



4728

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

LES HARAS NATIONAUX

## Le transport d'embryons équins réfrigérés : mise en place et premier bilan

par, D. LAGNEAUX, G. DUCHAMP, B. BRUNEAU, A.M. POMMARICI<sup>1</sup>,  
F. RISCO<sup>2</sup>, M. PELTIER<sup>3</sup>, J.L. TREMOLEDA<sup>4</sup>, & P.F. DAELS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Equipe « Les Haras nationaux » - INRA, P.R.C. 37 380 Nouzilly - France

<sup>2</sup> Haras National - 52 220 Montier-en-Der - France

<sup>3</sup> Haras National - 78 610 Les Bréviaires - France

<sup>4</sup> Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht 3584 CL Utrecht - Pays-Bas

### Résumé

Disposer de receveuses synchrones est une contrainte de la transplantation embryonnaire. La constitution d'un troupeau de juments receveuses permet de répondre partiellement à cette difficulté et la congélation des embryons permettra de s'affranchir définitivement de la synchronisation mais quelques années sont encore nécessaires pour une pratique en routine. Tout comme pour le sperme, des techniques de réfrigération et de transport des embryons existent. Elles ont l'avantage d'être simples, efficaces et peu coûteuses. Leur acquisition par les personnels des Centres de transfert des Haras nationaux, la validation des conditions de transport des embryons et l'amélioration de leur pratique sont rapportées ici. Une soixantaine d'embryons a été incluse dans cette étude. Dans des conditions précises d'utilisation, les résultats obtenus à partir d'embryons réfrigérés 24 heures et transportés sont comparables à ceux obtenus couramment lors de transferts d'embryons frais. Cette technique peut : intéresser des praticiens du transfert en manque ponctuel de receveuses, être à l'origine de la constitution d'un troupeau commun de juments receveuses, et favoriser à terme les échanges européens.

*Mots-clés : Synchronisation - Réfrigération - Transport - Validation - Conditions*

### Summary

The ability to collect embryos and transport them to another location would permit to eliminate the need for recipient and donor mares to be on the same premises and thereby reducing the cost of embryo transfer. The aim of this study was to determine the effects of different factors affecting pregnancy rates after cooling, transport (using Equitainer) and transfer of embryos. In precise conditions, pregnancy rates after the transfer of equine embryos stored in Ham's F10 for 24 h were similar to those of fresh embryos collected and transferred in previous studies. Transported embryos are commonly used only in the United States. This study would contribute to develop this technique in France and in Europe by shipment of embryos within and between countries.

*Key-words : Equine - Cooling - Transport - Embryo transfer - Factors*

## INTRODUCTION

Après les premiers travaux concernant le transfert d'embryons équins en 1972, d'autres publications synthétisées par LAGNEAUX (1999) ont permis la mise au point d'une technique non chirurgicale de collecte et de transfert des embryons adaptée à l'espèce équine. Il est possible d'obtenir des gestations à partir de juments âgées mais de haute valeur génétique ou commerciale mais aussi de mères jeunes poursuivant leur carrière sportive. Le transfert d'embryon permet d'augmenter la production de juments d'élite par récoltes et transferts répétés. Les résultats varient selon les équipes et en fonction des techniques pratiquées (BRUYAS et LAGNEAUX, 1992). Le taux de collecte dépend de la fertilité de la jument donneuse et de l'étalon utilisé. Le taux de gestation dépend de la qualité de la jument receveuse, de son degré de synchronisation avec la jument donneuse mais aussi de la qualité intrinsèque de l'embryon. En France, depuis 1986, 490 juments différentes ont bénéficié de cette technique. Pour chaque jument donneuse ayant au moins une porteuse gestante, le nombre moyen de poulains obtenus par transfert est de 1,7 par an. Les résultats récents des Haras nationaux donnent un taux de collecte de 40-50 % et un taux de gestation à 15 jours par embryon transféré de 65 % (LAGNEAUX, 1999). Parmi les facteurs de réussite, le degré de synchronisation entre donneuse et receveuse est un facteur essentiel. Aussi, depuis plusieurs années, des solutions palliatives ont été mises au point, permettant de contourner cette contrainte : utilisation de receveuses ovariectomisées (HINRICHS et al., 1987) ou en anoestrus (LAGNEAUX et PALMER, 1993) mais nécessitant une supplémentation hormonale précise et parfois de longue durée.

La congélation sera sans conteste la solution définitive résolvant cette difficulté puisqu'elle permettra de dissocier dans le temps et dans l'espace les actes de récoltes et de transferts des embryons. Si la première congélation d'embryons équins a été réalisée avec succès au début des années 80, les travaux qui se sont succédés depuis lors n'ont pas permis d'établir une méthode fiable de congélation. Les résultats restent fort médiocres avec un taux de gestation après transfert d'embryons congelés-décongelés inférieur à 40% (synthèse de SQUIRES *et al* 1999) même si de tous récents résultats (rapportés par LAGNEAUX, 1999) ont mis en évidence des progrès significatifs. Face aux lents progrès de la congélation, et tout comme pour le sperme, la technique de réfrigération des embryons s'est développée, en particulier en Amérique du nord où elle bénéficie désormais d'une infrastructure (moyens de transport rapides) et d'un circuit économique (industriels du transport de sperme et d'embryons) performants.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

*Principes généraux* - La réfrigération des embryons, encore très peu utilisée en France, permet (en particulier aux Etats-Unis) de transporter des embryons dans un milieu de culture (Ham's F10) à l'aide d'un container thermostaté (à 4°C) du lieu de récolte au lieu de présence de la porteuse. La remise en place est ainsi différée de 24 à 48 heures. Un équipement supplémentaire nécessaire à la pratique de l'embryon réfrigéré vient compléter l'équipement de base requis lors de toutes collectes d'embryons en vue du transfert immédiat. Il se compose d'un Equitainer complet (Hamilton-Thorn) et d'une bouteille de gaz de mélange ( 90% N<sub>2</sub> - 5% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> ) équipée d'un mano-détendeur permettant la régulation d'un débit de sortie de 1 bar/min.

*Milieu de conservation* - Le milieu de conservation et de transport des embryons est un mélange nutritif carbonaté le Ham's F10 - L-Glutamine (Gibco) (tableau 1) avec antibiotiques ( 10<sup>5</sup> UI/l pénicilline et 0,1 g/l de streptomycine). La veille d'une collecte, les deux boîtes de l'Equitainer contenant le liquide de refroidissement sont placées au congélateur à -18°C, les sachets de l'enceinte de l'Equitainer sont placés à l'étuve à 37°C. Le jour de la collecte, un tube Corning contenant 50 ml du milieu de conservation (Ham's F10 + antibiotiques) est placé à 37°C (étuve ou bain-marie).

*Procédure de réfrigération* - Le jour de la collecte, dès l'obtention de l'embryon celui-ci est lavé 10 fois selon la procédure en vigueur lors d'un transfert frais. Le milieu Ham's F10, mélange nutritif enrichi en bicarbonates n'est pas directement prêt à recevoir l'embryon. Il doit subir un gazage qui consiste à faire barboter un gaz (5% CO<sub>2</sub> - 5% O<sub>2</sub> - 90% N<sub>2</sub>) dans un Corning pendant 5mn à l'aide d'un filtre millipore stérile, sous un débit de 1 bar/mn. Après gazage, on prélève dans un tube stérile de 5 ml, à bouchon étanche et préalablement identifié, 4,5 ml de ce milieu gazeux auquel on ajoute 10% de Sérum de Veau Fœtal filtré (0,5 ml). L'embryon est alors déposé dans ce milieu ; le tube est fermé à l'aide d'un Parafilm

et placé dans le Corning. Le Corning est à son tour fermé avec du Parafilm et placé dans l'Equitainer qui est refermé et prêt à être expédié. Comme cela est pratiqué au Colorado (Squires et al, 1999) ces différentes manipulations devraient pouvoir être réalisées la veille par le Centre de remise en place et la totalité du système, prêt à usage, expédié par Equitainer sur le site de collecte.

*Juments donneuses et receveuses* - Pour la bonne réalisation de cette étude un suivi en parallèle et à distance des juments donneuses et receveuses avec échanges réguliers d'informations sur l'évolution des troupeaux ont été nécessaires. Les collectes des embryons sont réalisées à J7 (J0 = ovulation constatée). Même si le principe de la réfrigération des embryons permet d'imaginer l'utilisation de différents troupeaux de receveuses d'embryons et acheminer ces embryons sur ces différents sites en fonction de la disponibilité des receveuses, afin de ne pas multiplier les facteurs de variation, l'ensemble du troupeau de juments receveuses (types selle ou poney) a été localisé et suivi à Nouzilly, et les embryons remis en place par la même équipe de Nouzilly.

*Expédition et réception* - L'expédition des embryons s'est effectuée dans un Equitainer par voie postale et/ou par transporteurs privés. Les dates et heures de départ et d'arrivée de l'Equitainer ont été enregistrées. Lors de la réception des embryons ceux-ci sont placés dans le milieu habituel de transfert IMV, et la température du milieu de conservation est mesurée.

*Transferts des embryons et diagnostic de gestation* - Après lavage des embryons dans quatre bains de milieu habituel de transfert IMV, ils sont montés en paillettes si le transfert est cervical ou en pipette si le transfert est chirurgical. Le dépôt de l'embryon a lieu dans l'utérus de la receveuse qui au jour du transfert (chirurgical ou cervical) est à J5, J6 ou J7 (J0 = ovulation constatée de la receveuse). La procédure de remise en place non chirurgicale a déjà été décrite abondamment (BRUYAS et LAGNEAUX, 1992). Le transfert chirurgical utilise la méthode d'accès à l'utérus par le flanc et a été décrit par SQUIRES et al en 1985. Enfin le diagnostic de gestation par échographie est établi à 12-13 jours et vérifié à 15-17 jours.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

*Effectifs* - Au total 60 embryons collectés et réfrigérés de mi-juillet à fin décembre 1999 ont été utilisés dans cette étude. Les embryons proviennent pour partie (34 - lot A -INRA) de l'INRA de Nouzilly. Les autres embryons (26 - lot B - non INRA) proviennent d'un des Centres de transfert des Haras nationaux (Montier-en-Der, Les Bréviaires) ou de l'Université d'Utrecht aux Pays-Bas (tableau 2).

*Délais de livraison* - Les embryons du lot A-INRA stockés en Equitainer ont été transportés dans les véhicules des agents de l'équipe de telle sorte qu'un délai d'environ 24 heures sépare la mise de l'embryon en Equitainer et sa sortie. Les embryons du lot B ont été transportés par les services de La Poste et/ou des transporteurs privés. Le délai de 24 heures n'a pas été respecté à trois reprises (48, 72 heures, retour à l'expéditeur) mais ceci exclusivement avec des embryons en provenance des Pays-Bas. L'acheminement d'embryons en 24 heures peut être garanti sur le territoire français (sous réserve des classiques difficultés de week-ends et jours fériés). Des échanges avec d'autres pays restent envisageables mais après validation très stricte des différents intermédiaires de la chaîne de transport. Lorsque le délai de 24 heures a été respecté et à chaque fois que la mesure de température a été réalisée, le milieu de conservation après réception et ouverture de l'Equitainer était à 6°C suggérant un fonctionnement correct du système Equitainer.

*Receveuses et transfert* - Les 57 embryons disponibles ont été remis en place lors de 53 transferts : 49 transferts simples et 4 transferts doubles. Le recours à des transferts doubles signifie que la technique de réfrigération des embryons, même si elle est présentée comme une solution lors de l'absence de receveuses synchrones sur site, ne permet pas d'assurer une disponibilité totale des receveuses.

*Gestations* - Les 57 embryons transplantés ont permis d'obtenir 26 vésicules en développement (tableau 2). Ce taux de gestation global à 15 jours (lots A et B) de 45 % (26/57) est inférieur à celui obtenu en 1999 dans les Haras nationaux lors des transferts d'embryons frais (70 %) (VINCENT et al, 1999). La technique de réfrigération même si elle permet de disposer de receveuses hors du site de la collecte dans un rayon de livraison de 24 heures présente des résultats globalement inférieurs à ceux

obtenus lors de transferts d'embryons frais. Cette technique n'est donc pas immédiatement applicable dans les Centres des Haras nationaux. Toutefois, en comparant les résultats des taux de receveuses gestantes des lots A -INRA (20/34 - 58 %) et B -hors INRA ( 6/23 - 26 %) (tableau 2) on pourrait conclure que les conditions de réfrigération (gazage, conditionnement...) et/ou d'expédition du lot B n'ont pas été optimum. Une vérification de l'ensemble des procédures est indispensable avant une application de terrain.

*Types de receveuses et de transferts* - La totalité des 23 embryons du lot B a été réalisée sur des receveuses de type selle avec la technique cervicale classique et un taux de receveuses gestantes (6/23) de 26 % (tableau 2). Les 34 embryons du lot A (tableau 3) ont été transférés soit chirurgicalement (17 embryons - lot A3) sur des receveuses de type poney soit cervicalement (17 embryons - lot A1 + lot A2) sur des receveuses de type selle (10 - lot A1) ou de type poney (7 - lot A2). Si on analyse plus précisément les résultats au sein du lot A, le taux de vésicules est plus important lorsque les transferts ont eu lieu avec la méthode chirurgicale (14/17 - 81 % - lot A3) que lorsqu'ils ont eu lieu avec la méthode cervicale (6/17 - 35 % - lots A1+A2). Plus finement encore, au sein des transferts cervicaux des lots A1+A2 (17 embryons), on constate que le taux de vésicules est plus élevé lorsque les receveuses sont de type selle (5/10 - 50 % - lot A1) que lorsque les receveuses sont de type poney (1/7 - 14 % - lot A2). De ces résultats on peut tirer plusieurs remarques. Dans des conditions de bonne maîtrise de la réfrigération et de l'acheminement des embryons et en utilisant des receveuses de type selle, le taux de receveuses gestantes (50 %) reste encore inférieur à celui obtenu lors des transferts d'embryons frais mais peut toutefois être utilisé (car généralement c'est la seule solution pour utiliser l'embryon avec quelques chances de succès). Les résultats très faibles (taux de receveuses gestantes de 14 %) par suite de l'utilisation de receveuses de type poney confirme les précédentes observations (LAGNEAUX et al., 1989) qui mettaient en évidence un effet négatif des receveuses de type poney. Depuis 1989, et au cours de nos précédentes études, cet écart entre receveuses de types selle et poney a disparu lors de transferts d'embryons frais. Mais peut-être faut-il envisager qu'une plus grande "sensibilité" de l'embryon réfrigéré fasse réapparaître cet effet receveuse. L'excellent taux de receveuses gestantes obtenu par transfert chirurgical avec des receveuses de type poney (81 % - lot A3) permet de valider la technique de réfrigération selon la procédure ici décrite. Le type de receveuses n'apparaît plus comme limitant mais bien plus les conditions de remise en place de ces embryons. L'association « Anesthésie + chirurgie + antibiothérapie » a eu globalement un effet positif sur taux de receveuses gestantes (lot A3) ». Le choix d'une technique chirurgicale de remise en place des embryons équins a été l'option prise par certaines équipes de recherches dès l'origine (SQUIRES et al, 1985). De fait, lorsqu'on analyse les résultats obtenus dans la pratique de transfert d'embryons réfrigérés aux Etats-Unis, on constate que l'association « embryons réfrigérés - transferts chirurgicaux - receveuses de type selle » permet à cette technique d'avoir des taux de receveuses gestantes de 75-80 %. Aussi n'est-il pas surprenant qu'aux Etats-Unis les techniques de réfrigération et de transport des embryons, tout comme pour le sperme, tendent à supplanter la pratique du transfert d'embryon frais et induisent en même temps un intérêt très limité des équipes de recherches pour la congélation des embryons (SQUIRES et al, 1999).

## CONCLUSION

La mise au point de la réfrigération des embryons équins (sous réserve du respect des conditions strictes de réalisation) apporte plus de souplesse dans le travail de suivi gynécologique et pourrait permettre à chaque centre de collecte d'embryons de disposer de receveuses synchrones potentielles au sein de l'ensemble des troupeaux de receveuses du territoire français. Cette idée se heurtera sans doute à l'esprit individualiste dont on caractérise parfois les personnes du vieux continent. En Amérique du nord, avec des résultats techniques comparables à ceux présentés ici, la transplantation embryonnaire équine s'organise en unités de collectes d'embryons (quelques collectes pour un praticien isolé à plusieurs dizaines voire centaines dans de gros centres) et en unités de transfert (disposant toujours d'un important troupeau de juments receveuses), le lien entre ces deux types de structures étant permis par la réfrigération et le transport des embryons. Tout comme pour le sperme, cette technique de réfrigération est simple, efficace et peu coûteuse. Aussi peut-on espérer que l'individualisme saura s'estomper face à la baisse significative du prix de revient de la technique de transplantation embryonnaire qui dans les conditions actuelles de suivi sur site des receveuses n'est guère attractif. La réfrigération et le transport de l'embryon peuvent donc intéresser très rapidement des praticiens du transfert en manque ponctuel de receveuses ou ne souhaitant pas investir dans l'achat de receveuses hypothétiques. Cette technique peut

être à l'origine de la constitution d'un ou plusieurs troupeaux communs de juments receveuses sur le territoire français. Enfin elle pourra permettre les premiers échanges d'embryons intra-communautaires conformément à la directive 92 / 65 / CEE du Conseil des Communautés européennes et à l'arrêté du 11 mars 1996 de la République française.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions très chaleureusement les Haras nationaux pour leur importante contribution financière ainsi que le Haras national de Montier-en-Der (F. RISCO) et le Haras national des Bréviaires (M. PELTIER) pour leur participation à cette étude. Nos remerciements s'adressent également à la Faculté vétérinaire de l'Université d'Utrecht au Pays-Bas (J.L. TREMOLEDA et Pf. COLENBRANDER) pour leur association à ce travail.

## BIBLIOGRAPHIE

- BRUYAS J.F., LAGNEAUX D., 1992. Transplantation embryonnaire équine. *Rec.Med. Vet.* **168** (11-12) 937-946.
- HINRICHS K., SERTICH P.L., PALMER E., KENNEY R.M., 1987. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. *J. Reprod. Fert.*, **80**, 395-401.
- LAGNEAUX D., PALMER E., 1989. Are pony and larger mares similar as recipients for non-surgical transfer of Day 7 embryos ? *Equine Veterinary Journal suppl* **8** 64-67
- LAGNEAUX D., PALMER E., 1993. Embryo transfer in anoestrus recipient mares : attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. *Equine vet. J. suppl* **15** 107-110.
- LAGNEAUX D., 1999. Transfert d'embryons - aspects techniques. 25ème journée d'étude de la Recherche Equine - 61-67, DEFI -Paris
- SQUIRES E.L., GARCIA R.H., 1985. Factors affecting success of equine embryo transfer *Equine Veterinary Journal Suppl.* **3** 92.
- SQUIRES E.L., Mc CUE P.M., VANDERWALL D., 1999. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* **51** 91-104.
- VINCENT P., LAGNEAUX D., CLÉMENT F., 1999. Résultats de la transplantation embryonnaire dans les Haras nationaux au cours de la monte 99. Journées Techniques Nationales de Rosières-aux-Salines (diffusion Les Haras nationaux

Tableau 1 : Composition du milieu de conservation des embryons réfrigérés (Réf. 31550)

*Different components of medium Ham's F10 used for shipped embryos (Réf. 31550)*

Mélange Nutritif F-10 de Ham					
Ancienne Réf. Nouvelle Réf.	041-01550 31550 1X Liquide	042-01955 21955 10X Liquide	074-01200 31200 Poudre	041-02390 22390 1X Liquide	041-31550 41550 1X Liquide
Composants	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
<b>SELS INORGANIQUES:</b>					
CaCl <sub>2</sub> (anhyd.)	-	-	33,29	-	-
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	44,00	440,00	-	44,00	44,00
CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0,0025	0,025	0,003	0,0025	0,0025
FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,834	8,34	0,834	0,834	0,834
KCl	285,00	2850,00	285,00	285,00	285,00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	83,00	830,00	83,00	83,00	83,00
MgSO <sub>4</sub> (anhyd.)	-	-	74,62	-	-
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	153,00	1530,00	-	153,00	153,00
NaCl	7400,00	74000,00	7400,00	6900,00	7400,00
NaHCO <sub>3</sub>	1200,00	-	-	1200,00	1200,00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhyd.)	154,50	1545,00	153,70	154,50	154,50
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,0288	0,288	0,029	0,0288	0,0288
<b>AUTRES COMPOSANTS:</b>					
D-Glucose	1100,00	11000,00	1100,00	1100,00	1100,00
HEPES	-	-	-	5958,00	-
Hypoxanthine	4,00	40,00	-	4,08	4,00
Hypoxanthine (sel sodique)	-	-	4,68	-	-
Acide DL-68-Thioctique	0,20	2,00	0,20	0,20	0,20
Rouge de Phénol	1,20	12,00	1,20	1,20	1,20
Pyruvate de Sodium	110,00	1100,00	110,00	110,00	110,00
Thymidine	0,70	7,00	0,70	0,73	0,70
<b>ACIDES AMINES:</b>					
L-Alanine	9,00	90,00	9,00	8,92	9,00
L-Arginine • HCl	211,00	2110,00	211,00	211,00	211,00
L-Asparagine	15,01	150,10	15,01	12,98	15,01
Acide L-Aspartique	13,00	130,00	13,00	13,30	13,00
L-Cystéine	25,00	250,00	25,00	25,00	25,00
Acide L-Glutamique	14,70	147,00	14,70	14,70	14,70
L-Glutamine	146,00	1460,00	146,00	146,00	-
L-Alanyl-L-Glutamine	-	-	-	-	146,00
L-Glycine	7,50	75,00	7,50	7,52	7,50
L-Histidine HCl • H <sub>2</sub> O <sup>b</sup>	23,00	230,00	23,00	23,00	23,00
L-Isoleucine	2,60	26,00	2,60	2,60	2,60
L-Leucine	13,00	130,00	13,00	13,10	13,00
L-Lysine • HCl	29,00	290,00	29,00	29,30	29,00
L-Méthionine	4,50	45,00	4,48	4,48	4,50
L-Phénylalanine	5,00	50,00	5,00	4,96	5,00
L-Proline	11,50	115,00	11,50	11,50	11,50
L-Sérine	10,50	105,00	10,50	10,50	10,50
L-Thréonine	3,60	36,00	3,57	3,58	3,60
L-Tryptophane	0,60	6,00	0,60	0,60	0,60
L-Tyrosine	1,80	18,00	-	1,81	1,80
L-Tyrosine (sel disodique)	-	-	2,62	-	-
L-Valine	3,50	35,00	3,50	3,50	3,50
<b>VITAMINES:</b>					
Biotine	0,024	0,24	0,024	0,024	0,024
Pantothénate de Calcium D <sup>c</sup>	0,70 <sup>c</sup>	7,00	0,715 <sup>d</sup>	0,72	0,70 <sup>c</sup>
Chlorure de Choline	0,70	7,00	0,698	0,70	0,70
Acide Folique	1,30	13,00	1,32	1,32	1,30
i-Inositol	0,50	5,00	0,541	0,54	0,50
Niacinamide	0,60	6,00	0,615	0,62	0,60
Pyridoxal HCl	0,20	2,00	0,206	0,21	0,20
Riboflavine	0,40	4,00	0,376	0,38	0,40
Thiamine HCl	1,00	10,00	1,00	1,01	1,00
Vitamine B <sub>12</sub>	1,40	14,00	1,36	1,36	1,40

**Tableau 2**

Embryons réfrigérés en 1999 - principaux résultats  
*Cooled and transported equine embryos - main results in 1999*

provenance origin	embryons expédiés <i>cooled embryos</i>	délai <i>time</i>	emb. transférés <i>transferred emb.</i>	DG15 <i>D15 pregn.</i>	taux vésicules <i>pregnancy rate</i>
A1 cervical-Selle	10	24 h	10	5	5/10 (50 %)
A2 cervical-poney	7	24 h	7	1	1/7 (14 %)
A3 chirurg-poney	17	24 h	17	14	14/17 (81 %)
<b>sous-total lot A</b>	<b>34</b>	<b>24 h</b>	<b>34</b>	<b>20</b>	<b>20/34 (58 %)</b>
Montier-en-Der	8	24 h	8	2	2/8 (25 %)
Les Bréviaires	9	24 h	9	3	3/9 (33 %)
Utrecht	6	24 h	6	1	1/6 (25 %)
Utrecht	3	> 48 h	0	---	---
<b>sous-total lot B</b>	<b>26</b>		<b>23</b>	<b>6</b>	<b>6/23 (26 %)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>60</b>	<b>---</b>	<b>57</b>	<b>26</b>	<b>26/57 (45 %)</b>