86

En juin, 24 juments poney de type Welsh sont réparties en deux lots (8 traitées, 16 témoins). Le traitement est le suivant : injections quotidiennes intra-musculaires (im) de 20 mg d'extraits hypophysaires équins (CEG) (DUCHAMP et al, 1987) jusqu'à obtention d'au moins deux follicules d'un diamètre supérieur à 32 mm. Les ovulations sont induites par injection de 40 mg de CEG intra-veineux (iv) deux jours après arrêt du traitement de superovulation.

Expérimentation LENORMAND-87

En mai-juin, 26 juments de Selle et 21 juments poney de type Welsh sont réparties en deux lots (juments de Selle : 12 traitées, 14 témoins - juments poney : 12 traitées, 9 témoins). Des injections quotidiennes (im) de 25mg d'extraits hypophysaires (CEG) sont réalisées jusqu'à obtention d'au moins deux follicules d'un diamètre supérieur à 29 mm. Les ovulations sont induites par injection de 25 mg de CEG (iv) lorsqu'un follicule atteint un diamètre supérieur à 34 mm.

Expérimentation LENORMAND-88

De mars à juin, 10 juments poney de type Welsh sont réparties en deux lots, l'un (N=5) subissant un pré-traitement, l'autre (N=5) pas. Le pré-traitement consiste en une infusion continue (mini-pompe osmotique) de 2,5 mg de CEG (im) pendant environ 34 jours. Tous les animaux (N=10) reçoivent ensuite le traitement de superovulation : injections quotidiennes (im) de 25 mg de CEG. Le traitement se poursuit jusqu'à l'obtention de la première ovulation.

Expérimentation HOFFERER-90

En mars et avril, 27 juments poney de type Welsh sont réparties en trois lots. Les 9 juments du lot 1 ne reçoivent aucun traitement, celles du lot 2 reçoivent quotidiennement 25 mg CEG im jusqu'à ce qu'au moins deux follicules atteignent un diamètre de 34 mm. Enfin les 9 juments du lot 3 sont traitées comme celles du lot 2, les 25 mg de CEG étant remplacés par

0.75 mg de eFSH im (HOFFERER et al, 1993). Dans les trois lots, les ovulations sont induites par l'injection (iv) de 25 mg de CEG un jour après l'apparition d'un follicule de 34 mm et au moins un jour après la fin du traitement de superovulation.

Expérimentation HOFFERER-91 (publication : DIPPERT et al, 1992)

De juillet à septembre, 45 juments américaines de type Selle sont réparties en 3 lots. Dans le lot 1, le traitement quotidien de CEG (25 mg) im débute à partir de J5 post-ovulation. Dans le lot 2, le même traitement débute à J12 post-ovulation. Enfin dans le lot 3 : le traitement est identique au lot 2 (CEG 25 mg im quotidien débutant à J12 post-ovulation) mais il est précédé et accompagné d'un traitement de GnRH (implant de GnRH depuis J0, pendant 28 jours). Pour les trois lots, les traitements quotidiens im de CEG se poursuivent jusqu'à la première ovulation. Une injection d'hCG ce même jour permet l'ovulation des éventuels autres follicules préovulatoires restants.

Expérimentation DOMERG-92

De mars à mai, 12 juments Selle Français ont été réparties en deux lots. Le traitement des juments du lot 1 consiste en des injections quotidiennes (im) de 25 mg de CEG. Les juments du lot 2 subissent le même protocole, la quantité de CEG étant réduite au tiers. Dans les deux lots le traitement se poursuit jusqu'à obtention d'un follicule d'un diamètre de 35 mm. S'il y a un autre follicule entre 30 et 35 mm, le traitement se poursuit jusqu'à ce que le 2ème follicule atteigne 35 mm. Dans les deux lots, l'induction des ovulations par injection de CEG (iv) intervient quand le premier follicule (s'il est seul) ou quand le deuxième follicule atteint un diamètre de 35 mm.

Expérimentation LAGNEAUX-92

De janvier à mai, 12 juments de Selle ont été exploitées au cours de 39 cycles (10 traités - 29 témoins). Le traitement consiste en des injections quotidiennes (im) de eFSH (dose équivalente à 8,3 mg de CEG). Dans les deux lots, l'induction des ovulations par injection de CEG (iv) intervient quand le premier follicule (s'il est seul) ou quand le deuxième follicule atteint un diamètre de 35 mm.

Expérimentation HAJMELI-92 (publication : PALMER and HAJMELI, 1993)

Exploitées sur 2 cycles successifs au cours de l'hiver et sur 4 cycles successifs au printemps, 16 juments poney de type Welsh sont réparties en 2 lots. En hiver les juments du lot 1 reçoivent des injections quotidiennes (im) de 25 mg de CEG, les juments du lot 2 recevant l'équivalent en eFSH. Au cycle suivant, les traitements sont inversés : les juments du lot 1 reçoivent des injections quotidiennes (im) de l'équivalent en eFSH des 25 mg de CEG alors que les juments du lot 2 reçoivent des injections quotidiennes (im) de 25 mg de CEG. Au printemps deux autres lots sont constitués : un lot témoin avant traitement, un lot témoin après traitement. Ces lots témoins ne reçoivent aucun traitement ni de superovulation ni d'induction de l'ovulation.

Expérimentation GAILLOT-93

Exploitées à partir de février et ceci au cours de 6 cycles successifs, 12 juments poney de type Welsh et 6 juments de selle sont réparties de telle sorte qu'elles passent dans les 6 lots expérimentaux. Avant chaque mise en lot, il y a ponction de tous les follicules d'un diamètre supérieur à 12mm. Les variations entre lots concernent soit la présence ou non d'un traitement de superovulation, soit la durée du traitement (traitement long - traitement court), soit la dose quotidienne de eFSH (im) injectée (dose entière - demi-dose). Au cours des 6 cycles tous les animaux ont chacun deux cycles témoins (TO), deux traitements longs (TL), deux traitements courts (TC). TO : pas de traitement. TL : injection IM quotidienne d'une dose (ou demi-dose) de eFSH : - 1ère injection deux jours après ponction, - arrêt le jour de l'induction de l'ovulation. TC : injection IM quotidienne d'une dose (ou demi-dose) de FSH : - 1ère injection le jour où F1 > 17mm, - arrêt quand F2 = 25 mm. Les doses de eFSH injectées sont les suivantes : les 6 juments de selle reçoivent des doses entières (équivalent de 25 mg de CEG), 6 juments poney reçoivent des doses entières, les 6 autres reçoivent des demi-doses (équivalent de 12,5 mg de CEG). Dans tous les cas et pour tous les animaux, l'ovulation est induite par injection iv d'une dose de 25 mg de CEG.

Expérimentation BRUYAS-93 (publication BRUYAS et al, 1993)

Onze cycles de juments poney de type Welsh ont été exploités et répartis en 4 lots : un premier lot recevant quotidiennement eFSH, un deuxième lot recevant également quotidiennement du placebo (solution saline), un troisième lot divisé en deux sous-groupes reçoit eFSH en sous-cutané en une ou deux injections journalières. Enfin le quatrième lot, témoin, ne reçoit aucune injection.

RESULTATS

Expérimentation LAFAILLE-86 (cf. Tableau 1).

Le traitement de superovulation a permis d'obtenir significativement plus ($p < 0,05$) d'ovulations par animal traité (2,7) que chez les animaux témoins (1,1). Le taux de collecte par ovulation dans les deux lots (traité et témoin) n'est pas différent (respectivement 6/21 vs 6/15) même si globalement les animaux superovulés ont donné plus d'embryons (6 embryons sur 7 collectes) que les animaux témoins (6 embryons sur 15 collectes).

Expérimentation LENORMAND-87 (cf. Tableau 2)

Le traitement de superovulation des juments de selle n'a pas permis d'augmenter significativement le nombre d'ovulations puisqu'il est en moyenne de 2,0 chez les juments traitées alors qu'il est de 1,5 chez les juments témoins. Seules les juments traitées ont été inséminées. Les 12 collectes ont permis d'obtenir 10 embryons et un taux de collecte par ovulation de 0,4 (10/24). Les 12 juments poney superovulées ont eu en moyenne 2,27 ovulations et les juments poney témoins 1,13 ($p < 0,05$). Les 11 juments poney superovulées collectées ont donné 8 embryons alors que les 8 juments poney témoins en ont donné 3 ($p > 0,1$). Il n'y a là

Tableau 1 : expérimentation LAFAILLE-86

	effectif	ovulations	collectes embryons	
lot superovulé	08	21	07	06
lot témoin	16	15	14	06

Tableau 3 : expérimentation LENORMAND-88

	effectif	ovulations	collectes embryons	
prétraitées	05	14	14	05
non prétraitées	05	12	05	02

Tableau 5 : expérimentation HOFFERER-91

	effectif	ovulations	collectes embryons	
lot témoin	15	19	15	14
lot CEG-J5	15	40	14	17
lot CEG-J12	15	13	11	11
lot J12+GnRH	15	27	14	13

Tableau 7 : expérimentation LAGNEAUX-92

	effectif	ovulations	collectes embryons	
lot témoin	29	39	29	11
lot FSH(1/3)	10	16	10	0

Tableau 8 : expérimentation HAJMELI-92 (effectifs cumulés)

	effectif	ovulations	collectes embryons	
lots témoins	28	28	28	15
lots traités	59	168	57	33
lots CEG	29	83	27	11
lots FSH	30	85	30	22
1e stimulation	29	74	29	16
2e stimulation	30	94	28	17

Tableau 2 : expérimentation LENORMAND-87

	effectif	ovulations	collectes embryons	
Selle superov	12	24	12	10
Selle témoin	14	21	/	/
Poney superov	11	25	11	08
Poney témoin	08	09	08	03

Tableau 4 : expérimentation HOFFERER-90

	effectif	ovulations	collectes embryons	
lot témoin	09	09	05	02
lot CEG	09	20	07	00
lot eFSH	09	19	07	08

Tableau 6 : expérimentation DOMERG-92

	effectif	ovulations	collectes embryons	
lot témoin	21	27	21	13
lot CEG 25mg	19	46	19	12
lot CEG 8mg	19	28	19	08

Tableau 9 : expérimentation GAILLOT-93 (effectifs cumulés)

	effectif	ovulations	collectes embryons	
lots TL	28	41	19	12
lots TC	27	41	19	13
lots TO	29	28	27	11

Tableau 10 : expérimentation BRUYAS-93 (effectifs cumulés)

	effectif	ovulations	collectes embryons	
lot FSH	11	17	11	05
lot témoin	10	10	10	08
lot placebo	11	11	11	04

Tableau 11 : synthèse des différentes expérimentations

	tous traitements		témoins	
nb de cycles	271		152	
nb d'ovulations	558		171	
nb d'embryons	174		088	
race	Selle	poney	Selle	poney
nb de cycles	117	154	041	111
nb d'ovulation	212	346	053	118
nb of d'embryons	046	128	029	059
type de traitement	FSH	CEG	FSH	CEG
nb de cycles	012	105	096	058
nb d'ovulations	018	194	201	145
nb d'embryons	007	039	059	069

encore aucune différence significative du taux d'embryons par ovulation chez les animaux superovulés (0,32) et chez les animaux témoins (0,33).

Expérimentation LENORMAND-88 (cf. Tableau 3)

Le traitement de superovulation des juments poney de type Welsh (précédé ou non d'un pré-traitement de CEG) n'a pas fait apparaître de différence significative ($P > 0,1$) du nombre d'ovulations entre les animaux pré-traités au CEG (2,8) et les animaux témoins (2,4). Les 5 animaux superovulés pré-traités au CEG ont permis d'obtenir 5 embryons alors que les 5 animaux superovulés non pré-traités ont permis d'obtenir 2 embryons ($p > 0,1$). Ces taux de collecte par ovulation sont ici particulièrement faibles (0,35 et 0,17 respectivement) ($p > 0,1$).

Expérimentation HOFFERER-90 (cf. Tableau 4)

Les traitements des 27 animaux répartis dans les 3 lots ont permis d'obtenir respectivement 1,0 ovulation et 0,4 embryon par collecte pour le lot témoin, 2,2 ovulations et 0 embryon pour le lot CEG et 2,1 ovulations et 1,14 embryon par collecte pour le lot FSH. Alors que le taux de collecte par ovulation est identique entre les lots témoin et FSH (0,4), il y a significativement plus d'ovulations et donc plus d'embryons collectés par jument lors du traitement de superovulation avec FSH ($p < 0,05$). C'est la première fois qu'une telle observation a pu être faite.

Expérimentation HOFFERER-91 (cf. Tableau 5)

Il y a significativement plus d'ovulations ($p < 0,05$) dans le lot traité des J5 (2,9) que dans les trois autres lots (1,1 - 1,8 et 1,3 respectivement). S'il n'y a pas de différence significative du nombre d'embryons par jument dans les différents lots, il y a significativement plus d'embryons par ovulation dans les lots témoin (0,7) ou à traitement tardif J12 (0,8) que dans les lots à traitement précoce J5 (0,4 ou 0,5).

Expérimentation DOMERG-92 (cf. Tableau 6)

Il y a significativement plus d'ovulations dans le lot CEG 25mg (2,4) que dans les deux autres lots (lot témoin : 1,3, lot 8,3 mg : 1,5). Le nombre d'embryons par cycle est identique (respectivement 0,6 - 0,6 et 0,4). Il y a significativement plus d'embryons par ovulation ($p < 0,05$) dans le lot témoin (0,43) que dans les deux autres lots (lot CEG 25 mg : 0,22 - lot CEG 8,3 mg : 0,28).

Expérimentation LAGNEAUX-92 (cf. Tableau 7)

Le traitement de superovulation avec une dose réduite de eFSH n'a pas montré de différence significative du nombre d'ovulation entre les juments traitées (1,6) et les témoins (1,3). Au cours des 29 collectes témoins (39 ovulations), 11 embryons ont été obtenus alors qu'aucun embryon n'a été collecté sur les 10 juments du lot traité. Il y a significativement plus d'embryons par ovulation dans le lot témoin (0,28) que dans le lot traité (0,0) ($p < 0,05$).

Expérimentation HAJMELI-92 (cf. Tableau 8)

La répartition de traitements tout au long de l'année n'a pas montré de différence significative du nombre d'ovulations en fonction de la période. Toutefois, il semble y avoir plus d'ovulations dans la seconde vague de stimulation (mars et août) (3,1) que lors de la première (février et juillet) (2,5). Mais il n'y a pas plus d'embryons dans l'un ou l'autre lot (0,6 vs 0,5). Il n'y a pas non plus de différence entre le nombre d'ovulations obtenues avec FSH (2,8) ou avec CEG (2,8). Une tendance (non significative) semble indiquer un nombre d'embryons collectés supérieur avec le traitement FSH (0,7) par rapport au traitement CEG (0,41).

Expérimentation GAILLOT-93 (cf. Tableau 9)

La durée du traitement (TL ou TC) n'a pas permis de mettre en évidence d'augmentation du nombre d'ovulations (1,46 vs 1,51) ni d'augmentation du nombre d'embryons par collecte (0,63 vs 0,68). Il n'y a pas de différence entre race jument ou poney à l'intérieur de chaque lot TC ou TL. Enfin, le traitement demi-dose a présenté significativement moins d'ovulations dans chacun des deux lots TL et TC (respectivement 1,1 vs 1,7 dans le lot TL et 0,87 vs 1,7 dans le lot TC). Le nombre d'embryons par collecte n'est pas différent.

Expérimentation BRUYAS-93 (cf. Tableau 10)

Le traitement FSH a permis d'obtenir significativement plus d'ovulations (1,5) que le traitement placebo (1,0) ou l'absence de traitement (1,0) ($p < 0,05$). S'il n'y a pas d'effet du type d'injection (sous-cutanée ou im) sur le nombre d'ovulation ou d'embryon, il y a significativement moins d'embryons chez les animaux recevant du placebo (0,36) que chez les animaux témoins (0,8) ($p < 0,05$).

DISCUSSION (cf. Tableau 11)

Les différents cycles traités en superovulation ont permis d'obtenir significativement plus d'ovulations ($558/271 = 2,05$) ($p < 0,05$) que les animaux témoins ($171/152 = 1,12$). Le nombre d'embryons par jument traitée est identique à celui des juments témoins (0,64 vs 0,58) alors que le nombre d'embryons par ovulation est significativement plus faible ($p < 0,05$) dans les lots traités (0,31) que dans les lots témoins (0,51).

Effet de la race des animaux.

S'il y a significativement plus ($p < 0,05$) d'ovulations multiples naturelles chez les juments témoins de type Selle (1,3) que chez les juments poney (1,0) il n'y a pas globalement plus d'ovulations chez les juments de Selle superovulées (1,8) que chez les juments poney (2,2). Les différents traitements ainsi réalisés n'ont donc pas permis d'amplifier la différence naturelle observée. Elle est même atténuée. Dès lors, la dose employée lors des traitements des juments de Selle est-elle suffisante ?

Effet de la période de l'année

Parmi les expérimentations qui se sont déroulées sur plusieurs cycles successifs en hiver et au printemps (*HAJMELI-92 - GAILLOT93*) il n'y a pas d'effets de la période de l'année sur la réponse aux différents traitements de superovulation.

Effet du type de traitement utilisé.

Le type de traitement a été variable d'une expérimentation à l'autre. Même si l'appellation générique ICEGI est la même dans les différentes expérimentations utilisant des extraits hypophysaires bruts équins totaux, les lots, l'origine des hypophyses, la fabrication ... varient d'une année sur l'autre. L'activité biologique in vitro de CEG a été régulièrement testée (GUILLOU et al, 1983) et on peut donc considérer qu'il y a similitude entre un traitement de 25 mg de CEG en 1988 et un traitement de 25 mg de CEG en 1992. Deux traitements ont été utilisés : les extraits hypophysaires bruts équins totaux (CEG) et la partie purifiée en eFSH de ces mêmes extraits (HOFFERER et al, 1992). Alors qu'il n'y a pas globalement de différence entre CEG et FSH ni dans le nombre d'ovulations (respectivement 2,01 vs 2,03), ni dans le nombre d'embryons par ovulation (0,32 vs 0,31) *HAJMELI-92* semble indiquer une tendance à des taux d'embryons par ovulation avec eFSH supérieure à celle obtenue avec CEG (0,73 vs 0,41) ($p > 0, 1$).

Effet de la quantité de produit

Il est délicat de comparer les quantités de produits apportées dans les différentes expérimentations au cours de ces 8 années car l'origine hypophysaire, la fabrication et le conditionnement ont pu changer. Ainsi on ne peut pas dire si 20 mg de CEG utilisés au cours de l'expérimentation *LAFAILLE-86* sont significativement différents de 25 mg utilisés par la suite. Par contre, lorsque les expérimentations *DOMERG-92*, *LAGNEAUX-92*, *HAJMELI-92* ou *GAILLOT-93* ont comparé de façon stricte la dose entière (25mg) de CEG ou eFSH à une dose demi ou tiers, seule la dose entière a permis d'augmenter de façon significative le nombre d'ovulations par rapport aux lots témoins. Les doses réduites ont eu de plus un effet négatif sur la fertilité des ovulations obtenues. Le traitement réduit est inefficace, de plus il apporte des substances toxiques pour les ovocytes. Une étude du contenu réel des produits utilisés (eFSH ou CEG) paraît nécessaire.

Effet de la durée du traitement

Lors de l'élaboration d'un protocole de superovulation, il est toujours difficile de déterminer objectivement le jour du début du traitement. Faut-il le débiter à une date précise suivant le traitement de synchronisation ou au contraire en fonction de la population folliculaire présente sur les ovaires ? Ce traitement doit-il être poursuivi sur une longue période ou non ? Comme précédemment, il est impossible de comparer les expérimentations deux à deux, seules les études ayant porté précisément sur l'effet de la durée du traitement permettent de conclure. *HOFFERER-91* a montré que le traitement de superovulation était plus efficace (en nombre d'ovulation) s'il était débuté plus tôt (J5) avant la sélection du follicule dominant. Par contre, le nombre d'embryons par collecte est identique dans les deux lots, ce qui montre

qu'une trop longue durée de traitement à effet LH (type CEG) nuit à la qualité des ovocytes obtenus. Les expérimentations *HAJMELI-92* et *GAILLOT-93* ont tenté de lever l'ambiguïté du jour du début du traitement en effectuant, lors de l'arrêt du traitement de synchronisation, la ponction de tous les follicules d'un diamètre supérieur à 12 mm. L'effet de ce type de traitement n'a pas été étudié, mais à l'évidence il n'a pas permis d'améliorer les résultats ni du nombre d'ovulations ni du nombre d'embryons. Enfin *GAILLOT-93* n'a pas montré d'augmentation du nombre d'ovulations lors des traitements longs ou courts ni d'augmentation du nombre d'embryons par collecte. Chez la jument de selle, le traitement long (TL) diminue même le nombre d'embryons par collecte. Les effets bénéfiques et négatifs du traitement long s'auto-annulent : augmentation du nombre d'ovulations et risque que ce même traitement soit toxique pour la qualité des ovocytes produits (d'où diminution du nombre d'embryons). Apporter du CEG et donc eLH en début de croissance folliculaire n'est sans doute pas la meilleure solution. Mais il ne semble pas que eFSH soit plus efficace. Peut être des produits hormonaux encore plus purifiés permettront-ils de lever cette ambiguïté ?

Effet de l'induction des ovulations

Si aucune conclusion n'émerge ici, il reste que lorsque le traitement de superovulation s'inscrit dans un protocole de collecte d'embryons, il est nécessaire de pouvoir induire l'ovulation afin de synchroniser le stade de développement des embryons à collecter. Si plus de deux jours séparent la première ovulation de la dernière, il est techniquement difficile de pouvoir collecter utilement tous les embryons : avant J6 tous les embryons ne sont pas présents dans l'utérus et au-delà de J8, ils sont d'un maniement très délicat (cf LAGNEAUX et al, 1988).

Effet de traitements préalables

Aucun traitement préalable au traitement de superovulation n'a permis de mettre en évidence une augmentation significative du nombre d'ovulations ni le pré-traitement de *LENORMAND-88* consistant en une infusion continue (mini-pompe osmotique) de mini-dose de CEG ni celui de *HOFFERER-92* à base de GnRH (bien qu'ici une légère tendance se dessine). Dans l'expérimentation *HAJMELI-92*, même s'il semble qu'un traitement rebond de superovulation soit plus efficace quant au nombre d'ovulations, le nombre d'embryons par collecte n'est pas modifié.

Effet placebo

Une étude intéressante (et troublante) (*BRUYAS-93*) montre que l'effet placebo semble exister lors des traitements de superovulation puisque, chez les animaux recevant du placebo, le nombre d'embryons obtenus est significativement plus faible que chez les animaux témoins. Ceci nous invite à réfléchir sur de nouvelles méthodes et peut-être d'autres voies d'administration des différents traitements.

CONCLUSION

On sait, par différents traitements, augmenter de façon significative le nombre d'ovulations par cycle chez une jument, même si ceux-ci ne sont pas optimisés (en particulier chez les juments de Selle). Mais cette augmentation n'est pas suivie de celle du nombre d'embryons. Même si l'emploi systématique de eFSH plutôt que CEG est souhaitable, il paraît utile de mettre en évidence dans ces préparations la ou les substances ovocyto-toxiques qu'elles semblent renfermer. Une augmentation de la pureté de ces produits hormonaux permettra de lever cette ambiguïté. Peut-être faut-il également envisager de nouvelles voies d'administration de ces différents traitements ? Si la superovulation peut permettre sans doute le véritable essor de la technique de transplantation embryonnaire, cet objectif ne sera atteint que si, dans le même temps, la congélation des embryons acquiert davantage d'efficacité. Ainsi sont définis les deux principaux objectifs de recherche en transplantation embryonnaire pour les années à venir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHUPIN D., FLORIN B. et PROCUREUR R., 1983. Comparaison en ferme de l'efficacité de différentes méthodes de congélation - décongélation du blastocyste bovin conditionné en paillettes. *Bul. Tech. Insem. Artif.* 29,21-22.

DIPPERT K.D., HOFFERER S., PALMER E., JASKO D.J. and SQUIRES E.L., 1992. Initiation of superovulation in mares 5 or 12 days after ovulation using equine pituitary extract with or without GnRH agonist. *Theriogenology*, vol. 38,695-710.

DOUGLAS R.H. 1979. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. *Theriogenology* 2,33-46.

DUCHAMP G., BOUR B., COMBARNOUS Y. and PALMER E., 1987. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J.Reprod. Fert. suppl.* 35, 221-228.

GOUDET G., BEZARD J., DUCHAMP G., GAILLOT C. et PALMER E., 1994. Qualité des ovocytes et des follicules après ovulation au cours de cycles naturels. *Compte-rendu de la 20ème journée d'étude du CEREOPA, Paris.*

GUILLOU F. and COMBARNOUS Y., 1983. Purification of equine gonadotrophins and comparative study of their acid dissociation and receptor-binding specificity. *Biochem. Biophys. Acta* 755,229-236.

HOFFERER S., LECOMPTE F., MAGALLON T., PALMER E., and COMBARNOUS Y., 1993. Induction of ovulation and superovulation in the mare using equine luteinizing hor-

mone and follicle-stimulating hormone separated by hydrophobic interaction chromatography. *J. Reprod. Fert.* 98,597-602.

LAGNEAUX D., DUCHAMP G. et PALMER E., 1988. La transplantation embryonnaire chez la jument. CEREOPA, 14ème journée d'étude., Paris, 163-181.

LAPIN D.R. and GINTHER O.J., 1977. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory mares with an equine pituitary extract. *J. Anim. Sci.* 44,834-842.

OGURI N. and TSUTSUMI Y., 1972. Non surgical recovery of equine eggs and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. *J. Reprod. Fert.* 31, 1 87-1 95.

PALMER E., 1984. Recent attempts to improve synchronisation of ovulation and to induce superovulation in the mare. *Equine Vet. J. suppl.* 3,11-18.

WOODS G.L., SCRABA S.T. and GINTHER O.J., 1982. Prospect for induction of multiple ovulations and collection of multiple embryos in the mare. *Theriogenology* 17, 60-72.

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