



4727

26<sup>ème</sup> journée d'étude1<sup>er</sup> mars 2000

LES HARAS NATIONAUX

## Etude morpho-histologique d'embryons équins âgés exactement de 156 heures (6,5 jours) et de 168 heures (7 jours)

J-F. BRUYAS\* , S. COLCHEN\*, I. BATTUT\*, F.FIÉNI\*,  
B. SILIART\*\*, D. TAINTURIER\*

\*Laboratoire de Pathologie de la Reproduction,

\*\*Laboratoire des Dosages Hormonaux

Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes

B.P. 40706, 44307 Nantes Cedex 03

### Résumé

L'objectif de cette étude était d'effectuer une analyse histologique quantifiée de la structure d'embryons équins récoltés par lavage utérin exactement à 156 (n=8) et 168 (n=11) heures après l'ovulation. Les résultats montrent une grande hétérogénéité entre les embryons de même âge. Les embryons âgés de 156h sont aux stades morula ou jeune blastocyste avec ou sans capsule, ils comptent entre 117 et 417 cellules (moyenne  $\pm$  SD : 275  $\pm$  105). Pour ce lot d'embryons, il n'y a aucune corrélation entre le nombre de cellules et respectivement le diamètre embryonnaire, le taux de progestérone plasmatique de la mère. Les embryons âgés de 168h sont aux stades jeune blastocyste, blastocyste et blastocyste épanoui, ils ont entre 272 à 2217 cellules (moyenne  $\pm$  SD : 1093  $\pm$  666). Dans ce lot d'embryons, il n'y a pas de corrélation entre le nombre de cellules et la progestéronémie maternelle en revanche la corrélation est significative ( $P < 0.01$ ) entre le nombre de cellules et le diamètre embryonnaire. En outre, les embryons de 7 jours comptent significativement plus de cellules (x 4, en moyenne) que ceux de 6,5 jours. Outre la rapidité de doublement du nombre de cellules, ces résultats montrent une grande variabilité dans la chronologie du développement embryonnaire équin.

*Mots clés : Jument - Transfert d'embryons - Embryon équin*

### Summary

Horse embryos were collected at exactly 156 ( $\pm$  0.5) (n=8) or 168 ( $\pm$  0.5) hours (n=11) after ovulation. In the Day 6.5 group, all embryos were early blastocysts except one morula. This morula and an early blastocyst had no capsule. Capsules of the other embryos were thin. The mean ( $\pm$  s.d.) total number of cells was 275  $\pm$  105 [range: 117 to 417]. In the Day 7 group, there were early, mid and expanded blastocysts. The mean total number of cells ( $\pm$  s.d.) was 1093  $\pm$  666 [range: 272 to 2217]. In the Day 7 group, there were significant correlations ( $P < 0.01$ ) between the total number of cell and, the diameter. The Day 7 embryos were significantly ( $P < 0.01$ ) composed of more cells (x4) but with a lower proportion of Inner cell Mass than the Day 6.5 embryos. These results suggest that in equine embryos (i) there is an individual (perhaps seasonal) variability of the rate of development; (ii) the number of cells increases twofold every 6 hours between day 6.5 and day 7 after ovulation.

*Key-words : Mare - Development rate - Embryo transfer - Horse embryo*

4727

## INTRODUCTION

L'analyse des quelques études sur la chronologie du développement embryonnaire précoce chez les équins jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour post ovulation [ALLEN *et al.*, 1976 ; BETTERIDGE *et al.*, 1982 ; BEZARD *et al.*, 1989 ; BALL *et al.*, 1993] et sur les dénombrements de cellules faits sur des embryons récoltés par lavage utérin en moyenne 6,5 jours [BRUYAS *et al.*, 1993, 1995, 1997ab] ou 7 jours post-ovulation [BALL *et al.*, 1992] suggère que le développement embryonnaire équin serait très rapide. En effet entre le 4 et le 7<sup>ème</sup> jour post ovulation, le nombre de cellules composant les embryons semble doubler toutes les 12 heures. Les différentes analyses histologiques quantifiées que nous avons réalisées sur des embryons équins semblent montrer également, une hétérogénéité importante entre embryons récoltés en moyenne à  $6,5 \pm 0,5$  jours quant à leurs stades de développement [BRUYAS *et al.*, 1993, 1995, 1997ab]. Dans un essai précédent [BATTUT *et al.*, 1997 ; BRUYAS *et al.*, 1998], des récoltes non chirurgicales d'embryons avaient été réalisées exactement 144 ( $\pm 0,5$ ), 156 ( $\pm 0,5$ ) ou 168 ( $\pm 0,5$ ) heures après constat de l'ovulation. Aucun embryon n'avait été récolté à 144 h, et le taux de succès des récoltes était respectivement de 53 % et 48% à 156 et 168 h. Le but de l'étude était de réaliser une analyse histologique de ces embryons récoltés à 156 ( $\pm 0,5$ ) (6,5 jours) ou 168 ( $\pm 0,5$ ) heures (7 jours) après l'ovulation.

## I - MATERIEL ET METHODES

### A. Récoltes des embryons

La manière dont ont été récoltés les embryons de cette étude a été décrite dans le détail dans de précédents articles [BATTUT *et al.*, 1997 ; BRUYAS *et al.*, 1998 (expérience1)]. Ils ont été collectés chez des juments Trotteur français et des ponettes Pottock x Welsh, par lavage utérin à l'aide d'un milieu PBS modifié (milieu F1®, I.M.V., l'Aigle) selon la technique décrite par LAGNEAUX *et al.* [1988]. Ces collectes étaient réalisées 155,5 et 167,5 heures après le diagnostic de l'ovulation. Ce dernier était réalisé par un suivi échographique horaire des follicules ovariens préovulatoires. Ainsi, l'âge post-ovulation des embryons était exactement (à une demi-heure près) 156 ou 168 heures. Les ovulations avaient été préalablement induites par injections de gonadotrophines ou de gonadolibérine [BRUYAS *et al.*, 1998 (expérience1)]. Dans les 24 heures suivant cette injection, les juments étaient inséminées avec un mélange de spermatozoïdes frais récoltés à partir de 3 étalons fertiles. Les inséminations ont donc toutes eu lieu entre 8 et 20 heures avant l'ovulation.

Dès leur découverte dans le milieu de récolte, les embryons étaient placés dans un milieu F1® stérile, le temps de leur évaluation morphologique et de la mesure de leur diamètre sous loupe binoculaire et microscope inversé. Huit embryons de 156 h et 10 embryons de 168h jugés d'aspect morphologique excellent (score 1) ou bon (score 2) dans l'échelle d'évaluation morphologique proposée par MCKINNON & SQUIRES [1988] ont été utilisés pour cette étude. Le lot des embryons de 156h comprenait une morula, cinq jeunes blastocystes et deux embryons semblant être à un stade transitoire entre le stade morula et le stade jeune blastocyste avec seulement quelques rares cavités blastocœliques. Le diamètre de ces 8 embryons variait entre 162 et 245  $\mu\text{m}$  (moyenne  $\pm$  s.d. :  $189 \pm 27,9 \mu\text{m}$ ). Le lot des embryons de 168h comptait 4 jeunes blastocystes, 5 blastocystes et 1 blastocyste épanoui dont le diamètre variait de 159 à 365  $\mu\text{m}$  (moyenne  $\pm$  s.d. :  $243 \pm 66,5 \mu\text{m}$ ).

### B. Analyse histologique

L'analyse histologique a été réalisée selon la technique décrite précédemment [BRUYAS *et al.*, 1993].

Immédiatement après leur évaluation morphologique, les embryons étaient fixés dans de la glutaraldéhyde à 2% (Serva, Heidelberg) avec  $0,175 \text{mol.l}^{-1}$  de tampon cacodylate (Serva, Heidelberg) à Ph 7,3. Une post-fixation à l'acide osmique à 2% (Serva, Heidelberg) était ensuite réalisée avant une déshydratation dans des bains d'alcool et inclusion dans de l'épon 812 (Serva, Heidelberg). Des coupes sériées de 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur étaient en suite réalisées sur la totalité de chaque embryon. Une coupe sur 5 était colorée au bleu de toluidine (0,5%) à chaud et montée entre lame et lamelle pour une observation au microscope.

Lors de l'observation microscopique des coupes, chaque noyau cellulaire est évalué : normal ou pycnotique, en interphase ou mitotique. Le nombre total de cellules de chaque embryon est estimé à partir du nombre de noyaux comptés. Les noyaux pycnotiques ayant un diamètre inférieur à 5 µm ne peuvent être comptés qu'une seule fois, en revanche le diamètre des noyaux en interphase étant supérieur à 5 µm, le nombre compté est corrigé par un coefficient proposé par AMANN [1970] :

$c = e / (e + ((Dm. 0.5)^2 - (Dm. 0.25)^2)^{0.5})$  avec  $e = 5 \mu\text{m}$  et  $Dm = \text{diamètre nucléaire moyen}$ .

Les cellules en mitose étant facilement localisables sur chaque coupe, elles ne sont comptées qu'une seule fois. Le coefficient de variation entre 10 dénombrements cellulaires effectués sur le même embryon étant inférieur à 5%, la répétabilité des comptages est considérée comme satisfaisante [FROST, 1973].

### **C. Dosage de la progestéronémie**

Des prélèvements sanguins sur anticoagulant ont été réalisés chez les juments donneuses d'embryons afin de pouvoir mesurer l'évolution de leur progestéronémie. Un premier prélèvement était effectué au moment du diagnostic de l'ovulation, puis les prélèvements étaient renouvelés quotidiennement tous les matins jusqu'au moment de la récolte d'embryons. Ces prélèvements étaient immédiatement centrifugés et le plasma congelé et conservé à -20°C. Tous les échantillons ont été décongelés le même jour afin de mesurer le taux de progestérone qu'ils renfermaient par une technique radio-immunologique (DIRIA-PROGK (P2671), Sorin Biomedica). Pour ce type de kit de dosage, les coefficients de variation intra et inter essais sont respectivement de 5,5% et 8,1% et la sensibilité est inférieure à 0,1ng/ml avec un intervalle de confiance de 95%.

### **D. Analyse statistique**

Les comparaisons de nombre de cellules entre lots d'embryons d'âges différents ont été réalisées en utilisant le test U non paramétrique de MANN et WHITNEY. Les différences entre les taux de mitoses et de pycnoses du trophoblaste et du bouton embryonnaire ont été analysées par le test T sur séries appariées de Wilcoxon et les coefficients de corrélations par le test non paramétrique de SPEARMAN (SCHWARTZ, 1969).

## **II - RESULTATS**

Le plus gros des jeunes blastocystes de 156h (diamètre de 245 µm), 2 jeunes blastocystes et 1 blastocyste épanoui de 168h (diamètres de 159, 187 et 325 µm) ont été perdus au cours de l'analyse histologique.

### **A. Embryons de 156 heures (6,5 jours)**

Les observations des coupes montrent qu'un de ces embryons était au stade morula tandis que les 6 autres étaient des jeunes blastocystes. Chez ces derniers, une assise cellulaire périphérique forme le trophoblaste, au sein de ces cellules, de nombreuses vacuoles, dont certaines très volumineuses, sont présentes. Au centre de ces jeunes blastocystes se situe l'ICM (Inner cell Mass) ou bouton embryonnaire. Au sein de ces 6 embryons, le blastocœle en formation apparaît sous la forme de cavités irrégulières entre l'ICM et le trophoblaste, mais aussi entre les cellules de l'ICM. La morula et un de ces jeunes blastocystes n'ont pas de capsule, un autre jeune blastocyste a une capsule visiblement en cours de mise en place car très fine et n'entourant pas encore totalement le trophoblaste. Les 4 autres embryons ont une capsule entière mais peu épaisse.

Ces 7 embryons sont formés en moyenne ( $\pm$  s.d.) de  $275 \pm 105$  cellules avec une variation allant de 117 à 417 (figure 1). La morula est l'embryon qui compte le moins de cellules et le jeune blastocyste qui en renferme le plus est également celui qui possède la capsule la plus épaisse. La proportion de cellules formant l'ICM des 6 jeunes blastocystes est en moyenne ( $\pm$  s.d.) de 36,7 % ( $\pm$  5,2%) avec une variation allant de 30,8 à 42,9%. Le taux de mitoses au sein de ces 7 embryons est en moyenne ( $\pm$  s.d.) de 2,5% ( $\pm$  1,2%) et la proportion de cellules pycnotiques et dégénérées est de 1,1% ( $\pm$  1,8%). Il y a une répartition non différente des mitoses et des cellules mortes entre le trophoblaste et l'ICM.

Quatre jeunes blastocystes de ce lot avaient été récoltés le même jour au mois de mars chez 2 juments trotteuses et 2 ponettes, ils étaient formés de 199 à 294 cellules. La morula a été récoltée sur une ponette en juin et les 2 autres embryons chez 2 trotteuses en octobre. Ces deux derniers embryons étaient ceux qui comptaient le plus de cellules à savoir 388 et 417.

Dans ce lot, les coefficients de corrélation entre le nombre de cellules et d'une part la date de récolte (le numéro du jour dans l'année) et d'autre part le diamètre embryonnaire ne sont pas significatifs. Il n'y a pas non plus de corrélation significative entre le nombre total de cellules et la proportion de celles qui constituent l'ICM.

### **B. Embryons de 168 heures (7 jours)**

Les observations des coupes montrent que deux de ces embryons étaient au stade jeune blastocyste, un au stade blastocyste. Quatre autres étaient des blastocystes épanouis, présentant une large cavité blastocœlique, un ICM à un pôle de la vésicule embryonnaire et des cellules de l'endoderme en cours de mise en place entre le trophoblaste et le blastocœle. Le dernier embryon de ce lot était à un stade un peu intermédiaire entre le stade blastocyste et blastocyste épanoui avec seulement quelques cellules endodermiques. Les 8 embryons de 168 h ont une capsule, celle d'un des 2 jeunes blastocystes étant 3 fois plus épaisse que celle des 7 autres embryons.

Les 8 embryons sont formés en moyenne ( $\pm$  s.d.) de  $1093 \pm 666$  cellules avec une variation allant de 272 à 2217 (figure 1). Les deux jeunes blastocystes sont les embryons qui comptent le moins de cellules : respectivement 272 et 423. Le blastocyste est formé de 694 cellules et celui au stade transitoire blastocyste/blastocyste épanoui en renferme 840. Enfin les 4 blastocystes épanouis sont composés de 1244 à 2217 (moyenne  $\pm$  s.d. :  $1630 \pm 450$ ). La proportion de cellules formant l'ICM des 8 embryons varie de 5,9 % à 31,2 % pour une valeur moyenne ( $\pm$  s.d.) de 21,1 % ( $\pm$  9,7%). Le taux de mitoses au sein de ces 8 embryons est en moyenne ( $\pm$  s.d.) de 3,5% ( $\pm$  1,4%) et la proportion de cellules pycnotiques et dégénérées est de 0,1% ( $\pm$  0,03%). Il y a une répartition non différente des mitoses et des cellules mortes entre le trophoblaste et l'ICM.

Les six blastocystes de ce lot avaient été récoltés au mois de mars chez 3 juments trotteuses et 3 ponettes. Les 2 seuls jeunes blastocystes ont été collectés sur 2 juments trotteuses en juin.

Dans ce lot, le coefficient de corrélation entre le nombre de cellules et la date de récolte (numéro du jour dans l'année) n'est pas significatif. Il y a en revanche une corrélation positive significative ( $p < 0,01$ ) entre le nombre de cellules et le volume des embryons. Il existe également une corrélation significative ( $p < 0,01$ ) mais négative entre le nombre total de cellules et la proportion de celles qui constituent l'ICM.

### **C. Taux de progestérone**

Chez toutes les juments donneuses d'embryon, l'augmentation de la progestéronémie est significative à partir du 2<sup>ème</sup> jour post-ovulation. Les valeurs moyennes de la progestéronémie au moment de la récolte d'embryon étaient respectivement de  $6,4 \pm 1,9$  ng/ml et  $7,0 \pm 2,3$  ng/ml pour les lots 156 h et 168 h. Pour chacun des 2 lots, les corrélations entre le nombre de cellules et d'une part le taux de progestérone plasmatique au moment de la récolte d'embryon et d'autre part l'aire sous la courbe de la progestéronémie depuis l'ovulation jusqu'à la collecte ne sont pas significatives (figures 2 et 3).

## **III - DISCUSSION**

Cette étude est en accord avec des résultats précédemment publiés [FREEMAN *et al.*, 1991, LAGNEAUX & PALMER, 1991] montrant que des embryons de même âge post-ovulation peuvent être à des stades différents de développement : morula ou jeune blastocyste à 156 h et de jeune blastocyste à blastocyste épanoui à 168 h. De plus, les dénombrements cellulaires réalisés dans cette étude révèlent une grande variabilité entre les embryons de même âge. Le nombre de cellules comptabilisées pour les embryons de 156 h est comparable à ce que nous avons déjà trouvé pour des embryons approximativement de 6 jours et demi, puisque récoltés le 6<sup>ème</sup> jour après constat de l'ovulation fait à la faveur d'un examen échographique quotidien ou biquotidien [BRUYAS *et al.*, 1993, 1995, 1997ab]. De la

même manière, la composition cellulaire des embryons de 168 h est en accord avec celle déterminée par BALL *et al.* [1992] sur des embryons de 7 jours, seul l'écart type est ici plus grand (666 contre 280 et 374).

Dans le lot d'embryons de 156 h, la morula est composée de 3,6 fois moins de cellules que le jeune blastocyste le plus développé. Cette différence correspond presque à un écart de 2 cycles cellulaires ! Plus encore, pour le lot 168 h le plus « petit » des jeunes blastocystes renferme 8,2 fois moins de cellules que le blastocyste épanoui le plus « volumineux » soit près de 3 cycles cellulaires de différence !...

Pour tenter d'expliquer cette ample variabilité entre les embryons de même âge, plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

Premièrement, il pourrait exister un intervalle de temps différent entre l'ovulation et le moment de la fécondation pour des embryons considérés d'âge égal au vu du moment de l'ovulation. Chez les équins, le seul critère utilisable en pratique pour dater le début du développement embryonnaire est cependant le moment de l'ovulation. Ce paramètre est d'ailleurs beaucoup plus précis que chez les autres espèces de mammifères domestiques puisque par exemple chez les ruminants et les porcins le jour 0 est celui du début de l'œstrus. Dans la présente étude, toutes les juments ont été inséminées entre 8 et 20 h avant l'ovulation, il pourrait cependant exister d'un embryon à l'autre des différences de délai entre l'ovulation et la fécondation. Toutefois, l'équipe de l'INRA de Nouzilly [BÉZARD *et al.*, 1989] a réalisé des récoltes d'ovocytes 12 heures après l'ovulation chez des juments dont les inséminations et le suivi de l'ovulation induite avaient été réalisés dans des conditions proches du présent essai. Tous les ovocytes étaient fécondés 12 h après l'ovulation. De plus dans la même étude, les 3 embryons récoltés 24 h après l'ovulation étaient tous au stade 2 cellules, les 3 récupérés 48 h post-ovulation comptaient respectivement 4, 5 et 6 cellules. A 72 h post-ovulation, les 4 embryons étaient composés de 7, 8, 9 et 10 cellules et à 96h les 2 morulae avaient 8 et 12 cellules. GRØNDAHL *et al.* [1993] ont, quant à eux, récolté 2 embryons à exactement 34 et 64 h post ovulation, ils étaient respectivement au stade 2 et 6 cellules. Dans ces 2 études, le moment de l'ovulation était déterminé par des suivis échographiques horaires et aucune différence importante n'a été rapportée d'une part entre le moment de l'ovulation et le moment de la fécondation et d'autre part quant à la vitesse de développement embryonnaire précoce. Aussi pour les embryons analysés ici, pour expliquer une différence de 2 cycles cellulaires entre 2 embryons de même âge, il faudrait que la fécondation du « plus petit » se soit produite au moins 36 heures après celle du « plus développé ». Cette hypothèse est assez peu crédible dans la mesure où les juments ont été inséminées plusieurs heures avant l'ovulation et que la durée de survie des ovocytes après ovulation est estimée être relativement brève (inférieure à 12 h). C'est la raison pour laquelle, il semble que l'hétérogénéité entre embryons de même âge post-ovulation soit essentiellement liée à une variabilité de vitesse de développement entre les embryons. Cette dernière pourrait tenir à une variabilité individuelle propre à chaque embryon, mais aussi à des facteurs identifiables comme la progestéronémie maternelle, le sexe des embryons, la race de ces derniers, la saison...

Les résultats obtenus ici semblent confirmer ceux de BALL *et al.* [1992] qui tendaient à montrer que la progestéronémie maternelle n'influence apparemment pas la vitesse de développement des embryons chez la jument.

WÜRTH *et al.* [1994] suggéraient que des paramètres intrinsèques des embryons pouvaient être à l'origine de certains retards de développement embryonnaire. Cependant, les taux de mitoses présentés par tous les embryons analysés ici sont plus élevés que ceux des embryons en retard de développement dans l'étude de WÜRTH *et al.*

Il a été rapporté des différences de vitesse de développement des embryons humains [RAY *et al.*, 1995] et bovins [YADAV *et al.*, 1993] en fonction de leur sexe. Chez les équins ROMAGNANO *et al.* [1986] avaient avancé qu'il n'y aurait pas de différence sexuelle quant à la vitesse de croissance embryonnaire. Les embryons de cette étude n'ayant pas été sexés, l'éventualité d'une différence liée à ce facteur reste une éventualité.

Pour les embryons porcins, RIVERA *et al.* [1996] ont observé des différences quant au rythme de croissance des embryons en fonction de leur race. Ici aucune différence n'apparaît de manière flagrante entre les embryons issus de juments et ceux issus de ponettes.

En revanche, une influence de la saison n'est pas à exclure. En effet, aussi bien pour le lot 156 h que pour le lot 168 h, les embryons récoltés en mars, en juin ou en octobre forment des sous-groupes beaucoup plus homogènes quant au nombre de cellules les composant. Ainsi, les embryons récupérés en mars sont composés de plus de cellules que ceux collectés en juin : respectivement 2,2 fois plus pour le lot 156 h et 3,9 fois plus pour le lot 168 h. Pour le lot 156 h, les embryons d'octobre renferment en moyenne 1,6 et 3,4 fois plus de cellules que respectivement ceux de mars et de juin. Néanmoins, le nombre d'embryons par saison étudiés ici est trop restreint, et une future étude comparative de la structure embryonnaire en fonction de la saison semble pleinement se justifier.

Une autre hypothèse pour tenter d'expliquer la variabilité quant au stade de développement entre embryons pourrait être un intervalle de temps variable entre leur arrivée dans l'utérus et leur récupération. Différentes études [FREEMAN *et al.*, 1991, BATTUT *et al.*, 1997, BRUYAS *et al.*, 1998] semblent suggérer que le passage des embryons des trompes utérines à la cavité de l'utérus se produirait à un moment variable post-ovulation. L'analyse des embryons de 156h montre que 2 jeunes embryons n'ont pas de capsule et qu'un autre a une capsule très fine et incomplète. Cela laisserait penser que ces 3 embryons venaient juste de pénétrer dans la cavité utérine avant la récolte, puisque la capsule se met rapidement en place après que les embryons aient quitté la trompe utérine pour l'utérus [BETTERIDGE, 1989 ; SKIDMORE *et al.*, 1989]. En revanche, les 3 autres embryons de 156 h qui possèdent une capsule plus épaisse auraient atteint l'utérus plus précocement. En outre, il semble probable que la vitesse de division des cellules embryonnaires équines s'accélérait une fois que les embryons seraient dans l'utérus.

Ainsi, la comparaison entre le nombre moyen de cellules des embryons des deux lots montre que les plus âgés sont formés de 4 fois plus de cellules que ceux de 156 h. Ce fait tendrait à prouver qu'entre 156 et 168 heures post-ovulation, il se produirait deux cycles cellulaires soit un doublement du nombre de cellules toutes les 6 heures. Etant donné, par ailleurs que les embryons équins semblent compter 8 à 16 cellules, 96 heures après l'ovulation [BÉZARD *et al.*, 1989] et que 60 heures plus tard (156 h post-ovulation) ils en ont entre 10 et 52 fois plus, 3 à 6 cycles cellulaires doivent se dérouler pendant ce laps de temps. Ainsi entre 4 et 6,5 jours post-ovulation, il y aurait un cycle cellulaire toutes les 10 à 15 heures. A partir de 6 jours et demi ou à partir de l'entrée des embryons dans l'utérus, le rythme des divisions cellulaires augmenterait à un cycle toutes les 6 heures. Ainsi, si l'entrée des embryons dans la cavité utérine se produit à un moment variable, comme des résultats précédents le suggéraient [FREEMAN *et al.*, 1991, BATTUT *et al.*, 1997, BRUYAS *et al.*, 1998] avec 6 à 12 heures d'écart d'un embryon à l'autre, il est possible que des embryons de même âge aient 1 à 2 cycles cellulaires de différence.

Cette brièveté du cycle cellulaire chez les embryons équins expliquerait par ailleurs le fait que ces derniers possèdent un nombre bien supérieur de cellules que les embryons des autres espèces de mammifères domestiques au même stade, comme nous l'avions suggéré lors d'une étude précédente [BRUYAS *et al.*, 1993].

## CONCLUSION

Outre une meilleure connaissance de la chronologie du développement embryonnaire précoce et de la composition des embryons chez les équins, ces résultats ouvrent un certain nombre de perspectives.

La grande variabilité dans la vitesse de ce développement embryonnaire chez cette espèce devrait être étudiée de manière approfondie afin d'essayer de préciser quels sont les facteurs qui en sont responsables : effet de la saison, du sexe ou d'autres éléments intrinsèques à l'embryon. **Cerner ce ou ces facteurs de variation pourrait conduire à mettre en évidence certains paramètres à l'origine de mortalité embryonnaire.**

Cette grande variabilité et l'absence de corrélation entre l'âge, la taille, le stade de développement et le nombre de cellules rendent impossible la constitution de lots expérimentaux d'embryons homogènes. **Cet état de fait constitue un lourd handicap en particulier pour les essais de cryoconservation** : un embryon de 200 cellules ne réagit vraisemblablement pas comme un embryon de 600 ou de 2000 cellules, une morula pas comme un blastocyste, un embryon sans capsule pas comme un autre pourvu d'une

capsule épaisse. Cela donne par conséquent, un éclairage un peu nouveau aux résultats assez hétérogènes obtenus jusqu'à présent dans les différentes expériences de cryoconservation des embryons où les seuls critères utilisables en pratique pour sélectionner les embryons à congeler sont leur âge post-ovulation et/ou leur diamètre.

Un autre élément important apporté par cette étude est qu'entre 6,5 et 7 jours le nombre de cellules est doublé toutes les 6h00. Cela représente par rapport aux autres espèces de mammifères domestiques, un rythme de division cellulaire extrêmement rapide (en général le rythme de doublement du nombre de cellules embryonnaire est voisin de 24h00). Cette intense activité mitotique pourrait expliquer également la très grande sensibilité des embryons équins à la cryoconservation.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient pour leur aide financière le Conseil régional des Pays de la Loire qui a participé à l'aménagement de la salle de gynécologie équine, la Fondation du Crédit Mutuel qui a permis l'achat de 10 des juments expérimentales, le Conseil scientifique des Haras nationaux et le Laboratoire Intervet pour leur contribution ponctuelle apportée pour la réalisation de cette étude. Ils remercient également les laboratoires Hoechst-Roussel-Vet et Schering Plough Vétérinaire pour la fourniture des différentes molécules hormonales utilisées pour le traitement de maîtrise des cycles œstraux des juments donneuses d'embryons.

Des remerciements également au Pr. LEFRANC de la Faculté de médecine de Nantes pour l'accès à son laboratoire d'histologie, à madame WALTON pour son aide technique dans la réalisation des coupes sériées d'embryons et à mademoiselle COPIN pour sa contribution technique aux dosages de progestérone plasmatique.

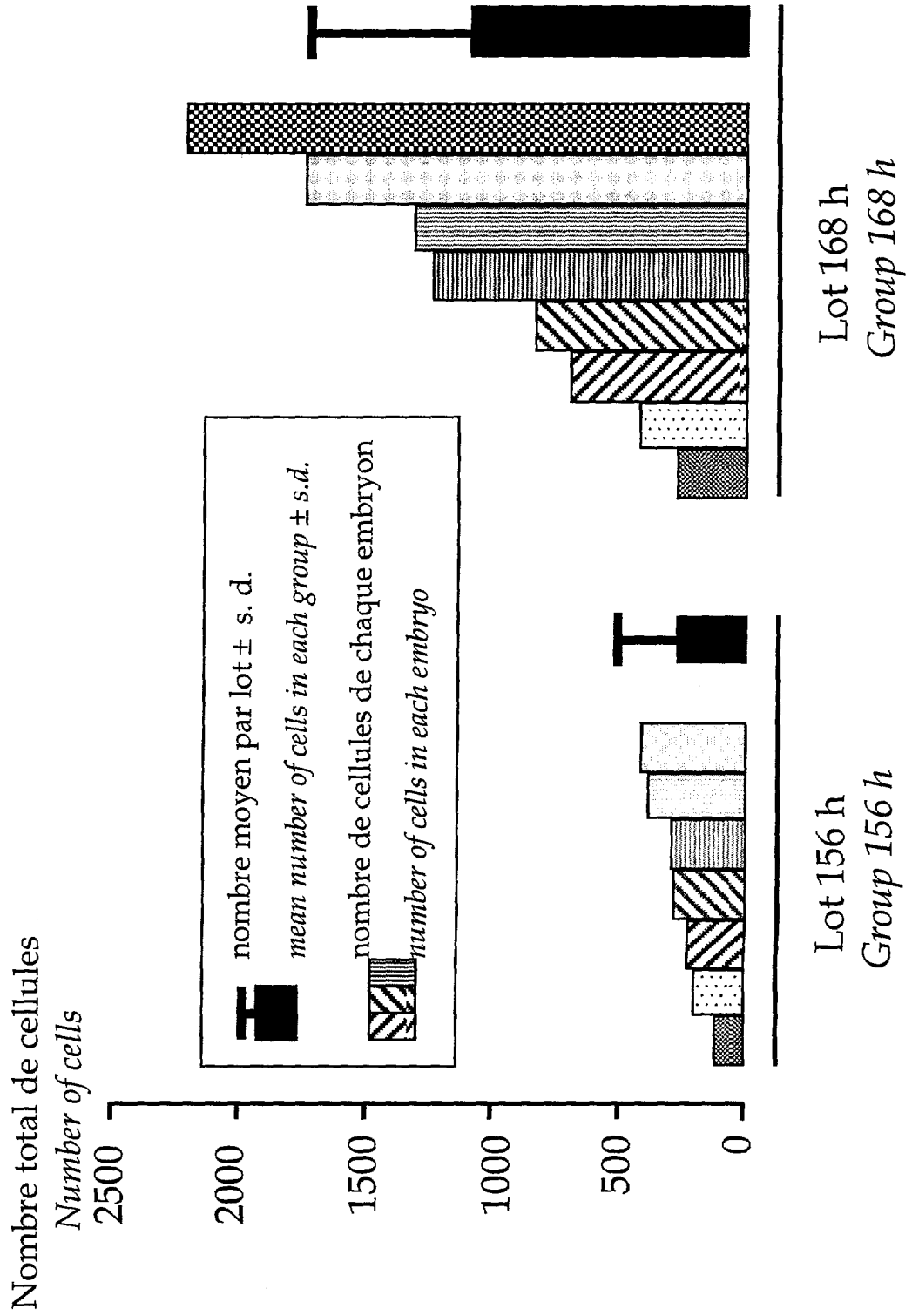
## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLEN WR, STEWART F, TROUNSON AO, TISCHNER M et BIELANSKI W, (1976) Viability of horse embryos after storage and long distance transport in the rabbit. *Journal of Reproduction and Fertility*, 47, 387-390.
- AMANN RP (1970) Sperm production rates. In : *The Testis*. vol I. Eds AD Johnson, WR Gomes & NL Vandermark, Academic Press, New York pp433-482.
- BATTUT I, COLCHEN S, FIÉNI F, TAINTURIER D et BRUYAS JF (1997) Success rates when attempting to non surgically collect equine embryos at 144, 156 and 168 hours after ovulation. *Equine Veterinary Journal, Suppl.* 25, 60-62
- BALL BA, BRINSKO SP, THOMAS PGA, MILLER PG, ELLINGTON JE et CURRIEWB (1993) Development to blastocysts of one- to two-cell equine embryos after coculture with uterine tubal epithelial cells. *American Journal of Veterinary Research*, 54, 1139-1144.
- BALL BA, MILLER PG et DAELS PF (1992) Influence of exogenous progesterone on early embryonic development in the mare. *Theriogenology*, 38, 1055-1063.
- BETTERIDGE KJ (1989) The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. *Equine Veterinary Journal, suppl.* 8, 92-100.
- BETTERIDGE KJ, EAGLESOME MD, MITCHELL D, Flood PF et BERIAULT R (1982) Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation : observation of fresh specimens. *Journal of Anatomy*, 135, 191-209.
- BEZARD J, MAGISTRINI M, DUCHAMP G et PALMER E (1989) Chronology of equine fertilisation and embryonic development in vivo and in vitro. *Equine Veterinary Journal, suppl.* 8, 105-110.
- BRUYAS JF, BATTUT I, POL JM, BOTREL C, FIÉNI F et TAINTURIER D (1995) Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after treatment with four cryoprotectants : differential effects on Inner Cell Mass and trophoblastic cells. *Biology of Reproduction Monograph Series* 1, 329-339.
- BRUYAS JF, BÉZARD J, LAGNEAUX D et PALMER E (1993) Quantitative analysis of morphological modifications of day 6.5 horse embryos after cryopreservation : differential effects on inner cell mass and trophoblast cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99, 15-23.

- BRUYAS JF, MARCHAND P, FIÉNI F et TAINTURIER D (1997a) The inability of DMSO to effectively cryoprotect day 6.5 horse embryos. *Theriogenology*, 47, 387 (abstract).
- BRUYAS JF, MARTINS-FERREIRA C, FIÉNI F et TAINTURIER D (1997b) The effect of propanediol on the morphology of fresh and frozen equine embryos. *Equine Veterinary Journal, Suppl. 25*, 80-84.
- BRUYAS JF, NICAISE JL, COLCHEN S, GRANCHAMP des RAULX A, BATTUT I, FIÉNI F et TAINTURIER D (1998) Taux de succès des récoltes non chirurgicales d'embryons équins entre 144 et 168 h post-ovulation. In: *Compte-Rendu de la 24ème Journée d'Etude du C.E.R.E.O.P.A.*, Paris pp 13-24.
- FREEMAN DA, WEBER JA, GEARY RT et WOODS GL (1991) Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology*, 36, 823-830.
- FROST HM (1973) The numerical and statistical approach. In: *Proceeding of the first workshop on bone morphometry*, Ottawa pp 23-34.
- GRØNDAHL C, GRØNDAHL NIELSEN C, ERIKSEN T, GREVE T et HYTTEL P (1993) In-vivo fertilisation and initial embryogenesis in the mare. *Equine Veterinary Journal, suppl 15*, 79-83.
- LAGNEAUX D, DUCHAMP G et PALMER E (1988). La transplantation embryonnaire chez la jument. In: *Compte-Rendu de la 14ème Journée d'Etude du C.E.R.E.O.P.A.*, Paris pp 163-181.
- LAGNEAUX D et PALMER E (1991) Non-surgical recovery of morulae in the mare for freezing purposes using induction of ovulation. *Theriogenology*, 35, 228 (abstract).
- MCKINNON AO et SQUIRES EL (1988) Morphologic assessment of the equine embryo. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 192, 401-406.
- RAY PF, CONAGHAN J, WINSTON RML et HANDYSIDE AH (1995) Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following *in vitro* fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility*, 104, 165-171.
- RIVERA RM, YOUNGS CR et FORD SP (1996) A comparison of the number of inner cell mass and trophectoderm cells of preimplantation Meishan and Yorkshire pig embryos at similar developmental stages. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106, 111-116.
- ROMAGNO A, BETTERIDGE KJ, RICHER CL, SIROIS J et KING WA (1989) Growth rates of male and female equine embryos between Days 6 and 15 of pregnancy. *Equine Veterinary Journal, suppl. 8*, 40-42.
- SKIDMORE J, BOYLE MS, CRAN D et ALLEN WR (1989) Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins. *Equine Veterinary Journal, suppl 8*, 126-128.
- SCHWARTZ D. (1969) *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. 3ème éd. Flammarion Médecine-Sciences, Paris.
- WÜRTH YA, VAN der ZEE-KOTTING W, DIELMAN SJ, BEVERS MM et KRUIP TAM (1994) Presence of mitotic cells: a parameter of embryo quality. *Animal Reproduction Science*, 35, 173-182.
- YADAV BR, KING WA et BETTERIDGE KJ (1993) Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 36, 434-439.

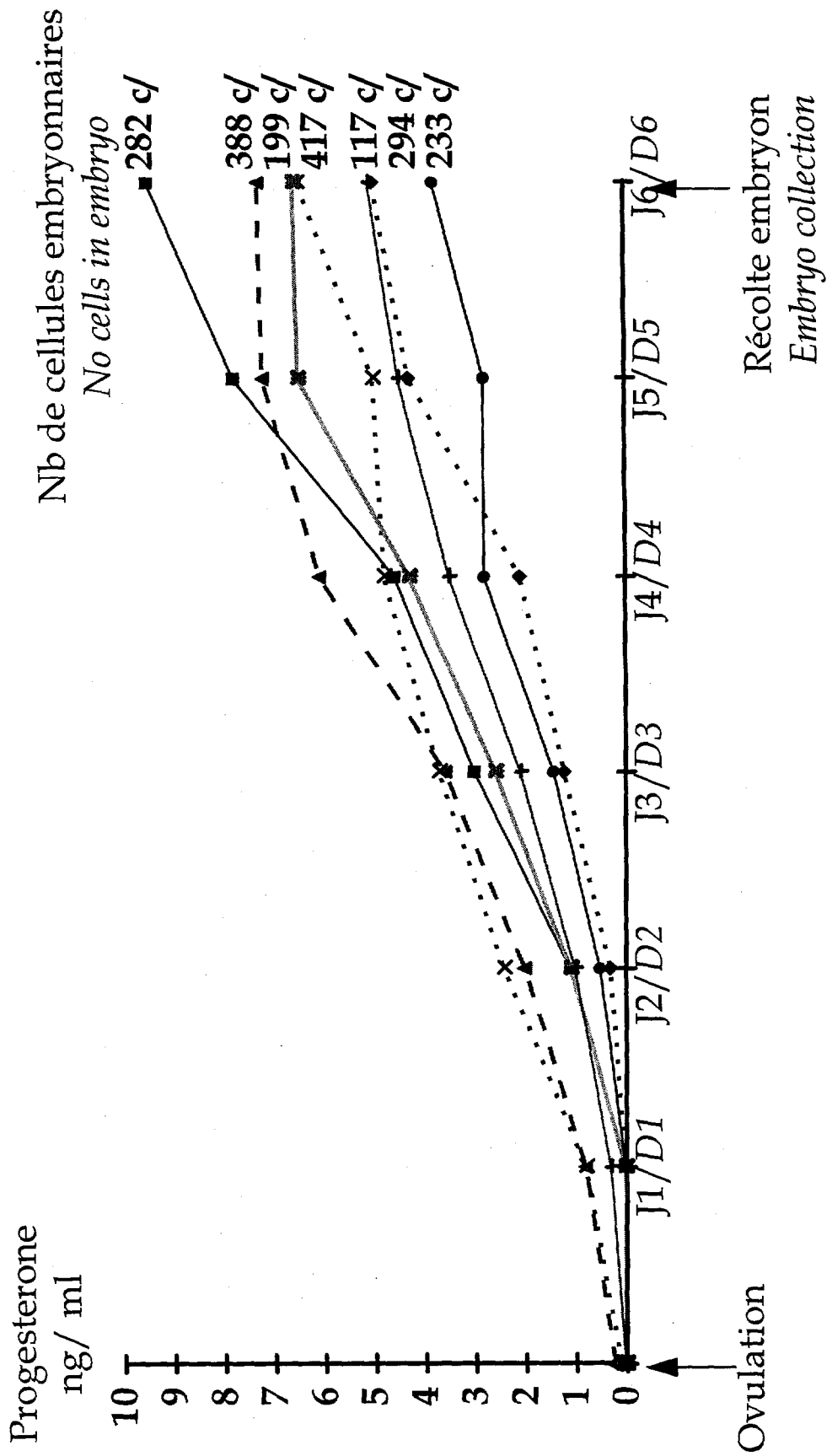


Figure 1: Nombre total de cellules des embryons des 2 lots  
*Number of cells in each embryo in the 2 groups*



**Figure 2:** Evolution de la progestéronémie chez les juments ayant donné un embryon à 156 h

*Progesterone levels in embryo donor mares successfully collected at 156 h*



**Figure 3:** Evolution de la progestéronémie chez les juments ayant donné un embryon à 168 h

*Progesterone levels in embryo donor mares successfully collected at 168 h*

