

ANNEE 2025 - Thèse n° 42

Évaluation comparative du taux de mortalité embryonnaire et fœtale après transfert chez les juments receveuses d'embryons frais produits *in vivo* et d'embryons congelés produits *in vitro* après injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) d'ovocytes maturés *in vitro* au cours de quatre saisons de reproduction (2021–2024)

THÈSE

pour l'obtention du diplôme d'État de

DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement devant

l'UFR de Médecine de l'Université de Nantes

le 15 juillet 2025

par

Axelle, Lisa, Ambre MARIE

Sous la direction de

Jean-François BRUYAS

Président du jury : Monsieur Thibault THUBERT, Professeur à la Faculté de Médecine de Nantes

Membres du jury : Monsieur Jean-François BRUYAS, Professeur de Reproduction à Oniris

Madame Laetitia JAILLARDON, Maître de Conférences en Pathologie Clinique Vétérinaire à Oniris

Membres invités : Monsieur Hubert TERRIS, Docteur Vétérinaire au Haras de Hus

Monsieur Vincent MEVEL, Docteur Vétérinaire, Spécialiste en Reproduction Animale (Dipl. ECAR)

| Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment | | |
|--|---|---|
| Responsable : Emmanuel JAFFRES - Adjointe : Frédérique NGUYEN | | |
| Nutrition et Endocrinologie | | |
| Pharmacologie et Toxicologie | Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Meg-Anne MORICEAU (MC stagiaire) Marc GOGNY (Pr émérite jusqu'au 30/06/2026) Martine KAMMERER (Pr émérite jusqu'au 31/08/2025) | Hervé POULIQUEN (Pr) Antoine ROSTANG (MC) |
| Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire | Jean-Marie BACH (Pr) Julie HERVE (Pr) | Lionel MARTIGNAT (Pr) Grégoire MIGNOT (MC) |
| Histologie et anatomie pathologique | Jérôme ABADIE (MC) Marie-Anne COLLE (Pr) Florian CHOCTEAU (MC stagiaire) | Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC) |
| Biochimie alimentaire industrielle | Clément CATANEO (MC) Joëlle GRUA (MC) Alix KHALIL (MC) | Laurent LE THUAUT (MC) Carole PROST (Pr) |
| Microbiotech | Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC HDR) Emmanuel JAFFRES (MC HDR) Coralie GOETZ (CERC jusqu'au 31/12/2025) Hervé PREVOST (Pr émérite jusqu'au 31/12/2025) | Judith LORANT (MC stagiaire) Boris MISERY (MC) Mathilde MOSSER (MC) Raouf TAREB (MC) |
| PACENV = VET1 | Eléonore BOUGUYON (PRAG) Nicolas BROSSAUD (PRAG) | Aurore CALVEL (PRAG) Charlotte MOCQUARD (PRAG) |
| Département SAESP Santé des Animaux d'Élevage et Santé Publique | | |
| Responsable : Raphaël GUATTEO - Adjoint : Jean-Michel CAPPELIER | | |
| Élevage, nutrition et santé des animaux domestiques | Juan Manuel ARIZA CHACON (MC) Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Ségolène CALVEZ (Pr) | Christine FOURICHON (Pr) Aurélien MADOUASSE (MC HDR) Nora NAVARRO-GONZALEZ (MC) |
| Infectiologie | Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC HDR) Alain CHAUVIN (Pr) Emmanuelle MOREAU (Pr) Pauline MAISONNASSE (CERC jusqu'au 31/08/2025) | Kenny OBERLE (MC) Léa LOISEL (AERC) Nadine RAVINET (MC) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr) |
| Médecine des animaux d'élevage | Sébastien ASSIE (MC) Catherine BELLOC (Pr) Aurore BOISHARDY (CERC jusqu'au 31/08/2025) Isabelle BREYTON (MC) | Raphaël GUATTEO (Pr) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Anne RELUN (MC) Maud ROUAULT (AERC) |
| Hygiène et qualité des aliments | Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Louis DELAUNAY (MC stagiaire) Bruno LE BIZEC (Pr) | Marie-France PILET (Pr) Sofia STRUBBIA (MC) |

| Département DSC Sciences cliniques | | |
|--|---|--|
| Responsable : Olivier Gauthier - Adjointe : Marion FUSELLIER | | |
| Anatomie comparée | Eric BETTI (MC) Aurélia BORVON (MC) | Claude GUINTARD (MC) |
| Pathologie chirurgicale et anesthésiologie | Eric AGUADO (Pr) Olivier GAUTHIER (Pr) Claire de FOURMESTRAUX (MC) | Eric GOYENVALLE (Pr) Pierre MAITRE (MC) |
| Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie | Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass) Vincent BRUET (MC) Maria Dolorès SANCHEZ (CERC jusqu'au 30/11/2026) | Jacques GUILLOT (Pr) Sabrina VIEU (AERC) |
| Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire | Nora BOUHSINA (MC) Nicolas CHOUIN (MC) Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (Pr) | Juan HERNANDEZ-RODRIGUEZ (Pr Ass) Catherine IBISCH (MC HDR) Aurélia LEROUX (MC) Françoise ROUX (Pr) Odile SENECAT (MC) |
| Biotechnologies et pathologie de la reproduction | Djemil BENCHARIF (Pr) Lamia BRIAND-AMIRAT (Pr) | Jean-François BRUYAS (Pr) |
| Département GPA Génie des procédés alimentaires | | |
| Responsable : Vanessa JURY- Adjoint : Cyril TOUBLANC | | |
| Lionel BOILLEREAUX (Pr) Sébastien CURET PLOQUIN (Pr) Kévin CROUVISIER-URION (MC) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) | Michel HAVET (Pr) Vanessa JURY (Pr) Emilie KORBEL (MC) Alain LEBAIL (Pr) Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) | Eve-Anne NORWOOD (MC) Raphaël PORYLES (MC) Laurence POTTIER (MC) Olivier ROUAUD (Pr) Cyril TOUBLANC (MC) |
| PAC- ING | Cyril GAILLARD (PCEA) | |
| Département MSC Management, statistiques et communication | | |
| Responsable : Jean-Michel GALHARRET - Adjointe : Sibylle DUCHAINE | | |
| Mathématiques, Statistiques, Informatique | Véronique CARIOU (Pr) Jean-Michel GALHARRET (MC) Yoba KANDE (CERC jusqu'au 31/07/2025) Evelyne VIGNEAU (Pr émérite jusqu'au 31/12/2025) | Benjamin MAHIEU (MC) Michel SEMENOU (MC) Chantal THORIN (PRAG) |
| Economie, gestion, Législation | Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MC) Florence BEAUGRAND (MC) Sibylle DUCHAINE (MC) | Jean-Marc FERRANDI (Pr) Franck INSIGNARES (IE) Sonia MAHJOUB (MC) Christophe PAPINEAU (Ens. cont.) Samira ROUSSELIERE (MC HDR) |
| Langues et communication | Marc BRIDOU (PLPA) Nathalie GOODENOUGH (PCEA) David GUYLER (Ens. cont.) Patricia JOSSE (Ens. Cont.) | Linda MORRIS (PCEA) Shaun MEEHAN (Ens. cont.) Ian NICHOLSON (Ens. Cont.) |

| |
|---|
| Formation Techniciens supérieurs |
|---|

| |
|--------------------------------------|
| Responsable : Laurence FRERET |
|--------------------------------------|

| |
|--|
| Françoise BRICHET (IAE) Christophe CARON (PLPA) Laurence FRERET (PCEA) Virginie MAGIN (Ens.cont.) |
|--|

Pr Ag : Professeur Agrégé, Pr : Professeur, MC : Maître de Conférence, MCC : MC contractuel, PLPA : Professeur Lycée Professionnel Agricole, PCEA : Professeur Certifié Enseignement Agricole, HDR : Habilité à Diriger des Recherches, CERC : Chargé d'Enseignement et de Recherche Contractuel, Ens. Cont. : Enseignant Contractuel

Protection des droits d'auteur et plagiat

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra donc être citée en incluant les éléments bibliographiques suivants :

- Nom et prénoms de l'auteur : Marie Axelle, Lisa, Ambre
- Année de soutenance : 2025
- Titre de la thèse : Évaluation comparative du taux de mortalité embryonnaire et fœtale après transfert chez les juments receveuses d'embryons frais produits *in vivo* et d'embryons congelés produits *in vitro* après injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) d'ovocytes maturés *in vitro* au cours de quatre saisons de reproduction (2021–2024)
- Intitulé du diplôme : Thèse de doctorat vétérinaire
- Université de soutenance : Faculté de Médecine de Nantes
- Ecole de soutenance : Oniris : Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de L'alimentation Nantes Atlantique
- Nombre de pages : 136 p.

Remerciements

Au Professeur Thibault Thubert,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse,

Sincères remerciements

Au Professeur Jean-François Bruyas,

Pour vos précieux conseils, votre disponibilité, votre énergie et pour m'avoir fait l'honneur d'être votre dernière thèse,

Un grand merci

Au Docteur Laetitia Jaillardon,

Pour avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse et pour votre enseignement tout au long de ces années,

Sincères remerciements

Au Docteur Vincent Mevel,

Pour tout l'intérêt que tu as porté à ce travail, tes précieux conseils également, ta motivation et ton investissement dans cette thèse,

Un grand merci

Au Docteur Hubert Terris,

Pour ta confiance, pour m'avoir partagé tes connaissances et transmis ta passion de la reproduction équine, pour m'avoir guidée et soutenue dans tous mes choix,

Merci beaucoup

Au Docteur Laure Normandin,

Pour ta bienveillance et tous tes précieux conseils,

Merci beaucoup

Au Professeur Chantal Thorin,

Pour vos conseils concernant les analyses statistiques,

Merci beaucoup

Table des matières

| | |
|---|----|
| Introduction | 20 |
| I. Matériels et méthodes | 26 |
| A. Production d'embryons <i>in vivo</i> | 27 |
| 1. Suivi génital et insémination de la jument donneuse | 27 |
| 2. Récolte des embryons..... | 27 |
| B. Production d'embryons <i>in vitro</i> par le laboratoire Avantea..... | 29 |
| 1. Ponction folliculaire (OPU) au Haras de Hus | 29 |
| 2. Transport des ovocytes jusqu'au laboratoire Avantea | 32 |
| 3. Fécondation par ICSI au laboratoire Avantea : injection intra-cytoplasmique de spermatozoïde | 32 |
| 4. Stade de développement et évaluation de l'embryon..... | 33 |
| 5. Sexage des embryons par biopsie..... | 34 |
| 6. Congélation et transport des embryons jusqu'au Haras de Hus..... | 35 |
| 7. Décongélation des embryons produits <i>in vitro</i> : protocole appliqué avant transfert | 36 |
| C. Transfert des embryons (<i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>) | 36 |
| 1. Choix et préparation des juments receveuses..... | 36 |
| 2. Evaluation pré-transfert de la jument receveuse | 37 |
| 3. Transfert de l'embryon | 37 |
| D. Techniques de diagnostic de gestation | 38 |
| 1. Diagnostic à 14 jours de gestation : détection précoce | 38 |
| 2. Diagnostic à 28 jours de gestation : confirmation de gestation..... | 39 |
| 3. Diagnostic à 45 jours de gestation : suivi intermédiaire, transition vers la phase fœtale | 40 |
| 4. Diagnostic à 63 jours de gestation : dernier diagnostic du suivi..... | 41 |
| 5. Référencement des gestations menées à terme | 42 |
| E. Mortalités embryonnaire et fœtale | 42 |
| 1. Définition des termes | 42 |
| a) Mortalité embryonnaire : avant 40 jours de gestation..... | 43 |
| b) Mortalité fœtale : au-delà de 40 jours de gestation | 43 |
| 2. Classification des cas observés par intervalle gestationnel..... | 43 |
| F. Collecte des données, variables étudiées et critères d'exclusion | 44 |
| 1. Récolte des données | 44 |
| a) Cahiers des transferts d'embryons du Haras de Hus (2021 à 2024) | 44 |

| | | |
|-----|---|----|
| b) | Fiches de suivi des cycles de reproduction des juments receveuses | 44 |
| c) | Logiciel GROOMY pour l'âge des juments receveuses | 45 |
| d) | Critères d'exclusion..... | 45 |
| e) | Données conservées sur les 1 339 transferts de l'étude | 45 |
| 2. | Variables étudiées | 46 |
| G. | Méthodes statistiques | 47 |
| 1. | Variables qualitatives..... | 47 |
| 2. | Variables quantitatives..... | 47 |
| 3. | Comparaison des groupes selon le mode de fécondation..... | 48 |
| 4. | Analyse des facteurs associés à la mortalité embryonnaire et fœtale | 48 |
| 5. | Niveau de signification des tests | 49 |
| II. | Résultats | 52 |
| A. | Analyse descriptive de la population étudiée | 52 |
| 1. | Répartition annuelle des transferts embryonnaires entre 2021 et 2024 selon le mode de fécondation dans la cohorte étudiée (n = 1 339) | 52 |
| 2. | Géniteurs des embryons et juments receveuses (n = 1 339 transferts)..... | 53 |
| a) | Juments donneuses (n = 389) | 53 |
| b) | Etalons (n = 187)..... | 56 |
| c) | Juments receveuses (n = 721)..... | 59 |
| (1) | Caractéristiques démographiques..... | 59 |
| (2) | Âge des juments receveuses | 61 |
| (3) | Nombre d'utilisations des juments receveuses..... | 62 |
| d) | Sexe des embryons issus de fécondation <i>in vitro</i> | 64 |
| e) | Diagnostic de gestations gémellaires issues d'embryons <i>in vitro</i> | 65 |
| B. | Analyse comparative des taux de mortalité embryonnaire et fœtale jusqu'à 63 jours de gestation par analyse de survie | 66 |
| 1. | Comparaison des probabilités de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> | 66 |
| 2. | Comparaison des probabilités de survie embryonnaire et fœtale selon l'année et le mode de fécondation | 68 |
| a) | Comparaison des modes de fécondation pour une année donnée | 69 |
| b) | Comparaison des années pour un même mode de fécondation..... | 71 |
| C. | Analyses multivariées (modèles de Cox) | 75 |
| 1. | Effet jument donneuse (≥ 10 transferts) | 75 |
| 2. | Effet étalon (≥ 10 transferts) | 77 |
| 3. | Effet jument receveuse | 78 |

| | | |
|------|--|-----|
| a) | Effet âge de la jument receveuse | 78 |
| b) | Effet du stade du cycle des juments receveuses en nombre de jours post-ovulation au moment du transfert embryonnaire | 79 |
| (1) | <i>Embryons produits in vivo</i> | 79 |
| (2) | <i>Embryons produits in vitro</i> | 83 |
| c) | Effet de la réutilisation des juments receveuses ayant connu un arrêt de gestation après un transfert précédent..... | 86 |
| (1) | Effet de la réutilisation de juments receveuses du fait d'arrêt de gestation après transfert précédent durant l'année | 86 |
| (2) | Effet de la réutilisation de receveuses ayant présenté au moins un arrêt de gestation après transfert au cours de la totalité de la période d'étude (2021-2024). | 87 |
| 4. | Effet embryon..... | 89 |
| a) | Embryons produits <i>in vivo</i> | 89 |
| (1) | Effet nombre d'embryons récoltés | 89 |
| b) | Embryons produits <i>in vitro</i> | 90 |
| (1) | Effet réalisation du sexage embryonnaire | 90 |
| (2) | Effet sexe embryonnaire..... | 92 |
| 5. | Effet saison au moment du transfert embryonnaire..... | 93 |
| 6. | Analyse multivariée des facteurs influençant la survie embryonnaire et fœtale | 96 |
| a) | Transferts d'embryons produits <i>in vivo</i> | 96 |
| b) | Transferts d'embryons produits <i>in vitro</i> | 97 |
| III. | Discussion | 100 |
| A. | Bilan des résultats..... | 100 |
| B. | Validité des résultats..... | 101 |
| 1. | Constitution de la base des données et exclusions de cas | 101 |
| a) | Représentativité de l'échantillon étudié par rapport à la population initiale..... | 101 |
| b) | Données manquantes et transferts exclus de l'étude | 102 |
| c) | Robustesse des diagnostics et des variables | 103 |
| d) | Ecart au protocole | 104 |
| 2. | Méthodologie statistique et limites analytiques | 104 |
| a) | Choix des variables d'étude | 104 |
| b) | Limites du modèle de survie (Kaplan-Meier et Cox)..... | 105 |
| C. | Analyse des résultats | 106 |
| 1. | Influence du mode de fécondation sur la survie embryonnaire et fœtale..... | 106 |
| a) | Une mortalité plus importante des embryons <i>in vitro</i> confirmée par la littérature | 106 |

| | | |
|----|---|-----|
| b) | Les mécanismes potentiels de la fragilité des embryons ICSI..... | 107 |
| 2. | Effets de l'année et de la saison de transfert | 109 |
| 3. | Effets individuels de la jument donneuse..... | 110 |
| 4. | Effet de la jument receveuse | 112 |
| a) | Effet âge de la jument receveuse | 112 |
| b) | Importance du stade post-ovulation de la receveuse le jour du transfert | 113 |
| c) | Effet de la réutilisation de juments receveuses ayant connu un arrêt de gestation après un transfert précédent..... | 114 |
| 5. | Impact de la réalisation du sexage embryonnaire sur les taux de mortalité des embryons produits <i>in vitro</i> | 115 |
| 6. | Effet du sexe embryonnaire..... | 116 |
| 7. | Impact du nombre d'embryons récoltés sur les taux de mortalité des embryons produits <i>in vivo</i> | 116 |
| 8. | Le diagnostic de gestations gémellaire à partir d'embryons issus d'OPU-ICSI.... | 117 |
| D. | Perspectives et pistes de recherches futures | 117 |
| 1. | Paramètres en plus à intégrer dans une future étude semblable..... | 117 |
| 2. | Points forts de l'étude..... | 118 |
| | | 119 |
| | Conclusion..... | 120 |
| | Bibliographie..... | 121 |
| | Sitographie | 127 |
| | Annexes..... | 128 |

Table des annexes

| | |
|---|-----|
| Annexe 1 - Répartition effective des pertes embryonnaires selon la jument donneuse (≥ 10 transferts)..... | 128 |
| Annexe 2 - Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon l'étalon (≥ 10 transferts)..... | 130 |
| Annexe 3 : Suivis incomplets correspondant aux suivis dont il manque des diagnostics de gestation intermédiaires..... | 133 |
| Annexe 4 : Juments receveuses sans date de naissance renseignée | 133 |

Table des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I – Répartition annuelle des embryons transférés selon le mode de fécondation (n = 1 339)..... | 52 |
| Tableau II – Répartition annuelle des juments donneuses selon le mode de fécondation (n = 389)..... | 54 |
| Tableau III - Répartition des juments donneuses selon le nombre d’embryons transférés, produits <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> (2021-2024)..... | 55 |
| Tableau IV - Statistiques descriptives du nombre d’embryons <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> par jument donneuse (2021-2024)..... | 56 |
| Tableau V - Répartition annuelle des étalons donneurs selon le mode de fécondation pour produire les embryons transférés..... | 57 |
| Tableau VI - Distribution des étalons selon le nombre d'utilisations (2021-2024)..... | 58 |
| Tableau VII - Statistiques descriptives du nombre d’embryons <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> par étalon (2021-2024)..... | 59 |
| Tableau VIII - Répartition annuelle des juments receveuses selon le mode de fécondation ... | 60 |
| Tableau IX - Statistiques descriptives des âges des juments receveuses au moment du transfert | 62 |
| Tableau X - Distribution des juments receveuses selon le nombre d'utilisations (2021-2024) | 62 |
| Tableau XI - Statistiques descriptives des utilisations des juments receveuses (2021-2024) .. | 63 |
| Tableau XII - Distribution des juments receveuses selon le nombre d'utilisations par année (2021-2024)..... | 63 |
| Tableau XIII - Statistiques descriptives des utilisations des juments receveuses par année (2021-2024)..... | 64 |
| Tableau XIV - Sexage des embryons produits <i>in vitro</i> par année | 64 |
| Tableau XV – Probabilités estimées de survie embryonnaire et fœtale aux quatre stades de diagnostic échographique selon le mode de fécondation (Kaplan-Meier)..... | 67 |
| Tableau XVI – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le mode de fécondation et l’année de transfert | 68 |
| Tableau XVII – Probabilités estimées de survie embryonnaire et fœtale aux quatre stades de diagnostic échographique selon le mode de fécondation (Kaplan-Meier)..... | 73 |
| Tableau XVIII – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le mode de fécondation et l’année de transfert | 74 |
| Tableau XIX – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon la jument donneuse (≥ 10 transferts) | 76 |
| Tableau XX – Effet des juments donneuses (≥ 10 transferts) sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox..... | 76 |
| Tableau XXI – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon l’étalon (≥ 10 transferts)..... | 77 |
| Tableau XXII – Effet des étalons (≥ 10 transferts) sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox..... | 78 |
| Tableau XXIII – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon la catégorie d’âge des juments receveuses au moment du transfert..... | 79 |
| Tableau XXIV – Effet de la catégorie d’âge des juments receveuses au moment du transfert sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox | 79 |

| | |
|---|----|
| Tableau XXV – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le stade du cycle de la jument receveuse (en nombre de jours post-ovulation) pour les embryons <i>in vivo</i> | 80 |
| Tableau XXVI – Effet du stade du cycle des juments receveuses au moment du transfert sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox pour les embryons <i>in vivo</i> | 81 |
| Tableau XXVII - Répartition des pertes selon la catégorie de stade de cycle de la jument receveuse au moment du transfert (en nombre de jours post-ovulation) pour les embryons <i>in vivo</i> | 82 |
| Tableau XXVIII – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le stade du cycle de la jument receveuse (en nombre de jours post-ovulation) pour les embryons <i>in vitro</i> | 83 |
| Tableau XXIX – Effet du stade du cycle des juments receveuses au moment du transfert sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox pour les embryons <i>in vitro</i> | 84 |
| Tableau XXX - Répartition des pertes selon la catégorie de stade de cycle de la jument receveuse au moment du transfert (en nombre de jours post-ovulation) pour les embryons <i>in vitro</i> | 85 |
| Tableau XXXI – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le nombre de réutilisations de receveuses durant l’année du transfert..... | 87 |
| Tableau XXXII – Effet de la réutilisation de juments receveuses du fait d’arrêt de gestation après transfert précédent durant l’année sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox | 87 |
| Tableau XXXIII – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le nombre de réutilisations de receveuses au cours de la totalité de la période d’étude (2021-2024) | 88 |
| Tableau XXXIV – Effet de la réutilisation de juments receveuses du fait d’arrêt de gestation après transfert précédent au cours de la totalité de la période d’étude sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox..... | 89 |
| Tableau XXXV – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le nombre d’embryons <i>in vivo</i> collectés chez une jument donneuse..... | 90 |
| Tableau XXXVI – Effet du nombre d’embryons <i>in vivo</i> collectés sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox..... | 90 |
| Tableau XXXVII – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon la réalisation du sexage embryonnaire <i>in vitro</i> ou non | 91 |
| Tableau XXXVIII – Effet de la réalisation du sexage embryonnaire sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox pour les embryons <i>in vitro</i> | 91 |
| Tableau XXXIX – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le résultat du sexage embryonnaire <i>in vitro</i> ou non | 92 |
| Tableau XL – Effet de la réalisation du sexe embryonnaire sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox pour les embryons <i>in vitro</i> | 93 |
| Tableau XLI – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon la saison au moment du transfert | 94 |
| Tableau XLII – Effet de la saison au moment du transfert sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox..... | 94 |
| Tableau XLIII – Effet combiné de l’année et de la saison de transfert sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox..... | 95 |

| | |
|--|----|
| Tableau XLIV – Effet combiné de la saison au moment du transfert et du mode de fécondation sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox | 96 |
| Tableau XLV - Modèle de Cox multivarié final pour les embryons <i>in vivo</i> | 97 |
| Tableau XLVI – Modèle de Cox multivarié final pour les embryons <i>in vitro</i> | 98 |

Table des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 - Schéma de la sonde de récolte d'embryons équins de type Bivona® et bouhcon de raccord (bo) au flacon de récolte muni de sa prise d'air (p). Dispositif © pour clamber la sonde-Ballonnet (b) gonflé à la seringue (s) (d'après BRUYAS et al. 1999) | 28 |
| Figure 2 - Mise en place de la sonde de récolte (d'après BRUYAS et al. 1999) | 28 |
| Figure 3 - Réalisation d'une ponction folliculaire durant laquelle un opérateur maintient l'ovaire avec la main droite, la sonde avec la paume de la main gauche, et manipule l'aiguille avec le pouce et l'index de la main gauche, et un second opérateur tient une seringue en plastique pour le rinçage des follicules (d'après Cuervo-Arango et al. 2025)..... | 30 |
| Figure 4 - Réalisation d'une ponction folliculaire au Haras de Hus par les Docteurs Hubert TERRIS et Laure NORMANDIN | 31 |
| Figure 5 - Milieu spécifique à base d'héparine et d'albumine bovine : EquiPlus OPU recovery medium®, Minitube | 32 |
| Figure 6 - ICSI classique : injection intracytoplasmique de spermatozoïde dans un ovocyte métaphasé II (McKinnon et al., 2011)..... | 33 |
| Figure 7 - Illustration des grades des embryons issu d'ICSI (L. H. A. Morris & Maclellan, 2024) | 34 |
| Figure 8 - Schéma explication de la synchronisation utérine pour les embryons <i>in vivo</i> (modifié de IFCE) | 37 |
| Figure 9 - Image échographique d'une vésicule embryonnaire de 12 jours (d'après McKinnon et al. 2011)..... | 38 |
| Figure 10 - Image échographique d'un embryon de 28 jours (d'après Ginther 1995)..... | 40 |
| Figure 11 - Image échographique d'un fœtus de 45 jours (d'après Ginther 1995)..... | 41 |
| Figure 12 - Répartition annuelle des transferts embryonnaires selon le mode de fécondation (n = 1 339) | 53 |
| Figure 13 - Répartition annuelle des juments donneuses selon le mode de fécondation | 54 |
| Figure 14 - Répartition annuelle des étalons donneurs selon le mode de fécondation | 57 |
| Figure 15 - Répartition annuelle des juments receveuses selon le mode de fécondation | 60 |
| Figure 16 - Distribution de l'âge des juments receveuses au jour d'implantation de l'embryon | 61 |
| Figure 17 – Répartition des embryons issus de la fécondation <i>in vitro</i> sexes par année | 65 |
| Figure 18 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : courbes de survie de Kaplan-Meier | 66 |
| Figure 19 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : courbes de survie de Kaplan-Meier de l'année 2021 | 69 |
| Figure 20 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : courbes de survie de Kaplan-Meier de l'année 2022 | 69 |
| Figure 21 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : courbes de survie de Kaplan-Meier de l'année 2023 | 70 |
| Figure 22 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : courbes de survie de Kaplan-Meier de l'année 2024 | 70 |
| Figure 23 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon l'année : courbes de survie de Kaplan-Meier du mode de fécondation <i>in vivo</i> | 71 |
| Figure 24 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon l'année : courbes de survie de Kaplan-Meier du mode de fécondation <i>in vitro</i> | 72 |

| | |
|---|-----|
| Figure 25 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le stade du cycle de la jument receveuse au moment du transfert : courbes de survie de Kaplan-Meier du mode de fécondation <i>in vivo</i> | 82 |
| Figure 26 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le stade du cycle de la jument receveuse au moment du transfert : courbes de survie de Kaplan-Meier du mode de fécondation <i>in vitro</i> | 85 |
| Figure 27 - Schéma explicatif des stades de cycle des juments receveuses..... | 104 |

Table des abréviations et des sigles

| | |
|-------------------------------|--|
| DG14, DG28, DG45, DG63 | Diagnostic de gestation réalisé par échographie transrectale à 14, 28, 45 ou 63 jours de gestation. |
| ET | Ecart-type. |
| FSH | Follicle Stimulating Hormone : hormone folliculo-stimulante, impliquée dans la croissance et la maturation des follicules ovariens. |
| GnRH | Gonadotropin-Releasing Hormone : hormone de libération des gonadotrophines, impliquée dans le déclenchement de la sécrétion de LH et FSH. |
| hCG | Human Chorionic Gonadotropin : gonadotrophine chorionique humaine utilisée pour induire l'ovulation. |
| HR | Hazard Ratio : rapport des risques instantanés entre deux groupes dans une analyse de survie (modèle de Cox). |
| IC95% | Intervalle de confiance à 95 % : intervalle dans lequel la valeur réelle du paramètre estimé a 95 % de chances de se situer. |
| ICSI | Injection intracytoplasmique de spermatozoïde : technique de fécondation <i>in vitro</i> consistant à injecter un spermatozoïde directement dans un ovocyte. |
| IFCE | Institut français du cheval et de l'équitation : organisme public chargé de la gestion des données équinés en France. |
| J3–J9 | Jour post-ovulation : nombre de jours après l'ovulation de la jument receveuse. |
| J14, J28, J45, J63 | Jour post-insémination ou post-ICSI : date estimée du développement embryonnaire ou fœtal, utilisée comme repère pour les suivis échographiques. |
| LH | Luteinizing Hormone : hormone lutéinisante, impliquée dans le déclenchement de l'ovulation et le maintien de la fonction lutéale. |
| OPU | Ovum Pick-Up : ponction folliculaire transvaginale échoguidée permettant de récupérer des ovocytes. |

Introduction

Introduction

Le premier transfert embryonnaire non chirurgical réussi chez la jument a été rapporté au Japon en 1974 (Oguri, Tsutsumi 1974). Depuis, les techniques de reproduction assistée équine ont considérablement évolué, permettant de contourner certaines limites physiologiques et de répondre à des objectifs de sélection génétique, de gestion sportive ou de préservation de la fertilité.

Le transfert embryonnaire équin, qu'il concerne des embryons produits *in vivo* ou *in vitro*, permet ainsi de dissocier la production embryonnaire de la gestation. Cette dissociation est particulièrement précieuse dans les cas où la jument donneuse ne peut ou ne doit pas porter elle-même la gestation : activité sportive en cours, valeur génétique élevée, boiterie, antécédents de dystocie ou comportement maternel incompatible avec le poulinage (Hinrichs 2018). Le recours au transfert embryonnaire peut également être justifié chez une jument fertile, mais sujette à des mortalités embryonnaires précoces ou tardives, ou à des avortements à des stades plus ou moins avancés de la gestation, notamment en lien avec des lésions endométriales chroniques ou liées à l'âge (Ball, Hillman, Woods 1987).

Chez la jument, le transfert d'embryon issu de fécondation *in vivo* présente plusieurs spécificités. La polyovulation n'est pas maîtrisée et n'est pas réalisée en routine, la majorité des cycles n'aboutissant qu'à une seule ovulation, tandis qu'une ovulation double survient dans environ 20 % des cas, et une ovulation triple de façon très exceptionnelle. Il est donc possible de ne pratiquer qu'une seule récolte d'embryon à chaque cycle sexuel. Les récoltes sont effectuées lorsque l'embryon a atteint la lumière utérine, à l'issue d'un transit intratubaire dont la durée semble variable, entre 6 et 8 jours post-ovulation. En pratique, les lavages utérins sont réalisés entre le 7,5^{ème} et le 8,5^{ème} jour post-ovulation, lorsque l'embryon est au stade blastocyste. Le taux de succès de la récolte est en moyenne de 50 %, ce qui correspond à environ 0,5 blastocyste par cycle. (McKinnon et al. 2011)

Du fait de la difficulté à cryoconserver les embryons équins, la majorité des transferts sont réalisés à partir d'embryons frais produits *in vivo*, généralement dans les deux heures suivant leur récolte. Cette contrainte logistique impose une gestion rigoureuse du temps entre la récolte et le transfert, ce qui limite les possibilités de stockage ou de transport différé des embryons.

Cette limitation s'explique par les obstacles techniques longtemps rencontrés dans la cryoconservation des blastocystes équins. Jusqu'à un passé récent, cette procédure n'était pas maîtrisée, en raison de la présence d'une capsule, couche glycoprotéique synthétisée entre la zone pellucide et le trophoblaste et résultant d'une coopération entre les cellules tubaires et les cellules du trophoblaste, ainsi que du large volume de la cavité blastocœlique, qui rend la vitrification difficile et nécessite le recours à des micromanipulations. (McKinnon et al. 2011)

En conséquence, le transfert d'un embryon frais nécessite de disposer, au moment de la procédure, d'une jument receveuse présentant un stade de cycle parfaitement synchronisé avec celui de la donneuse, soit entre 6 et 8 jours post-ovulation. La synchronisation des ovulations entre juments donneuses et receveuses constitue ainsi une contrainte pratique majeure.

Cependant, l'utilisation du transfert embryonnaire chez les juments de compétition reste parfois délicate, du fait de la variabilité du moment de survenue des ovulations, qui induit une programmation de la récolte et du transfert difficilement compatible avec la gestion sportive de la jument, car non planifiable à l'avance. La répétition des opérations, telles que le suivi de l'œstrus et de l'ovulation, l'insémination, ainsi que la récolte des embryons à chaque cycle, s'avère également délicate à gérer en parallèle d'une saison de compétition. Le stress, les manipulations fréquentes de l'appareil génital (insémination, lavage utérin), ou encore l'endométrite induite par le sperme, peuvent compromettre la réussite du transfert (Campbell 2014). Ces éléments doivent être soigneusement pris en compte dans les programmes de reproduction chez les juments sportives.

Face aux limites de la fécondation *in vivo*, une alternative a émergé : la production *in vitro* d'embryons, qui a fait l'objet de nombreux travaux. Dans l'espèce équine, les échecs répétés des tentatives de fécondation *in vitro* « classique » ont toutefois conduit à privilégier l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), seule technique actuellement capable de produire de manière reproductible des embryons viables, y compris à partir de semences réfrigérées ou congelées de qualité réduite.

Historiquement, la fécondation *in vitro* classique a échoué chez la jument en raison de plusieurs barrières physiologiques, notamment l'incapacité des spermatozoïdes à traverser la zone pellucide, en lien avec une capacitation inefficace et une réaction acrosomiale incomplète (Felix et al. 2022). Malgré des progrès récents, les milieux de culture adaptés restent difficiles à standardiser et leur application clinique demeure marginale. À ce jour, l'ICSI représente la seule technique de fécondation *in vitro* applicable de manière fiable chez le cheval. Elle permet la formation de blastocystes viables à partir d'un nombre limité de spermatozoïdes, même immobiles, en contournant les étapes classiques de fécondation et en s'affranchissant du microenvironnement des trompes utérines (Hinrichs 2018).

Parmi les techniques actuellement disponibles, l'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI), précédée d'une ponction folliculaire transvaginale (OPU), s'est largement diffusée au cours des dernières années, en particulier chez les chevaux de sport, et notamment dans le secteur du saut d'obstacles (Clutton-Brock, Cuervo-Arango, Arrondo 2023). Cette approche permet, en moyenne, l'obtention de 1,7 à 2,1 embryons par session d'OPU, avec des rendements parfois bien supérieurs (Claes, Stout 2022; Lazzari et al. 2020). L'ICSI offre des perspectives précieuses chez les reproducteurs de haute valeur génétique, y compris en cas de qualité spermatique réduite ou de subfertilité maternelle (Hinrichs 2018).

Deux méthodes principales permettent d'obtenir des ovocytes chez la jument. La première consiste à aspirer le follicule dominant mûr, après induction de l'ovulation par injection d'hCG ou d'un agoniste de la GnRH, afin de recueillir un ovocyte déjà mature. La seconde, plus couramment utilisée en ICSI, consiste à aspirer tous les follicules immatures présents dans les ovaires, sans stimulation préalable. Les ovocytes immatures sont ensuite mis en maturation *in vitro* jusqu'au stade de métaphase II, stade physiologique de l'ovulation. C'est précisément cette seconde approche, l'aspiration transvaginale de follicules immatures suivie de maturation *in vitro*, qui est utilisée dans le cadre de la présente étude.

L'attrait croissant pour l'ICSI (Hinrichs 2018) s'explique également par sa flexibilité logistique. Les ovocytes peuvent être prélevés par le vétérinaire référent à un jour planifié à l'avance, car en dehors de la phase ovulatoire, chez des juments vivantes, puis expédiés de nuit vers un laboratoire spécialisé (Galli et al. 2016), sans perte de viabilité. Il est même possible, en cas de décès de la jument, de récupérer les ovaires ou les ovocytes et de les confier à un laboratoire d'ICSI pour tenter de préserver le patrimoine génétique de la jument (Hinrichs et al. 2012). Par ailleurs, les embryons produits *in vitro* peuvent être « biopsiés » pour analyses génétiques, notamment le sexe (Choi et al., 2010), congelés car non pourvus de capsule, stockés, puis transférés ultérieurement. En ce qui concerne les embryons produits *in vivo*, la ponction de la capsule et le collapsus de la cavité blastocœlique par aspiration du liquide blastocœlique améliore significativement l'efficacité de la congélation des blastocystes (Choi, Hartman, et al. 2010), tandis que la cryopréservation d'ovocytes reste, à ce jour, peu performante (Hinrichs 2018).

La production d'embryons *in vitro* par ICSI, suivie de leur congélation, permet de dissocier totalement dans le temps les étapes de ponction folliculaire et de transfert embryonnaire, supprimant ainsi les contraintes de synchronisation des cycles entre juments donneuses et receveuses. En outre, les sessions d'OPU peuvent être planifiées de manière plus anticipée que les récoltes d'embryons produits *in vivo*, notamment à des moments plus compatibles avec le planning sportif des juments. Par ailleurs, une seule session d'OPU peut permettre la production de plusieurs embryons, optimisant ainsi le rendement reproductif à partir d'un même cycle folliculaire. (Lazzari et al. 2020)

C'est dans ce contexte technologique en pleine expansion, marqué par une adoption croissante de l'ICSI, que s'inscrit la présente étude, qui vise à évaluer de manière comparative les taux de mortalité embryonnaire et fœtale après transfert chez les juments receveuses d'embryons frais produits *in vivo* et d'embryons congelés produits *in vitro* après injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) d'ovocytes maturés *in vitro* au cours de quatre saisons de reproduction, de 2021 à 2024.

L'objectif de cette étude rétrospective était d'évaluer comparativement le taux de mortalité embryonnaire et fœtale après transfert d'embryons produits *in vivo* et d'embryons produits *in vitro* par ICSI, et d'analyser l'impact de différents facteurs sur cette mortalité.

Préambule

Sur le plan biologique, la fécondation désigne l'union d'un gamète mâle et d'un gamète femelle de la même espèce, aboutissant à la formation d'un zygote. Ce processus comporte plusieurs étapes successives : l'adhésion du spermatozoïde qui capacite sa réaction à la zone pellucide de l'ovocyte et l'induction de la réaction acrosomiale, suivies de la traversée de cette barrière extracellulaire, puis de la fusion des membranes plasmiques des deux gamètes, accompagnée de l'activation ovocytaire, et enfin de la fusion des deux pronuclei, événement marquant la formation du zygote à proprement parler (McKinnon et al. 2011; Zegers-Hochschild et al. 2017).

Sur le plan terminologique, il convient de distinguer plusieurs modalités techniques de la fécondation (Hinrichs 2018; Zegers-Hochschild et al. 2017) :

- La **fécondation *in vivo***, qui se déroule naturellement dans l'appareil génital femelle après saillie ou insémination artificielle ;
- La fécondation *in vitro* « classique », réalisée en laboratoire par simple mise en contact des gamètes dans un milieu de culture adapté ;
- La fécondation assistée par micro-injection, ou ICSI (injection de sperme intracytoplasmique), qui consiste à injecter mécaniquement un spermatozoïde unique dans le cytoplasme ovocytaire à l'aide d'une micropipette, en contournant les étapes de reconnaissance cellulaire initiales, qui sera aussi citée simplement **fécondation *in vitro*** dans le reste de l'étude.

Chez la jument, le développement embryonnaire débute par une phase tubaire longue de près d'une semaine avec un passage actif de l'embryon dans la cavité tubaire par sécrétion de prostaglandine E qui permet le relâchement du sphincter de la papille utéro-tubaire. Une fois dans l'utérus à J7-J8 post-ovulation, l'embryon est très mobile du fait de la tonicité utérine (4 mm/minute), et une zone acellulaire glycoprotéique (la capsule) est synthétisée autour de l'embryon par le trophoblaste en coopération avec les cellules de l'endomètre. L'embryon reste libre dans la lumière utérine longtemps avant que ne débute la placentation. Vers J16-J17 post-ovulation, l'embryon cesse de se déplacer dans la cavité utérine et s'immobilise à la base des deux cornes utérines. C'est à ce stade que débute l'organogenèse. Cette étape de grande mobilité, qui coïncide avec la reconnaissance maternelle de la gestation, est essentielle au maintien du corps jaune et à la poursuite du développement embryonnaire.

Ce n'est en revanche que vers le 40-45^{ème} jour que débute la mise en place du placenta qui, chez les juments, est diffus et de type épithélio-chorial, caractérisé par la présence de 6 couches cellulaires séparant la circulation sanguine maternelle placentaire de celle du fœtus.

I. Matériels et méthodes

I. Matériels et méthodes

L'étude a été menée au Haras de Hus, situé à Petit Mars (44), au cours des saisons de reproduction de 2021 à 2024. Elle porte sur les embryons produits entre 2021 et 2024 par la méthode classique de transfert d'embryon après fécondation *in vivo*, récoltés au Haras de Hus, et sur les embryons produits entre 2015 et 2024 au laboratoire Avantea (Crémone, Italie) par le mode de fécondation *in vitro* assistée par microinjection, congelés puis transportés au Haras de Hus pour implantation.

Ces embryons ont été transférés sur des juments receveuses issues des juments propres du Haras de Hus ainsi que des juments extérieures en pension, fournies par les propriétaires des juments donneuses d'embryons ou d'ovocytes.

Les manipulations de récolte des embryons *in vivo*, de ponctions folliculaires chez les juments donneuses et de transferts d'embryons chez les juments receveuses, ont été réalisées au centre d'insémination artificielle et de transfert d'embryons du Haras de Hus, par les Drs Laure NORMANDIN et Hubert TERRIS.

La très grande majorité des ponctions folliculaires ont été réalisées au Haras de Hus sur des juments donneuses appartenant à l'élevage de Hus ou à d'autres propriétaires. Les ovocytes récoltés au Haras de Hus ont ensuite été acheminés jusqu'au laboratoire Avantea (Crémone, Italie), où ils ont été maturés puis fécondés par injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Quelques embryons produits *in vitro* par le laboratoire Avantea (Crémone, Italie), et transférés au Haras de Hus, étaient issus d'ovocytes obtenus dans quelques autres centres de reproduction français.

Au total, 1 639 transferts embryonnaires ont été recensés entre 2021 et 2024 au Haras de Hus. Parmi eux, 827 concernaient des embryons produits *in vivo*, et 812 concernaient des embryons produits *in vitro*. Ont été inclus dans cette étude rétrospective tous les transferts embryonnaires réalisés au Haras de Hus entre 2021 et 2024, quel que soit le succès du transfert. Pour les embryons produits *in vivo*, seuls les transferts dont la récolte et le transfert ont été réalisés au Haras de Hus ont été retenus.

Les transferts d'embryons inclus dans l'étude ont été réalisés entre le 15 février et le 17 septembre de l'année 2021, entre le 21 février et le 18 septembre de l'année 2022, entre le 6 mars et le 30 septembre de l'année 2023, et entre le 3 mars et le 20 septembre de l'année 2024.

Les saisons ont été définies telles que :

- Hiver : 21 décembre au 20 mars,
- Printemps : 21 mars au 20 juin,
- Été : 21 juin au 20 septembre,
- Automne : 21 septembre au 20 décembre.

Aucun transfert n'a été recensé en automne.

A. Production d'embryons *in vivo*

1. Suivi génital et insémination de la jument donneuse

Pour les transferts d'embryons produits *in vivo*, les juments donneuses étaient inséminées selon les protocoles classiques de suivi et d'insémination artificielle, en tenant compte du moment de l'œstrus suivi par échographie génitale transrectale, de l'évolution de la croissance folliculaire et du type de dose de sperme utilisée (fraîche, réfrigérée ou congelée). L'ovulation était induite par voie sous-cutanée à l'aide de triptoréline (0,2 mg, Decapeptyl®, Ipsen Pharma, Boulogne-Billancourt, France), lorsqu'un follicule de plus de 35 mm de diamètre était identifié à l'échographie, en association avec un œdème endométrial marqué.

En cas d'utilisation de sperme frais ou réfrigéré, l'insémination était réalisée 24 heures après l'induction de l'ovulation. Si l'ovulation n'était pas confirmée, une seconde insémination avait lieu 48 heures après la première. Lorsque du sperme congelé était utilisé, l'évolution du follicule dominant était suivie à l'échographie toutes les 6 heures et l'insémination était réalisée une fois l'ovulation constatée.

Lors de survenue d'une endométrite persistante post-insémination, une prise en charge adaptée était mise en place avec, le cas échéant, des injections répétées d'ocytocine associées ou non, selon le cas, à des lavages utérins avec du lactate de Ringer.

2. Récolte des embryons

La récolte des embryons était effectuée par lavage utérin transcervical 8 jours après la première ovulation (si plusieurs ovulations avaient été observées). Les juments étaient sédâtées à l'aide de détomidine (5-10 µg/kg, Detogesic®, Vetcare, Salo, Finlande), par voie intraveineuse, à une dose variable en fonction de leur tempérament et de l'effet obtenu. Le rectum était ensuite vidé avec précaution, la queue enveloppée dans un protège-queue, et la région périnéale lavée 3 fois avec un savon antiseptique à la povidone iodée et rincée, puis soigneusement séchée à l'aide d'un essuie-tout à usage unique. Juste après cette étape, une injection intramusculaire ou intraveineuse de 10 à 20 UI d'ocytocine (1 à 2 mL, Biocytocine®, Inovet, France) était effectuée dans le but de favoriser les contractions utérines et ainsi optimiser la récupération des embryons.

Le lavage utérin était réalisé à l'aide d'un cathéter Bivona 36 CH avec ballonnet (IMV Technologies, L'Aigle, France), connecté à un ensemble de gravité (IMV Technologies, L'Aigle, France). Le cathéter était introduit par voie transcervicale jusque dans le corps utérin. Une fois en place, le ballonnet situé à son extrémité était gonflé avec 40 à 60 mL d'air, puis tiré caudalement afin d'assurer une obturation efficace contre l'orifice interne du col utérin (**figure 1**).

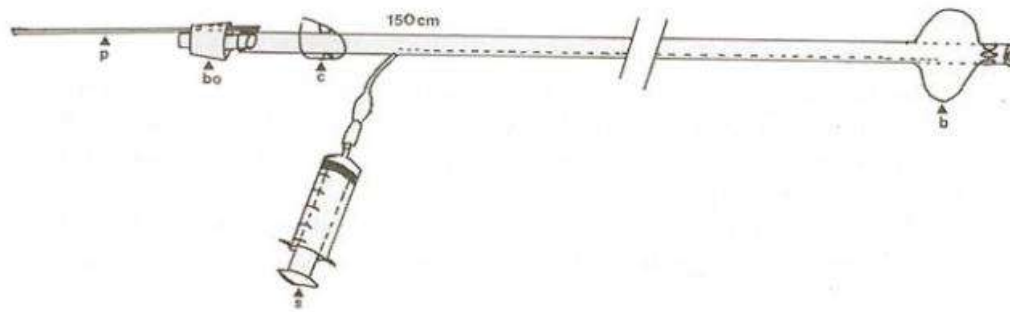


Figure 1 - Schéma de la sonde de récolte d'embryons équins de type Bivona® et bouhcon de raccord (bo) au flacon de récolte muni de sa prise d'air (p). Dispositif © pour clamer la sonde-Ballonnet (b) gonflé à la seringue (s) (d'après BRUYAS et al. 1999)

L'utérus de chaque jument donneuse était ensuite lavé 4 fois en moyenne, et parfois jusqu'à 6 fois selon l'appréciation du clinicien. À chaque lavage, 1L de solution EuroFlush à 37 °C (IMV Technologies, L'Aigle, France) était utilisé, avec un siphonnage par gravité. Il s'agit d'une solution de récolte stérile contenant un indicateur de pH (rouge de phénol) et de l'albumine bovine, afin d'éviter l'adhérence des embryons aux surfaces plastiques du matériel de récolte. Le cathéter était connecté aux bouteilles via l'ensemble de gravité fixé avec un clip de raccord (IMV Technologies, L'Aigle, France). Afin d'optimiser la récupération du liquide, un massage transrectal de l'utérus était effectué après la deuxième, la troisième et la quatrième introduction du milieu dans l'utérus et avant sa récupération par siphonnage obtenue par gravité en abaissant le flacon de récolte en dessous du niveau de l'utérus (**figure 2**).

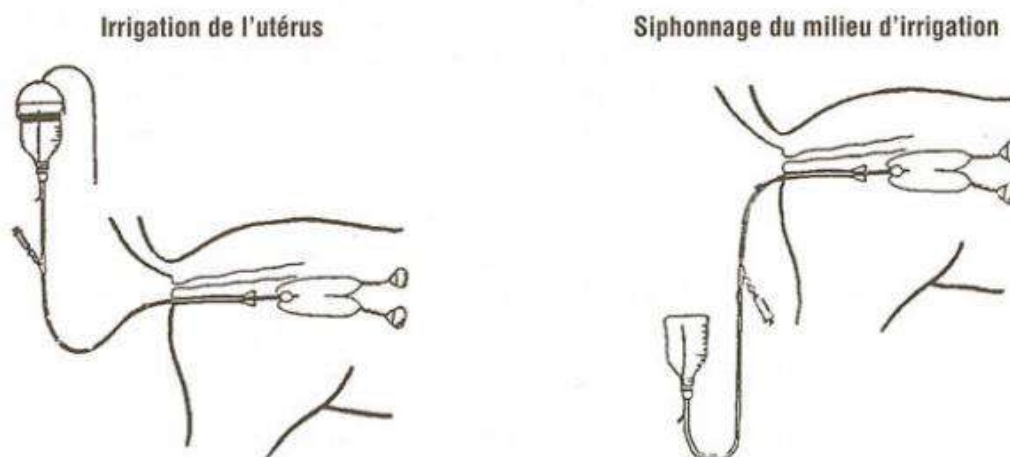


Figure 2 - Mise en place de la sonde de récolte (d'après BRUYAS et al. 1999)

À la fin de la procédure, le ballonnet était dégonflé et le cathéter retiré. Une injection intramusculaire de prostaglandine F2 α était ensuite administrée à la jument donneuse afin d'induire une lutéolyse, de prévenir une gestation non désirée en cas de non récupération de l'embryon et de favoriser un retour rapide en œstrus. Selon les cas, les produits utilisés étaient le dinoprost (0,01 mg/kg, Dinolytic®, Zoetis France, Châtillon, France), l'alphaprostol (4

µg/kg, Alfabedyl®, Ceva Salute Animale, Milan, Italie) ou le cloprosténol (0,5 µg/kg, Estrumate®, Intervet, Beaucouzé, France).

Au laboratoire attendant à la salle de manipulation des juments, les opérations étaient effectuées sous hotte à flux laminaire. Le liquide de lavage était filtré à travers un filtre stérile à embryons (Em Con™, Minitube, Tiefenbach, Allemagne), et les embryons étaient recherchés sous loupe binoculaire (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen, Germany), puis placés dans un milieu stérile adapté pour leur évaluation et lavés 10 fois conformément à la réglementation sanitaire européenne.

Chaque embryon produit *in vivo* a été évalué sous loupe binoculaire afin de vérifier son stade de développement (généralement blastocyste entre J7 et J8) et son intégrité morphologique.

B. Production d'embryons *in vitro* par le laboratoire Avantea

1. Ponction folliculaire (OPU) au Haras de Hus

La très grande majorité des ovocytes étaient collectés au Haras de Hus par ponction transvaginale guidée par échographie.

La ponction est réalisée uniquement si la jument n'est pas en œstrus et présente au moins 10 follicules ovariens, mesurant entre 10 et 20 mm de diamètre, répartis sur les deux ovaires.

Les juments donneuses étaient préparées à l'avance par une prémédication orale associant une antibiothérapie à large spectre sous la forme de **sulfadiazine-triméthoprim** (30 mg/kg et 6 mg/kg, Equibactin® pâte orale, Le Vet Pharma BV, Oudewater, Pays-Bas), ainsi qu'une tranquillisation par l'**acépromazine** (0,2 mg/kg, Tranquigel®, Le Vet Pharma BV, Oudewater, Pays-Bas) donnée au moins 20 minutes avant son introduction dans la barre de contention.

En l'absence de tranquillisation orale préalable, une tranquillisation initiale pouvait être effectuée par voie intraveineuse à l'aide d'**acépromazine** (0,03 mg/kg, Calmivet® injectable, Vetoquinol, Lure, France) au moment de l'entrée dans la barre de contention. Selon la profondeur de la tranquillisation obtenue, une sédation complémentaire était éventuellement réinjectée pendant la phase de préparation avec de la **détomidine** (environ 5 µg/kg, Detogesic®, Vetcare, Salo, Finlande) administrée par fractionnement selon la profondeur de la sédation de la jument.

Juste avant la réalisation de l'anesthésie épidurale, une analgésie multimodale était administrée par voie intraveineuse via un cathéter intraveineux, incluant **détomidine** (5 µg/kg, Detogesic®, Vetcare, Salo, Finlande), **butylbromure de scopolamine** (0,12 mg/kg, Estocelan®, Boehringer Ingelheim Animal Health France, Lyon, France), **métamizole sodique** (15 mg/kg, Estocelan®, Boehringer Ingelheim Animal Health France, Lyon, France), **kétoprofène** (2 mg/kg, Ketofen® 10%, Ceva Santé Animale, Libourne, France) et **morphine** (0,12 mg/kg, Morphine (chlorhydrate) Lavoisier® 20 mg/mL, Laboratoire Chaix et du Marais, Paris, France).

L'anesthésie épidurale était réalisée après un rasage et une désinfection rigoureuse de l'espace intercoccygien entre la première et la deuxième vertèbre coccygienne (Co1-Co2). Deux seringues de 10 mL étaient préparées : chacune contenait **xylazine**, **morphine** et un

complément de **chlorure de sodium 0,9 %** (NaCl 0,9 %) comme diluant jusqu'à 7,5 mL par seringue. Ainsi, chaque seringue renfermait 50 mg de **xylazine** (0,2 mg/kg, Rompun® 2%, Elanco, Cuxhaven, Allemagne), 20 mg de **morphine** (0,08 mg/kg, Morphine (chlorhydrate) Lavoisier® 20 mg/mL, Laboratoire Chaix et du Marais, Paris, France) et 4 mL de **NaCl 0,9%**, pour un volume total de 10 mL. Le contenu des deux seringues, soit 20 mL au total, était administré lentement dans l'espace épidural.

Le rectum était ensuite vidé avec précaution, la queue enveloppée dans un protège-queue, et la région périnéale lavée 3 fois avec un savon antiseptique à la povidone iodée et rincée, puis soigneusement séchée à l'aide d'un essuie-tout à usage unique. Une sonde urinaire, souple et munie d'un ballonnet, était mise en place.

Juste avant le début de la ponction, un complément de sédation était administré par voie intraveineuse avec de la **détomidine** (10 µg/kg, Detogesic®, Vetcare, Salo, Finlande).

La ponction était ensuite réalisée par voie transvaginale, sous guidage échographique. La sonde échographique est placée à l'extrémité d'un support rigide permettant de pousser la sonde contre le fornix du vagin. Ce support est muni également d'un guide de ponction, dans laquelle chemine l'aiguille de ponction. Le praticien tient l'ovaire par voie transrectale et le plaque contre la paroi du vagin en regard de la sonde de l'échographe (ExaPad, IMV Technologies, L'Aigle, France), d'une sonde linéaire de 5 MHz, en mode B (**figures 3 et 4**).



Figure 3 – Réalisation d'une ponction folliculaire durant laquelle un opérateur maintient l'ovaire avec la main droite, la sonde avec la paume de la main gauche, et manipule l'aiguille avec le pouce et l'index de la main gauche, et un second opérateur tient une seringue en plastique pour le rinçage des follicules (d'après Cuervo-Arango et al. 2025)



Figure 4 - Réalisation d'une ponction folliculaire au Haras de Hus par les Docteurs Hubert TERRIS et Laure NORMANDIN

La ponction de chaque follicule est alors effectuée à l'aide d'une aiguille de calibre 12Ga x 60 cm (Equine Oocyte Collection Set Etched tip, MILA, Hebron, Kentucky, Etats-Unis). Pour tous les follicules entre 10 et 20 mm de diamètre, le liquide folliculaire était aspiré, puis la cavité folliculaire était rincée 10 fois à l'aide d'un milieu commercial spécifique à base d'héparine et d'albumine bovine (EquiPlus OPU recovery medium®, Minitube, Tiefenbach, Allemagne), en combinant le rinçage à des mouvements de rotation de l'aiguille pour racler la paroi folliculaire. A chaque rinçage, la cavité folliculaire était regonflée pour atteindre au moins sa taille initiale d'avant la ponction. Le liquide folliculaire et les solutions de rinçage étaient filtrés au travers d'un filtre stérile à embryons (EZ-Way Filter, SPI-MFG, Canton, Texas, Etats-Unis), puis le contenu du filtre était transféré dans une boîte de Petri stérile tel que le EquiHold® (Minitube, Tiefenbach, Allemagne) ou un milieu enrichi en albumine bovine et tampon biologique (HEPES), maintenu à température ambiante.



Figure 5 – Milieu spécifique à base d'héparine et d'albumine bovine : EquiPlus OPU recovery medium®, Minitube

Les ovocytes étaient identifiés à l'aide d'une loupe binoculaire (Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen, Germany), lavés à trois reprises, puis transférés dans des cryovials contenant un milieu tamponné à base de HEPES dérivé de la Synthetic Oviductal Fluid (H-SOF modifié).

2. Transport des ovocytes jusqu'au laboratoire Avantea

Les ovocytes, dans leur milieu de conservation, étaient ensuite expédiés dans une boîte en polyéthylène (Sonoco™ ThermoSafe, Fisher Scientific, Strasbourg, France) à 22 °C, en direction du laboratoire Avantea, à Crémone en Italie.

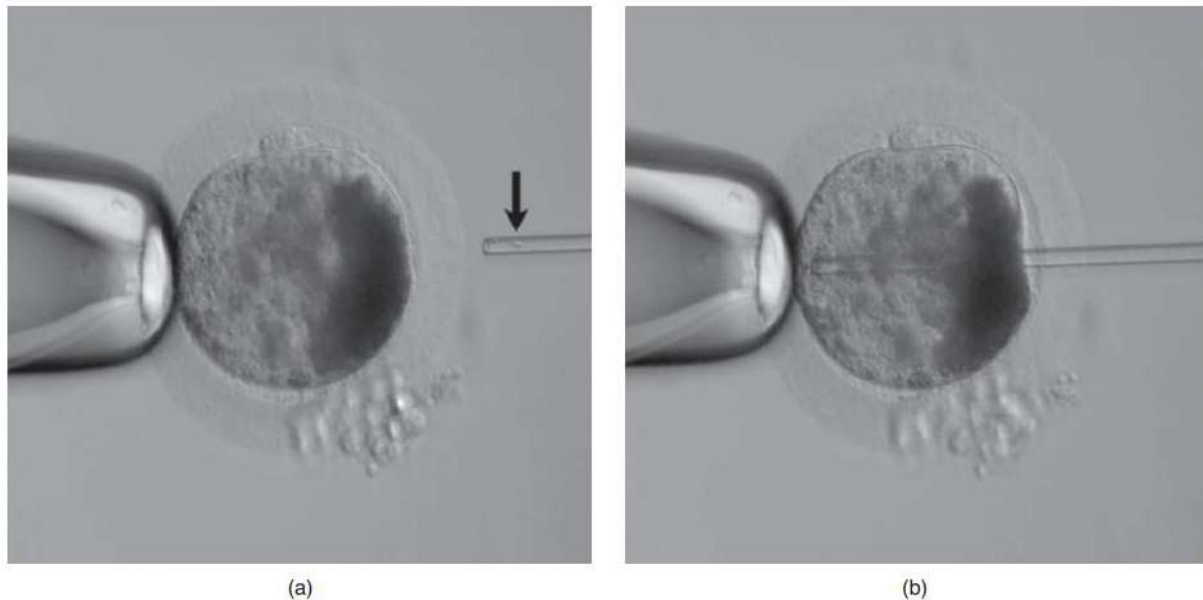
3. Fécondation par ICSI au laboratoire Avantea : injection intracytoplasmique de spermatozoïde

Une fois réceptionnés au laboratoire Avantea (Cremona, Italie), les ovocytes étaient maturés et fécondés *in vitro* selon la méthode standardisée du laboratoire (Arnold et al. 2025; Lazzari et al. 2020).

Les ovocytes sont d'abord maturés *in vitro* pendant 24 heures dans un milieu spécifique à 38,5 °C, sous une atmosphère contrôlée à 5 % de CO₂. À l'issue de cette phase, ils sont incubés pendant 5 minutes dans du H-SOF contenant de la hyaluronidase (2,5 µg/mL) afin de faciliter l'élimination des cellules du cumulus, puis transférés dans du H-SOF modifié. Seuls les ovocytes présentant un premier globule polaire, indicateur de leur passage en métaphase II, sont sélectionnés pour la fécondation.

La fécondation est réalisée par la technique d'injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI). Du sperme congelé-décongelé, issu d'un étalon choisi par le propriétaire de la jument

donneuse, est utilisé. Une petite portion d'une paillette de 0,5 mL est décongelée, puis soumise à une centrifugation sur gradient de densité afin d'enrichir la préparation en spermatozoïdes mobiles et sans anomalie morphologique détectable. Les spermatozoïdes sont sélectionnés individuellement, immobilisés à l'aide d'une impulsion piézoélectrique, puis injectés dans le cytoplasme des ovocytes en métaphase II, à l'aide d'un micromanipulateur monté sur microscope inversé. L'injection traverse la zone pellucide, créant un orifice visible caractéristique de la procédure.



(a) Ovocyte avec globule polaire visible en position 12 heures ; le spermatozoïde est visible à l'extrémité de la micropipette (flèche) juste avant l'injection.
(b) Injection du spermatozoïde en profondeur dans le cytoplasme de l'ovocyte mature.

Figure 6 - ICSI classique : injection intracytoplasmique de spermatozoïde dans un ovocyte métaphasé II (McKinnon et al., 2011)

Les ovocytes injectés sont alors mis en culture dans du H-SOF modifié, supplémenté en acides aminés et en albumine sérique bovine (BSA). Deux jours après l'ICSI (considéré comme le jour 0), la division cellulaire est évaluée ; les ovocytes non clivés sont éliminés. Aux jours 4 et 6 de la culture, la moitié du milieu est renouvelée. La formation des jeunes blastocystes est ensuite suivie quotidiennement entre les jours 6 et 9. Le délai de formation du jeune blastocyste, variable d'un embryon à l'autre, est systématiquement enregistré (Claes, Stout 2022). Dès l'obtention du stade blastocyste, l'embryon est immédiatement cryoconservé.

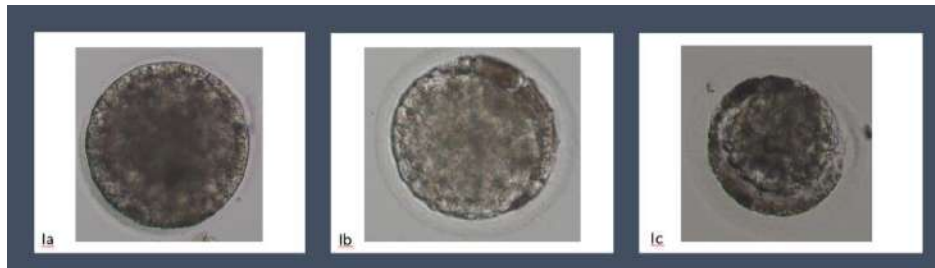
Ce protocole, strictement standardisé au sein du laboratoire AVANTEA, permet une reproductibilité optimale des étapes de maturation, de fécondation et de culture embryonnaire.

4. Stade de développement et évaluation de l'embryon

Les embryons produits *in vitro* ont été évalués et sélectionnés par le laboratoire Avantea (Crémone, Italie) selon un protocole standardisé combinant le stade de développement, des critères morphologiques et des indicateurs de viabilité.

En effet, les embryons sont éventuellement sexés et cryoconservés lorsqu'ils ont atteint le stade de jeune blastocyste. Leur qualité est ensuite déterminée à l'aide d'un système de grading simplifié basé sur la morphologie (Arnold et al. 2025). Trois grades sont définis en fonction de la quantité de matériel extracellulaire présent entre le trophoblaste et la zone pellucide (L. Morris et al., 2022; L. H. A. Morris & Maclellan, 2024) :

- **Grade 1** : membrane plasmique intacte, différenciation claire entre le trophoctoderme et le bouton embryonnaire ;
- **Grade 2** : membrane intacte, présence modérée de débris cellulaires ou d'extrusions, différenciation moins marquée ;
- **Grade 3** : membrane intacte, extrusions importantes, faible nombre de cellules, différenciation peu définie.



1a = Grade 1, 1b = Grade 2, 1c = Grade 3

Figure 7 – Illustration des grades des embryons issu d'ICSI (L. H. A. Morris & Maclellan, 2024)

Seuls les blastocystes présentant une couronne bien délimitée de cellules trophoblastiques alignées en périphérie, correspondant à un Grade 1 selon les critères de l'International Embryo Transfer Society (IETS) (L. H. A. Morris & Maclellan, 2024), étaient sélectionnés pour la cryoconservation.

5. Sexage des embryons par biopsie

Le sexage des embryons était réalisé à la demande du propriétaire de la jument donneuse par le laboratoire Avantea (Lazzari et al. 2020), avant cryoconservation. Cette procédure repose sur une biopsie embryonnaire suivie d'une amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), permettant d'identifier la présence ou l'absence du chromosome Y (Lazzari et al. 2020).

La biopsie consiste à prélever, par pipetage doux à l'aide de micromanipulateurs, quelques cellules trophoblastiques s'extrudant spontanément à travers l'orifice de la zone pellucide formé lors de l'injection du spermatozoïde (ICSI). Elle est réalisée entre le 7^{ème} et le 9^{ème} jour post-ICSI, dès qu'une extrusion cellulaire suffisante était visible au microscope inversé. Après le prélèvement, les embryons sont soit replacés en culture, soit directement cryoconservés.

Les cellules biopsiées (environ 5 à 10 cellules) sont déposées dans un tube à microcentrifuger de 0,5 mL, puis conservées à -20°C . Après décongélation, le contenu de chaque tube est traité avec une solution de protéinase K à 20 mg/mL (Ambion™, ThermoFisher Scientific, Milan,

Italie) et incubé à 38 °C pendant 30 minutes, suivie d'une étape de dénaturation enzymatique à 99 °C pendant 10 minutes.

La réaction de PCR est réalisée en duplex, ciblant simultanément le gène **eSRY** (Herrera et al. 2014), situé sur le chromosome Y et impliqué dans la différenciation sexuelle chez le cheval, et le gène constitutif **GGTA1** (alpha-galactosyltransférase 1), utilisé comme témoin interne. Elle est conduite à l'aide de l'enzyme **LA Taq DNA Polymerase** (TaKaRa EuropeClontech, Saint-Germain-en-Laye, France), selon les recommandations du fabricant. Le protocole inclut une dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 minutes, suivie de 40 cycles de 94 °C pendant 30 secondes, 60 °C pendant 30 secondes et 72 °C pendant 30 secondes, puis une extension finale de 7 minutes à 72 °C.

Des fibroblastes mâles et femelles lysés sont utilisés comme témoins positifs et négatifs. Les produits amplifiés sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, visualisés sous lumière UV à l'aide d'un transilluminateur, puis photographiés. Le couple d'amorces dirigé contre **eSRY** permet l'amplification d'un fragment de 429 paires de bases, tandis que celui ciblant **GGTA1** génère un fragment de 368 paires de bases.

6. Congélation et transport des embryons jusqu'au Haras de Hus

Les embryons viables étaient congelés et stockés en paillettes au sein du laboratoire Avantea (Arnold et al. 2025).

Avant congélation, les embryons étaient lavés dans un milieu H-SOF modifié à température ambiante. Ils étaient ensuite incubés successivement dans du H-SOF modifié contenant 5 % (v/v) de glycérol pendant cinq minutes, puis dans un second milieu contenant 10 % (v/v) de glycérol pendant vingt minutes, afin d'assurer une pénétration progressive du cryoprotecteur.

Chaque blastocyste était ensuite aspiré individuellement dans une paillette de 0,25 mL, dont l'extrémité ouverte était scellée thermiquement. Les paillettes étaient placées dans un congélateur programmable utilisant un bain de méthanol, maintenu à -6,5 °C. Après une stabilisation de cinq minutes à cette température, une cristallisation était induite en touchant une extrémité de la paillette avec une tige métallique préalablement trempée dans l'azote liquide. Le refroidissement se poursuivait ensuite à raison de -0,5 °C par minute jusqu'à atteindre -32 °C, température à laquelle les paillettes étaient immédiatement plongées dans de l'azote liquide à -196 °C (Arnold et al. 2025).

Pour chaque embryon, une paillette de 0,5 mL portant les informations d'identification (jument, étalon, date) était attachée à la paillette contenant le blastocyste. Les embryons cryoconservés étaient ensuite stockés par lots jument-étalon dans des *canisters*, eux-mêmes immergés dans de l'azote liquide à -196 °C jusqu'à leur envoi au Haras de Hus.

7. Décongélation des embryons produits *in vitro* : protocole appliqué avant transfert

La décongélation des embryons au Haras de Hus était réalisée selon le protocole standardisé fourni par le laboratoire Avantea (Arnold et al. 2025), en utilisant des milieux spécifiques adaptés à la réhydratation progressive.

L'embryon était tout d'abord retiré de l'azote liquide, maintenu à température ambiante pendant environ 8 secondes, puis immergé dans un bain-marie à 20–24 °C pendant 25 secondes. La paillette était ensuite essuyée avec un papier imbibé d'alcool sous hotte à flux laminaire (FlowFAST H, Ferrare, Italie).

Toujours sous hotte à flux laminaire, le coton d'obturation de la paillette était sectionné, et l'extrémité ouverte reliée à une seringue de 1 mL contenant environ 0,5 mL d'air. L'extrémité scellée était ensuite retirée, permettant d'expulser le contenu de la paillette dans une boîte de Petri stérile, sous loupe binoculaire.

L'embryon était identifié visuellement, puis transféré dans une plaque à quatre puits contenant du milieu H-SOF modifié. Ce protocole visait à éliminer progressivement le cryoprotecteur (glycérol) à travers quatre bains successifs de 5 minutes, contenant respectivement 8 %, 6 %, 4 %, puis 2 % (v/v) de glycérol (Equine Embryon Thawing Kit, Avantea, Crémone, Italie).

Enfin, l'embryon était placé dans du H-SOF modifié pendant environ 1 minute (Equine Embryon Thawing Kit, Avantea, Crémone, Italie). L'embryon était ensuite aspiré dans une paillette de 0,25 mL ou de 0,5 mL, selon la taille de l'embryon, pour le transfert.

C. Transfert des embryons (*in vivo* et *in vitro*)

1. Choix et préparation des juments receveuses

Les juments receveuses étaient choisies selon quatre situations.

La synchronisation du cycle œstral des juments receveuses, qu'elles appartiennent au propriétaire de la jument donneuse ou qu'elles soient louées au Haras de Hus à sa demande, reposait sur un protocole identique. Ces receveuses faisaient l'objet d'un suivi échographique régulier, et leur ovulation était induite par injection intraveineuse d'hCG (1500 UI, Chorulon®, Intervet, Beaucozé, France) dès l'observation d'un follicule de plus de 35 mm de diamètre associé à un œdème endométrial marqué.

Lorsque la jument receveuse était spécifiquement attribuée à une jument donneuse, son ovulation était induite le même jour que celle de la donneuse. L'ovulation était ensuite confirmée par échographie entre 24 et 48 heures après l'injection. L'objectif était alors d'obtenir une jument receveuse à J6 post-ovulation (+/- 1 jour) lorsque la donneuse était à J8, jour de la récolte embryonnaire.

En l'absence d'attribution spécifique, notamment lorsque la jument receveuse était louée au Haras de Hus, le même protocole d'induction était appliqué. Le jour de la récolte (J7 ou J8 post-

ovulation chez la jument donneuse), une jument receveuse dont l'ovulation avait été datée entre J4 et J8 était alors sélectionnée pour le transfert (Cuervo-Arango et al., 2019).

Concernant les transferts d'embryons produits *in vitro*, que la jument receveuse appartienne au propriétaire de l'embryon ou qu'elle soit louée au Haras de Hus, le suivi et la préparation reposait sur les mêmes critères échographiques et le même protocole hormonal que pour les embryons produits *in vivo*. Le transfert était réalisé lorsque la phase lutéale du cycle œstral était optimale pour l'accueil de l'embryon, c'est-à-dire lorsque la jument receveuse se trouvait entre J4 et J5 post-ovulation (Cuervo-Arango et al., 2019).

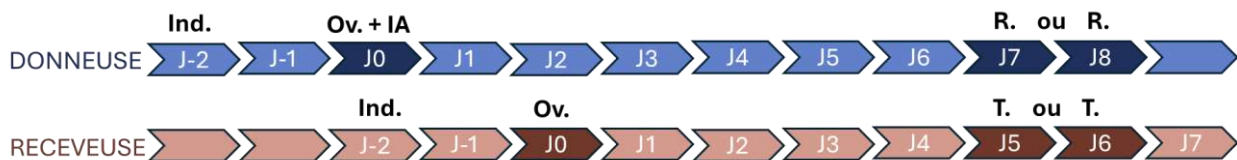


Figure 8 - Schéma explicatif de la synchronisation utérine pour les embryons *in vivo* (modifié de IFCE)

Ind. : induction de l'ovulation, Ov. : ovulation, IA : insémination artificielle, R. : récolte de l'embryon, T. : transfert de l'embryon

2. Evaluation pré-transfert de la jument receveuse

Quatre jours après la détection de l'ovulation, toutes les juments receveuses faisaient l'objet d'un examen clinique incluant une palpation transrectale et une échographie. Seules les juments présentant un tonus utérin et cervical satisfaisant, une absence d'œdème utérin, l'absence de liquide ou d'air intra-utérin, ainsi qu'un ou plusieurs corps jaunes, étaient retenues pour recevoir un embryon.

L'examen visait également à réaliser la détection d'éventuels kystes utérins et à faire une sorte de cartographie échographique de l'utérus situant leur position afin de pouvoir effectuer une différenciation entre vésicule embryonnaire et kystes utérins au moment du diagnostic précoce. Cette étape est particulièrement importante pour prévenir d'éventuels diagnostics faussement positifs de gestation, la plupart des kystes utérins ayant une taille et une forme comparables à celles de vésicules embryonnaires.

3. Transfert de l'embryon

La technique de transfert était identique pour les embryons issus de fécondation *in vivo* et ceux issus de fécondation *in vitro*. La jument receveuse était systématiquement sédaturée à l'aide d'un protocole associant **butorphanol** (environ 8 µg/kg, Torbugesic®, Zoetis, Châtillon, France) et **détomidine** (environ 7 µg/kg, Detogesic®, Vetcare, Salo, Finlande), administrés par voie intraveineuse lente.

Le rectum était ensuite vidé avec précaution, la queue enveloppée dans un protège-queue, et la région périnéale lavée 3 fois avec un savon antiseptique à la povidone iodée et rincée, puis soigneusement séchée à l'aide d'un essuie-tout à usage unique.

L'embryon était transféré dans le corps utérin, à l'aide d'un pistolet de transfert spécifique dont le diamètre était choisi en fonction du stade de développement de l'embryon (J7 ou J8, aspirés dans des paillettes de 0,25 mL ou 0,5 mL respectivement). Une asepsie rigoureuse était assurée au moment de l'introduction du pistolet, notamment par l'utilisation de la technique du *double gant* : un second gant stérile, enfilé au-dessus du pistolet et du premier gant stérile, était retiré après le passage de l'anneau vestibulaire, afin de prévenir toute contamination de l'embryon et du matériel pénétrant dans le canal cervical.

D. Techniques de diagnostic de gestation

Chaque jument receveuse faisait l'objet d'un suivi échographique de gestation rigoureux dont l'objectif principal était de déterminer, à chaque étape clé du suivi post-transfert, si la gestation se poursuivait ou non. Ce suivi permettait ainsi de distinguer les gestations maintenues des pertes embryonnaires ou fœtales, tout en surveillant le bon développement du conceptus et en excluant les éventuelles anomalies susceptibles de compromettre son maintien.

1. Diagnostic à 14 jours de gestation : détection précoce

Le premier diagnostic de gestation était réalisé à l'aide d'une sonde linéaire de 5 MHz, en mode B, par échographie transrectale à 6 jours post-transfert pour les embryons *in vivo*, l'embryon était alors à 14 jours de développement en moyenne. En effet, la récolte était réalisée à J8 post-insémination, et le transfert avait lieu dans une jument receveuse qui avait ovulé depuis 4 à 8 jours. À ce stade, la vésicule embryonnaire apparaît sous la forme d'une structure anéchogène sphérique, mesurant généralement entre 10 et 15 mm de diamètre. En l'absence de visualisation claire à J14, un second examen est effectué à J16.

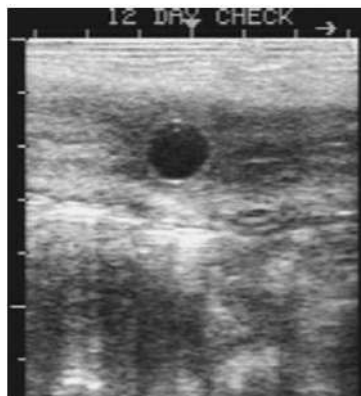


Figure 8 - Image échographique d'une vésicule embryonnaire de 12 jours (d'après McKinnon et al. 2011)

Pour les embryons produits *in vitro*, transférés généralement au stade de son développement *in vitro* dans des juments receveuses ayant ovulé depuis 4 à 5 jours, la première échographie était également majoritairement programmée 6 jours après le transfert, soit autour du 12^{ème} jour post-ICSI. À ce stade, certains embryons atteignent déjà un diamètre d'environ 8 mm, ce qui les rend détectables à l'échographie. En l'absence de visualisation de la vésicule embryonnaire, un second examen était effectué 2 jours plus tard, la vésicule embryonnaire ayant alors le plus souvent une taille et une forme comparables à celles des vésicules d'embryon *in vivo* J14, et au besoin encore 2 jours plus tard.

Cette échographie permettait également de dépister toute éventuelle gestation gémellaire en examinant l'intégralité de l'utérus. En cas de diagnostic de gestation gémellaire, le choix de la conduite à tenir était laissé au propriétaire : laisser évoluer la gestation en espérant une résorption spontanée de l'un des deux embryons, procéder à l'écrasement transrectal d'une des vésicules, ou interrompre la gestation par administration d'une prostaglandine à effet lutéolytique.

Ainsi, quel que soit le mode de production embryonnaire, ce premier diagnostic sera, dans la suite de l'exposé, considéré comme ayant permis la mise en évidence d'une vésicule embryonnaire au 14^{ème} jour de développement.

Les résultats de ces diagnostics étaient entrés dans la variable DG14 pour faciliter la compréhension dans les analyses : positif pour une vésicule embryonnaire visualisée, négatif sinon.

En cas de diagnostic de gestation négatif, la conduite à tenir était la suivante quel que soit le stade de gestation. Chez les juments receveuses, qu'elles appartiennent au propriétaire ou qu'elles soient mises à disposition par le Haras de Hus, deux possibilités étaient envisagées : soit la jument revenait spontanément en œstrus, soit une induction de l'œstrus était réalisée par une injection intramusculaire de prostaglandine F2 α , administrée sous forme de dinoprost (0,01 mg/kg, Dinolytic®, Zoetis France, Châtillon, France).

Dans tous les cas, l'œstrus immédiat consécutif à la perte embryonnaire n'était pas utilisé pour un nouveau transfert ; seule l'œstrus suivant celui-ci, soit le deuxième après la perte, pouvait faire l'objet d'un transfert embryonnaire. En cas de perte d'un embryon produit *in vitro*, il était fortement conseillé au propriétaire de ne plus utiliser cette jument receveuse pour recevoir d'autres embryons *in vitro* au cours de la même saison de reproduction. Toutefois, cette décision lui revenait. En cas de réutilisation, seuls des embryons produits *in vivo* étaient alors proposés pour le transfert.

2. Diagnostic à 28 jours de gestation : confirmation de gestation

Un second examen échographique était effectué lorsque l'embryon atteignait environ 28 jours de développement, afin de confirmer ou non la poursuite de la gestation. L'examen était réalisé à l'aide d'une sonde linéaire de 5 MHz, en mode B également. L'examen permettait de visualiser l'embryon et la présence d'un battement cardiaque embryonnaire constituait le principal critère de viabilité retenu. Accessoirement, le début de développement des cavités allantoïdienne et amniotique étaient également évalués.

À ce stade, l'allantoïde est en développement actif et occupe approximativement la moitié de la vésicule (Brinsko, Blanchard 2011), traduisant une évolution physiologique. L'embryon se positionne progressivement en région dorsale de la vésicule, accompagné du sac vitellin en régression.



Figure 9 - Image échographique d'un embryon de 28 jours (d'après Ginther 1995)

L'ensemble de l'utérus était également minutieusement examiné afin d'exclure la présence d'une gestation gémellaire. En cas de diagnostic de gestation gémellaire, la décision quant à la conduite à tenir était également laissée au propriétaire : laisser évoluer la gestation en espérant une réduction spontanée de l'un des deux embryons, procéder à une ponction échoguidée par voie transvaginale de l'une des deux vésicules embryonnaires avec aspiration du contenu liquidien (avec ou sans injection de pénicilline dans la vésicule vidée), ou interrompre la gestation par administration d'une prostaglandine à effet lutéolytique.

Les résultats de ces diagnostics étaient entrés dans la variable DG28 pour les analyses : positif pour un embryon avec battements cardiaques visualisés, négatif sinon.

3. Diagnostic à 45 jours de gestation : suivi intermédiaire, transition vers la phase fœtale

Lorsque l'embryon atteint 40 jours de développement, la placentation débute, le cordon ombilical est en début de formation et donc la gestation entre dans sa phase fœtale (Brinsko, Blanchard 2011). Un contrôle échographique, à l'aide d'une sonde linéaire de 5 MHz, en mode B, était alors réalisé à 45 jours afin de confirmer que la jument était toujours gravide.

La croissance régulière du fœtus était vérifiée, notamment par l'observation de l'allongement du cordon ombilical et de la migration du fœtus vers la portion ventrale de la cavité allantoïdienne. Le sac vitellin était généralement en cours de résorption.



Figure 10 - Image échographique d'un fœtus de 45 jours (d'après Ginther 1995)

Les premiers mouvements spontanés du fœtus (mouvements de la tête, du tronc ou des membres) étaient parfois visibles, traduisant une activité neuromusculaire débutante et une vitalité satisfaisante.

La présence des battements cardiaques fœtaux était systématiquement vérifiée.

Une attention particulière était portée à l'exclusion de toute gestation gémellaire résiduelle, grâce à une exploration complète de la cavité utérine. Comme aux autres stades de gestation, plusieurs options étaient envisagées, la décision finale appartenant au propriétaire : laisser évoluer la gestation en espérant une réduction spontanée de l'un des deux fœtus, réaliser une ponction échoguidée par voie transvaginale de la cavité cardiaque de l'un des deux fœtus avec injection de pénicilline, ou interrompre la gestation par l'administration d'une prostaglandine à effet lutéolytique.

Les résultats de ces diagnostics étaient entrés dans la variable DG45 pour les analyses : positif pour un fœtus avec battements cardiaques visualisés, négatif sinon.

4. Diagnostic à 63 jours de gestation : dernier diagnostic du suivi

Le dernier diagnostic de gestation était réalisé à l'occasion du diagnostic du sexe fœtal, réalisé par échographie transrectale, à l'aide d'une sonde linéaire de 5 MHz, en mode B, à 63 jours de gestation.

La fenêtre optimale pour cette évaluation se situe entre 58 et 70 jours, période durant laquelle la précision du diagnostic est élevée (Crişan et al. 2016; Curran, Ginther 1989; Renaudin, Jument, Pratique 2017).

Avant l'examen, les juments étaient systématiquement sédaturées par voie intraveineuse avec une association de butorphanol à la dose de 0,01 mg/kg (soit 0,4 mL pour un cheval de 500 kg, Torbugesic® Vet 10 mg/mL, Zoetis) et de détomidine à la dose de 7 à 10 µg/kg (soit 0,4 mL pour un cheval de 500 kg, Detogesic® 10 mg/mL, Dechra), ajustée en fonction du tempérament de la jument. Cette sédation permettait une meilleure tolérance de l'examen échographique transrectal tout en limitant les mouvements, essentiels pour l'obtention d'images optimales.

Lors de cet examen, la viabilité fœtale est systématiquement contrôlée, notamment par l'observation de l'activité cardiaque et du développement de l'amnios et de l'allantoïde, ce qui constitue une étape essentielle avant toute manipulation diagnostique ou décision thérapeutique (Brinsko, Blanchard 2011; Ginther 1995). Cette technique requiert donc une bonne maîtrise de l'échographie transrectale et une connaissance précise de l'anatomie fœtale pour éviter les erreurs d'interprétation.

En cas de gestation gémellaire, la prise en charge suivait le même protocole que celui appliqué aux gestations gémellaires diagnostiquées à 45 jours de gestation. Si le diagnostic de gestation était positif, la jument receveuse était soit envoyée chez le propriétaire locataire, soit maintenue au pré au Haras de Hus jusqu'au terme, sous surveillance.

Les résultats de ces diagnostics étaient entrés dans la variable DG63 pour les analyses : « vivant » pour un fœtus avec activité cardiaque visualisée, « mort » pour fœtus visualisé sans activité cardiaque ou non intégrité du sac gestationnel, « vide » sinon.

5. Référencement des gestations menées à terme

Dans le cadre de cette étude, une recherche des dates de poulinage des juments receveuses a été effectuée via la base de données de l'IFCE afin d'obtenir des informations complémentaires sur les gestations menées à terme. Toutefois, toutes les naissances n'étaient pas systématiquement enregistrées, ce qui limitait l'exhaustivité des données disponibles et ne permettait pas une analyse complète des arrêts de gestation (avortements précoces et tardifs) survenus entre J63 et le terme.

E. Mortalités embryonnaire et fœtale

1. Définition des termes

La distinction entre mortalité embryonnaire précoce et mortalité fœtale était basée sur les critères échographiques et la chronologie des pertes gestationnelles.

a) Mortalité embryonnaire : avant 40 jours de gestation

Les pertes survenues avant 40 jours de gestation ont été considérées comme des mortalités embryonnaires. Lorsque le diagnostic échographique réalisé à 14 jours (DG14) était négatif, le transfert a été classé comme un échec de transfert et correspond à une mortalité embryonnaire précoce, défini par la combinaison : transfert embryonnaire réalisé + DG14 négatif.

Lorsque la gestation avait été confirmée à DG14, mais qu'elle n'était plus visible à J28, la perte a été définie comme une mortalité embryonnaire semi-tardive : DG14 positif + DG28 négatif.

Enfin, lorsque la gestation persistait à DG28, mais qu'aucune vésicule embryonnaire n'était plus visible à J45, la perte a été considérée comme une mortalité embryonnaire tardive : DG28 positif + DG45 négatif.

De manière générale, la mortalité embryonnaire s'est traduite par la disparition brutale de la vésicule embryonnaire ou par l'absence de développement (Vanderwall, 2008).

b) Mortalité fœtale : au-delà de 40 jours de gestation

Les pertes diagnostiquées après 40 jours ont été considérées comme des mortalités fœtales. Lorsque la gestation était confirmée au DG45, mais qu'aucun fœtus vivant n'était observé à J63, la perte a été classée comme une mortalité fœtale précoce, correspondant à la situation : DG45 positif + DG63 négatif.

Ces mortalités ont impliqué la perte d'un fœtus formé et étaient caractérisées par l'absence de battement cardiaque ou par l'absence de fœtus visible dans l'utérus lors de l'examen échographique (Vanderwall 2008).

2. Classification des cas observés par intervalle gestationnel

Afin de situer temporellement les pertes observées, celles-ci ont donc été regroupées en quatre intervalles couvrant les 63 premiers jours de gestation, en fonction des diagnostics échographiques réalisés :

- Échec de transfert ou mortalité embryonnaire précoce : transfert réalisé puis DG14 négatif ;
- Mortalité embryonnaire semi-tardive : DG14 positif puis DG28 négatif ;
- Mortalité embryonnaire tardive : DG28 positif puis DG45 négatif ;
- Mortalité fœtale précoce : DG45 positif puis DG63 négatif.

F. Collecte des données, variables étudiées et critères d'exclusion

1. Récolte des données

a) *Cahiers des transferts d'embryons du Haras de Hus (2021 à 2024)*

Pour chaque transfert embryonnaire, qu'il s'agisse d'un embryon produit *in vivo* ou *in vitro*, un ensemble standardisé d'informations est systématiquement consigné dans les cahiers de suivi. Ces données, consignées de manière rigoureuse au moment de chaque procédure, ont constitué la base de l'analyse rétrospective réalisée dans le cadre de cette étude.

Les informations disponibles pour chaque transfert incluent :

- La date du transfert embryonnaire ;
- Les géniteurs de l'embryon, à savoir le nom de la jument donneuse et celui de l'étalon donneur ;
- Le nom de la jument receveuse ayant porté l'embryon ;
- Le résultat du diagnostic de gestation à 14 jours de gestation ;
- Le résultat du diagnostic de gestation à 28 jours de gestation ;
- Le résultat du diagnostic de gestation à 45 jours de gestation ;
- Le résultat du sexage fœtal réalisé par échographie à 63 jours de gestation ;
- Le résultat du sexage de l'embryon, lorsqu'il a été effectué avant transfert par le laboratoire Avantea.

Ces données ont ensuite été saisies et organisées sous forme de tableau dans un fichier Excel, afin de permettre leur traitement statistique.

b) *Fiches de suivi des cycles de reproduction des juments receveuses*

Les données concernant les juments receveuses ont été extraites des fiches de suivi gynécologique tenues au Haras de Hus. Deux formats de fiches étaient utilisés selon l'origine des juments : celles appartenant au Haras et celles confiées par les clients. Toutefois, les informations renseignées étaient identiques dans les deux cas et permettaient un suivi standardisé de chaque cycle reproducteur.

Chaque fiche contenait les éléments suivants :

- Le nom de la jument suivie ;
- La date de l'échographie transrectale effectuée ;
- La taille des follicules présents sur chaque ovaire, gauche et droit, ainsi que la présence éventuelle d'un ou plusieurs corps jaunes ;
- L'aspect de l'utérus, en particulier son échogénicité, et la localisation ainsi que les dimensions d'éventuels kystes utérins. Ces éléments étaient notés avec soin afin de faciliter l'interprétation ultérieure des diagnostics de gestation à 14 jours, notamment en distinguant un kyste d'une vésicule embryonnaire ;

- Les traitements administrés au cours du cycle, notamment la date d'injection intraveineuse d'hCG (1500 UI, Chorulon®, Intervet, Beaucozé, France), utilisée pour induire l'ovulation, considérée comme le jour d'induction ;
- Le jour d'ovulation estimé, correspondant à l'apparition d'un corps jaune associée à la disparition d'un follicule de plus de 35 mm, dont la croissance avait été observée lors des examens précédents.

Ces données ont permis d'identifier le jour post-ovulation au moment du transfert embryonnaire, variable clé dans l'évaluation de la synchronisation entre l'embryon et l'utérus receveur.

c) Logiciel GROOMY pour l'âge des juments receveuses

Les données démographiques des juments receveuses, notamment leur date de naissance utilisée pour le calcul de l'âge au moment du transfert, ont été extraites du logiciel de gestion GROOMY, utilisé au Haras de Hus pour le suivi administratif et sanitaire des chevaux.

Les informations sur le statut des juments receveuses concernant leur parité étaient manquantes pour beaucoup d'entre elles, cette information n'a donc pas été relevée pour cette étude.

d) Critères d'exclusion

Ont été exclus de l'analyse : les transferts dont un diagnostic de gestation intermédiaire n'avait pas été effectué, ne permettant pas de déduire la date de perte embryonnaire ou fœtale ; les transferts dont les dates de naissance des juments receveuses n'étaient pas répertoriées ; les transferts avec des diagnostics de gestation manquants rendant impossible la connaissance de l'issue de la gestation et donc la détermination d'une éventuelle perte embryonnaire ou fœtale ; les transferts d'embryons produits *in vivo* dont soit la récolte, soit le transfert ont été réalisées ailleurs qu'au Haras de Hus.

Les transferts pour lesquels le nombre de jours post-ovulation de la jument receveuse au moment du transfert embryonnaire n'était pas renseigné ont néanmoins été conservés dans l'analyse.

e) Données conservées sur les 1 339 transferts de l'étude

Pour chaque transfert, les données suivantes ont été collectées :

- Nom de la jument donneuse et nom de l'étalon donneur,
- Données sur la jument receveuse : nom (numéro de puce électronique) et date de naissance,
- Données sur l'embryon : méthode de production (*in vivo* ou *in vitro*), sexage éventuel,

- Données sur le transfert : date du transfert, diagnostics de gestation à 14 jours, 28 jours, 45 jours et 63 jours, nombre d'embryons récoltés lors d'une récolte d'embryons produits *in vivo*,

Si les derniers diagnostics de gestation étaient manquants, ils ont été déduits lorsque les informations de poulinage étaient renseignées dans la base IFCE, avec les données précises permettant d'identifier la date du transfert, la jument donneuse et la jument receveuse associée, ainsi que la date de naissance du poulain et son sexe.

2. Variables étudiées

Les différents transferts embryonnaires ont été analysés afin d'évaluer les taux de mortalité embryonnaire et fœtale, en lien avec le mode de production de l'embryon (*in vivo* ou *in vitro*), mais également afin d'identifier certains facteurs susceptibles d'influencer ces taux.

Dans un premier temps, les transferts ont été répartis en deux lots selon le mode de fécondation utilisée : les embryons produits *in vivo*, issus de juments donneuses ayant été inséminées et dont les embryons ont été récoltés à J8 post-ovulation, et les embryons produits *in vitro*, à partir d'ovocytes récupérés par ponction folliculaire, maturés *in vitro* puis fécondés par ICSI, et transférés après décongélation. Cette distinction a permis l'analyse comparative des deux techniques de production embryonnaire.

Dans un second temps, différents facteurs ont été étudiés, afin d'évaluer leur impact potentiel sur la survie embryonnaire ou fœtale.

Tout d'abord, les juments donneuses et les étalons ont été étudiés individuellement. En effet, seuls les juments donneuses et étalons ayant été à l'origine d'au moins 10 transferts au cours des quatre saisons de reproduction ont été retenus pour cette analyse, afin de garantir une puissance statistique suffisante. Leurs productions respectives ont été comparées, afin d'identifier d'éventuelles différences de performances reproductives, indépendamment de la technique de production embryonnaire utilisée. Pour une question de confidentialité, les noms des chevaux sont remplacés par un code suivi d'un numéro unique ; « jd » pour les juments donneuses et « e » pour les étalons.

Par ailleurs, plusieurs caractéristiques liées aux juments receveuses ont été étudiées :

- L'âge des juments receveuses au moment du transfert, calculé à partir de la date de naissance ;
- Le stade du cycle de la juments receveuse au moment du transfert embryonnaire, exprimé en nombre de jours post-ovulation, paramètre reflétant l'adéquation entre le stade de développement de l'embryon et la fenêtre de réceptivité utérine. Ce nombre de jours post-ovulation a été déterminé à partir des examens échographiques réalisés quotidiennement. Une jument a été considérée comme ayant ovulé le jour où l'examen révélait la disparition d'un follicule pré-ovulatoire observé précédemment, associée à l'apparition d'un corps jaune en formation. Ce jour a été désigné comme J0 ;
- Concernant les antécédents reproducteurs des juments receveuses, les informations détaillées relatives à la subfertilité ou à d'autres troubles reproducteurs n'ont pas été

systématiquement collectées. En revanche, pour caractériser partiellement ces antécédents, nous avons retenu comme indicateur le fait qu'une jument receveuse ait présenté une perte embryonnaire ou fœtale et donc le nombre de réutilisations de cette même jument, au cours de l'année du transfert ou des années antérieures depuis 2021.

Certains paramètres directement liés à l'embryon ont également été pris en compte. Le sexage des embryons produits *in vitro* a été intégré à l'analyse. Dans le cas des embryons produits *in vivo*, le nombre d'embryons obtenus lors de chaque récolte a été renseigné : cela a permis d'interroger l'impact potentiel de la compétition folliculaire, de la qualité ovarienne sur la viabilité embryonnaire ou de potentiels facteurs de réduction embryonnaire précoce de gémeauté.

Enfin, la saison au moment de la récolte des embryons *in vivo* et du transfert des embryons *in vivo* et *in vitro* a été intégrée à l'analyse, les conditions environnementales (température, lumière, humidité) étant susceptibles d'influencer la réussite du transfert embryonnaire et la poursuite de la gestation.

L'évolution de la gestation a été suivie à l'aide des diagnostics réalisés à 14, 28, 45 et 63 jours de gestation. Ces examens ont permis d'identifier les fenêtres de survenue des pertes gestationnelles. Il est à noter que le calcul en jours de gestation tient compte de l'âge embryonnaire au moment du transfert dans l'utérus, qui est toujours estimé à 8 jours, quelle que soit la technique de production de l'embryon.

G. Méthodes statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel R (version 4.4.0, publiée le 24 avril 2024). Les tests statistiques suivants ont été utilisés pour évaluer les différences entre les embryons issus de fécondation *in vivo* et ceux issus de fécondation *in vitro* par ICSI, ainsi que pour identifier les facteurs associés à la mortalité embryonnaire et fœtale.

1. Variables qualitatives

Les variables qualitatives prises en compte dans cette étude sont : le mode de fécondation (*in vivo* ou *in vitro*), le nom de la jument donneuse (pour les juments ayant fait l'objet d'au moins 10 transferts), le nom de l'étalon (également pour les étalons ayant été utilisés dans au moins 10 transferts), la catégorie d'âge de la jument receveuse, la réalisation du sexage de l'embryon produit *in vitro*, l'année-saison du transfert, ainsi que le devenir de la gestation (succès ou échec à différents stades).

2. Variables quantitatives

Les variables quantitatives utilisées sont : le nombre total de transferts réalisés par cheval sur la période étudiée (2021–2024), le nombre de réutilisations d'une même jument receveuse, dans

l'année ou depuis 2021, le nombre d'embryons récoltés par récolte, et le nombre de jours écoulés entre le transfert embryonnaire et le diagnostic de perte, lorsqu'il y en a eu une. Cette dernière variable a été utilisée dans les analyses de survie.

3. Comparaison des groupes selon le mode de fécondation

Les taux de survie embryonnaire et fœtale ont été comparés entre les deux lots à l'aide d'une fonction de survie. Les courbes de survie ont été estimées selon la méthode de Kaplan-Meier, et comparées par un test du log-rank, permettant d'évaluer l'existence d'une différence statistiquement significative entre les deux modalités.

4. Analyse des facteurs associés à la mortalité embryonnaire et fœtale

L'analyse multivariée a été réalisée à l'aide d'un modèle de régression de Cox à risques proportionnels, permettant d'estimer, pour chaque variable, le risque relatif instantané (HR : hazard ratio) de perte embryonnaire ou fœtale, en fonction du temps écoulé depuis le transfert. Afin de déterminer les variables à inclure, une première étape d'analyse univariée a été conduite pour chaque facteur potentiel. Les variables présentant une association avec la survie embryonnaire à un seuil de $p < 0,20$ ont été retenues comme candidates, ce seuil élargi ayant permis de limiter le risque d'exclusion prématurée de facteurs aux effets modérés, mais susceptibles de devenir significatifs dans un modèle ajusté. Les variables sélectionnées ont ensuite été soumises à une procédure automatisée de sélection ascendante (*stepwise*), fondée sur le critère d'information d'Akaike, afin d'identifier le modèle final le plus parcimonieux.

Ce modèle multivarié a permis d'obtenir, pour chaque facteur inclus, une estimation ajustée de son effet propre sur la survie embryonnaire, en tenant compte de l'influence conjointe des autres variables. La qualité globale du modèle a été évaluée à l'aide du *Likelihood ratio test*, comparant la vraisemblance du modèle complet à celle d'un modèle nul. Une p-value significative pour ce test indiquait que le modèle apportait une amélioration statistiquement significative de l'explication de la survie.

Les variables explorées incluaient : le mode de fécondation, l'année et la saison du transfert, la jument donneuse (≥ 10 transferts), l'étalon (≥ 10 transferts), la catégorie d'âge de la jument receveuse, le stade du cycle de la jument receveuse au moment du transfert, les antécédents de pertes gestationnelles (annuelles et cumulées), la réalisation d'un sexage embryonnaire *in vitro*, le sexe déterminé par ce sexage, et le nombre d'embryons récoltés pour les transferts *in vivo*.

L'effet de la jument receveuse a été étudié à travers des variables biologiquement pertinentes, susceptibles d'influencer l'environnement utérin au moment du transfert : l'âge au transfert, le stade du cycle évalué par le nombre de jours post-ovulation, et les antécédents de pertes gestationnelles, considérés comme indicateur indirect de fertilité. La jument receveuse en tant qu'individu n'a pas été incluse comme variable spécifique, aucun effet propre indépendant de ces paramètres biologiques n'étant attendu. D'un point de vue statistique, le nombre restreint

de transferts par jument receveuse ne permettait par ailleurs pas de détecter un éventuel effet individuel avec une puissance suffisante.

L'effet de la synchronisation utérine a été évalué en analysant l'association entre le nombre de jours post-ovulation de la receveuse au moment du transfert et le taux de gestation à 14 jours (DG14), ce dernier ayant été choisi comme point d'évaluation principal en raison du nombre important de pertes précoces survenant avant ce terme. Ce choix différait de celui proposé dans d'autres travaux (Cuervo-Arango, Claes, Tom A.E. Stout 2019b; Cuervo-Arango, Claes, Stout 2018; Cuervo-Arango, Claes, Tom A. Stout 2019), qui s'étaient fondés sur le DG30, mais il a permis ici de maximiser la puissance statistique de l'analyse. Cette analyse a été conduite séparément pour les transferts issus de fécondation *in vivo et in vitro*, en combinant des tests de χ^2 sur les pertes survenues avant et après le DG14 selon le nombre de jours post-ovulation, des modèles de Cox univariés sur la survie gestationnelle globale, et des courbes de Kaplan-Meier comparatives.

5. Niveau de signification des tests

Pour l'ensemble des analyses, le seuil de risque est fixé à $\alpha = 0,05$. Les intervalles de confiance sont exprimés à 95 %.

II. Résultats

II. Résultats

A. Analyse descriptive de la population étudiée

Sur les 1 639 transferts réalisés, 300 transferts ont été exclus de l'analyse en raison de données incomplètes ou manquantes, portant ainsi la population d'étude à 1 339 transferts exploitables. Dans ce sous-échantillon, 665 embryons étaient issus du mode de fécondation *in vivo* et 674 de le mode de fécondation *in vitro*.

Sur la période de 2021 à 2024, 389 juments donneuses, 187 étalons et 721 juments receveuses ont été utilisés pour ces 1 339 transferts étudiés.

1. Répartition annuelle des transferts embryonnaires entre 2021 et 2024 selon le mode de fécondation dans la cohorte étudiée (n = 1 339)

En 2021, la fécondation *in vivo* représentait le mode majoritairement utilisé. À partir de 2022, cette tendance s'est inversée au profit de la fécondation *in vitro*, qui est devenue prédominante et l'est restée au cours des années 2023 et 2024.

On observe une légère variation du nombre total de transferts au cours des 3 premières années de 392 en 2021, 372 en 2022, 378 en 2023, et une diminution sensible à 197 transferts en 2024, liée au démantèlement ou à la vente du cheptel équin propre au haras.

Le **tableau I** et la **figure 12** présentent cette répartition annuelle des embryons de l'étude en fonction de leur mode d'obtention et de l'année de transfert.

Tableau I – Répartition annuelle des embryons transférés selon le mode de fécondation (n = 1 339)

| Mode de fécondation | Année de transfert | | | | Total |
|-----------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | 2021 ¹ | 2022 ¹ | 2023 ¹ | 2024 ¹ | |
| Fécondation <i>in vivo</i> | 250 (64%) | 162 (44%) | 175 (46%) | 78 (40%) | 665 (49.7%) |
| Fécondation <i>in vitro</i> | 142 (36%) | 210 (56%) | 203 (54%) | 119 (60%) | 674 (50.3%) |
| Total | 392 (29%) | 372 (28%) | 378 (28%) | 197 (15%) | 1339 |

¹n (%)

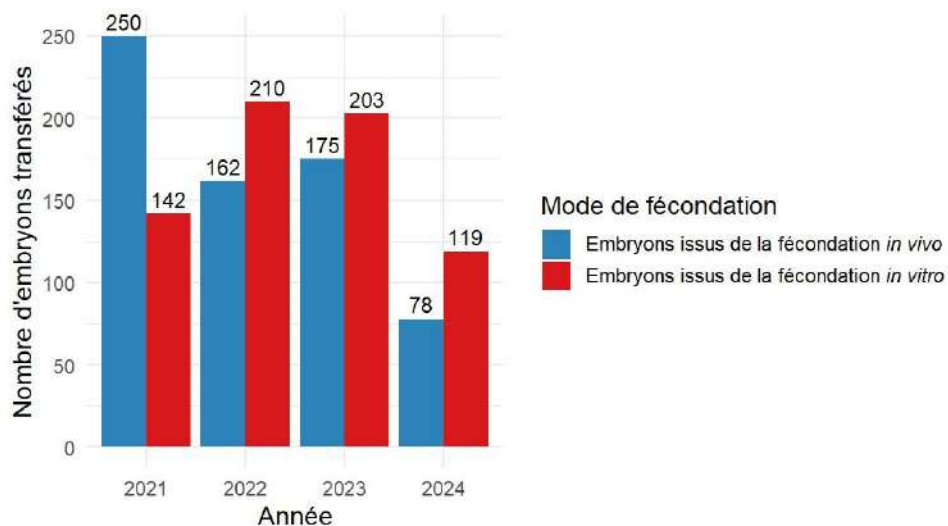


Figure 11 – Répartition annuelle des transferts embryonnaires selon le mode de fécondation (n = 1 339)

2. Géniteurs des embryons et juments receveuses (n = 1 339 transferts)

a) Juments donneuses (n = 389)

Les 1 339 embryons de l'étude ont été produits par 389 juments donneuses différentes, d'embryons, d'ovocytes, ou des deux. Sur l'ensemble de la période, 389 juments donneuses différentes ont été utilisées au total avec 197 uniquement dans le cadre de la production d'embryons par fécondation *in vivo*, tandis que 142 juments donneuses ont été impliquées uniquement dans la production par fécondation *in vitro*. De plus, 50 juments donneuses ont participé aux deux méthodes de fécondation au cours de la période étudiée. Une part de ces juments donneuses ont été exploitées plusieurs années. Ainsi, pour chaque année, le nombre de juments donneuses différentes a été respectivement de 164 en 2021, 176 en 2022, 150 en 2023 et 97 en 2024. Le **tableau II** et la **figure 13** présentent cette répartition annuelle entre génitrices d'embryons *in vivo*, *in vitro* ou les deux.

Tableau II – Répartition annuelle des juments donneuses selon le mode de fécondation
(n = 389)

| Répartition des juments donneuses | Année de transfert | | | |
|---|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 2021 ¹ | 2022 ¹ | 2023 ¹ | 2024 ¹ |
| Juments donneuses – Embryons issus de la fécondation <i>in vivo</i> | 101 | 84 | 71 | 40 |
| Juments donneuses – Embryons issus de la fécondation <i>in vitro</i> | 49 | 73 | 70 | 52 |
| Juments impliquées dans les deux modes | 14 | 13 | 9 | 5 |
| Total des juments donneuses / année | 164 | 170 | 150 | 97 |

¹n

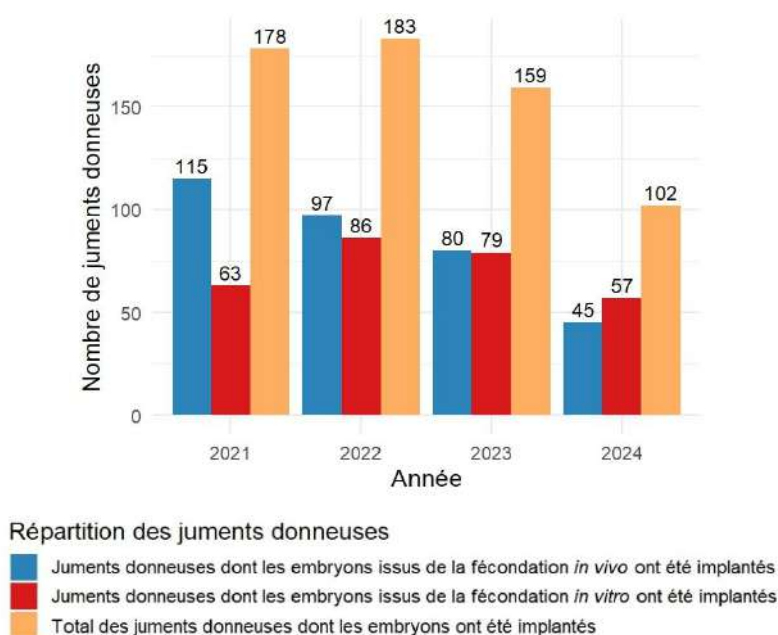


Figure 12 - Répartition annuelle des juments donneuses selon le mode de fécondation

On observe que pour 165 juments (28,4 %), un seul embryon a été transféré sur la totalité de la période d'étude, et pour 79 autres (13,6 %), 2 embryons ont été transférés. À l'inverse, un nombre restreint de juments sont génitrices de nombreux embryons de cette étude, avec notamment 3 juments impliquées dans 20 transferts et une jument ayant atteint le maximum de 28 transferts.

Le **tableau III** présente la distribution du nombre d'embryons transférés des juments donneuses sur la période 2021 à 2024.

Tableau III - Répartition des juments donneuses selon le nombre d'embryons transférés, produits *in vivo* ou *in vitro* (2021-2024)

| Nombre d'embryons transférés issus de fécondation <i>in vivo</i> | Nombre de juments donneuses | Nombre d'embryons transférés issus de fécondation <i>in vitro</i> | Nombre de juments donneuses |
|--|-----------------------------|---|-----------------------------|
| 1 | 113 | 1 | 82 |
| 2 | 53 | 2 | 36 |
| 3 | 26 | 3 | 22 |
| 4 | 21 | 4 | 13 |
| 5 | 7 | 5 | 11 |
| 6 | 6 | 6 | 1 |
| 7 | 2 | 7 | 7 |
| 8 | 1 | 8 | 1 |
| 9 | 7 | 9 | 3 |
| 10 | 2 | 10 | 2 |
| 11 | 6 | 11 | 1 |
| 14 | 3 | 13 | 2 |
| | | 14 | 1 |
| | | 15 | 1 |
| | | 16 | 3 |
| | | 17 | 2 |
| | | 19 | 1 |
| | | 21 | 1 |
| | | 22 | 1 |
| | | 27 | 1 |

Sur la période 2021–2024, les juments donneuses ont produit en moyenne un plus grand nombre d'embryons via la technique de fécondation *in vitro* (3,51 embryons/jument) que par fécondation *in vivo* (2,69 embryons/jument).

L'écart-type (4,38 pour le mode *in vitro* contre 2,66 pour le mode *in vivo*) et la variance (19,20 contre 7,07) sont sensiblement plus élevés en *in vitro*, traduisant une plus grande hétérogénéité du nombre d'embryons produits par jument selon cette méthode.

Les valeurs extrêmes confirment cette dispersion : le nombre maximal d'embryons *in vitro* produits par une même jument s'élève à 27, contre 14 pour les embryons *in vivo*. En revanche, la médiane reste identique dans les deux groupes (2 embryons/jument), ce qui suggère que la majorité des juments donneuses produisent peu d'embryons, quelle que soit la méthode, et que la différence moyenne est surtout tirée vers le haut par quelques cas très productifs en *in vitro*.

Les statistiques descriptives détaillées dans le **tableau IV** confirment cette forte variabilité dans l'utilisation des juments donneuses.

Tableau IV - Statistiques descriptives du nombre d'embryons in vivo et in vitro par jument donneuse (2021-2024)

| Paramètres statistiques | Nombre d'embryons <i>in vivo</i> | Nombre d'embryons <i>in vitro</i> |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Moyenne | 2.69 | 3.51 |
| Médiane | 2 | 2 |
| Écart-type | 2.66 | 4.38 |
| Variance | 7.07 | 19.20 |
| Minimum | 1 | 1 |
| Maximum | 14 | 27 |

b) Etalons (n = 187)

Au sein de l'étude, un total de 187 étalons différents, de races de selle, ont été impliqués dans la production des embryons transférés sur l'ensemble de la période étudiée. La répartition annuelle des étalons selon le mode de fécondation est présentée dans le **tableau V**, avec 96 étalons en 2021, 85 en 2022, 81 en 2023, et 62 en 2024.

Concernant le mode de fécondation, 187 étalons ont été utilisés au total dont 110 étalons qui ont participé à la production d'embryons issus de la fécondation *in vivo* uniquement, 41 étalons qui ont été impliqués dans la fécondation *in vitro* seulement et 36 étalons qui ont contribué à la production d'embryons selon les deux méthodes. Le **tableau V** et la **figure 14** présentent cette répartition annuelle entre géniteurs d'embryons *in vivo*, *in vitro* ou les deux.

Certaines données relatives aux caractéristiques des étalons, telles que leur âge ou le mode de récolte du sperme, n'ont pas été collectées dans le cadre de cette étude.

Tableau V - Répartition annuelle des étalons donneurs selon le mode de fécondation pour produire les embryons transférés

| Répartition des étalons | Année de transfert | | | |
|---|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 2021 ¹ | 2022 ¹ | 2023 ¹ | 2024 ¹ |
| Étalons – Embryons issus de la fécondation <i>in vivo</i> | 64 | 45 | 39 | 27 |
| Étalons – Embryons issus de la fécondation <i>in vitro</i> | 20 | 26 | 28 | 26 |
| Étalons impliqués dans les deux modes | 12 | 14 | 14 | 9 |
| Total des étalons / année | 96 | 85 | 81 | 62 |

¹n

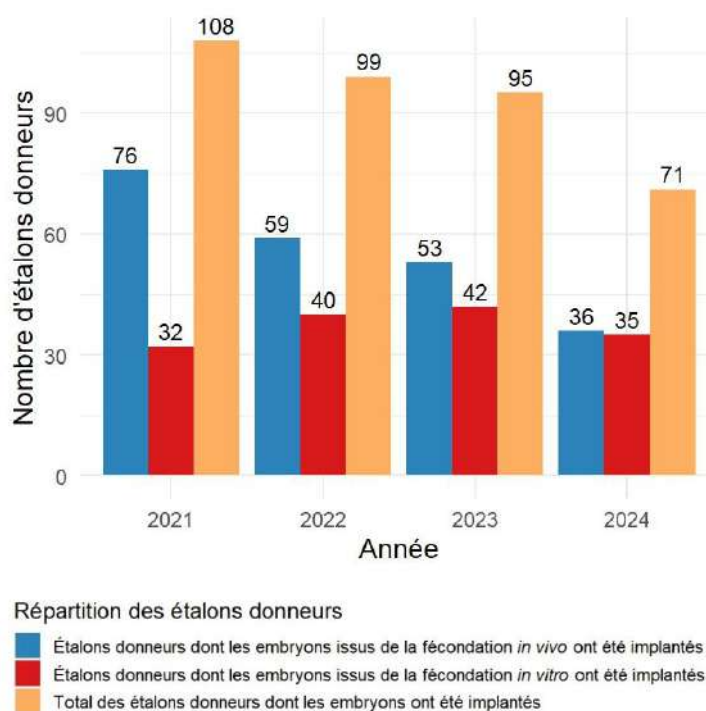


Figure 13 - Répartition annuelle des étalons donneurs selon le mode de fécondation

La distribution montre que 73 étalons (38,4 %) ont été géniteurs d'un seul embryon, et 37 autres (19,5 %) ont été géniteurs de 2 embryons seulement pour la totalité de la période. En revanche, 6 étalons (3 %) sont les pères de plus de 50 embryons transférés. Cela illustre une stratégie d'exploitation où un nombre limité d'étalons, sont employés intensivement, tandis que la majorité des étalons sont utilisés ponctuellement.

Le **tableau VI** présente la distribution du nombre d'embryons transférés des étalons sur la période 2021 à 2024.

Tableau VI - Distribution des étalons selon le nombre d'utilisations (2021-2024)

| Nombre d'embryons transférés issus de fécondation <i>in vivo</i> | Nombre d'étalons donneurs | Nombre d'embryons transférés issus de fécondation <i>in vitro</i> | Nombre d'étalons donneurs |
|---|----------------------------------|--|----------------------------------|
| 1 | 70 | 1 | 27 |
| 2 | 26 | 2 | 15 |
| 3 | 12 | 3 | 6 |
| 4 | 2 | 4 | 4 |
| 5 | 4 | 5 | 3 |
| 6 | 4 | 6 | 2 |
| 7 | 3 | 7 | 1 |
| 8 | 2 | 8 | 1 |
| 9 | 2 | 9 | 1 |
| 10 | 1 | 10 | 2 |
| 11 | 4 | 11 | 2 |
| 12 | 2 | 13 | 1 |
| 13 | 4 | 14 | 1 |
| 15 | 1 | 15 | 1 |
| 17 | 2 | 17 | 1 |
| 20 | 1 | 19 | 1 |
| 21 | 1 | 23 | 1 |
| 28 | 1 | 33 | 1 |
| 32 | 3 | 44 | 2 |
| 56 | 1 | 45 | 1 |
| | | 48 | 1 |
| | | 73 | 1 |
| | | 102 | 1 |

Sur l'ensemble de la période étudiée (2021–2024), les étalons ont produit en moyenne un plus grand nombre d'embryons par fécondation *in vitro* (8,75 embryons) que par fécondation *in vivo* (4,55 embryons).

Toutefois, la médiane reste identique pour les deux groupes (2 embryons par étalon), ce qui suggère que dans les deux modalités, une majorité d'étalons produisent un faible nombre d'embryons, tandis que seuls quelques étalons élèvent fortement la moyenne, en particulier en *in vitro*.

Cette hétérogénéité est confirmée par des écarts-types très différents : 16,97 en *in vitro* contre 7,50 en *in vivo*, et des variances respectives de 287,90 et 56,21. Cela traduit une variabilité marquée du nombre d'embryons obtenus par étalon en *in vitro*, plus encore qu'en *in vivo*.

Enfin, les valeurs extrêmes illustrent bien cette disparité : un étalon a produit jusqu'à 102 embryons *in vitro* sur la période, contre un maximum de 56 embryons *in vivo*.

Dans le **tableau VII** sont exposées les statistiques descriptives.

Tableau VII - Statistiques descriptives du nombre d'embryons in vivo et in vitro par étalon (2021-2024)

| Paramètres statistiques | Nombre d'embryons <i>in vivo</i> | Nombre d'embryons <i>in vitro</i> |
|-------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Moyenne | 4.55 | 8.75 |
| Médiane | 2 | 2 |
| Écart-type | 7.50 | 16.97 |
| Variance | 56.21 | 287.90 |
| Minimum | 1 | 1 |
| Maximum | 56 | 102 |

c) Juments receveuses (n = 721)

(1) Caractéristiques démographiques

Au total, 721 juments receveuses différentes, principalement de race Trotteur français, ont été mobilisées pour la réalisation des transferts d'embryons sur l'ensemble de la période étudiée. La répartition annuelle des juments receveuses est détaillée dans le **tableau VIII**, avec 299 juments receveuses en 2021, 312 en 2022, 331 en 2023, et 172 en 2024. Ainsi, Certaines juments receveuses ont été sollicitées à plusieurs reprises au cours de la période, soit à la suite d'un transfert n'ayant pas conduit à une gestation évolutive, soit après mise-bas et sevrage du poulain, dans le cadre d'une réutilisation possible environ 2 ans après un transfert ayant abouti à terme.

Parmi ces 721 juments receveuses, 220 ont été utilisées uniquement pour des transferts d'embryons issus de fécondation *in vivo*, tandis que 272 ont été utilisées uniquement pour des embryons produits par fécondation *in vitro* et 229 juments receveuses ont été utilisées pour les deux types de transfert au cours d'une ou plusieurs saisons.

Tableau VIII - Répartition annuelle des juments receveuses selon le mode de fécondation

| Répartition des juments receveuses | Année de transfert | | | |
|--|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 2021 ¹ | 2022 ¹ | 2023 ¹ | 2024 ¹ |
| Juments receveuses – Embryons issus de la fécondation <i>in vivo</i> | 166 | 120 | 140 | 60 |
| Juments receveuses – Embryons issus de la fécondation <i>in vitro</i> | 99 | 164 | 164 | 96 |
| Juments receveuses utilisées pour les deux modes | 34 | 28 | 27 | 16 |
| Total des juments receveuses utilisées | 299 | 312 | 331 | 172 |

¹n

La **figure 15** illustre de façon visuelle la répartition annuelle de l'utilisation des juments receveuses selon le mode de production embryonnaire.

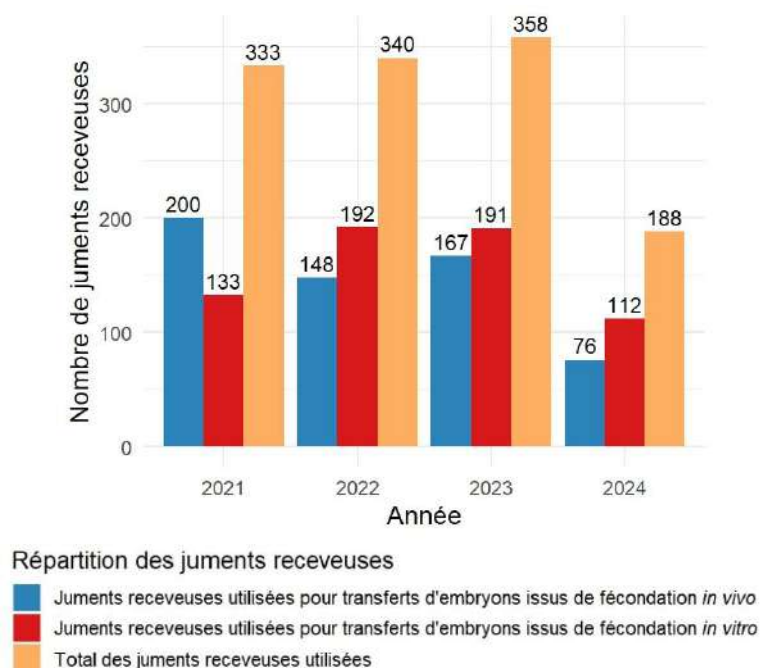


Figure 14 - Répartition annuelle des juments receveuses selon le mode de fécondation

(2) Âge des juments receveuses

L'âge des juments receveuses a été calculé par la différence entre la date de transfert de l'embryon et la date de naissance de la jument, puis arrondi à l'entier le plus proche afin de faciliter l'analyse.

La **figure 16** met en évidence que les juments ont, pour la plupart d'entre elles, entre 4 et 7 ans, avec un maximum observé à 6 ans ($n = 170$ juments). L'utilisation de juments de 10 ans et plus est plus rare (21 % des cas).

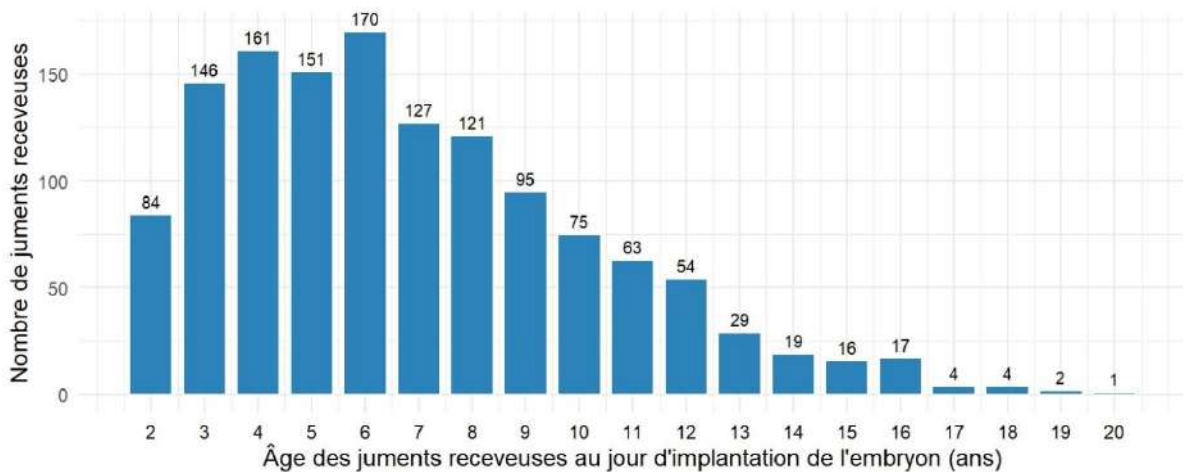


Figure 15 - Distribution de l'âge des juments receveuses au jour d'implantation de l'embryon

L'âge des juments receveuses, initialement considéré comme une variable continue, a été catégorisé en classes d'âges en raison de l'impossibilité de vérifier l'hypothèse de proportionnalité des risques pour cette variable continue. En effet, le test de Schoenfeld, reposant sur la variabilité continue des résidus en fonction du temps, n'était pas applicable dans le contexte du protocole utilisé, où seuls quatre temps de mesure distincts (J14, J28, J45 et J63) étaient disponibles pour le suivi de gestation.

Pour faciliter les analyses statistiques ultérieures, nous avons donc fait le choix de classer les juments en trois catégories d'âges afin d'obtenir trois lots à effectifs semblables et en concordance avec les catégories déjà citées dans les études (Donato et al. 2023) : 2 à 5 ans, 6 à 9 ans, et âge supérieur ou égal à 10 ans. Ce découpage a été défini dans un objectif de comparer plus efficacement les taux de mortalité embryonnaire et fœtale selon ces catégories. Les effectifs de ces trois groupes sont répertoriés dans le **tableau IX**.

L'âge moyen des juments receveuses au moment du transfert de l'embryon est de 6,86 ans, avec un écart type de 3,45 ans, traduisant une variabilité modérée autour de la moyenne. L'âge médian est de 6 ans, ce qui signifie que la moitié des juments étaient âgées de 6 ans ou moins au moment du transfert. L'âge minimal observé est de 2 ans, tandis que l'âge maximal est de 20 ans.

Tableau IX - Statistiques descriptives des âges des juments receveuses au moment du transfert

| Caractéristiques d'âge | N = 1339 ¹ |
|----------------------------|-----------------------|
| Âge des juments receveuses | 6.86 (3.45) [2; 20] |
| Catégories d'âge | |
| 2-5 ans | 542 (40%) |
| 6-9 ans | 513 (38%) |
| ≥ 10 ans | 284 (21%) |

¹Moyenne (ET) [Min;Max] ; n(%)

(3) Nombre d'utilisations des juments receveuses

Trois cent neuf juments (42,9 %) ont été utilisées une seule fois sur l'ensemble de la période, constituant la catégorie la plus représentée, 255 juments (35,4 %) ont été utilisées deux fois et 117 juments (16,2 %) sollicitées pour trois transferts sur les quatre années d'étude. Ensuite, 32 juments (4,4 %) ont participé à quatre transferts, 7 juments (1,0 %) à cinq transferts, et seulement une jument (0,1 %) a été utilisée six fois sur la période étudiée.

Le **tableau X** présente la distribution du nombre d'utilisations des juments receveuses sur la période 2021-2024 et le **tableau XI** présente les statistiques descriptives correspondantes.

Tableau X - Distribution des juments receveuses selon le nombre d'utilisations (2021-2024)

| Nombre d'utilisations | Juments receveuses |
|-----------------------|--------------------|
| 1 | 309 |
| 2 | 255 |
| 3 | 117 |
| 4 | 32 |
| 5 | 7 |
| 6 | 1 |

La moyenne d'utilisation des juments receveuses est de 1,86 transferts par jument. L'écart-type de 0,93 indique une variabilité modérée dans la fréquence d'utilisation. Le nombre d'utilisations s'étale de 1 à 6 transferts par jument, avec une médiane de 2, signifiant que la moitié des juments receveuses ont participé à deux transferts ou moins.

Tableau XI - Statistiques descriptives des utilisations des juments receveuses (2021-2024)

| Paramètres | Juments receveuses |
|-------------------|---------------------------|
| Moyenne | 1.86 |
| Écart-type | 0.93 |
| Variance | 0.86 |
| Minimum | 1 |
| Maximum | 6 |
| Médiane | 2 |

Chaque année, la majorité des juments receveuses ont été utilisées une seule fois : 219 en 2021 (73,2 %), 258 en 2022 (82,7 %), 287 en 2023 (86,7 %) et 147 en 2024 (85,5 %). L'utilisation de juments receveuses à deux reprises dans une même année, après un diagnostic de gestation négatif post-transfert, devient progressivement moins fréquente, passant de 68 cas en 2021 à seulement 25 en 2024. Les utilisations multiples (trois fois ou plus au cours d'une même année), après 2 non-gestations post-transfert, deviennent très rares dès 2022 et ne sont plus observées en 2024. Le **tableau XII** présente ensuite la répartition annuelle du nombre d'utilisations des juments receveuses sur la période 2021–2024.

Tableau XII - Distribution des juments receveuses selon le nombre d'utilisations par année (2021-2024)

| Année | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--------------|----------|----------|----------|----------|
| 2021 | 219 | 68 | 11 | 1 |
| 2022 | 258 | 48 | 6 | 0 |
| 2023 | 287 | 41 | 3 | 0 |
| 2024 | 147 | 25 | 0 | 0 |

La moyenne d'utilisation par jument est relativement basse, autour de 1 sur les quatre années, indiquant une fréquence d'utilisation faible sur chaque saison. Les paramètres statistiques associés sont présentés dans le **tableau XIII**.

Tableau XIII - Statistiques descriptives des utilisations des juments receveuses par année (2021-2024)

| Paramètres | 2021 | 2022 | 2023 | 2024 |
|------------|------|------|------|------|
| Moyenne | 1.31 | 1.19 | 1.14 | 1.15 |
| Minimum | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Maximum | 4 | 3 | 3 | 2 |
| Écart type | 0.56 | 0.44 | 0.37 | 0.35 |
| Variance | 0.31 | 0.19 | 0.14 | 0.12 |

d) Sexe des embryons issus de fécondation *in vitro*

Un sous-échantillon d'embryons produits par fécondation *in vitro* a fait l'objet d'un sexage embryonnaire sur la période d'étude 2021-2024. Au total, sur les 674 embryons produits *in vitro* durant cette période, 37 ont été sexés par le laboratoire Avantea (Crémone, Italie), représentant au total 5,5% des embryons produits *in vitro*. La répartition par sexe des embryons sexés était de 17 embryons femelles et 20 embryons mâles. Ces données sont présentées dans le **tableau XIV** et illustrées par la **figure 17** sous forme d'histogramme en barres empilées.

Tableau XIV - Sexage des embryons produits *in vitro* par année

| Sexage des embryons produits <i>in vitro</i> | Année de transfert | | | | Total |
|--|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|
| | 2021 ¹ | 2022 ¹ | 2023 ¹ | 2024 ¹ | |
| Embryons sexés femelles | 11 | 5 | 0 | 1 | 17 |
| Embryons sexés mâles | 7 | 7 | 5 | 1 | 20 |
| Total d'embryons produits <i>in vitro</i> | 142 | 210 | 203 | 119 | 674 |
| Total d'embryons sexés | 18 | 12 | 5 | 2 | 37 |
| Proportion d'embryons sexés (%) | 12.7% | 5.7% | 2.5% | 1.7% | 5.5% |

n¹

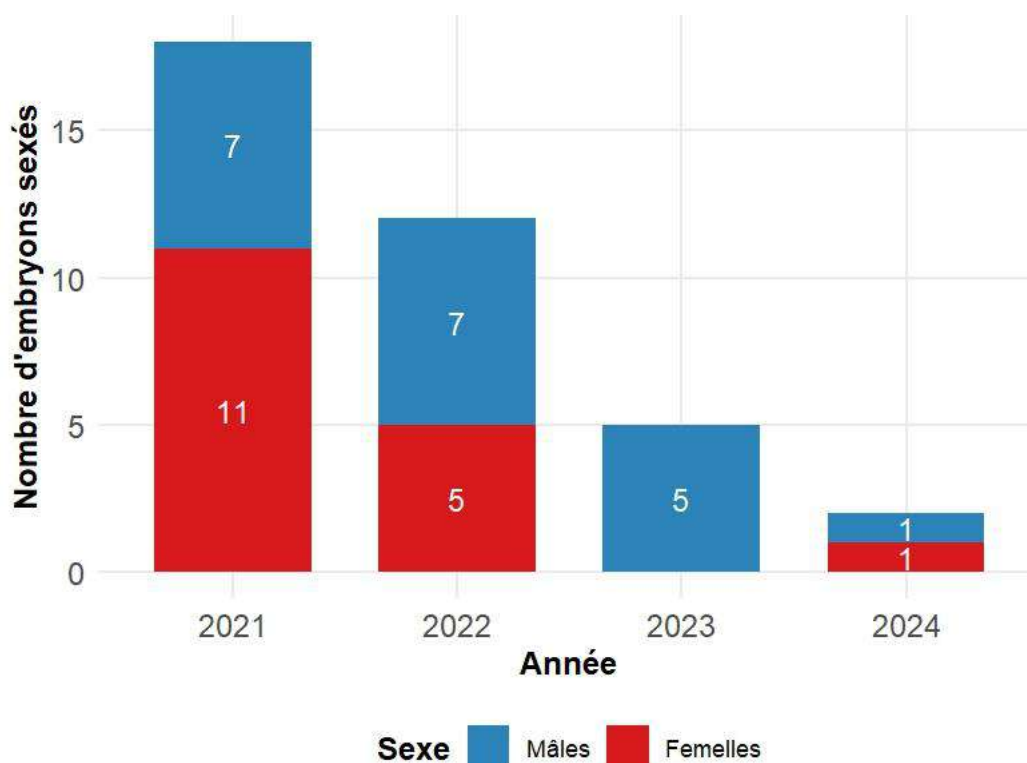


Figure 16 – Répartition des embryons issus de la fécondation in vitro sexés par année

e) *Diagnostic de gestations gemellaires issues d'embryons in vitro*

En 2023, trois gestations gemellaires ont été diagnostiquées à 45 jours de gestation, toutes issues d'embryons obtenus par ICSI et provenant de couples de géniteurs distincts. La prise en charge a été différente pour chacune d'entre elles.

Dans un premier cas, une interruption spontanée de gestation est survenue sans intervention. Dans un second cas, l'arrêt de gestation a été induit par l'administration intramusculaire répétée de prostaglandine F2 α , sous forme de dinoprost (0,01 mg/kg, Dinolytic®, Zoetis France, Châtillon, France), deux injections ayant suffi à provoquer l'avortement. Dans le dernier cas, une tentative de réduction du fœtus par ponction transvaginale échoguidée a été réalisée ; il s'agissait d'une gestation confirmée à 63 jours comme étant constituée de deux fœtus mâles. La gestation a finalement évolué vers une interruption spontanée.

B. Analyse comparative des taux de mortalité embryonnaire et fœtale jusqu'à 63 jours de gestation par analyse de survie

Bien que l'objectif de cette étude soit la comparaison des taux de mortalité embryonnaire et fœtale, les analyses statistiques reposent sur des modèles de survie (Kaplan-Meier), qui estiment la probabilité de survie au cours du temps. Ces probabilités de survie sont l'inverse des taux cumulatifs de mortalité. En d'autres termes, une diminution de la courbe de survie traduit une augmentation du nombre d'arrêts de gestation. Ce choix méthodologique permet d'exploiter la date de chaque diagnostic échographique et la durée de gestation avant une éventuelle mortalité embryonnaire ou fœtale. Ainsi, bien que présentées sous forme de fonctions de survie, les données analysées permettent d'évaluer et de comparer les pertes embryonnaires ou fœtales dans les deux lots étudiés ; transferts d'embryons issus de fécondation *in vivo* et transferts d'embryons issus de fécondation *in vitro*.

1. Comparaison des probabilités de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : *in vivo* ou *in vitro*

La survie embryonnaire a été comparée entre les deux modes de fécondation à l'aide de courbes de Kaplan-Meier, associées à un test du log-rank pour évaluer la significativité statistique des différences observées. Le modèle a été ajusté à partir d'une variable de survie combinant le temps de gestation (exprimé en jours), et l'événement de mortalité embryonnaire, codé sous forme binaire. Ce modèle permet de distinguer les transferts d'embryons issus de fécondation *in vivo* de ceux issus de fécondation *in vitro*.

Les résultats sont présentés dans la **figure 18**, qui illustre les courbes de Kaplan-Meier associées aux deux lots. Le tableau situé sous les courbes indique, pour chaque lot, le nombre d'embryons encore suivis à chaque moment clé de la gestation (jours 14, 28, 45 et 63). Ces effectifs permettent de s'assurer de la robustesse et de la comparabilité des courbes de survie tout au long de l'analyse.

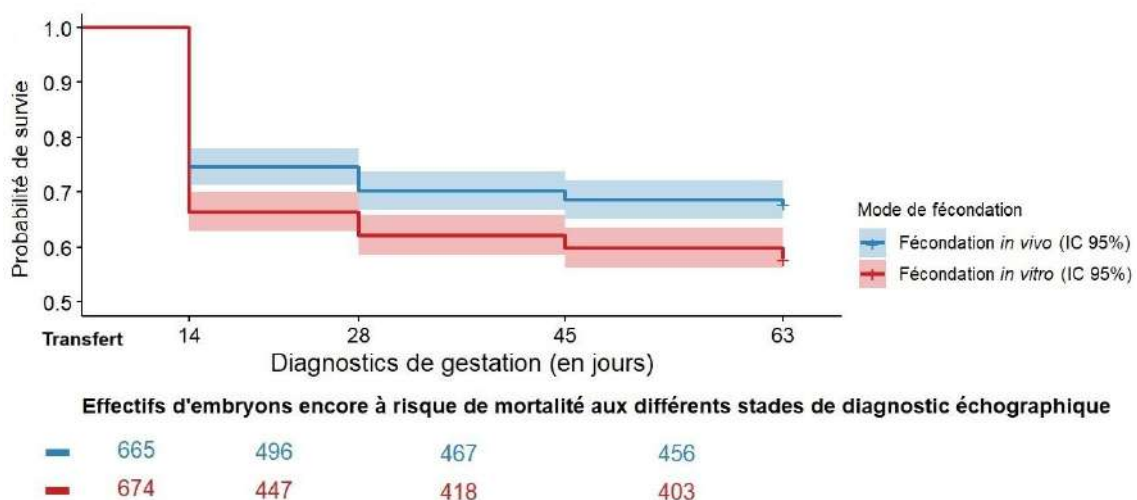


Figure 17 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : courbes de survie de Kaplan-Meier

Ces courbes montrent une diminution progressive des probabilités de survie embryonnaire au fil du temps dans les deux lots, avec une probabilité globalement plus élevée pour les embryons issus de fécondation *in vivo*. Cette différence apparaît dès le premier contrôle échographique à 14 jours, où la probabilité de survie est estimée à 75 % pour les embryons *in vivo*, contre 66 % pour les embryons *in vitro* (**tableau XV**). Elle se maintient jusqu'au dernier diagnostic à 63 jours de gestation, avec des probabilités respectives de 68 % et 58 %.

Tableau XV – Probabilités estimées de survie embryonnaire et fœtale aux quatre stades de diagnostic échographique selon le mode de fécondation (Kaplan-Meier)

| | DG 14 ¹ | DG 28 ¹ | DG 45 ¹ | DG 63 ¹ | p-value ² |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Mode de fécondation | | | | | <0.001 |
| <i>In vivo</i> | 75% (71%, 78%) | 70% (67%, 74%) | 69% (65%, 72%) | 68% (64%, 72%) | |
| <i>In vitro</i> | 66% (63%, 70%) | 62% (58%, 66%) | 60% (56%, 64%) | 58% (54%, 62%) | |

¹% (IC 95%)

²Log-rank test

Il convient toutefois de distinguer cette différence de probabilité cumulée de survie, qui traduit l'effet global du mode de fécondation sur la viabilité embryonnaire, de la dynamique temporelle des pertes embryonnaires et fœtales, répertoriées dans le **tableau XVI**.

Si le nombre de pertes observées entre le transfert embryonnaire et le DG14 est significativement plus élevé ($p = 0,0011$) pour les embryons issus de fécondation *in vitro* avec 227 (33,7 %) pertes contre 169 (25,4 %) pertes d'embryons produits *in vivo*, les pertes sont ensuite relativement similaires entre le DG14 et le DG28 (29 dans les deux modes), ainsi qu'entre le DG28 et le DG45 (15 *in vitro* contre 11 *in vivo*). Enfin, entre le DG45 et le DG63, on observe encore 13 pertes supplémentaires dans le lot *in vitro* contre 5 dans le lot *in vivo*.

En revanche, il n'y a pas de différence significative ($p = 0,0870$) concernant le nombre de pertes survenues entre J14 et J63 entre les lots *in vivo* et *in vitro* avec respectivement 45/496 (9,1 %) et 57/447 (12,8 %) pertes.

Tableau XVI – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le mode de fécondation et l'année de transfert

| | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14 - J28 ¹ | J28 - J45 ¹ | J45 - J63 ¹ | J14 - J63 ¹ |
|---------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Mode de fécondation | | | | | |
| <i>In vivo</i> | 169/665 (25.4%) | 29/496 (58.5%) | 11/467 (23.6%) | 5/456 (11.0%) | 45/496 (9.1%) |
| <i>In vitro</i> | 227/674 (33.7%) | 29/447 (64.9%) | 15/418 (35.9%) | 13/403 (32.3%) | 57/447 (12.8%) |

¹n/N (%)

Le test du log-rank révèle une différence statistiquement significative entre les lots *in vivo* et *in vitro* ($\chi^2 = 14,4$; ddl = 1 ; $p < 0,001$), indiquant que les trajectoires de survie diffèrent selon le mode de fécondation. Cette significativité est portée avant tout par une différence marquée de survie précoce, en particulier entre le transfert et le DG14, en défaveur des embryons produits *in vitro* (66% contre 75% *in vivo*). Les pertes embryonnaires et fœtales ultérieures jusqu'à J63 sont respectivement de 12,8% (57/447) pour les embryons *in vitro* contre 9,1% (45/496) pour les embryons *in vivo*, la différence tendant à être significative ($p < 0,09$).

Les embryons issus de **fécondation *in vitro*** présentent une probabilité de survie significativement plus faible, traduisant un **taux de mortalité embryonnaire plus élevé**, en particulier durant la période critique comprise **entre le transfert embryonnaire et le 14^{ème} jour de gestation**.

2. Comparaison des probabilités de survie embryonnaire et fœtale selon l'année et le mode de fécondation

L'analyse de survie réalisée sur huit lots définis par la combinaison de l'année (2021 à 2024) et du mode de fécondation (*in vivo* ou *in vitro*) met en évidence des différences marquées dans les probabilités cumulées de survie embryonnaire au cours des 63 premiers jours de gestation. Un test du log-rank confirme une différence statistiquement significative entre les lots ($\chi^2 = 35,5$; ddl = 7 ; $p = 9 \times 10^{-6}$).

Afin de mieux caractériser ces écarts, deux angles d'analyse ont été privilégiés : la comparaison des deux modes de fécondation au sein de chaque année, et celle des différentes années pour un même mode de fécondation.

a) Comparaison des modes de fécondation pour une année donnée

En 2021, les probabilités de survie à 63 jours de gestation apparaissent similaires entre les deux modes de fécondation, respectivement 61,6 % pour la fécondation *in vivo* (95/250) et 57,7 % pour la fécondation *in vitro* (82/142). Les courbes se superposent largement, et aucune différence significative n'est détectée ($\chi^2 = 0,8$; $p = 0,4$), elles sont représentées dans la **figure 19**.

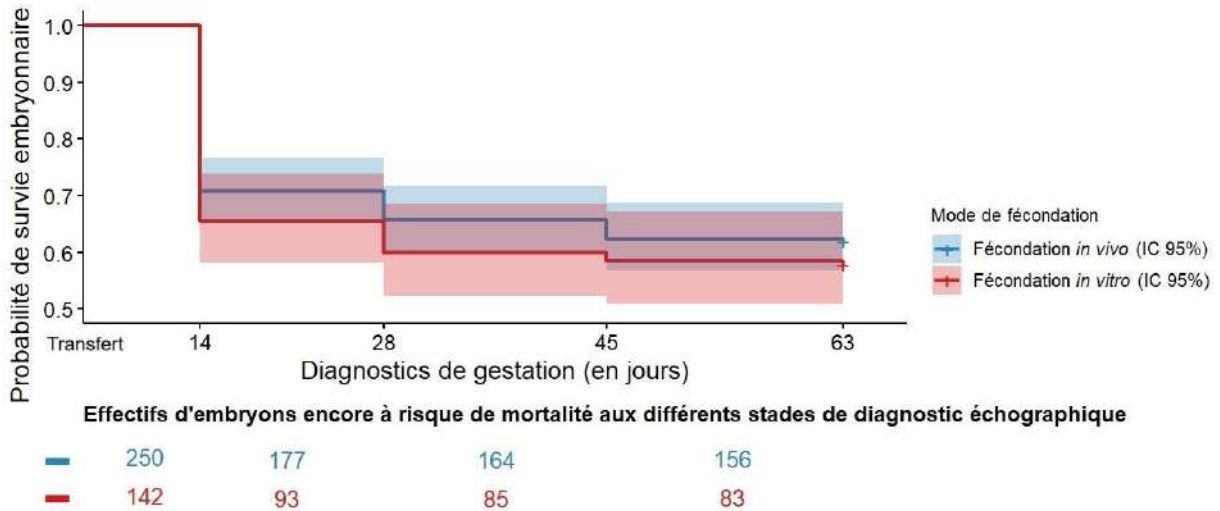


Figure 18 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : courbes de survie de Kaplan-Meier de l'année 2021

En 2022, la divergence est marquée : les courbes s'écartent précocement, et le test du log-rank confirme une différence significative entre les groupes ($\chi^2 = 12,1$; $p = 0,0005$). La probabilité de survie à 63 jours de gestation est alors significativement plus faible pour les embryons issus de fécondation *in vitro* (53,8 %, soit 113/210), comparée à 71,6 % pour les embryons issus de fécondation *in vivo* (116/162). Les courbes sont représentées dans la **figure 20**.

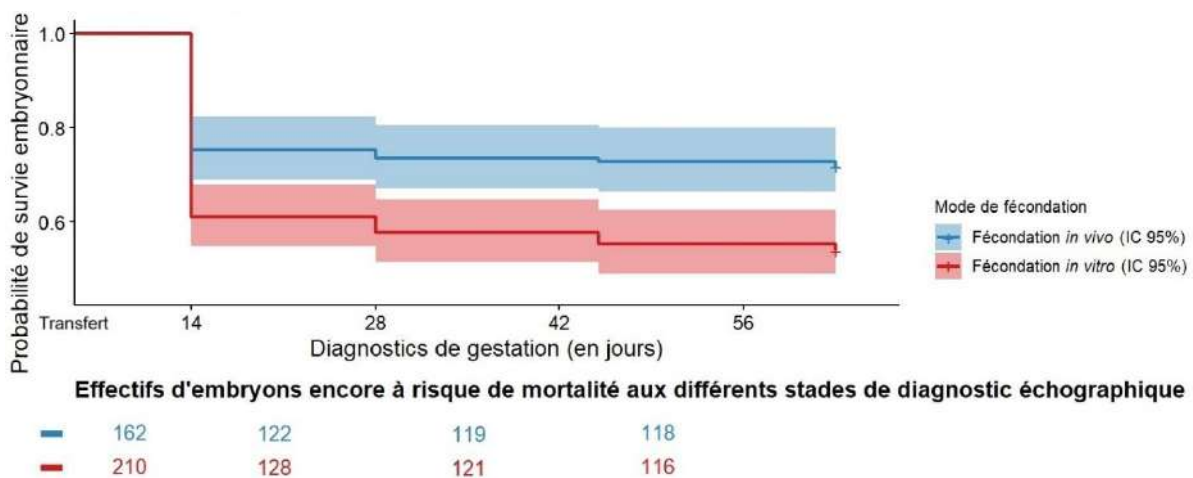


Figure 19 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : courbes de survie de Kaplan-Meier de l'année 2022

En 2023, bien que les intervalles de confiance des deux courbes se chevauchent partiellement, la différence globale reste significative au test du log-rank ($\chi^2 = 8,1$; $p = 0,005$), ce qui indique également une probabilité de survie à 63 jours de gestation significativement plus faible pour le lot *in vitro* (64,0 %, soit 130/203), par rapport au lot *in vivo* (77,7 %, soit 136/175). Ces courbes sont représentées dans la **figure 21**.

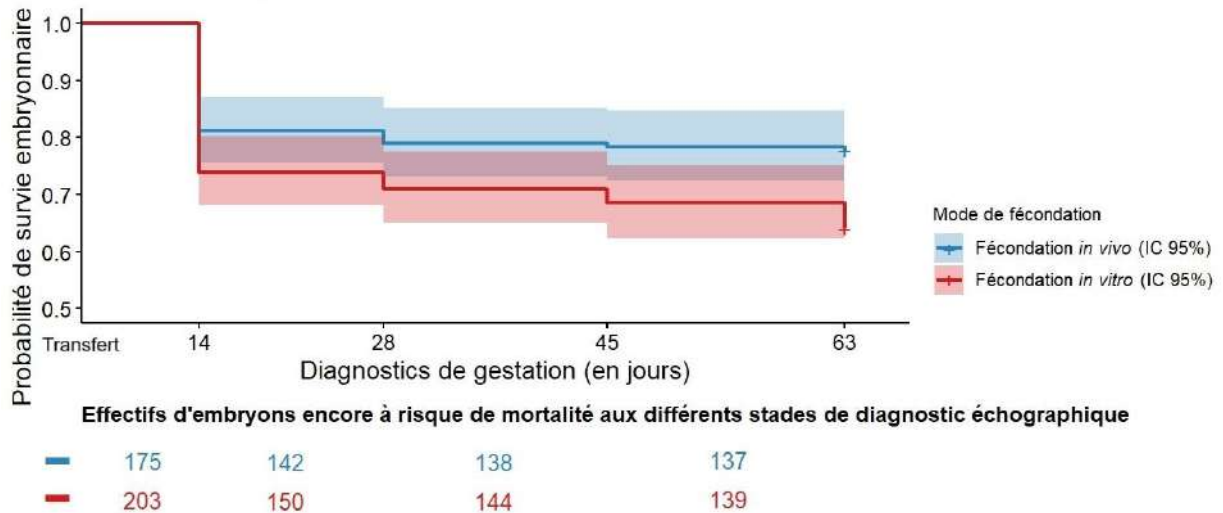


Figure 20 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : courbes de survie de Kaplan-Meier de l'année 2023

Enfin, en 2024, les courbes restent proches, avec une probabilité de survie à 63 jours de gestation de 56,4 % pour les embryons *in vivo* (44/78) et 54,6 % pour les embryons *in vitro* (65/119). La comparaison ne révèle pas de différence significative ($\chi^2 = 0,1$; $p = 0,7$). Les courbes sont représentées dans la **figure 22**.

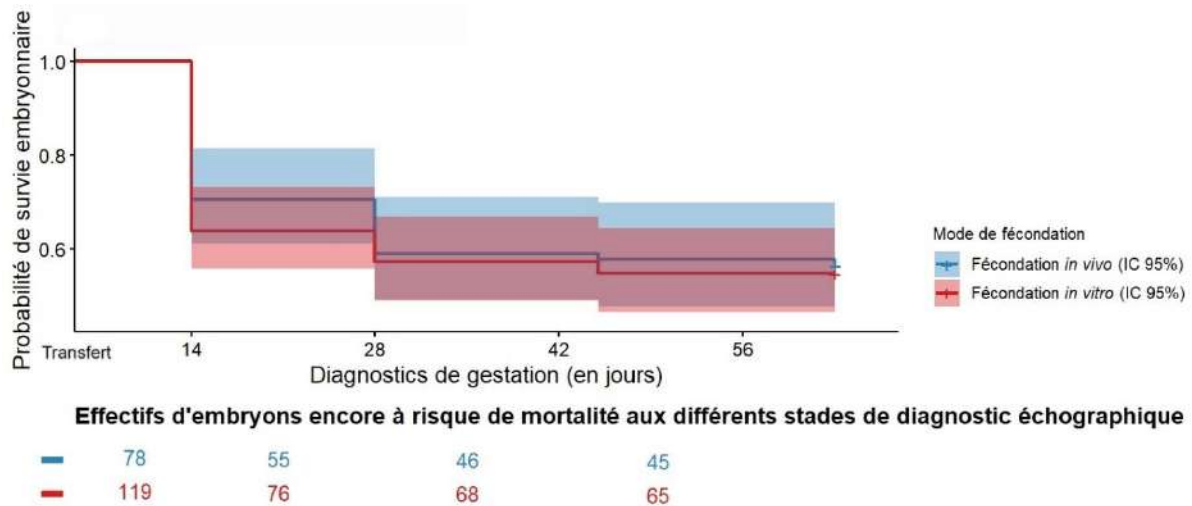


Figure 21 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le mode de fécondation : courbes de survie de Kaplan-Meier de l'année 2024

Ainsi, en 2022 et 2023, une **mortalité embryonnaire et fœtale significativement plus élevée** est observée pour les **embryons issus de fécondation *in vitro*** comparés à ceux issus de fécondation *in vivo*, tandis qu'en 2021 et 2024, les résultats ne montrent **aucune différence significative** entre les deux modes de fécondation.

b) *Comparaison des années pour un même mode de fécondation*

Pour les embryons issus de fécondation *in vivo*, les probabilités de survie varient significativement selon l'année de transfert ($p = 0,0007$). Les courbes de Kaplan-Meier révèlent des écarts marqués entre les années, avec des probabilités de survie à 63 jours de gestation de 61,6 % en 2021 (95/250), 71,6 % en 2022 (116/162), 77,7 % en 2023 (136/175), et 56,4 % en 2024 (44/78), cette dernière correspondant à l'année où la mortalité atteint son niveau le plus élevé parmi les lots *in vivo*. Les courbes sont représentées dans la **figure 23**.

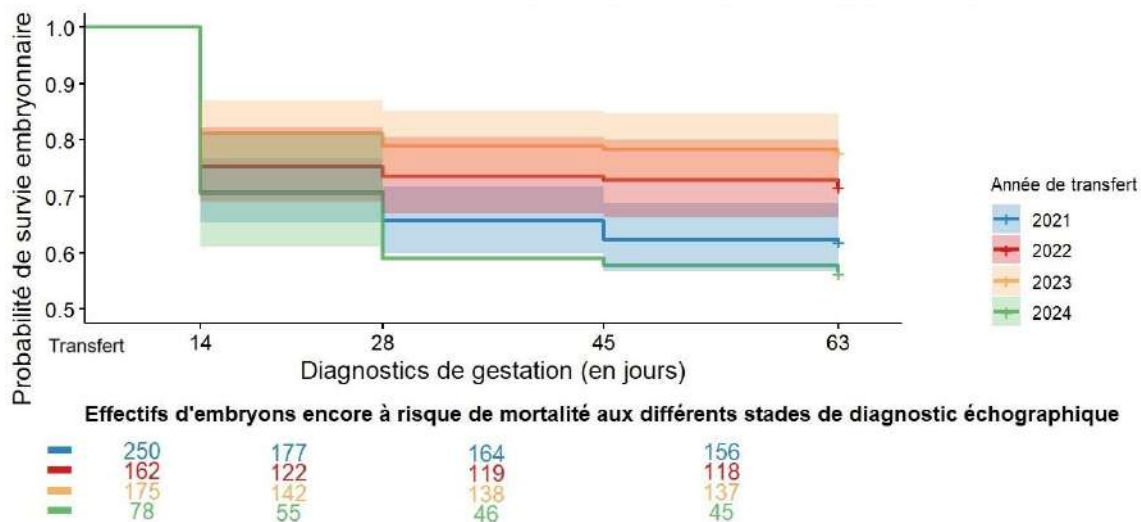


Figure 22 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon l'année : courbes de survie de Kaplan-Meier du mode de fécondation *in vivo*

Pour les embryons issus de fécondation *in vitro*, aucune différence statistiquement significative n'est détectée entre les années ($p = 0,1$), bien que les trajectoires de survie ne soient pas parfaitement superposables. Les probabilités de survie à 63 jours de gestation s'élèvent respectivement à 57,7 % en 2021 (82/142), 53,8 % en 2022 (113/210), 64,0 % en 2023 (130/203), et 54,6 % en 2024 (65/119), traduisant une certaine variabilité interannuelle, mais sans franchir le seuil de significativité statistique. Les courbes sont représentées dans la **figure 24**.

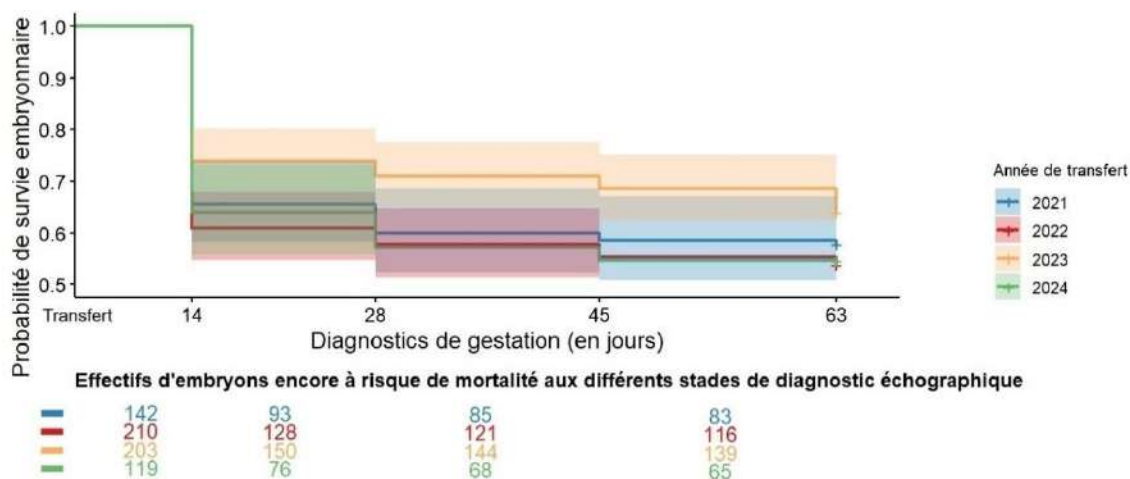


Figure 23 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon l'année : courbes de survie de Kaplan-Meier du mode de fécondation *in vitro*

Ainsi, la **mortalité embryonnaire des embryons issus de fécondation *in vivo*** varie **significativement selon l'année de transfert**, avec un taux particulièrement élevé observé en **2024**. À l'inverse, **aucune variation significative** de la survie embryonnaire n'est mise en évidence entre les années pour les **embryons issus de fécondation *in vitro***.

Les probabilités estimées de survie embryonnaire à chaque point de suivi échographique (DG14, DG28, DG45 et DG63) sont présentées dans le **tableau XVII**. Ces probabilités estimées traduisent la dynamique de survie cumulée, tandis que la répartition effective des pertes entre chaque intervalle (**tableau XVIII**) permet d'en affiner l'interprétation temporelle. En effet, ces deux approches sont complémentaires : les probabilités de Kaplan-Meier indiquent la proportion estimée de gestations poursuivies, tandis que le comptage brut des pertes embryonnaires et fœtales permet d'évaluer l'intensité et le moment de leur survenue.

Le taux de mortalité embryonnaire précoce est relativement comparable après transfert d'embryons produits *in vivo* d'une année sur l'autre, variant de 19 % en 2023 à 29 % en 2021 et 2024, en passant par 25 % en 2022. En revanche, pour les arrêts de gestation entre J14 et J63, l'année 2024 fait exception avec un taux de mortalité nettement plus élevé (20 %), contrairement aux années 2023 (4,2 %) et 2022 (4,9 %), l'année 2021 étant intermédiaire (12,4 %).

Pour les embryons produits *in vitro*, la mortalité embryonnaire précoce post-transfert est assez comparable pour 2021 (34,5 %), 2022 (39 %) et 2024 (36,1 %), alors qu'elle est moindre en 2023 (26,1 %). En revanche, le taux d'arrêt de gestation entre J14 et J63 est à des niveaux relativement comparables pour les quatre années, avec respectivement 11,8 % en 2021, 11,7 % en 2022, 18,7 % en 2023, et 14,5 % en 2024.

L'année 2024 se distingue des autres principalement par le taux bien plus élevé (20 %) d'arrêt de gestation entre J14 et J63 chez les embryons *in vivo*, ce qui représente le taux le plus élevé observé pendant cette phase de gestation, tous lots confondus. À titre de comparaison, pour les

embryons *in vitro*, les taux d'arrêts tardifs ne dépassent pas 18,7 %, et aucune année ne présente de pic aussi net.

Enfin, les résultats de 2021 montrent une différence plus nette entre les deux modes de fécondation. Les embryons issus de fécondation *in vivo* ont une meilleure survie cumulée au DG63 (62 %) comparée aux embryons *in vitro* (57 %), avec un taux de pertes avant J14 plus élevé pour les embryons *in vitro* (34,5 % contre 29,2 % en *in vivo*).

Dans l'ensemble, ces résultats confirment que les probabilités de survie estimées par Kaplan-Meier sont fortement influencées par les pertes précoces, survenant en majorité avant 14 jours de gestation. Toutefois, la répartition des pertes après ce seuil reste essentielle à considérer, en particulier pour comprendre les trajectoires divergentes de certaines courbes de survie, comme en 2023 pour les embryons *in vitro*, où 28 pertes sont enregistrées entre J14 et J63 (soit 18,7 % des gestations poursuivies après DG14), entraînant une décroissance prolongée de la survie cumulée, malgré une probabilité estimée de mortalité initiale faible à DG14 (26 %).

Tableau XVII – Probabilités estimées de survie embryonnaire et fœtale aux quatre stades de diagnostic échographique selon le mode de fécondation (Kaplan-Meier)

| | DG 14 ¹ | DG 28 ¹ | DG 45 ¹ | DG 63 ¹ | p-value ² |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Mode de fécondation – Année | | | | | <0.001 |
| <i>In vivo</i> – 2021 | 71% (65%, 77%) | 66% (60%, 72%) | 63% (57%, 69%) | 62% (56%, 68%) | |
| <i>In vitro</i> – 2021 | 65% (58%, 74%) | 60% (52%, 68%) | 58% (51%, 67%) | 57% (50%, 66%) | |
| <i>In vivo</i> – 2022 | 75% (69%, 82%) | 73% (67%, 81%) | 73% (66%, 80%) | 72% (65%, 79%) | |
| <i>In vitro</i> – 2022 | 61% (55%, 68%) | 58% (51%, 65%) | 55% (49%, 62%) | 54% (47%, 61%) | |
| <i>In vivo</i> – 2023 | 81% (76%, 87%) | 79% (73%, 85%) | 78% (72%, 85%) | 78% (72%, 84%) | |
| <i>In vitro</i> – 2023 | 74% (68%, 80%) | 71% (65%, 77%) | 68% (62%, 75%) | 64% (58%, 71%) | |
| <i>In vivo</i> – 2024 | 71% (61%, 81%) | 59% (49%, 71%) | 58% (48%, 70%) | 56% (46%, 69%) | |
| <i>In vitro</i> – 2024 | 64% (56%, 73%) | 57% (49%, 67%) | 55% (46%, 64%) | 55% (46%, 64%) | |

¹% (IC 95%)

²Log-rank test

Tableau XVIII – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le mode de fécondation et l'année de transfert

| | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14 - J28 ¹ | J28 - J45 ¹ | J45 - J63 ¹ | J14 - J63 ¹ |
|-------------------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Mode de fécondation – Année | | | | | |
| <i>In vivo</i> – 2021 (n = 250) | 73/250 (29.2%) | 13/177 (7.3%) | 8/164 (4.9%) | 1/156 (0.6%) | 22/177 (12.4%) |
| <i>In vitro</i> – 2021 (n = 142) | 49/142 (34.5%) | 8/93 (8.6%) | 2/85 (2.4%) | 1/83 (1.2%) | 11/93 (11.8%) |
| <i>In vivo</i> – 2022 (n = 162) | 40/162 (24.7%) | 3/122 (2.5%) | 1/119 (0.8%) | 2/118 (1.7%) | 6/122 (4.9%) |
| <i>In vitro</i> – 2022 (n = 210) | 82/210 (39.0%) | 7/128 (5.5%) | 5/121 (4.1%) | 3/116 (2.6%) | 15/128 (11.7%) |
| <i>In vivo</i> – 2023 (n = 175) | 33/175 (18.9%) | 4/142 (2.8%) | 1/138 (0.7%) | 1/137 (0.7%) | 6/142 (4.2%) |
| <i>In vitro</i> – 2023 (n = 203) | 53/203 (26.1%) | 14/150 (9.5%) | 5/136 (3.7%) | 9/131 (6.9%) | 28/150 (18.7%) |
| <i>In vivo</i> – 2024 (n = 78) | 23/78 (29.5%) | 9/55 (16.4%) | 1/46 (2.2%) | 1/45 (2.2%) | 11/55 (20%) |
| <i>In vitro</i> – 2024 (n = 119) | 43/119 (36.1%) | 8/76 (10.5%) | 3/68 (4.4%) | 0/65 (0%) | 11/76 (14.5%) |

¹n/N (%)

Les **pertes embryonnaires précoces**, survenant avant 14 jours de gestation, déterminent en grande partie les probabilités de survie cumulée. Toutefois, la mortalité entre J14 et J63 reste déterminante dans certains cas, comme en 2023 pour les embryons *in vitro* (18,7 %) ou en 2024 pour les embryons *in vivo* (20 %), influençant significativement la trajectoire des courbes de survie.

La **mortalité embryonnaire** est plus élevée après fécondation *in vitro*, en particulier avant **14 jours de gestation**, avec des taux atteignant jusqu'à 39 %, contre 19 à 29 % après fécondation *in vivo*. Si les **pertes précoces** expliquent l'essentiel des écarts entre les lots,

certaines années se distinguent par une mortalité tardive marquée entre J14 et J63, notamment en 2024 pour les embryons *in vivo* (20 %) et en 2023 pour les embryons *in vitro* (18,7 %).

C. Analyses multivariées (modèles de Cox)

Afin d'identifier les facteurs indépendamment associés à la survenue des pertes embryonnaires et fœtales, des analyses multivariées ont été réalisées à l'aide de modèles de régression de Cox. Compte tenu des différences de variables disponibles selon le mode de production embryonnaire, des analyses distinctes ont été conduites pour les transferts d'embryons produits *in vivo* et *in vitro*.

Pour chaque lot, les variables présentant une association univariée avec une p-value strictement inférieure à 0,20 ont été sélectionnées en vue de leur inclusion dans le modèle multivarié initial. Une procédure de sélection pas à pas (*stepwise*) a ensuite été appliquée afin d'optimiser le modèle final et de ne conserver que les variables indépendamment associées au risque d'arrêt de gestation. Seules les variables analysées avec les test de Cox et présentant une association avec la survie embryonnaire à un seuil de $p < 0,20$ ont été incluses dans le modèle multivarié, ces variables sont :

- Le stade du cycle de la jument receveuse (uniquement pour les embryons produits *in vitro*) ;
- Le nombre de réutilisations d'une jument receveuse à la suite d'un arrêt de gestation post-transfert durant l'année en cours ;
- Le nombre d'embryons récoltés (uniquement pour les embryons produits *in vivo*) ;
- La réalisation ou non d'un sexage embryonnaire (uniquement pour les embryons produits *in vitro*) ;
- La saison au moment du transfert embryonnaire.

Pour les variables catégorielles incluses dans les modèles de Cox, les modalités de référence utilisées ont été choisies de telle sorte à ce qu'elles soient à la fois les plus fréquentes dans l'échantillon étudié et représentatives d'une situation de référence clinique ou biologique pertinente. Ces références permettent d'interpréter les hazard ratios comme des comparaisons relatives à ces modalités de base.

1. Effet jument donneuse (≥ 10 transferts)

Trente-sept juments donneuses ont donné lieu à au moins 10 transferts embryonnaires sur l'ensemble des quatre années étudiées, représentant un total de 563 embryons transférés. Seules ces 37 juments ont été retenues pour l'analyse du facteur « jument donneuse ».

La jument *jd11* a été choisie comme modalité de référence, car elle est la première dans l'ordre alphabétique parmi celles ayant atteint ce seuil de 10 transferts (tous modes de production embryonnaire confondus).

En ne prenant compte que les résultats des 37 juments qui ont produit plus de 9 embryons transférés, **aucun effet significatif « jument donneuse » sur le taux d'arrêt de gestation après transfert n'est observé (p = 0,209)**. Le facteur « jument donneuse » n'est donc pas retenu dans la construction du modèle multivarié.

Cependant, en analysant individuellement ces juments, 3 d'entre elles semblaient présenter un effet potentiel sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale. La jument *jd104* montre ainsi une forte tendance à générer des embryons présentant un risque accru de mortalité par rapport à la jument de référence *jd11* (HR = 2,50 ; IC95% [0,88 ; 7,14] ; p = 0,086). À l'inverse, *jd81* tend à produire des embryons avec un risque plus faible (HR = 0,24 ; IC95% [0,03 ; 1,94] ; p = 0,20), tandis que *jd284* présente également une tendance à l'augmentation du risque (HR = 1,92 ; IC95% [0,77 ; 4,82] ; p = 0,20). Ces estimations de hazard ratios issues du modèle de Cox sont détaillées dans le **tableau XX**.

Il est à noter que, pour trois ces juments, les pertes observées semblent se concentrer avant J14, c'est-à-dire durant la phase embryonnaire précoce. Les données de taux d'arrêt de gestation par jument donneuse sont présentées dans le **tableau XIX**.

Tableau XIX – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon la jument donneuse (≥ 10 transferts)

| Juments donneuses | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14 - J28 ¹ | J28 - J45 ¹ | J45 - J63 ¹ | J14 - J63 ¹ |
|-------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| jd11 | 7/20 (35%) | 0/13 (0%) | 0/13 (0%) | 0/13 (0%) | 0/13 (0%) |
| jd81 | 1/10 (10%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) |
| jd104 | 6/10 (60%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) | 1/4 (25%) | 1/4 (25%) |
| jd284 | 9/21 (42.9%) | 2/12 (16.7%) | 0/10 (0%) | 2/10 (20%) | 4/12 (33.3%) |

¹n/N (%)

Tableau XX – Effet des juments donneuses (≥ 10 transferts) sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox

| Jument donneuse | HR | IC95% | p-value |
|-----------------|------|------------|---------|
| jd11 | — | — | — |
| jd81 | 0.24 | 0.03, 1.94 | 0.2 |
| jd104 | 2.50 | 0.88, 7.14 | 0.086 |
| jd284 | 1.92 | 0.77, 4.82 | 0.2 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p-value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | 0.209 |

Aucun effet significatif « jument donneuse » sur le taux d'arrêt de gestation après transfert n'est observé (p = 0,209).

2. Effet étalon (≥ 10 transferts)

Trente-cinq étalons ont permis de produire *in vivo* et *in vitro* plus de 9 embryons transférés, représentant un total de 995 embryons transférés. Seuls ces 35 étalons ont été retenus pour l'analyse du facteur « étalon ».

L'étalon *e1* a été choisi comme modalité de référence, car il est le premier dans l'ordre alphabétique parmi ceux ayant atteint ce seuil de 10 transferts.

En prenant en compte cette sous-population, **aucun effet significatif du facteur « étalon » sur le taux d'arrêt de gestation post-transfert n'est mis en évidence (p = 0,236)**. Le facteur « étalon » n'a donc pas été retenu dans la construction du modèle multivarié.

Pour 3 étalons, une influence tendrait à exister sur le taux de survie des embryons après transfert (**tableau XXII**) avec un taux de mortalité embryonnaire tendant pour les 3 à être plus élevé en comparaison avec *e1* : *e44* (HR = 2,95 ; IC95% [0,74 ; 11,8] ; p = 0,13), *e78* (HR = 2,55 ; IC95% [0,64 ; 10,2] ; p = 0,20) et *e186* (HR = 2,70 ; IC95% [0,74 ; 9,80] ; p = 0,13).

Comme observé précédemment pour les juments donneuses, les pertes gestationnelles enregistrées chez ces quatre étalons semblent majoritairement survenir avant J14 voire jusqu'à J28, c'est-à-dire au cours des phases embryonnaires précoce et semi-tardive. Les données de taux d'arrêt de gestation par étalon sont présentées dans le **tableau XXI**.

Tableau XXI – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon l'étalon (≥ 10 transferts)

| Etalons | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14 - J28 ¹ | J28 - J45 ¹ | J45 - J63 ¹ | J14 - J63 ¹ |
|---------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| e1 | 3/11 (27.3%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) |
| e44 | 6/10 (60%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) |
| e78 | 4/10 (40%) | 2/6 (33.3%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) | 2/6 (33.3%) |
| e186 | 7/16 (43.8%) | 1/9 (11.1%) | 2/8 (25%) | 0/6 (0%) | 3/9 (33.3%) |

¹n/N (%)

Tableau XXII – Effet des étalons (≥ 10 transferts) sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox

| Étalon | HR | IC95% | p-value |
|--------|------|------------|---------|
| e1 | — | — | |
| e44 | 2.95 | 0.74, 11.8 | 0.13 |
| e78 | 2.55 | 0.64, 10.2 | 0.2 |
| e186 | 2.70 | 0.74, 9.80 | 0.13 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p-value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | 0.236 |

Aucun effet significatif du facteur « étalon » sur le taux d'arrêt de gestation post-transfert n'est mis en évidence (p = 0,236)

3. Effet jument receveuse

a) Effet âge de la jument receveuse

Les juments receveuses ont été réparties en trois classes d'âge au moment du transfert embryonnaire : 2 à 5 ans (n = 542 embryons transférés), 6 à 9 ans (n = 513), et 10 ans et plus (n = 284). La catégorie des juments âgées de 10 ans et plus a été définie comme modalité de référence.

Les arrêts de gestation sont majoritairement embryonnaires précoces voire semi-tardifs. Avant J14, elles représentent 28,6 % des transferts chez les juments de 2 à 5 ans, 28,7 % chez celles de 6 à 9 ans, et 33,1 % chez les juments âgées de 10 ans ou plus. Aucune différence marquée n'est observée entre les classes. Deux tests du Chi², dont les hypothèses nulles supposent l'absence d'association entre la catégorie d'âge et la survenue des arrêts de gestation à la fois avant J14 et entre J14 et J63, ont été réalisés. En effet, **aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les trois catégories d'âge**, ni pour les pertes embryonnaires précoces (avant J14, p = 0,341), ni pour les pertes survenues entre J14 et J63 (p = 0,758). Les données de fréquence des pertes selon la catégorie d'âge des receveuses au moment du transfert sont présentées dans le **tableau XXIII**.

Le modèle de Cox, qui intègre la dimension temporelle des événements, confirme cette **absence d'effet significatif de la catégorie de l'âge sur l'arrêt de la gestation (p = 0,521)**. Les estimations de hazard ratios issues du modèle de Cox sont détaillées dans le **tableau XXIV**.

Tableau XXIII – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon la catégorie d'âge des juments receveuses au moment du transfert

| Catégorie d'âge | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14 - J28 ¹ | J28 - J45 ¹ | J45 - J63 ¹ | J14 - J63 ¹ |
|-----------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 2-5 ans (n = 542) | 155/542 (28.6%) | 25/387 (6.5%) | 9/362 (2.5%) | 6/353 (1.7%) | 40/387 (10%) |
| 6-9 ans (n = 513) | 147/513 (28.7%) | 25/366 (6.8%) | 10/341 (2.9%) | 8/331 (2.4%) | 43/366 (11.7%) |
| ≥ 10 ans (n = 284) | 94/284 (33.1%) | 8/190 (4.2%) | 7/182 (3.8%) | 4/175 (2.3%) | 19/190 (10%) |

¹n/N (%)

Tableau XXIV – Effet de la catégorie d'âge des juments receveuses au moment du transfert sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox

| Catégorie d'âge | HR | IC95% | p-value |
|-----------------|------|------------|---------|
| ≥ 10 ans | — | — | — |
| 2-5 ans | 0.87 | 0.69, 1.10 | 0.3 |
| 6-9 ans | 0.90 | 0.71, 1.14 | 0.4 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p-value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | 0.521 |

Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les trois catégories d'âge (2-5 ans ; 6-9 ans ; ≥ 10 ans) sur le taux d'arrêt de gestation.

b) Effet du stade du cycle des juments receveuses en nombre de jours post-ovulation au moment du transfert embryonnaire

(1) Embryons produits *in vivo*

Chez les juments receveuses de transferts d'embryons *in vivo*, les taux de gestation à 14 jours varient de 50 à 100 % selon le jour post-ovulation au moment du transfert. Des taux de 100 % sont observés à J5,5 (n = 3), J6,5 (n = 1) et J9 (n = 2), mais ces résultats reposent sur des effectifs très limités, ce qui en empêche toute interprétation fiable. À J3, le taux de gestation atteint 85,71 %, mais ne concerne que 7 transferts. Parmi les stades les plus représentés, J6 présente le taux de gestation le plus élevé (83 % pour 66 transferts), suivi de J5 (78 %, n = 197). Les stades

J4 (74 %, n = 39), J7 (77 %, n = 52) et J8 (60 %, n = 10) montrent des taux de succès un peu plus faibles sur des effectifs également plus restreints.

Le **tableau XXV** présente la répartition effective des pertes selon le stade post-ovulation des juments receveuses.

Au vu de ces observations, le stade J6 est retenu comme référence dans l'analyse de survie réalisée avec le modèle de Cox.

Tableau XXV – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le stade du cycle de la jument receveuse (en nombre de jours post-ovulation) pour les embryons in vivo

| Stade du cycle de la jument receveuse au moment du transfert (en nombre de jours post-ovulation) | Transfert embryonnaire - J14 ^l | J14 - J28 ^l | J28 - J45 ^l | J45 - J63 ^l | J14 - J63 ^l |
|--|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 3.0 | 1/7 (14.3%) | 0/6 (0%) | 0/6 (0%) | 0/6 (0%) | 0/6 (0%) |
| 4.0 | 10/39 (25.6%) | 1/29 (3.4%) | 1/28 (3.6%) | 0/27 (0%) | 2/29 (6.9%) |
| 4.5 | 1/2 (50%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) |
| 5.0 | 44/197 (22.3%) | 9/153 (5.9%) | 1/144 (0.7%) | 2/143 (1.4%) | 12/153 (7.8%) |
| 5.5 | 0/3 (0%) | 0/3 (0%) | 0/3 (0%) | 0/3 (0%) | 0/3 (0%) |
| 6.0 | 11/66 (16.7%) | 4/55 (7.3%) | 1/51 (2%) | 0/50 (0%) | 5/55 (9.0%) |
| 6.5 | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) |
| 7.0 | 12/52 (23.1%) | 1/40 (2.5%) | 0/39 (0%) | 1/39 (2.6%) | 2/40 (5%) |
| 8.0 | 4/10 (40%) | 1/6 (16.7%) | 0/5 (0%) | 0/5 (0%) | 1/6 (16.7%) |
| 9.0 | 0/2 (0%) | 0/2 (0%) | 0/2 (0%) | 0/2 (0%) | 0/2 (0%) |

^ln/N (%)

Le modèle de Cox (**tableau XVI**) évalue l'effet du stade post-ovulation de la jument receveuse sur le risque de perte gestationnelle après transfert embryonnaire *in vivo*, en prenant le stade J6 comme modalité de référence. Aucune différence significative de risque n'est mise en évidence entre les différents stades comparés ($p > 0,05$ pour l'ensemble des modalités).

Certaines estimations de hazard ratios indiquent numériquement une tendance à un risque accru pour les transferts réalisés à J4 (HR = 1,35 ; IC95 % : 0,64–2,85), J4,5 (HR = 2,67 ; IC95 % : 0,35–20,1), J5 (HR = 1,22 ; IC95 % : 0,70–2,12) et J8 (HR = 2,49 ; IC95 % : 0,91–6,81), mais sans atteindre la significativité statistique. Ces résultats doivent toutefois être interprétés avec prudence en raison des effectifs très limités pour certains sous-groupes.

Tableau XXVI – Effet du stade du cycle des juments receveuses au moment du transfert sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox pour les embryons in vivo

| Stade du cycle de la jument receveuse au moment du transfert (en nombre de jours post-ovulation) | HR | IC95% | p-value |
|--|------|------------|---------|
| 6 | — | — | |
| 3 | 0.57 | 0.08, 4.32 | 0.6 |
| 4 | 1.35 | 0.64, 2.85 | 0.4 |
| 4.5 | 2.67 | 0.35, 20.1 | 0.3 |
| 5 | 1.22 | 0.70, 2.12 | 0.5 |
| 5.5 | 0.00 | 0.00, Inf | >0.9 |
| 6.5 | 0.00 | 0.00, Inf | >0.9 |
| 7 | 1.15 | 0.56, 2.37 | 0.7 |
| 8 | 2.49 | 0.91, 6.81 | 0.075 |
| 9 | 0.00 | 0.00, Inf | >0.9 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p-value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | 0.533 |

Les courbes de Kaplan-Meier illustrent la probabilité cumulée de survie embryonnaire selon le stade du cycle de la jument receveuse. Le choix a été fait de comparer deux lots de stades : J3 à J5,5 et J6 à J9. Cette distinction repose sur la distribution des effectifs observés dans la base de données. Entre J3 et J5,5, les stades les plus représentés sont J5 (n = 197) et J4 (n = 72). Entre J6 et J9, les transferts sont moins nombreux, mais J6 (n = 66) et J7 (n = 52) permettent une analyse fiable. Ce regroupement permet de tester l'effet du stade du cycle sur la survie embryonnaire, tout en maintenant des effectifs suffisants dans chaque lot.

Sur les courbes de Kaplan-Meier (**figure 25**), la probabilité de survie embryonnaire est légèrement plus élevée dans le groupe J6 à J9. Cette différence n'est pas significative (p = 0,70). Les intervalles de confiance se chevauchent largement tout au long du suivi. Dans les deux lots, la survie embryonnaire reste élevée jusqu'au DG63.

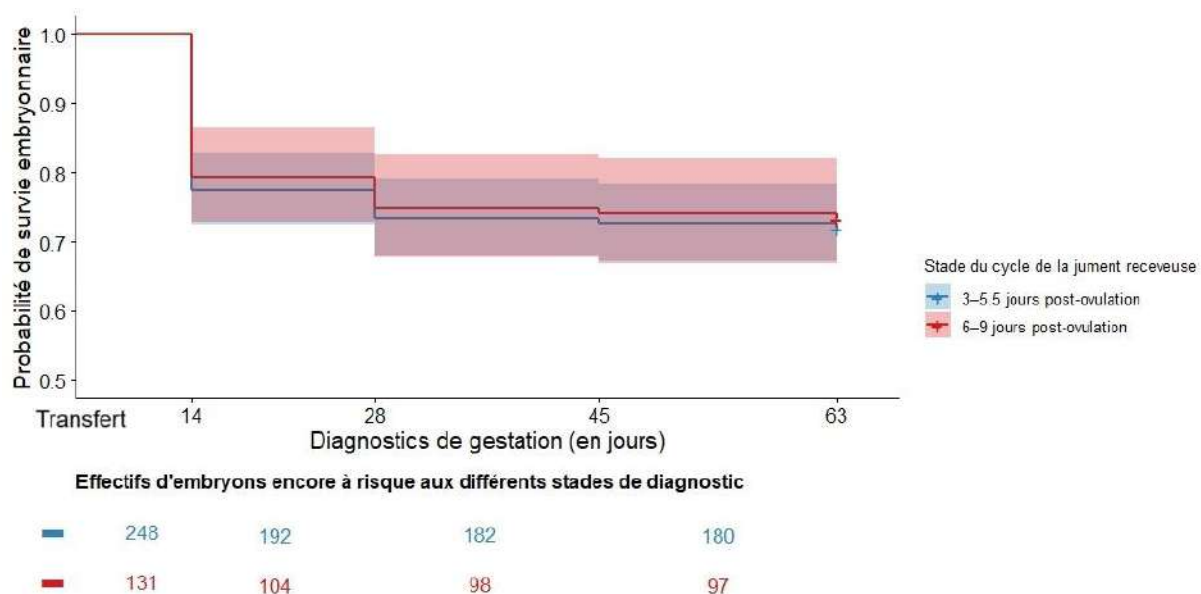


Figure 24 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le stade du cycle de la jument receveuse au moment du transfert : courbes de survie de Kaplan-Meier du mode de fécondation in vivo

Afin d'examiner plus finement la répartition des pertes gestationnelles selon le stade du cycle de la jument receveuse, un test de χ^2 a été réalisé en distinguant deux catégories : les pertes précoces, survenant avant 14 jours de gestation (soit les diagnostics négatifs à 14 jours), et les pertes secondaires, survenant après 14 jours de gestation (soit les diagnostics négatifs à 28, 45 ou 63 jours). La proportion de pertes précoces et celle de pertes secondaires apparaissent similaires dans les deux lots (**tableau XXVII**).

Aucune différence significative n'est observée entre les catégories 3-5,5 jours et 6-9 jours concernant les pertes embryonnaires précoces ou tardives. Les pertes avant J14 atteignent 21,7 % (56/258) pour la catégorie 3-5,5 jours et 20,6 % (27/131) pour la catégorie 6-9 jours, avec une p-value de 0,906. De même, les pertes survenues entre J14 et J63 sont comparables entre les deux groupes : 7,3 % (14/192) pour la catégorie 3-5,5 jours et 7,7 % (8/104) pour la catégorie 6-9 jours, sans différence significative ($p = 1,000$).

Tableau XXVII - Répartition des pertes selon la catégorie de stade de cycle de la jument receveuse au moment du transfert (en nombre de jours post-ovulation) pour les embryons in vivo

| Catégorie de stade de cycle de la jument receveuse au moment du transfert | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14-J63 ¹ |
|---|---|----------------------|
| 3-5,5 | 56/258 (21.7%) | 14/192 (7.3%) |
| 6-9 | 27/131 (20.6%) | 8/104 (7.7%) |

¹n/N (%)

(2) *Embryons produits in vitro*

Chez les juments receveuses de transferts d'embryons *in vitro*, les taux de gestation à 14 jours sont également très variables selon le jour post-ovulation. Des taux de 100 % sont enregistrés à J5,5 (n = 1) et J6 (n = 4), mais les effectifs étant trop faibles, ces résultats ne peuvent être considérés comme représentatifs. Un taux de 75 % est obtenu à J3 (n = 4), et 78 % à J4,5 (n = 9). Le stade J5 est le plus fréquemment utilisé (n = 274), avec un taux de gestation de 65 %, proche de celui observé à J4 (66 %, n = 220). Ces deux jours concentrent la quasi-totalité des transferts.

Le **tableau XXVIII** présente la répartition des pertes selon le stade post-ovulation.

Au vu de cette distribution et de la proximité des taux observés à J4 et J5, le jour J4 est choisi comme modalité de référence dans le modèle de Cox.

Tableau XXVIII – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le stade du cycle de la jument receveuse (en nombre de jours post-ovulation) pour les embryons in vitro

| Stade du cycle de la jument receveuse au moment du transfert (en nombre de jours post-ovulation) | Transfert embryonnaire - J14 ^l | J14 - J28 ^l | J28 - J45 ^l | J45 - J63 ^l | J14 - J63 ^l |
|--|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 3.0 | 1/4 (25%) | 0/3 (0%) | 1/3 (33.3%) | 0/2 (0%) | 1/3 (33.3%) |
| 4.0 | 74/220 (33.6%) | 9/146 (6.2%) | 7/137 (5.1%) | 6/130 (4.6%) | 22/146 (15.1%) |
| 4.5 | 2/9 (22.2%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) |
| 5.0 | 95/274 (34.7%) | 10/179 (5.6%) | 5/169 (3%) | 4/164 (2.4%) | 19/179 (10.6%) |
| 5.5 | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) |
| 6.0 | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) |
| 7.0 | 1/1 (100%) | 0/0 (0.0%) | 0/0 (0.0%) | 0/0 (0.0%) | 0/0 (0.0%) |

Le modèle de Cox (**tableau XXIX**) évalue l'effet du stade du cycle de la jument receveuse sur le risque de perte gestationnelle, en prenant J4 comme référence. Aucune différence significative n'est observée. Les transferts à J4,5 (HR = 0,46 ; IC95 % : 0,11–1,86) et J5 (HR = 0,96 ; IC95 % : 0,73–1,26) ne montrent pas de risque accru. À l'inverse, un HR élevé est observé à J7 (HR = 5,00), mais l'effectif est unique et l'intervalle de confiance très large.

Tableau XXIX – Effet du stade du cycle des juments receveuses au moment du transfert sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox pour les embryons in vitro

| Stade du cycle de la jument receveuse au moment du transfert (en nombre de jours post-ovulation) | HR | IC95% | p-value |
|--|------|------------|---------|
| 4 | — | — | |
| 3 | 1.09 | 0.27, 4.40 | >0.9 |
| 4.5 | 0.46 | 0.11, 1.86 | 0.3 |
| 5 | 0.96 | 0.73, 1.26 | 0.8 |
| 5.5 | 0.00 | 0.00, Inf | >0.9 |
| 6 | 0.00 | 0.00, Inf | >0.9 |
| 7 | 5.00 | 0.70, 36.0 | 0.11 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p-value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | 0.190 |

Les courbes de Kaplan-Meier (**figure 17**) illustrent la probabilité cumulée de survie embryonnaire en fonction du stade du cycle de la jument receveuse le jour du transfert. Le choix a été fait de comparer les stades J4 et J5, en raison de leurs effectifs importants. Ce regroupement permet de tester l'effet du stade du cycle tout en garantissant une représentativité satisfaisante.

Les courbes de survie associées aux stades J4 et J5 sont quasiment superposées. Les intervalles de confiance se chevauchent pleinement tout au long du suivi. Aucune différence significative n'est observée entre les deux groupes ($\chi^2 = 0,2$; ddl = 1 ; p = 0,7). Ces résultats indiquent une survie embryonnaire comparable entre les deux stades, jusqu'à DG63.

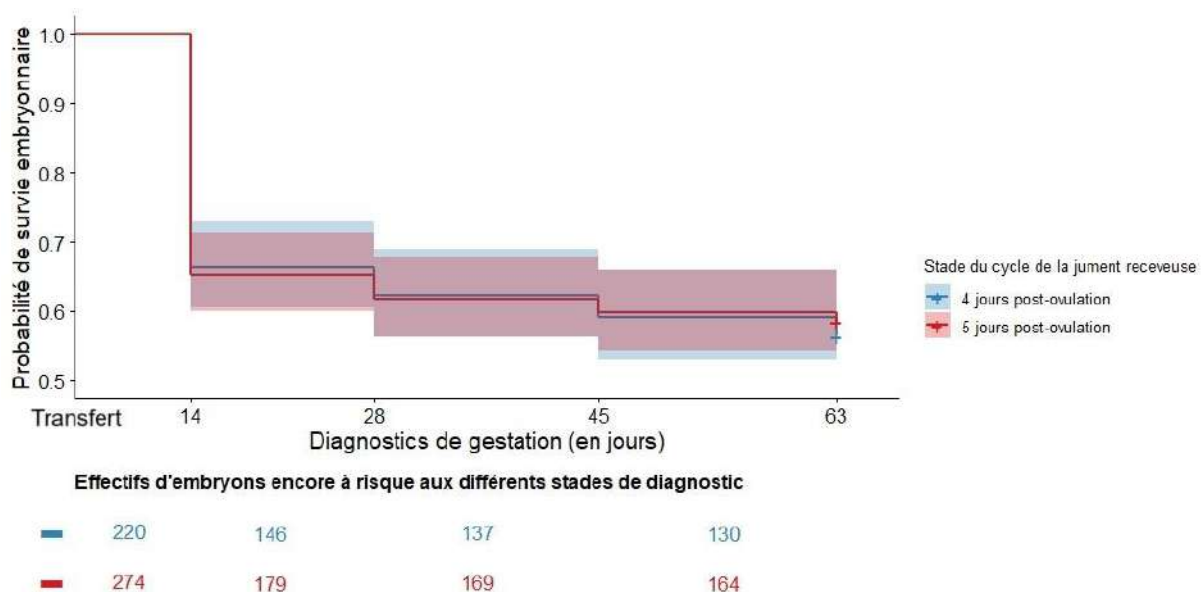


Figure 25 - Probabilité de survie embryonnaire et fœtale selon le stade du cycle de la jument receveuse au moment du transfert : courbes de survie de Kaplan-Meier du mode de fécondation in vitro

Afin d'examiner la répartition des pertes gestationnelles selon le stade du cycle de la jument receveuse, un test de χ^2 a été réalisé en distinguant deux catégories : les pertes précoces (avant 14 jours de gestation) et les pertes secondaires (après 14 jours de gestation).

Aucune différence significative n'est observée entre les catégories 4 et 5 du cycle de la jument receveuse, représentées dans le **tableau XXX**, que ce soit pour les pertes embryonnaires précoces ou tardives. Les taux de pertes avant J14 sont très similaires : 33,6 % (74/220) pour la catégorie 4 et 34,7 % (95/274) pour la catégorie 5, avec une p-value de 0,884. De même, les pertes survenues après J14 atteignent 15,1 % (22/146) pour la catégorie 4 et 10,6 % (19/179) pour la catégorie 5, sans différence significative ($p = 0,305$).

Tableau XXX - Répartition des pertes selon la catégorie de stade de cycle de la jument receveuse au moment du transfert (en nombre de jours post-ovulation) pour les embryons in vitro

| Catégorie de stade de cycle de la jument receveuse au moment du transfert | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14-J63 ¹ |
|---|---|----------------------|
| 4 | 74/220 (33.6%) | 22/146 (15.0%) |
| 5 | 95/274 (34.7%) | 19/179 (10.6%) |

¹n/N (%)

Pour résumer, le stade du cycle de la jument receveuse n'a pas montré d'association significative avec la survie embryonnaire, que ce soit après transfert d'embryons *in vivo* ou *in vitro*. Toutefois, en raison d'une p-value inférieure au seuil de sélection fixé ($p < 0,20$), cette variable a été intégrée au modèle multivarié pour les embryons issus de fécondation *in vitro* uniquement.

Aucun impact significatif du stade post-ovulation de la receveuse n'est mis en évidence sur la survie embryonnaire, ni pour les embryons *in vivo*, ni pour les embryons *in vitro*.

c) Effet de la réutilisation des juments receveuses ayant connu un arrêt de gestation après un transfert précédent

(1) Effet de la réutilisation de juments receveuses du fait d'arrêt de gestation après transfert précédent durant l'année

Le nombre de réutilisations d'une même jument receveuse au cours de l'année du transfert, après une ou plusieurs pertes embryonnaires ou fœtales, semble associé à une augmentation progressive du taux de pertes précoces. En effet, les juments réutilisées une fois présentent un taux de perte embryonnaire avant J14 de 35,8 %, contre 28,5 % chez les juments non réutilisées, (**tableau XXXI**). Les pertes après J14 restent comparables, autour de 11 % pour les groupes 0 ou 1 réutilisation, mais atteignent 20 % pour les juments ayant été réutilisées deux fois.

En revanche, aucune perte gestationnelle n'a été observée chez la seule jument ayant été réutilisée trois fois durant la même année ($n = 1$), ce qui ne permet pas d'en tirer de conclusion robuste mais suggère un effectif trop limité pour analyse.

L'analyse de survie par modèle de Cox (**tableau XXXII**) confirme une tendance à l'augmentation du risque de perte embryonnaire ou fœtale chez les juments réutilisées après une perte gestationnelle antérieure dans l'année, avec un hazard ratio de 1,17 (IC95% [0,97 ; 1,42]) et une p-value à 0,108. Bien que cette association ne soit pas statistiquement significative au seuil classique de 0,05, la p-value reste inférieure au seuil d'inclusion fixé à 0,20 pour la construction du modèle multivarié.

Aucune influence significative de la réutilisation de juments receveuses ayant déjà fait l'objet d'un ou plusieurs transferts au cours de la même année n'a été observée sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale après un nouveau transfert. En revanche, la p-value étant inférieure au seuil choisi de 0,2, le facteur « réutilisation de receveuses durant l'année » sera inclus dans le modèle multivarié.

Tableau XXXI – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le nombre de réutilisations de receveuses durant l'année du transfert

| Nombre de réutilisations de receveuses durant l'année du transfert | Transfert embryonnaire - J14 ^l | J14 - J28 ^l | | | J28 - J45 ^l | | J45 - J63 ^l | | J14 - J63 ^l | |
|--|---|------------------------|------------------|------------------|------------------------|--|------------------------|--|------------------------|--|
| | | | | | | | | | | |
| 0 | 318/1116 (28.5%) | 51/798 (6.4%) | 19/747 (2.5%) | 15/728 (2.1%) | 85/798 (10.7%) | | | | | |
| 1 | 72/201 (35.8%) | 6/129 (4.7%) | 6/123 (4.9%) | 2/117 (1.7%) | 14/129 (10.8%) | | | | | |
| 2 | 6/21 (28.6%) | 1/15 (6.7%) | 1/14 (7.1%) | 1/13 (7.7%) | 3/15 (20%) | | | | | |
| 3 | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | | | | | |

^ln/N (%)

Tableau XXXII – Effet de la réutilisation de juments receveuses du fait d'arrêt de gestation après transfert précédent durant l'année sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox

| Nombre de réutilisations de receveuses durant l'année du transfert | HR | IC95% | p-value |
|--|------|------------|---------|
| | 1.17 | 0.97, 1.42 | 0.10 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p-value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | 0.108 |

(2) Effet de la réutilisation de receveuses ayant présenté au moins un arrêt de gestation après transfert au cours de la totalité de la période d'étude (2021-2024)

Le nombre cumulé de réutilisations d'une même jument receveuse, après un ou plusieurs arrêts de gestation survenus lors de transferts précédents entre 2021 et 2024, ne semble pas associé à une augmentation du risque de perte embryonnaire ou fœtale. Les taux de pertes embryonnaires avant J14 varient de 25,0 % à 33,7 % selon le nombre de réutilisations. Par exemple, les juments ayant été réutilisées une fois présentent un taux de pertes précoces de 33,7 % (100/297), contre 28,7 % chez les juments non réutilisées (272/949), tandis que celles réutilisées deux ou trois fois présentent des taux similaires ou plus faibles (26,2 % et 25,0 % respectivement). Les pertes après J14 sont également comparables entre groupes, oscillant entre 10,0 % et 15,3 %, à

l'exception des groupes avec très faible effectif (n = 1 ou n = 12), pour lesquels aucune perte après J14 n'est rapportée (tableau XXXIII).

L'analyse de survie par modèle de Cox (tableau XXXIV) ne montre pas d'association significative entre le nombre cumulé de réutilisations et le risque d'arrêt de gestation (HR = 1,05 ; IC95% [0,92 ; 1,20] ; p = 0,500). Le test global de l'effet est également non significatif (p = 0,465), ce qui confirme l'absence d'influence de ce facteur sur la survie embryonnaire ou fœtale.

En résumé, **aucune association significative n'a été observée entre les réutilisations cumulées de juments receveuses ayant présenté des pertes gestationnelles antérieures et la mortalité embryonnaire ou fœtale.** Par conséquent, le facteur « réutilisation de receveuses cumulées » ne sera **pas retenu dans le modèle multivarié.** En revanche, comme précédemment mentionné, le facteur « réutilisation de receveuses durant l'année » sera intégré au modèle final, en raison d'une p-value inférieure au seuil d'inclusion fixé à 0,20 (p = 0,108).

Tableau XXXIII – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le nombre de réutilisations de receveuses au cours de la totalité de la période d'étude (2021-2024)

| Nombre de réutilisations de receveuses au cours de la totalité de la période | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14 - J28 ¹ | J28 - J45 ¹ | J45 - J63 ¹ | J14 - J63 ¹ |
|--|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 0 | 272/949 (28.7%) | 39/677 (5.8%) | 16/638 (2.5%) | 13/622 (2.1%) | 68/677 (10.0%) |
| 1 | 100/297 (33.7%) | 13/197 (6.6%) | 9/184 (4.9%) | 3/175 (1.7%) | 25/197 (12.7%) |
| 2 | 21/80 (26.2%) | 6/59 (10.2%) | 1/53 (1.9%) | 2/52 (3.8%) | 9/59 (15.3%) |
| 3 | 3/12 (25%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) |
| 4 | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) | 0/1 (0%) |

¹n/N (%)

Tableau XXXIV – Effet de la réutilisation de juments receveuses du fait d’arrêt de gestation après transfert précédent au cours de la totalité de la période d’étude sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox

| Nombre de réutilisations de receveuses au cours de la totalité de la période | HR | IC95% | p-value |
|--|---------|------------|---------|
| | 1.05 | 0.92, 1.20 | 0.5 |
| IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio | | | |
| Test | p-value | | |
| Likelihood ratio test total | 0.465 | | |

La réutilisation de juments receveuses du fait d’arrêt de gestation après transfert précédent durant l’année semble augmenter le risque de mortalité embryonnaire ou fœtale. En revanche, les réutilisations cumulées sur plusieurs années n’influencent pas significativement la survie embryonnaire.

4. Effet embryon

a) Embryons produits *in vivo*

(1) Effet nombre d’embryons récoltés

Concernant les embryons produits *in vivo* :

- 549 transferts ont été réalisés à partir d’un unique embryon récolté chez une donneuse,
- 114 transferts ont été réalisés à partir de deux embryons jumeaux récoltés simultanément chez une donneuse,
- 3 transferts ont été réalisés à partir de trois embryons triplés récoltés simultanément chez une donneuse.

Un nombre d’embryons récoltés plus important, chez une même jument donneuse, tend à être associé à une mortalité embryonnaire à risque plus faible (HR = 0,72 ; IC95% [0,49 ; 1,05] ; p = 0,089), sans association significative (p = 0,075). Les estimations de hazard ratios issues du modèle de Cox sont détaillées dans le **tableau XXXVI**.

Aucune influence significative du nombre d’embryons récoltés n’est observée mais le facteur « nombre d’embryons récoltés » sera intégré au modèle multivarié pour les embryons issus de fécondation *in vivo*.

Il n’y a **pas** non plus de **différence significative** entre les nombres d’embryons récoltés (embryon unique, jumeaux ou triplés) concernant le taux de perte avant J14 (p = 0,374) ou entre J14 et J63 (p = 0,382). En revanche, **les arrêts de gestation sont significativement plus fréquents avant J14 que pendant la période J14–J63, aussi bien pour les embryons uniques (p = 9,63 × 10⁻¹²) que pour les embryons jumeaux (p = 0,0015)**. Aucun test n’a pu être réalisé pour les embryons triplés en raison de l’effectif trop faible (n = 3). Les données de

fréquence des pertes selon la catégorie d'âge des receveuses au moment du transfert sont présentées dans le **tableau XXXV**.

Tableau XXXV – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le nombre d'embryons in vivo collectés chez une jument donneuse

| Nombre d'embryons <i>in vivo</i> récoltés | Nombre d'embryons <i>in vivo</i> transplantés | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14 - J28 ¹ | J28 - J45 ¹ | J45 - J63 ¹ | J14 - J63 ¹ |
|---|---|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Embryons uniques | 549 | 144/548 (26.3%) | 25/404 (6.2%) | 11/379 (2.9%) | 4/368 (1.1%) | 40/404 (9.9%) |
| Embryons jumeaux | 114 | 25/114 (21.9%) | 4/89 (4.5%) | 0/85 (0%) | 1/85 (1.2%) | 5/89 (5.6%) |
| Embryons triplés | 3 | 0/3 (0%) | 0/3 (0%) | 0/3 (0%) | 0/3 (0%) | 0/3 (0%) |

¹n/N (%)

Tableau XXXVI – Effet du nombre d'embryons in vivo collectés sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox

| Nombre d'embryons récoltés | HR | IC95% | p-value |
|--|---------|------------|---------|
| | 0.72 | 0.49, 1.05 | 0.089 |
| IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio | | | |
| Test | p-value | | |
| Likelihood ratio test total | 0.075 | | |

Un plus grand nombre d'embryons récoltés chez une même jument tend à être associé à une meilleure survie embryonnaire *in vivo*. Cet effet reste non significatif mais justifie l'inclusion de cette variable dans l'analyse multivariée.

b) Embryons produits in vitro

(1) Effet réalisation du sexage embryonnaire

Concernant les embryons produits *in vitro*, 37 ont fait l'objet d'un sexage embryonnaire réalisé par le laboratoire Avantea (Crémone, Italie). La réalisation d'un sexage est associée à une augmentation significative du risque de perte embryonnaire ou fœtale. L'analyse de survie montre que ce risque est plus élevé pour les embryons sexés (HR = 2,10 ; IC95% [1,38 ; 3,19] ; $p < 0,001$), comme présenté dans le **tableau XXXVIII**.

Les fréquences de pertes selon la réalisation ou non du sexage embryonnaire sont détaillées dans le **tableau XXXVII**. Un test du χ^2 montre que les pertes embryonnaires précoces (avant J14) sont significativement plus fréquentes chez les embryons ayant été sexés ($p = 0,0003$). En revanche, aucune différence significative n'est observée pour les pertes survenues entre J14 et J63 ($p = 0,816$).

Ces résultats suggèrent que **l'augmentation du risque liée au sexage concerne principalement la phase embryonnaire précoce**. En raison de son effet significatif, le facteur « réalisation du sexage embryonnaire » sera intégré au modèle multivarié.

Tableau XXXVII – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon la réalisation du sexage embryonnaire in vitro ou non

| Réalisation du sexage embryonnaire | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14 - J28 ¹ | J28 - J45 ¹ | J45 - J63 ¹ | J14 - J63 ¹ |
|------------------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Non | 204/637 (32%) | 28/433 (6.5%) | 15/405 (3.7%) | 13/390 (3.3%) | 56/433 (12.9%) |
| Oui | 23/37 (62.2%) | 1/14 (7.1%) | 0/13 (0%) | 0/13 (0%) | 1/14 (7.1%) |

¹n/N (%)

Tableau XXXVIII – Effet de la réalisation du sexage embryonnaire sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox pour les embryons in vitro

| Réalisation du sexage embryonnaire | HR | IC95% | p-value |
|------------------------------------|------|------------|---------|
| Non | — | — | |
| Oui | 2.10 | 1.38, 3.19 | <0.001 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p-value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | 0.002 |

(2) Effet sexe embryonnaire

Parmi les embryons produits *in vitro* ayant été sexés, 17 ont été identifiés comme femelles et 20 comme mâles.

Le sexe mâle tend à être associé à une mortalité embryonnaire plus élevée que le sexe femelle, avec un hazard ratio estimé à 1,66 (IC95% [0,73 ; 3,80]), mais cette association n'est pas statistiquement significative ($p = 0,222$), comme le montre le **tableau XL**.

Les fréquences de pertes embryonnaires selon le sexe de l'embryon sont détaillées dans le **tableau XXXIX**. Un test du χ^2 n'a mis en évidence aucune différence significative entre les sexes pour les pertes précoces (avant J14 ; $p = 0,468$) ni pour les pertes survenues entre J14 et J63 ($p = 0,881$).

Ces résultats suggèrent que, bien qu'une tendance à une mortalité accrue des embryons mâles soit observée, aucune influence significative du sexe embryonnaire n'a pu être démontrée. Le facteur « sexe embryonnaire » ne sera donc pas retenu dans le modèle multivarié.

Tableau XXXIX – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon le résultat du sexage embryonnaire *in vitro* ou non

| Résultat du sexage embryonnaire | Transfert embryonnaire - J14 ¹ | J14 - J28 ¹ | J28 - J45 ¹ | J45 - J63 ¹ | J14 - J63 ¹ |
|---------------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Embryon femelle | 9/17 (52.9%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) |
| Embryon mâle | 14/20 (70%) | 1/6 (16.7%) | 0/5 (0%) | 0/5 (0%) | 1/6 (16.7%) |

¹n/N (%)

Tableau XL – Effet de la réalisation du sexe embryonnaire sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox pour les embryons *in vitro*

| Sexe embryonnaire | HR | IC95% | p-value |
|-------------------|------|------------|---------|
| Embryon femelle | — | — | |
| Embryon mâle | 1.66 | 0.73, 3.80 | 0.2 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p-value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | 0.222 |

La réalisation du sexage des embryons *in vitro* est associé à un risque accru d'arrêt de gestation avec majoritairement de la mortalité embryonnaire précoce. Une tendance à une mortalité plus élevée des embryons mâles est observée, sans atteindre de seuil de significativité.

5. Effet saison au moment du transfert embryonnaire

La saison au moment du transfert influence significativement le risque de mortalité embryonnaire ou fœtale. Par rapport au printemps (modalité de référence choisi car il correspond à la principale saison de reproduction et au plus grand nombre de transferts), le risque est significativement accru en été (HR = 1,48 ; IC95% [1,22 ; 1,81] ; $p < 0,001$), tandis qu'aucune différence significative n'est observée pour les transferts réalisés en hiver (HR = 1,26 ; IC95% [0,89 ; 1,78] ; $p = 0,20$), comme présenté dans le **tableau XLII**.

Les fréquences de pertes selon la saison sont détaillées dans le **tableau XLI**. Un test du χ^2 réalisé sur les pertes embryonnaires précoces (avant J14) met en évidence une différence significative entre les trois saisons ($p = 0,00015$), avec un taux de perte plus élevé en été (38,8 %) qu'au printemps (26,3 %) ou en hiver (32,6 %). En revanche, aucune différence significative n'est observée entre les saisons pour les pertes survenues entre J14 et J63 ($p = 0,916$).

Ces résultats indiquent que **l'impact de la saison sur la mortalité embryonnaire concerne essentiellement la phase très précoce, avant J14. Réaliser un transfert embryonnaire en été augmente significativement le risque d'arrêt de gestation, indépendamment des autres facteurs.** Le facteur « saison » sera donc intégré au modèle multivarié.

Tableau XLI – Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon la saison au moment du transfert

| Saison au moment du transfert | Transfert embryonnaire - J14 ^l | J14 - J28 ^l | J28 - J45 ^l | J45 - J63 ^l | J14 - J63 ^l |
|-------------------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Printemps | 250/949 (26.3%) | 42/699 (6%) | 18/657 (2.7%) | 14/639 (2.2%) | 74/699 (10.6%) |
| Été | 118/304 (38.8%) | 11/186 (5.9%) | 8/175 (4.6%) | 2/167 (1.2%) | 21/186 (11.2%) |
| Hiver | 28/86 (32.6%) | 5/58 (8.6%) | 0/53 (0%) | 2/53 (3.8%) | 7/58 (12.0%) |

^ln/N (%)

Tableau XLII – Effet de la saison au moment du transfert sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox

| Saison au moment du transfert | HR | IC95% | p-value |
|-------------------------------|------|------------|---------|
| Printemps | — | — | |
| Été | 1.48 | 1.22, 1.81 | <0.001 |
| Hiver | 1.26 | 0.89, 1.78 | 0.2 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p-value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | < 0.001 |

L'analyse de l'effet combiné de l'année et de la saison de transfert met en évidence des variations significatives du risque d'arrêt de gestation au fil des périodes étudiées ($p < 0,001$), comme présenté dans le **tableau XLIII**. Le choix de la modalité « hiver 2021 » comme référence repose sur les résultats du modèle de Cox univarié pour la variable SAISON, qui positionne l'hiver comme modalité intermédiaire en termes de risque de perte gestationnelle (entre printemps et été), et sur le constat que l'année 2021 se situe globalement entre les autres années en termes de survie embryonnaire.

Comparativement à l'hiver 2021, aucune variation significative individuelle du risque de perte embryonnaire ou fœtale n'est observée jusqu'en 2023. Une tendance à la réduction du risque, bien que non significative, est retrouvée au printemps 2023 (HR = 0,64 ; IC95 % [0,35 ; 1,17] ; $p = 0,15$). À l'inverse, une augmentation significative du risque est mise en évidence à l'été 2024 (HR = 2,24 ; IC95 % [1,05 ; 4,79] ; $p = 0,037$). Cette différence entre périodes est confirmée par le test du *likelihood ratio* appliqué au modèle global ($p < 0,001$).

Tableau XLIII – Effet combiné de l'année et de la saison de transfert sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox

| Combinaison année – saison au moment du transfert | HR | IC95% | p-value |
|---|------|------------|---------|
| 2021-hiver | — | — | |
| 2021-été | 1.08 | 0.58, 2.03 | 0.8 |
| 2021-printemps | 0.83 | 0.45, 1.51 | 0.5 |
| 2022-été | 1.48 | 0.79, 2.77 | 0.2 |
| 2022-hiver | 1.12 | 0.47, 2.65 | 0.8 |
| 2022-printemps | 0.71 | 0.39, 1.29 | 0.3 |
| 2023-été | 0.61 | 0.30, 1.23 | 0.2 |
| 2023-hiver | 0.71 | 0.25, 2.00 | 0.5 |
| 2023-printemps | 0.64 | 0.35, 1.17 | 0.15 |
| 2024-été | 2.24 | 1.05, 4.79 | 0.037 |
| 2024-hiver | 0.93 | 0.39, 2.20 | 0.9 |
| 2024-printemps | 0.96 | 0.52, 1.78 | 0.9 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p_value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | < 0.001 |

L'analyse de l'effet croisé entre la saison de transfert et le mode de fécondation met en évidence une variation significative du risque de perte gestationnelle selon les combinaisons étudiées ($p < 0,001$), comme présenté dans le **tableau XLIV**. Le groupe « hiver – *in vivo* » est retenu comme modalité de référence, car il correspond à une situation intermédiaire en termes de risque, tant sur le plan saisonnier que dans la dynamique observée au fil des années.

Aucune des autres modalités ne présente de différence statistiquement significative de manière isolée, mais plusieurs tendances se dégagent. Le risque d'arrêt de gestation tend à augmenter pour les transferts réalisés durant l'été, en particulier lorsque les embryons sont issus de fécondation *in vitro* (HR = 2,36 ; IC95% [0,74 ; 7,53] ; $p = 0,15$). Ce risque est également plus élevé pour les transferts hivernaux d'embryons *in vitro* (HR = 1,66), bien que cette augmentation ne soit pas significative. À l'inverse, les transferts printaniers d'embryons *in vivo* n'induisent aucune différence de risque par rapport à la référence (HR = 1,00).

Tableau XLIV – Effet combiné de la saison au moment du transfert et du mode de fécondation sur le risque de perte embryonnaire ou fœtale : Hazard ratios estimés par modèle de régression de Cox

| Combinaison année – saison au moment du transfert | HR | IC95% | p-value |
|---|------|------------|---------|
| hiver - IV | — | — | |
| printemps - IV | 1.00 | 0.32, 3.15 | >0.9 |
| été - IV | 1.60 | 0.51, 5.08 | 0.4 |
| printemps - IT | 1.50 | 0.48, 4.68 | 0.5 |
| été - IT | 2.36 | 0.74, 7.53 | 0.15 |
| hiver - IT | 1.66 | 0.51, 5.41 | 0.4 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

| Test | p_value |
|-----------------------------|---------|
| Likelihood ratio test total | < 0.001 |

Cette analyse met en évidence une **tendance à l'augmentation de la mortalité embryonnaire** pour les embryons issus de fécondation *in vitro* lorsque le transfert est réalisé en été ou en hiver, tandis qu'aucune variation marquée n'est observée pour les embryons produits *in vivo*, dont la survie reste globalement stable quelle que soit la saison. Bien que ces différences ne soient pas significatives individuellement, l'effet global de l'interaction entre la saison et le mode de fécondation est statistiquement significatif.

6. Analyse multivariée des facteurs influençant la survie embryonnaire et fœtale

a) Transferts d'embryons produits *in vivo*

Le nombre de réutilisations de juments receveuses après transfert précédent au cours de l'année du transfert n'a pas été retenu dans le modèle multivarié final pour les transferts *in vivo*, car cette variable a été écartée lors de la sélection automatique par régression *stepwise*.

Dans le modèle multivarié final concernant les transferts d'embryons produits *in vivo*, l'augmentation du nombre d'embryons récoltés au moment de la récolte est associée à une diminution significative du risque de perte embryonnaire et fœtale (HR = 0,71 ; IC95% [0,61 ; 0,82] ; p < 0,001).

La saison de transfert influence également la mortalité embryonnaire et fœtale : les transferts réalisés durant l'été présentent un risque significativement accru de mortalité comparé au

printemps (HR = 1,59 ; IC95% [1,30 ; 1,94] ; p < 0,001), tandis qu'aucune différence significative n'est observée pour les transferts réalisés en hiver (p = 0,60) (**tableau XLV**).

Tableau XLV - Modèle de Cox multivarié final pour les embryons in vivo

| Facteurs étudiés | HR | IC95% | p-value |
|------------------------------------|-----------|--------------|----------------|
| Nombres d'embryons récoltés | 0.71 | 0.61, 0.82 | <0.001 |
| Saison | | | <0.001 |
| Printemps | — | — | |
| Été | 1.59 | 1.30, 1.94 | <0.001 |
| Hiver | 1.09 | 0.77, 1.55 | 0.6 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

Le risque de mortalité diminue significativement quand plusieurs embryons *in vivo* sont récoltés. En revanche, les transferts réalisés en été présentent un risque accru d'arrêt de gestation.

b) Transferts d'embryons produits in vitro

Le stade du cycle de la jument receveuse n'a pas été intégré au modèle multivarié final pour les transferts *in vitro*, ayant été exclu au cours de la procédure de sélection automatique par régression *stepwise*.

Dans le modèle multivarié final relatif aux embryons issus de fécondation *in vitro*, la réalisation d'un sexage embryonnaire est associée à une augmentation significative du risque de mortalité embryonnaire ou fœtale, avec un risque accru d'arrêt de gestation (HR = 3,71 ; IC95% [1,92 ; 7,17] ; p < 0,001).

L'augmentation du nombre de réutilisations de juments receveuses ayant présenté au moins un arrêt de gestation après transfert précédent au cours de l'année du transfert est également associée à un risque accru d'arrêt de gestation (HR = 1,51 ; IC95% [1,08 ; 2,11] ; p = 0,022).

La saison de transfert influence également le maintien ou non de la gestation après transfert, avec un risque accru d'arrêt de gestation lors des transferts réalisés en été comparé au printemps (HR = 1,47 ; IC95% [1,08 ; 2,00] ; p = 0,014), tandis qu'aucune différence significative n'est observée pour les transferts réalisés en hiver (p = 0,80) (**tableau XLVI**).

Tableau XLVI – Modèle de Cox multivarié final pour les embryons in vitro

| Facteurs étudiés | HR | IC95% | p-value |
|---|------|------------|---------|
| Réalisation du sexage embryonnaire | | | |
| Non | — | — | |
| Oui | 3.71 | 1.92, 7.17 | <0.001 |
| Nombre de réutilisations de receveuses durant l'année du transfert | | | |
| | 1.51 | 1.08, 2.11 | 0.022 |
| Saison au moment du transfert | | | |
| Printemps | — | — | 0.050 |
| Été | 1.47 | 1.08, 2.00 | 0.014 |
| Hiver | 0.94 | 0.63, 1.41 | 0.8 |

IC95% = Intervalle de confiance à 95%, HR = Hazard Ratio

La réalisation du sexage embryonnaire et la réutilisation de receveuses dans l'année augmentent significativement le risque d'arrêt de gestation. L'été est également associé à un risque de mortalité embryonnaire et fœtale plus important que les autres saisons.

III. Discussion

III. Discussion

A. Bilan des résultats

Les résultats montrent une différence significative des taux de mortalité embryonnaire et fœtale entre les embryons issus de fécondation *in vivo* et ceux obtenus par fécondation *in vitro* (OPU-ICSI). L'analyse des courbes de survie met en évidence cette différence dès les tout premiers stades de la gestation et jusqu'à 63 jours. À 14 jours de gestation, les probabilités de survie atteignent 75 % pour les embryons issus de fécondation *in vivo* contre 66 % pour ceux issus de fécondation *in vitro*, avec environ 30 % de pertes supplémentaires pour ces derniers (58 pertes supplémentaires exactement). À 63 jours de gestation, les probabilités de survie demeurent significativement supérieures pour les fœtus issus de fécondation *in vivo* (68 % contre 58 % en *in vitro*). Le test du log-rank confirme une différence statistiquement significative entre les courbes de survie des deux lots ($p < 0,001$).

Ces écarts sont principalement portés par les pertes embryonnaires précoces, survenant avant 14 jours de gestation. À l'inverse, les pertes embryonnaires semi-tardives, tardives et les pertes fœtales précoces (entre J14 et J63) sont globalement comparables, bien que certaines années, comme 2023 (*in vitro*) et 2024 (*in vivo*), se distinguent par des taux d'arrêts de gestation plus élevés pour cet intervalle.

L'analyse par année montre que 2023 est associée aux taux de survie embryonnaire et fœtale les plus élevés pour les deux modes de fécondation, avec une différence significative par rapport aux autres années.

L'analyse multivariée a mis en évidence plusieurs facteurs associés de manière significative à la mortalité embryonnaire et fœtale. Pour les embryons issus de fécondation *in vivo*, deux variables sont significatives : un nombre plus élevé d'embryons récoltés est associé à une diminution du risque de perte (HR = 0,71), tandis que la saison estivale augmente ce risque comparativement au printemps (HR = 1,59). En revanche, les transferts réalisés en hiver n'ont pas montré de différence significative. En ce qui concerne la réutilisation des juments receveuses après un arrêt de gestation post-transfert antérieur survenues au cours de l'année du transfert, une tendance non significative à l'augmentation du risque de mortalité est observée pour ces embryons issus de fécondation *in vivo*.

Pour les embryons issus de fécondation *in vitro*, trois facteurs sont associés de manière significative à une augmentation du risque de mortalité embryonnaire ou fœtale : la réalisation d'un sexage embryonnaire (HR = 2,28 ; $p < 0,001$), la réutilisation de juments receveuses au cours de la même année après un arrêt de gestation antérieur après un transfert précédent (HR = 1,51 ; $p = 0,022$), et la saison estivale au moment du transfert (HR = 1,47 ; $p = 0,014$). À l'inverse, aucune différence significative n'a été observée pour les transferts réalisés en hiver par rapport au printemps ($p = 0,80$).

En revanche, ni l'âge des juments receveuses, ni les facteurs génétiques des juments donneuses et des étalons n'ont montré d'influence significative sur la mortalité embryonnaire et fœtale après transfert. De même, le sexe embryonnaire n'a pas présenté d'effet significatif (HR = 1,66

; $p = 0,222$), bien qu'une tendance à un risque accru ait été observée chez les embryons sexés mâles et que l'effectif de la sous-population permettant l'analyse est limité.

Le stade du cycle de la jument receveuse, évalué par le nombre de jours post-ovulation au moment du transfert, n'a pas été significativement associé au risque d'arrêt de gestation, que ce soit pour les transferts d'embryons *in vivo* ou *in vitro*. Bien qu'il ait initialement été inclus dans le modèle pour les embryons *in vitro* sur la base du seuil de sélection univariée, il a finalement été écarté par la procédure de régression *stepwise*, suggérant un effet non significatif dans le modèle multivarié final.

B. Validité des résultats

1. Constitution de la base des données et exclusions de cas

a) Représentativité de l'échantillon étudié par rapport à la population initiale

L'étude repose sur l'analyse rétrospective de l'ensemble des transferts embryonnaires réalisés entre 2021 et 2024 au sein du Haras de Hus, structure spécialisée dans la reproduction équine de chevaux de sport. La population étudiée est donc représentative des pratiques de reproduction rencontrées dans la filière équine de sport européenne (Stout 2020; IFCE - Equipédia 2015; Clutton-Brock, Cuervo-Arango, Arrondo 2023), notamment car ces méthodes de reproduction assistée permettent de ne pas interrompre les carrières sportives des juments donneuses (Campbell 2014).

L'analyse de l'ensemble des 1 639 transferts initialement recensés révèle une évolution progressive des pratiques reproductives, parfaitement retrouvée dans l'échantillon de 1 339 transferts analysés. En 2021, les transferts d'embryons produits *in vivo* dominaient (275 contre 168 pour les *in vitro*). Dès 2022, cette tendance s'est inversée au profit de la fécondation *in vitro*, qui s'impose progressivement sur les trois années suivantes (242, 231 et 171 transferts *in vitro* respectivement).

Cette transition traduit l'adoption croissante des biotechnologies avancées telles que l'ICSI dans l'élevage équin de sport (IFCE - Equipédia 2015; Stout 2020).

Parallèlement, le nombre total de transferts réalisés annuellement est resté relativement stable durant les trois premières années (443 en 2021, 441 en 2022, 433 en 2023), avant de chuter à 322 en 2024. Des considérations économiques, telles que le coût croissant des biotechnologies de la reproduction équine (location de juments receveuses, suivi gynécologique, frais techniques), peuvent jouer un rôle dans la diminution du recours global à ces techniques (ANPFS 2024). Cette diminution ne s'inscrit cependant pas dans une tendance continue, mais semble liée à un événement ponctuel : la vente aux enchères de l'ensemble des chevaux et des embryons du Haras de Hus en juin 2024, dans le cadre d'une cessation d'activité partielle, a pu fortement désorganiser la saison de reproduction (Studforlife 2024).

Après l'exclusion de certains transferts qui a mené la population de 1 639 transferts recensés à 1 339 transferts étudiés, la répartition entre les deux modes de fécondation reste équilibrée, avec 665 transferts d'embryons produits *in vivo* et 674 transferts d'embryons issus de fécondation *in*

vitro. La conservation de cet équilibre entre les lots garantit l'absence de distorsion majeure susceptible d'affecter la comparabilité des modes de fécondation dans l'analyse statistique.

L'échantillon analysé est ainsi représentatif de la clientèle du Haras de Hus et reflète les tendances actuelles de la reproduction équine assistée en France et en Europe. Cet échantillon constitue donc une base pertinente pour une comparaison fiable des taux de mortalité embryonnaire et fœtale entre les embryons issus de fécondation *in vivo* et ceux issus de fécondation *in vitro*.

b) *Données manquantes et transferts exclus de l'étude*

Sur les 1 639 transferts embryonnaires initialement recensés, 300 transferts ont été exclus de l'analyse en raison de données incomplètes ou inexploitable.

Neuf transferts ont été supprimés car réalisés sur des embryons produits *in vivo*, implantés ou récoltés à l'extérieur du Haras de Hus. Ces transferts, tous issus de la saison 2022, ont été exclus en raison de suivis incomplets et potentiellement liés à des pratiques de manipulation différentes. Parmi ces 9 transferts, 3 ont donné lieu à un échec de gestation à 14 jours, tandis que 6 ont abouti à une gestation de 63 jours (2 femelles et 4 mâles).

Le deuxième motif d'exclusion concerne les suivis échographiques incomplets : 259 transferts ont été exclus de l'analyse car des diagnostics de gestation manquants rendaient impossible la connaissance de l'issue de la gestation et donc la détermination d'une éventuelle perte embryonnaire ou fœtale.

De plus, 22 transferts ont été écartés car au moins un des diagnostics intermédiaires de gestation était manquant, empêchant de dater précisément l'instant de l'événement d'interruption de gestation dans l'analyse de survie. Ces exclusions concernaient autant d'embryons produits par fécondation *in vivo* (11) que par fécondation *in vitro* (11). Tous ces transferts correspondaient à des pertes survenues entre 14 et 63 jours de gestation (**Annexe 3**). Ces 22 transferts représentaient 7% des 300 transferts exclus, ce qui est comparable à ce qui est observé dans l'échantillon conservé, il n'y a donc *a priori* pas de biais de résultat.

Enfin, le dernier motif d'exclusion concerne l'absence de date de naissance des juments receveuses. Dix transferts impliquaient des juments extérieures au Haras de Hus, pour lesquelles aucune date de naissance n'était renseignée, empêchant ainsi le calcul de l'âge au moment du transfert. Parmi ces 10 cas, 4 concernaient des embryons issus de fécondation *in vitro* et 6 des embryons issus de fécondation *in vivo*. Concernant l'issue de ces transferts, 2 embryons ont abouti à une gestation de 63 jours (un mâle et une femelle), tandis que 8 ont présenté une interruption de gestation (6 échecs à 14 jours, 2 échecs à 28 jours) (**Annexe 4**).

Ces 300 transferts, représentant 18,3 % de la population initiale, ont été exclus de manière homogène sur l'ensemble des années et des modes de fécondation. L'équilibre entre les lots est resté préservé à chaque étape, limitant le risque de biais de sélection.

L'impact de ces exclusions sur la robustesse des résultats a été vérifié après chaque étape de nettoyage de la base. Les courbes de survie de Kaplan-Meier sont restées parfaitement superposables à chaque stade d'exclusion et le test de log-rank est resté significatif tout au long

du processus ($\text{Chi}^2 = 14,4$; $p < 0,0001$), confirmant la stabilité des différences observées entre les modes de fécondation.

L'application de ces critères d'exclusion a permis de sécuriser la qualité des analyses multivariées, notamment pour le modèle de Cox, en limitant l'introduction de données censurées imprécises ou partiellement renseignées.

En parallèle, certaines données manquantes ont pu être reconstituées *a posteriori* grâce aux informations issues des naissances enregistrées dans la base IFCE. Ainsi, la viabilité de la gestation a été déduite, en l'absence d'échographie intermédiaire, pour 30 cas au DG45 et 18 cas au DG28.

c) Robustesse des diagnostics et des variables

La fiabilité de l'étude repose sur des définitions méthodologiques précises, garantissant la cohérence des données utilisées.

L'échec d'un transfert embryonnaire, ou la mortalité embryonnaire précoce, est défini comme l'absence de visualisation échographique d'une vésicule gestationnelle à 14 jours de gestation (DG14). En présence d'un diagnostic initial positif, un arrêt de gestation est identifié dès qu'un diagnostic ultérieur (DG28, DG45 ou DG63) devient négatif. Les interruptions de gestation, quel qu'en soit le stade, sont considérées comme des événements dans l'analyse de survie, à condition que la date du diagnostic soit connue.

En matière de fiabilité diagnostique, l'échographie transrectale est reconnue comme le test le plus fiable pour identifier une vésicule embryonnaire à 14 jours de gestation (Renaudin, Conley 2023; McKinnon et al. 2011). La détection d'éventuels kystes utérins afin de réaliser une sorte de cartographie utérine préalable permet de distinguer les kystes utérins, fixes et de taille stable, des vésicules embryonnaires, mobiles et croissantes, réduisant ainsi le risque de faux positifs et améliorant la spécificité du diagnostic (Stanton, Steiner, Pugh 2004).

À partir de 28 jours de gestation, l'observation de l'activité cardiaque constitue un critère majeur de viabilité, celle-ci étant détectable dès le 25^{ème} jour (Ginther 1995). À 45 et 63 jours, la viabilité fœtale est systématiquement confirmée par l'identification de l'activité cardiaque et par l'évaluation du développement de l'amnios et de l'allantoïde (Brinsko, Blanchard 2011; Ginther 1995)

En conclusion, les diagnostics échographiques réalisés dans cette étude sont basés sur des repères physiologiques robustes, largement décrits dans la littérature, ce qui garantit la fiabilité des données utilisées dans les analyses de survie.

d) *Ecart au protocole*

Les juments receveuses ont été échographiées, en principe, toutes les 24 heures. Le stade du cycle au moment du transfert embryonnaire, exprimé en nombre de jours post-ovulation, a été déterminé en considérant le jour où l'ovulation a été constatée comme le jour 0 (J0). Toutefois, chez certaines juments, un intervalle de 48 heures s'est écoulé entre deux examens, au lieu de 24 heures, ce qui a entraîné une incertitude d'une demi-journée dans le calcul.

Par exemple, une jument échographiée le lundi sans signe d'ovulation, puis de nouveau le mercredi où l'ovulation avait été constatée, aurait également pu présenter une ovulation visible dès le mardi si un contrôle intermédiaire avait été réalisé. Dans ce cas, si un embryon a été transféré le dimanche, la jument pouvait être considérée à J4 ou à J5. Pour standardiser les données et permettre une analyse cohérente, ces situations ont été codées comme J4,5.



Figure 26 - Schéma explicatif des stades de cycle des juments receveuses

2. Méthodologie statistique et limites analytiques

a) *Choix des variables d'étude*

Pour comparer les taux de mortalité embryonnaire et fœtale dans les deux lots selon le mode de fécondation (*in vivo* ou *in vitro*), différentes variables ont été étudiées :

- Les résultats des diagnostics de gestation à 14 jours, 28 jours, 45 jours et 63 jours,
- L'effet de la jument donneuse (Claes et al. 2019; Campbell 2014; Vogelsang, Vogelsang 1989; Fonte et al. 2024; Marinone et al. 2015),
- L'effet de l'étalon donneur,
- L'effet de la jument receveuse avec son âge au moment du transfert ((Ball, Hillman, Woods 1987; Donato et al. 2023), le degré de synchronisation utérine avec l'embryon (Wilsher, Clutton-Brock, Allen 2010; Wilsher, Lefranc, Allen 2012; Cuervo-Arango, Martín-Peláez, Claes 2020), estimé par le nombre de jours post-ovulation au moment du transfert, ainsi que le nombre de réutilisations de cette jument, que ce soit au cours d'une même année ou cumulées sur l'ensemble de la période d'étude, dans les cas où elle avait présenté un ou plusieurs arrêts de gestation après des transferts précédents (Donato et al. 2023; Newcombe, Wilsher, Cuervo-Arango 2022),
- L'effet de la saison du transfert (Squires, Iuliano, Shideler 1982; Squires, Garcia, Ginther 1985; Fanelli et al. 2022),
- L'effet du nombre d'embryons fécondés *in vivo* collectés d'une même jument donneuse,
- L'effet de la réalisation d'un sexage embryonnaire des embryons fécondés *in vitro*.

Le choix de ces variables reflète un équilibre entre pertinence biologique, représentativité et contraintes méthodologiques liées aux effectifs disponibles. Toutefois, certaines informations, bien que potentiellement déterminantes, n'ont pas pu être incluses en raison d'un recueil incomplet ou hétérogène. C'est le cas, par exemple, de la technique d'insémination utilisée pour produire les embryons *in vivo* (sperme congelé, réfrigéré ou frais), de l'âge de la jument donneuse au moment de la ponction folliculaire ou de la récolte d'embryons, de sa fertilité par cycle et de sa parité, ou encore de l'âge de l'étalon au moment de la récolte de sperme. Les races n'ont pas non plus été recensées, empêchant toute comparaison avec une étude ayant montré un taux de gestation plus élevé pour les embryons issus de juments de saut d'obstacles que pour ceux de juments de polo (68 % vs 43 %; $P < 0,05$) (Clutton-Brock, Cuervo-Arango, Arrondo 2023; Fonte et al. 2024). Le vétérinaire ayant réalisé le transfert d'embryon, qu'il s'agisse du Dr Hubert Terris ou du Dr Laure Normandin, n'a pas été inclus parmi les variables analysées. Dans l'étude de Squires et al. (Squires, Iuliano, Shideler 1982; Squires, Garcia, Ginther 1985), il est rapporté que le technicien n'influence pas le taux de récupération embryonnaire lors d'une récolte d'embryon ($p > 0,05$), les données ayant été regroupées malgré des taux de 71,4 % et 60,7 %. Toutefois, cette même étude montre un effet significatif du technicien sur le taux de gestation après transfert, avec un taux de 46,2 % pour le technicien le plus expérimenté, contre 7,7 % pour l'autre. Ici, les deux vétérinaires impliqués présentent une expérience comparable dans la technique de transfert ; leur identité n'est donc pas considérée comme un facteur discriminant dans cette analyse.

Concernant les embryons issus d'OPU-ICSI, les données relatives aux ponctions folliculaires, comme le nombre de ponctions réalisées, leur répartition dans le temps, le taux de succès ou le nombre d'ovocytes matures récupérés, n'ont pas pu être exploitées en raison d'une centralisation partielle de ces informations (Jacobson et al. 2010; Fonte et al. 2024; Claes, Stout 2022). En revanche, ces paramètres semblent essentiellement influencer le taux de succès des ponctions folliculaires, de la maturation ovocytaire de l'ICSI et du taux de blastocystes obtenus *in vitro* et avoir moins ou pas d'influence sur le taux de survie après transfert. De même, les durées de congélation des embryons, parfois variables entre les cas, n'étaient pas renseignées. La note d'état corporel (NEC) de la jument receveuse au moment du transfert (Hallman, Karikoski, Kareskoski 2023), le nombre de corps jaunes présents sur les ovaires (Cuervo-Arango et al. 2018), ainsi que les antécédents de subfertilité des reproducteurs, qu'il s'agisse de la donneuse (Vogelsang, Vogelsang 1989) ou de la receveuse (Donato et al. 2023), sont autant de paramètres qui n'ont pu être intégrés malgré leur potentiel impact sur le devenir de la gestation.

Ainsi, les analyses réalisées s'appuient sur des variables des plus robustes et des plus systématiquement renseignées. Si cette approche permet une modélisation fiable, elle laisse néanmoins ouverte la voie à des études futures intégrant de façon plus exhaustive les paramètres reproductifs individuels des juments et des étalons.

b) Limites du modèle de survie (Kaplan-Meier et Cox)

Les courbes de Kaplan-Meier, tout comme le test du log-rank, se limitent à une lecture bivariée, sans possibilité d'ajustement sur d'éventuelles covariables. Le modèle de Cox, bien que multivarié, repose sur l'hypothèse que les rapports de risques restent constants dans le temps. Dans cette étude, cette condition reste difficile à vérifier : le nombre restreint de temps de suivi (J14, J28, J45, J63) empêche toute variation continue des résidus. Les tests de Schoenfeld ne sont donc pas interprétables, ce qui fragilise la validation du modèle. À cela s'ajoute une

fréquence réduite de certains événements, notamment les pertes tardives entre 45 et 63 jours, limitant la puissance statistique et augmentant l'imprécision des estimations. C'est donc dans cette optique d'analyse de la dynamique temporelle des pertes qu'ont été effectués les différents tests de Chi².

De plus, le modèle de Cox repose sur l'hypothèse que l'effet d'une variable reste constant au cours du temps. Il en résulte une limitation importante : il ne permet pas d'identifier les périodes où l'impact de certains facteurs est maximal. Il ne permet pas, par exemple, de déterminer si l'effet du sexage embryonnaire se manifeste préférentiellement en phase précoce ou tardive de gestation. De même, l'influence de la saison au moment du transfert, du nombre de réutilisations de juments receveuses ayant subi un ou des arrêts de gestation après des transferts précédents, ou encore du nombre d'embryons *in vivo* récoltés chez la donneuse, est modélisée comme stable dans le temps. Pourtant, ces effets pourraient varier selon les stades gestationnels. Cette hypothèse de proportionnalité, non vérifiable dans ce jeu de données du fait des temps de suivi discontinus, constitue une limite majeure à l'interprétation dynamique des facteurs de risque.

C. Analyse des résultats

1. Influence du mode de fécondation sur la survie embryonnaire et fœtale

a) Une mortalité plus importante des embryons in vitro confirmée par la littérature

Pour analyser nos résultats, il est nécessaire de les confronter aux taux de succès reconnus. Avec une jument donneuse fertile, le taux attendu de récupération embryonnaire est d'environ 75 %, et le taux de gestation après transfert d'environ 75 % également (Hinrichs 2018), soit un taux global de gestation par cycle avoisinant 50 % (Squires, McCue, Vanderwall 1999; Vogelsang, Bondioli, Massey 1985). Dans notre étude, la probabilité de survie à 14 jours pour les embryons produits *in vivo* atteint précisément ce chiffre, validant la performance du programme sur cette étape.

Les résultats obtenus dans notre étude au Haras de Hus révèlent une différence marquée de survie entre les embryons produits *in vivo* et ceux issus de la technique OPU-ICSI. La probabilité de survie à 63 jours des fœtus issus de fécondation *in vitro* atteint 58 %, une valeur cohérente avec les données cliniques récentes. En effet, dans une étude portant spécifiquement sur des embryons produits *in vitro* cryoconservés par congélation lente (Claes et al. 2019), il est rapporté un taux de gestation initial de 56 %, qui se stabilise à 48 % après 37 jours, soit une perte embryonnaire de 16 %. Ces valeurs, très proches de celles observées dans notre étude, confirment une mortalité embryonnaire et fœtale avoisinant les 40-50 % dans les programmes OPU-ICSI et soulignent que même après une congélation considérée comme réussie, la fragilité intrinsèque de l'embryon produit *in vitro* persiste. Plus récemment, les mêmes auteurs ont rapporté une nette amélioration des performances initiales, avec un taux de gestation atteignant 77,7 % entre 7 et 10 jours post-transfert (Claes, Stout 2022). Néanmoins, le taux de poulains nés vivants reste limité à environ 60 %, ce qui souligne qu'une part importante d'arrêts de

gestation survient après le diagnostic précoce, et que la mortalité embryonnaire ou fœtale reste une caractéristique persistante des embryons issus d'OPU-ICSI.

La courbe de survie des embryons ICSI, qui diverge précocement de celle des embryons *in vivo* et reste inférieure, est une observation également validée par d'autres études. Il a été démontré que même après un début de gestation après transfert, les embryons ICSI présentent un taux de perte de gestation entre 15 et 60 jours significativement plus élevé (17%) que celui des embryons *in vivo* (4%) (Morris, Weiss, Maclellan 2022). Cela suggère que la production *in vitro* peut entraîner des modifications, potentiellement épigénétiques, qui ne compromettent pas uniquement le développement précoce mais affectent également la capacité de l'embryon à poursuivre son développement au-delà de J14 et à établir une placentation fonctionnelle. Cependant, dans notre étude, bien que la survie globale soit plus faible chez les embryons issus d'OPU-ICSI, aucune différence significative n'a été observée entre les deux modes de fécondation en ce qui concerne les pertes de gestation survenant entre 14 et 63 jours ($p = 0,087$). Le taux d'arrêt de gestation entre J14 et J63 s'élève à 9,1 % (45/496) pour les embryons produits *in vivo*, contre 12,8 % (57/447) pour ceux issus de fécondation *in vitro*. Ce résultat suggère que les écarts de viabilité observés entre les deux techniques sont principalement liés à la phase embryonnaire précoce, avant le premier diagnostic échographique à 14 jours.

b) *Les mécanismes potentiels de la fragilité des embryons ICSI*

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la vulnérabilité accrue des embryons ICSI, certains étant spécifiques à l'espèce équine. La formation défectueuse de la capsule embryonnaire représente un facteur explicatif majeur. Cette structure acellulaire, essentielle à la protection embryonnaire, ne se forme correctement qu'à la suite d'une interaction complexe entre l'embryon et un endomètre réceptif (Kovascy, (Twink) Allen, Wilsher 2022). Les embryons produits *in vitro* sont dépourvus de capsule et sont transférés à un stade de blastocyste alors que les embryons *in vivo* gagnent la cavité utérine à un stade de jeune blastocyste ou parfois de morula (Kovascy et al., 2022). Peut-être que certains embryons *in vitro* sont placés un peu trop tardivement dans l'utérus des juments receveuses, à un stade un peu trop avancé pour leur permettre une synthèse correcte de la capsule. Un défaut ou une anomalie de cette étape pourrait les rendre potentiellement plus vulnérables à l'environnement utérin et contribuant à la mortalité précoce observée.

La sensibilité particulière de l'embryon équin à l'environnement utérin constitue un facteur aggravant. Contrairement à d'autres espèces, l'embryon équin semble incapable d'accélérer son développement pour compenser un utérus trop avancé (Wilsher et al., 2012), alors que le mouton peut moduler sa vitesse de clivage en réponse à un environnement utérin asynchrone (Pope 1988). Cette rigidité du programme développemental pourrait être un facteur aggravant la mortalité pour les embryons produits *in vitro*. Leur développement en culture, potentiellement déjà ralenti ou perturbé, les rendrait d'autant plus vulnérables à une synchronisation imparfaite avec l'endomètre post-transfert, contribuant ainsi à la mortalité supérieure constatée. Cependant, il apparaît que le stade post-ovulation de la jument receveuse le jour du transfert (qui peut être considéré en retard par rapport au stade de développement des embryons *in vivo* et *in vitro*) n'influence pas de manière majeure les taux de mortalité embryonnaire aussi bien précoce que tardive (Jacob et al. 2012).

Les altérations de la cinétique du développement représentent un autre mécanisme explicatif de la mortalité supérieure des embryons issus d'OPU-ICSI. Une étude très récente comparant la technique de fécondation *in vitro* classique, mentionnée en introduction (Felix et al. 2022), à l'ICSI, démontre que, malgré des taux de production de blastocystes similaires, les embryons ICSI présentent un développement significativement plus lent (Martin-Pelaez et al. 2025). Cependant, les embryons à développement ralenti présentent des taux de gestation inférieurs et un risque accru de perte, même lorsqu'ils atteignent le stade de blastocyste (Claes, Stout 2022). Cette cinétique retardée, associée à l'incapacité de l'embryon équin à ajuster son rythme de développement à l'environnement utérin, pourrait expliquer une part significative de la mortalité observée dans notre étude. Un autre étude clinique rétrospective déjà citée (Claes et al. 2019) confirme cette hypothèse : ils ont observé que le taux de perte embryonnaire tendait à être plus élevé (19,8 %) pour les embryons ayant mis plus de 8 jours à atteindre le stade blastocyste, contre seulement 10 % pour ceux s'étant développés plus rapidement. De plus, il est démontré que la taille de la vésicule embryonnaire au premier diagnostic est significativement plus petite pour les gestations qui seront perdues par la suite, associant directement une croissance post-transfert ralentie à un risque accru d'échec.

Chez les autres espèces, il a été montré que les embryons produits par fécondation *in vitro* classique ou par ICSI sont morphologiquement différents des embryons produits *in vivo* avec, pour un même stade de développement, moins de cellules embryonnaires, souvent équipées de mitochondries moins nombreuses et morphologiquement différentes (Lazzari et al. 2002). La structure de la zone pellucide est également différente, tout comme leur aptitude à être cryoconservés.

Ce retard de développement observé en ICSI pourrait provenir de la nature même de la technique. L'injection mécanique du spermatozoïde, qui contourne les processus de sélection membranaire, et l'aspiration d'une partie du cytoplasme peuvent perturber l'activation ovocytaire et l'initiation du développement embryonnaire (Martin-Pelaez et al. 2025). Ces interventions, bien qu'elles n'empêchent pas la formation d'un blastocyste, pourraient expliquer sa fragilité ensuite.

La différence fondamentale de survie entre les embryons produits *in vivo* et par OPU-ICSI trouve probablement l'une de ses origines au moment même de la fécondation. En effet, l'injection d'un spermatozoïde par ICSI ne déclenche les oscillations calciques nécessaires à l'activation de l'ovocyte que dans 38% des cas (Bedford et al. 2003), contrairement à la fécondation naturelle où cette activation est systématique. Cette absence ou irrégularité du signal calcique constitue vraisemblablement un facteur limitant majeur dans la réussite de la fécondation *in vitro*. À l'inverse, la fécondation *in vivo* assure une activation ovocytaire complète, ce qui pourrait en partie expliquer les taux de gestation plus élevés, observés après transfert d'embryons frais produits naturellement.

Lors d'ICSI, le choix de sélection du spermatozoïde fécondant est fait par le technicien au laboratoire alors que, lors de fécondation *in vivo*, il y a une sélection des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles qui peut sans doute conduire à une sélection plus pertinente pour la production d'embryons viables (Leemans B., Van Soom A., Hoogewijs M. 2015).

Par ailleurs, la réussite de la production embryonnaire *in vitro* par ICSI dépend également de nombreux facteurs non intégrés dans notre analyse, notamment l'âge et la race de la jument donneuse, la saison de la ponction, ou la phase du cycle œstral lors de la ponction folliculaire.

Les juments âgées de 6 à 15 ans, ainsi que les races de type *Warmblood* ou Quarter Horse, montrent des rendements embryonnaires supérieurs (Fonte et al. 2024). Ces variables, non recensées dans cette étude, pourraient contribuer aux taux de mortalité embryonnaire légèrement supérieurs observés dans les transferts d'embryons *in vitro* comparativement aux transferts d'embryons frais produits *in vivo*.

Un autre facteur majeur de différence est que les embryons ICSI de cette étude ont tous été congelés, contrairement aux embryons *in vivo*. Il est probable que la cryoconservation entraîne à elle seule des dommages cellulaires qui peuvent se révéler délétères chez une partie des embryons. Dans l'espèce bovine, les taux de gestation après transfert d'embryons produits *in vivo* sont principalement plus faibles lors de transfert d'embryons préalablement cryoconservés par rapport à des embryons frais (Hasler 1998).

Enfin, le grade morphologique embryonnaire constitue par ailleurs un facteur prédictif majeur du maintien de la gestation. La probabilité de gestation diminue de 87 % à chaque augmentation du grade embryonnaire, c'est-à-dire à chaque diminution de la qualité (Morris, Weiss, Maclellan 2022). Néanmoins, les embryons transférés dans notre étude ayant été sélectionnés par le laboratoire Avantea selon des critères stricts de qualité morphologique et de stade (blastocyste) (Arnold et al. 2025), ce facteur ne devrait pas constituer une source de biais majeure dans l'interprétation de nos résultats.

2. Effets de l'année et de la saison de transfert

Les résultats de cette étude montrent que certaines périodes de transfert, notamment les étés les plus récents, sont associées à une augmentation marquée de la mortalité embryonnaire. À l'inverse, les périodes printanières apparaissent globalement plus protectrices, avec une réduction significative du risque de perte embryonnaire et fœtale.

L'influence saisonnière constitue l'un des facteurs les plus anciennement documentés en transfert d'embryon équin. Les études pionnières ont révélé des effets drastiques, rapportant par exemple, l'absence totale de gestation lors de transferts printaniers (0/12), contrastant avec plus de 50% de succès durant la période estivale (Squires, Iuliano, Shideler 1982). Certaines études ultérieures ont confirmé des taux de gestation significativement plus faibles au printemps par rapport à la pleine saison estivale (Squires et al., 1985). Si aujourd'hui les protocoles de gestion des receveuses ont permis d'atténuer ces extrêmes, nos données, révélant une mortalité accrue en été, confirment que la saisonnalité demeure un facteur d'influence majeur, qui doit être nuancé car il peut néanmoins varier selon le contexte climatique, probablement en fonction des conditions climatiques spécifiques, de la latitude géographique mais aussi du réchauffement climatique actuel.

Notre résultat, bien qu'en contradiction avec certaines études nord-américaines plus anciennes qui décrivaient un pic de fertilité en été, trouve un écho dans des travaux européens plus récents. En effet, une étude menée en Italie a également rapporté une diminution significative des taux de gestation durant les mois de juillet et août (Fanelli et al. 2022). Ces observations suggèrent que l'optimum saisonnier pour la reproduction équine pourrait varier selon la latitude.

Dans des conditions climatiques tempérées comme celles de notre étude, le milieu de l'été pourrait constituer une période de stress, qu'il soit thermique ou d'autre nature, préjudiciable à la réceptivité utérine ou au maintien précoce de la gestation. L'étude de Fanelli et al. (2022) attribue cet effet saisonnier principalement à la jument receveuse, impliquant que la photopériode et les conditions environnementales associées modulent directement la compétence utérine à initier et maintenir la gestation. L'augmentation de la mortalité embryonnaire et fœtale précoce estivale, observée dans notre population d'étude, pourrait donc résulter d'une altération de la réceptivité endométriale durant cette période, indépendamment de la qualité embryonnaire.

L'effet de températures élevées sur la mortalité embryonnaire et sur la qualité intrinsèque des ovocytes a fait l'objet de plusieurs études, non seulement pour l'espèce équine, mais aussi pour l'espèce bovine en particulier. Certaines montrent un effet délétère de températures extérieures élevées sur la survie des embryons produits *in vivo* voire *in vitro*. Certaines autres, en revanche, ne montrent pas d'effet significatif. Ces données divergentes s'expliquent peut-être par des effets croisés avec d'autres facteurs.

L'effet bénéfique du printemps sur la survie embryonnaire pourrait aussi découler d'un équilibre hormonal optimal. C'est durant cette saison que la diminution progressive de la sécrétion de mélatonine, induite par l'allongement des jours, lève l'inhibition de l'axe gonadotrope et assure un démarrage robuste de la cyclicité. Il est possible que les concentrations de mélatonine, bien qu'en baisse par rapport à l'hiver, restent suffisantes pour exercer leurs effets cytoprotecteurs locaux. La mélatonine a effectivement démontré son rôle bénéfique sur la qualité ovocytaire et la protection endométriale chez la jument (Alves et al., 2021; Han et al., 2022).

À l'inverse, la période estivale, caractérisée par les durées de sécrétion, et sans doute des concentrations de mélatonine les plus faibles, ainsi qu'un stress environnemental potentiellement accru, pourrait représenter un environnement moins favorable au maintien de la gestation, ce qui expliquerait la mortalité accrue que nous avons observée.

Une étude récente a évalué l'ajout de mélatonine dans des conditions de maturation à taux d'oxygène réduit. Ce protocole, spécifiquement conçu pour limiter le stress oxydatif, n'a montré aucun bénéfice significatif de la mélatonine sur les taux de maturation, de clivage ou de production de blastocystes (Foss 2023). Cette observation indique que les bénéfices de tels suppléments dépendent fortement des conditions de culture initiales, leur effet pouvant être masqué lorsque le système est déjà optimisé pour minimiser le stress oxydatif.

3. Effets individuels de la jument donneuse

Il est essentiel de rappeler que la technique d'OPU-ICSI, bien que très performante, reste fortement dépendante de la qualité ovocytaire de la jument donneuse. L'injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde ne permet pas de compenser une compétence intrinsèque déficiente de l'ovocyte (Hinrichs 2018). Par conséquent, une partie de la mortalité embryonnaire observée dans notre population d'embryons *in vitro* pourrait être attribuée à la qualité sub-optimale des gamètes, plutôt qu'à un échec du protocole de culture ou de transfert.

Plusieurs études confirment que des facteurs tels que l'âge, la race, la saison ou encore le statut reproducteur de la jument influencent significativement les rendements embryonnaires après ICSI (Fonte et al. 2024). Ce constat est renforcé par les données d'études plus anciennes (Vogelsang, Vogelsang 1989), qui montrent que les juments donneuses subfertiles, définies comme restant vides pendant au moins deux années consécutives, présentent des taux de réussite significativement inférieurs. Leurs résultats indiquent une baisse marquée du taux de récupération embryonnaire, un taux de gestation post-transfert significativement plus faible et une fréquence accrue de pertes embryonnaires chez les receveuses ayant reçu des embryons issus de ces juments.

Les taux de gestation des embryons récoltés sur des juments nullipares ou ayant pouliné récemment étaient significativement plus élevés ($p < 0,05$) que ceux des embryons issus de juments subfertiles. De plus, les pertes embryonnaires étaient significativement moins fréquentes lorsque les embryons provenaient de juments jeunes ou récemment fertiles ($p < 0,05$). Ces observations suggèrent que la baisse de fertilité des juments subfertiles ne s'explique pas uniquement par un environnement utérin altéré, mais pourrait également résulter d'une viabilité embryonnaire compromise dès la production. La qualité intrinsèque des ovocytes semble donc jouer un rôle déterminant dans le succès de la gestation, même lorsque le transfert est réalisé dans des conditions optimales.

De plus, notre modèle n'ayant pas révélé d'effet significatif de ce facteur sur la mortalité post-transfert, il est en accord avec d'autres études à grande échelle, qui montrent que si l'âge de la donneuse diminue significativement le taux de récolte d'embryons, il n'influence pas les taux de gestation une fois qu'un embryon de bonne qualité a été transféré (Marinone et al. 2015). Cela suggère que la principale baisse de fertilité liée à l'âge de la donneuse se manifeste avant la récolte d'embryon, par une moindre viabilité ovocytaire ou un échec précoce du développement.

Ces éléments soulignent l'importance de prendre en compte le profil reproducteur des juments donneuses dans l'interprétation des résultats, notamment pour les embryons issus d'OPU-ICSI. Il est probable que, parmi les transferts inclus dans notre étude, certains embryons provenaient de juments subfertiles, ce qui pourrait avoir contribué à une augmentation du taux de pertes précoces indépendamment du protocole *in vitro* lui-même.

Par ailleurs, la dispersion observée du nombre d'embryons produits par jument donneuse traduit une stratégie d'utilisation où un petit nombre de juments donneuses est exploité intensivement, tandis que la majorité est sollicitée de manière plus limitée. Une autre explication possible est que certaines juments donneuses qui peuvent être plus ou moins intensivement exploitées mais qui, du fait d'une faible fertilité, ne génèrent que très peu d'embryons.

Pour finir, dans notre étude, bien que le facteur « jument donneuse » n'ait pas montré d'effet significatif dans les modèles multivariés, l'âge des donneuses des embryons sexés doit être considéré avec attention. Il est établi que le vieillissement maternel s'accompagne d'une altération progressive de la qualité ovocytaire. Des travaux récents ont montré que les ovocytes issus de juments âgées présentent une augmentation marquée des anomalies du fuseau méiotique et des défauts d'alignement chromosomique, entraînant un risque accru

d'aneuploïdie embryonnaire (Maclellan et al. 2023). Ces anomalies, incompatibles avec le développement embryonnaire normal, constituent une cause majeure de mortalité précoce.

Dans notre population d'étude, les embryons sexés produits *in vitro* ont été obtenus à partir de juments donneuses nées entre 1997 et 2018. Cette distribution indique que la majorité des ovocytes provenaient de juments relativement âgées au moment de la ponction folliculaire, même si l'âge exact au moment de l'OPU n'était pas toujours disponible. Les observations individuelles confortent cette hypothèse : l'embryon provenant de la jument née en 2018 a poursuivi sa gestation au moins jusqu'à J63, tandis que les embryons issus de donneuses plus âgées ont présenté un taux de perte plus élevé, notamment ceux issus des juments nées en 1997, 1999 ou 2007. Cette tendance, bien que fondée sur un effectif réduit, renforce l'idée selon laquelle l'âge avancé des juments donneuses pourrait avoir contribué à la fragilité des embryons *in vitro* sexés, en raison de défauts ovocytaires préexistants.

4. Effet de la jument receveuse

a) *Effet âge de la jument receveuse*

Contrairement à nos attentes et à certaines données de la littérature, notre analyse multivariée n'a pas mis en évidence d'association significative entre l'âge de la jument receveuse et le risque de mortalité gestationnelle. Cette absence d'effet pourrait s'expliquer par les critères de sélection rigoureux appliqués au sein du cheptel de receveuses du Haras de Hus, qui visent à exclure les juments présentant des antécédents de subfertilité ou des anomalies reproductives connues.

Dans une étude expérimentale, Ball et al., (1987) ont montré que les juments âgées peuvent maintenir une gestation embryonnaire avec des taux comparables à ceux de juments jeunes, au moins jusqu'à 28 jours de gestation (Ball, Hillman, Woods 1987). Ces résultats laissent supposer que l'environnement utérin des juments plus âgées pourrait ne pas avoir d'influence sur les mortalités embryonnaires précoces et semi-tardives.

Cette hypothèse d'absence d'effet de l'âge de la jument receveuse peut être discutée par l'analyse d'une population de plus de 1 200 transferts d'embryons (Donato et al. 2023). Les résultats rapportent une augmentation significative des pertes embryonnaires et fœtales entre 14 et 45 jours de gestation, chez les juments receveuses âgées de 10 à 13 ans, avec un taux de mortalité atteignant 15,6 % dans cette tranche d'âge, contre 6,4 % chez les juments plus jeunes (3 à 5 ans). Aucune différence significative n'a toutefois été observée en ce qui concerne les taux de gestation à 14 jours de gestation. Donato et al. suggèrent que l'âge maternel induit des modifications de l'environnement utérin susceptibles de compromettre le maintien de la gestation, sans nécessairement empêcher la fixation embryonnaire.

Ainsi, bien que nos résultats ne mettent pas en évidence de lien statistiquement significatif entre l'âge de la receveuse et les arrêts de gestation post-transfert, il demeure plausible qu'un effet biologique réel soit présent, mais atténué ou masqué par la sélection stricte des juments intégrées dans notre étude.

b) *Importance du stade post-ovulation de la receveuse le jour du transfert*

Nos analyses n'ont pas identifié le jour post-ovulation au moment du transfert comme un facteur de risque significatif de mortalité embryonnaire, que ce soit pour les embryons produits *in vivo* ou issus d'OPU-ICSI. Ce résultat, qui pourrait sembler contre-intuitif au regard des pratiques courantes visant à maximiser la synchronie entre embryon et utérus, est pourtant en accord avec plusieurs données de la littérature.

Dans une étude exclusivement menée sur des embryons produits *in vivo* (Wilsher, Clutton-Brock, Allen 2010), les auteurs ont mis en évidence l'étonnante plasticité de l'embryon équin, capable de s'adapter à une large fenêtre d'asynchronie utérine allant de +2 à -7 jours. Cette capacité d'adaptation explique en partie pourquoi, dans une population de juments receveuses bien gérées, où les décalages extrêmes sont systématiquement évités, le degré de synchronie n'émerge pas comme un déterminant majeur de la survie embryonnaire.

Il convient toutefois de nuancer cette interprétation. L'absence d'effet significatif sur la mortalité n'implique pas l'absence d'un effet biologique. En effet, la même étude de Wilsher et al. (2010) a montré que l'asynchronie, bien que tolérée, influence la cinétique de développement de l'embryon. Un utérus moins avancé entraîne un ralentissement du développement embryonnaire, mécanisme qui permet sa survie immédiate mais pourrait générer une fragilité sous-jacente, le rendant plus sensible à d'autres stress non mesurés dans notre étude.

Cette tolérance de l'embryon à l'environnement utérin a ses limites. Wilsher et al. (2010) ont également démontré qu'un utérus trop avancé (+4 jours) au contraire devient létal pour l'embryon. Ce constat est renforcé par des données expérimentales ultérieures (Wilsher, Lefranc, Allen 2012), qui ont clairement établi qu'un environnement utérin, au-delà de 2 jours d'avance par rapport au stade post-ovulation de la donneuse, entraîne une mortalité embryonnaire, même en présence de niveaux physiologiques de progestérone. Ces travaux montrent que l'échec n'est pas lié à une lutéolyse prématurée, mais bien à un environnement biochimique devenu inapproprié à la poursuite du développement embryonnaire.

Dans notre étude, les protocoles de gestion des juments receveuses ont probablement permis de maintenir une fenêtre de synchronie compatible avec la survie embryonnaire. Pour les embryons *in vivo*, 95 % des transferts ont été réalisés entre J4 et J7 post-ovulation, tandis que pour les embryons issus d'OPU-ICSI, 98 % des transferts ont été effectués entre J4 et J5. L'absence de transferts réalisés dans des conditions d'asynchronie positive extrême pourrait expliquer pourquoi le jour post-ovulation n'apparaît pas comme un facteur de risque dans notre modèle.

La fenêtre de synchronie acceptable est réputée plus étroite pour les embryons issus d'OPU-ICSI, en particulier lorsqu'ils sont cryoconservés (Cuervo-Arango et al., 2020). Ainsi, bien que notre analyse n'ait pas mis en évidence d'effet statistiquement significatif, il reste biologiquement plausible que la survie des embryons *in vitro* soit plus sensible à de faibles variations de synchronie, en raison d'une capacité d'adaptation réduite liée à leur origine et à leur traitement préalable.

c) Effet de la réutilisation de juments receveuses ayant connu un arrêt de gestation après un transfert précédent

Nos observations mettent en évidence un effet délétère de la réutilisation de juments receveuses ayant connu un arrêt de gestation après un transfert précédent dans l'année sur la survie embryonnaire, en particulier pour les embryons issus de fécondation *in vitro* pour lesquels cet effet est significatif. Ce résultat est cohérent avec les données de Donato et al. (2023), qui rapportent une diminution significative des taux de gestation chez les juments receveuses soumises à un troisième transfert au cours de la même saison de reproduction, à la suite d'échecs des deux transferts précédents (Donato et al. 2023). Ces auteurs suggèrent que les échecs répétés reflètent une altération persistante de la réceptivité utérine. Ainsi, la répétition des transferts pourrait révéler une compétence endométriale sous-optimale, qu'elle soit liée à des modifications inflammatoires, dégénératives ou fonctionnelles.

La vulnérabilité des embryons produits *in vitro*, possiblement moins capables de s'adapter à un environnement utérin altéré, pourrait expliquer leur plus grande sensibilité aux antécédents négatifs de la receveuse. La moindre plasticité de ces embryons face à un environnement maternel receveur défavorable constitue une hypothèse crédible, qui pourrait justifier l'effet significatif mis en évidence dans notre analyse.

Un autre facteur, plus difficilement objectivable, pourrait résider dans la variabilité individuelle de la reconnaissance maternelle de la gestation. Il a en effet été démontré que la fenêtre de réceptivité de l'endomètre au signal embryonnaire antilutéolytique varie fortement d'une jument à l'autre, tout en restant stable au sein d'un même individu (Newcombe, Wilsher, Cuervo-Arango 2022). Ainsi, une jument receveuse dont la fenêtre de reconnaissance maternelle est naturellement précoce ou étroite pourrait échouer à maintenir la gestation si l'embryon transféré, notamment s'il est issu d'OPU-ICSI, présente un léger retard de développement. Le signal de reconnaissance serait alors émis trop tard, conduisant à une lutéolyse prématurée et à un arrêt de la gestation, sans qu'aucune anomalie utérine visible ne soit nécessaire pour expliquer l'échec.

Ces considérations doivent toutefois être nuancées par les résultats plus anciens de Ball et al. (1987), qui n'ont pas observé de différence significative de survie embryonnaire à J12 et J28 entre des juments dites subfertiles (biopsies endométriales de grade II ou III, infertilité > 2 ans) et des juments saines, à condition que les embryons transférés soient morphologiquement normaux et que l'utérus soit bien synchronisé. Ce constat souligne que la subfertilité diagnostiquée n'est pas en soi un obstacle absolu à une gestation précoce.

Ainsi, dans notre étude, la répétition d'échecs gestationnels sur une même année apparaît comme un indicateur fonctionnel plus pertinent que les seuls critères histologiques ou cliniques. L'effet observé chez les embryons *in vitro* renforce l'idée que ceux-ci présentent un seuil de tolérance plus étroit aux variations de réceptivité utérine.

La gestion raisonnée des juments receveuses dans notre cohorte reflète cette prudence : la majorité des juments n'ont été utilisées qu'une ou deux fois sur l'ensemble des quatre saisons, limitant les risques liés à une utilisation excessive. En l'absence de consensus scientifique sur le nombre maximal de tentatives, la recommandation empirique, partagée dans la littérature, est de suspendre temporairement l'utilisation d'une jument après deux ou trois échecs successifs

malgré des transferts bien synchronisés. La réalisation d'examen complémentaires (biopsie, dosages hormonaux) est alors indiquée.

Enfin, certaines informations n'étaient pas disponibles dans notre étude, telles que le statut reproducteur initial (nullipare ou non) des receveuses, ou la réutilisation éventuelle après un poulinage (par exemple, une jument gestante en 2021 redevenue receveuse en 2023). Cette limite réduit la précision de notre analyse longitudinale mais n'invalide pas les tendances observées.

5. Impact de la réalisation du sexage embryonnaire sur les taux de mortalité des embryons produits *in vitro*

La question de l'influence du sexage embryonnaire sur la survie gestationnelle reste encore peu documentée dans la littérature équine. Nos résultats démontrent de manière significative que, pour les embryons produits *in vitro*, la réalisation d'un sexage est associée à une augmentation de près de quatre fois du risque de mortalité embryonnaire ou fœtale (HR = 3,71 ; $p < 0,001$). Cette observation est en accord avec une étude récente conduite chez des juments de polo qui a mis en évidence un taux de gestation significativement plus faible pour les embryons produits par OPU-ICSI ayant fait l'objet d'un sexage par biopsie (23,1 %) comparé aux embryons non sexés (56 %) (Clutton-Brock, Cuervo-Arango, Arrondo 2023). Ce résultat suggère que la manipulation embryonnaire nécessaire au sexage pourrait, dans certaines conditions, altérer la viabilité de l'embryon, directement via la biopsie.

Cette fragilité semble spécifique aux embryons produits *in vitro*, puisqu'une étude de grande ampleur menée en Argentine (Riera et al. 2019) sur 459 embryons conçus *in vivo* n'a, à l'inverse, mis en évidence aucune différence de survie entre les embryons biopsiés et les témoins (72,4 % contre 73,0 %). Ce résultat suggère que la biopsie, lorsqu'elle est réalisée sur un embryon conçu *in vivo*, immédiatement transféré après un test PCR rapide, ne nuit pas forcément au maintien de la gestation.

L'élément sans doute le plus marquant de notre étude réside dans le fait que cet effet négatif est observé alors même que la biopsie a été réalisée selon un protocole réputé peu invasif, tel que celui décrit par Lazzari et al. (2020). Ce protocole consiste à aspirer doucement les cellules qui, spontanément, hernient à travers l'ouverture créée par l'injection d'ICSI. Il évite ainsi toute manipulation supplémentaire directe de l'embryon et limite les traumatismes mécaniques.

Néanmoins, cet élément peut être nuancé. En effet, une limite importante de notre étude est l'absence de traçabilité précise quant à la date de production de chaque embryon produit *in vitro*. Le laboratoire Avantea (Crémone, Italie), à l'origine de ces embryons, est reconnu pour sa capacité d'innovation et l'amélioration continue de ses protocoles. Il est donc probable que les embryons produits et biopsiés au début de la période d'étude aient été soumis à des techniques moins récentes que ceux produits en fin de période. Cette évolution technique, non contrôlée dans notre analyse, introduit une hétérogénéité temporelle susceptible d'avoir influencé le maintien de la gestation globale observée. Elle pourrait également expliquer pourquoi, malgré l'utilisation d'un protocole de biopsie qualifié de « doux », un effet délétère persiste.

Au final, nos résultats suggèrent que pour un embryon issu de fécondation *in vitro*, le risque ne tient pas uniquement à l'acte de biopsie lui-même. C'est probablement l'accumulation des contraintes (ponction, culture, congélation, biopsie) qui dépasse le seuil de tolérance de ces embryons, déjà vulnérables par nature.

6. Effet du sexe embryonnaire

Dans notre étude, l'analyse de la mortalité en fonction du sexe embryonnaire n'a révélé aucun effet statistiquement significatif sur la survie embryonnaire et fœtale. Le facteur « sexe embryonnaire » n'a donc pas été retenu dans le modèle multivarié. Toutefois, une tendance à une mortalité plus élevée a été observée chez les embryons mâles, avec un hazard ratio de 1,66 ($p = 0,222$), suggérant une différence biologique potentielle, non significative sur le plan statistique mais possiblement pertinente sur le plan physiologique.

Cette tendance, bien que non concluante, est en accord avec les observations de Claes & Stout (2022), qui suggèrent que les embryons mâles issus de fécondation *in vitro* présentent une cinétique de développement plus rapide que les embryons femelles pendant la phase précoce *in vitro* (Claes, Stout 2022). Cette accélération pourrait refléter un métabolisme plus intense dès les premières étapes du développement, les rendant potentiellement plus sensibles au stress environnemental post-transfert. De plus, un développement plus rapide pourrait être le reflet d'une programmation épigénétique moins stable, ce qui pourrait également contribuer à une plus grande vulnérabilité dans les jours suivant le transfert.

Ainsi, même si nos données ne permettent pas d'établir un lien significatif entre le sexe embryonnaire et le risque de mortalité embryonnaire plus ou moins précoce, les éléments issus de la littérature justifient que cette variable continue d'être surveillée dans les analyses futures, en particulier dans des cohortes de plus grande taille et pour les embryons issus d'OPU-ICSI.

7. Impact du nombre d'embryons récoltés sur les taux de mortalité des embryons produits *in vivo*

Nos résultats révèlent une diminution significative du risque de mortalité embryonnaire et fœtale lorsque plusieurs embryons sont collectés chez une même jument donneuse ($HR = 0,71$; $p < 0,001$). Cette observation suggère que, dans les conditions de notre programme, les cycles à ovulations multiples induites produisent des embryons de meilleure viabilité, ou bien que la présence de plusieurs embryons reflète un environnement utérin particulièrement favorable.

Ce constat contraste toutefois avec des données d'études plus anciennes (Squires, Garcia, Ginther 1985), obtenus sur un total de 11 transferts pour chaque type d'ovulation, simple ou multiple, qui rapportaient une réduction marquée du taux de gestation (27,2 %) pour des embryons issus d'ovulations multiples induites et collectés à J8, comparativement à ceux issus d'ovulations simples (54,5 %). Les auteurs avançaient alors que la stimulation hormonale, ou une éventuelle compétition embryonnaire, pouvait compromettre la survie.

Cette divergence entre ces résultats et les nôtres peut s'expliquer par les importantes évolutions des pratiques de reproduction équine au cours des dernières décennies. Les protocoles actuels d'induction hormonale, les milieux de manipulation embryonnaire et les critères de sélection des juments donneuses sont probablement plus performants. Ces améliorations, prises dans leur ensemble, pourraient expliquer pourquoi, dans les conditions actuelles, la récolte de plusieurs embryons au sein d'un même cycle n'est plus associée à une baisse du maintien de la gestation, mais au contraire à de meilleures performances de survie.

Nos résultats, obtenus sur une population bien plus large (666 transferts d'embryons *in vivo* entre 2021 et 2024), suggèrent au contraire un effet bénéfique d'un nombre augmenté d'embryons *in vivo* récoltés : la survie embryonnaire et fœtale s'avère significativement meilleure (HR = 0,71 ; $p < 0,001$). Ce constat est confirmé par les taux d'échec cumulés de J14 à J63 : 9,9 % pour les embryons uniques ($n = 404$), contre 5,6 % pour les embryons jumeaux ($n = 89$), et 0 % pour les embryons triplés ($n = 3$).

8. Le diagnostic de gestations gémellaire à partir d'embryons issus d'OPU-ICSI

Une autre manifestation de l'altération du développement des embryons produits *in vitro* est leur tendance accrue à la division monozygotique. Nos données révèlent la survenue de ce phénomène dans 3 situations soit 0,2% des transferts étudiés. Bien que rare, l'incidence de vrais jumeaux est significativement plus élevée après le transfert d'un embryon issu d'OPU-ICSI (1,6 %) qu'après le transfert d'un embryon *in vivo* (0 %) (Peere et al. 2022; Dijkstra et al. 2020). Ce phénomène, qui conduit quasi systématiquement à une perte de gestation, peut être interprété comme un signe de la fragilité de la cohésion blastocytaire ou d'une dérégulation des voies de signalisation de l'embryon *in vitro*. Il constitue donc une cause supplémentaire de mortalité, spécifique à ce mode de production.

D. Perspectives et pistes de recherches futures

1. Paramètres en plus à intégrer dans une future étude semblable

L'analyse des facteurs influençant la survie embryonnaire et fœtale après transfert d'embryons équins gagnerait à être approfondie en intégrant certains paramètres encore peu documentés et biologiquement pertinents. Parmi ceux-ci, la qualité du cycle œstral de la jument receveuse apparaît comme un déterminant important de la réceptivité utérine. Les travaux de Cuervo-Arango et al. (2018) ont mis en évidence une corrélation significative entre la durée de l'œstrus précédant le transfert et les taux de gestation obtenus (Cuervo-Arango et al. 2018). Un œstrus court, associé à une imprégnation œstrogénique insuffisante de l'endomètre, pourrait limiter l'expression de gènes de réceptivité et altérer l'environnement utérin de manière subclinique. Ce facteur, non pris en compte dans notre étude, pourrait constituer une source de variabilité non contrôlée, en particulier chez les juments receveuses ayant des cycles induits ou perturbés.

Par ailleurs, plusieurs variables reconnues comme ayant un impact sur la mortalité embryonnaire dans la littérature (statut reproducteur antérieur, simple ou double ovulation)

n'ont pu être intégrées ici que de façon partielle ou indirecte. Il serait donc pertinent, dans une étude future, de construire une analyse multivariée plus exhaustive en incluant :

- La durée de l'œstrus chez la receveuse ;
- L'aspect échographique de l'endomètre de la receveuse avant transfert ;
- Les conditions de culture, de congélation et de transport des embryons ainsi que le temps de conservation congelés ;
- La nature du cycle (spontané ou induit) des juments receveuses ;
- La parité de la jument receveuse.

2. Points forts de l'étude

Enfin, il convient de souligner que la majorité des grandes études rétrospectives publiées jusqu'à présent, dont celle de Donato et al. (2023), portent quasi exclusivement sur des transferts d'embryons frais produits *in vivo*. L'une des forces de notre étude réside précisément dans la possibilité de comparer directement, au sein d'un même haras, et sur une même période, les taux de mortalité embryonnaire et fœtale associés aux deux modes de production embryonnaire, *in vivo* vs. *in vitro* par OPU-ICSI. Cette approche réduit considérablement les biais liés aux différences de gestion ou de conditions environnementales, et permet d'attribuer avec davantage de certitude les différences observées à la nature intrinsèque des embryons eux-mêmes.

Néanmoins, une étude prospective ciblée, intégrant les facteurs manquants identifiés ici, serait nécessaire pour affiner cette interprétation et valider, ou non, les hypothèses formulées.

Conclusion

Conclusion

Cette étude rétrospective, menée sur 1 339 transferts embryonnaires réalisés entre 2021 et 2024 au Haras de Hus, visait à comparer les taux de mortalité embryonnaire et fœtale selon le mode de production des embryons : embryons frais issus de fécondation *in vivo* et embryons congelés issus de fécondation *in vitro* par injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) d'ovocytes maturés *in vitro*. Elle s'inscrit dans un contexte de recours croissant aux biotechnologies de la reproduction équine, notamment à l'OPU-ICSI, chez les reproducteurs de haute valeur génétique.

Les résultats montrent que les embryons produits *in vitro* présentent une probabilité de survie légèrement inférieure à celle des embryons produits *in vivo*, notamment durant la phase critique des deux premières semaines de gestation. Toutefois, plus de 58 % des gestations initiées à partir d'embryons ICSI sont maintenues jusqu'à 63 jours contre 68% pour les embryons produits *in vivo*, ce qui témoigne d'un taux de succès globalement satisfaisant dans le cadre d'un usage clinique raisonné. Les courbes de survie révèlent également que la majorité des pertes embryonnaires surviennent avant le 14^{ème} jour de gestation, quelle que soit la méthode de fécondation. Au-delà de 28 jours, les taux d'arrêts de gestation deviennent comparables entre les deux lots.

Au-delà du mode de production embryonnaire, plusieurs paramètres influencent la survie embryons transférés. Une meilleure viabilité est observée au printemps, et l'année 2023 présente les meilleurs taux de gestation sur l'ensemble de la période étudiée. Certains profils individuels, comme les juments receveuses n'ayant pas présenté d'arrêt de gestation à la suite de transfert précédent au cours de la saison, sont associés à des taux de succès plus élevés. Concernant les embryons produits par ICSI, la réalisation du sexage embryonnaire, bien qu'intéressante d'un point de vue génétique, semble être associée à une mortalité accrue, ce qui invite à poursuivre les investigations sur l'impact des manipulations embryonnaires. Concernant les embryons produits *in vivo*, la récolte de plusieurs embryons chez une même jument donneuse est associée à une diminution de la mortalité, en contradiction avec les études déjà menées sur le sujet. Enfin, trois gestations gémellaires issues d'embryons ICSI ont été observées en 2022, mais aucune n'a été menée à terme.

En conclusion, si les embryons *in vitro* présentent globalement une viabilité légèrement inférieure, cette étude met en lumière leur potentiel reproductif réel dans un cadre bien contrôlé. Elle souligne également l'importance d'une approche multifactorielle dans l'analyse des échecs de gestation. Ces résultats mettent en évidence l'intérêt d'une optimisation continue des protocoles de sélection embryonnaire, de synchronisation hormonale et de suivi des juments receveuses, afin d'adapter les pratiques aux spécificités de la reproduction assistée moderne dans l'espèce équine.

Bibliographie

ARNOLD, L. C., STOUT, T. A. E., BEITSMA, M. M., DEELEN, C. C., RIZZO, M., LEEMANS, B., GALLI, C., COLLEONI, S., LAZZARI, G., BARANDALLA, M. et CLAES, A. N. J., 2025. Marked blastomere herniation is the only post-thaw morphological characteristic associated with a reduced pregnancy rate for in vitro produced equine blastocysts. *Theriogenology*. 15 mars 2025. Vol. 235, pp. 1–8. Disponible sur : DOI 10.1016/j.theriogenology.2024.12.028

BALL, B. A., HILLMAN, R. B. et WOODS, G. L., 1987. Survival of equine embryos transferred to normal and subfertile mares. *Theriogenology*. 1987. Vol. 28, n° 2, pp. 167–174. Disponible sur : DOI 10.1016/0093-691X(87)90264-0

BEDFORD, S. J., KUROKAWA, M., HINRICHS, K. et FISSORE, R. A., 2003. Intracellular calcium oscillations and activation in horse oocytes injected with stallion sperm extracts or spermatozoa. *Reproduction*. 2003. Vol. 126, n° 4, pp. 489–499. Disponible sur : DOI 10.1530/REP.0.1260489

BRINSKO, S. P. et BLANCHARD, T. L., 2011. *Manual of equine reproduction*. Saint Louis : Mosby/Elsevier. ISBN 9780323064828.

BRUYAS, J. F., BATTUT, I., BENCHARIF, D., TAINTURIER, D., 1999. Transfert d'embryon chez la jument : approche pratique. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France*. T 83, n°6-7, p.403.

CAMPBELL, M. L. H., 2014. Embryo transfer in competition horses: Managing mares and expectations. *Equine Veterinary Education*. 2014. Vol. 26, n° 6, pp. 322. Disponible sur : DOI 10.1111/EVE.12182

CHOI, Y. H., GUSTAFSON-SEABURY, A., VELEZ, I. C., HARTMAN, D. L., BLISS, S., RIERA, F. L., ROLDÁN, J. E., CHOWDHARY, B. et HINRICHS, K., 2010. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction*. 1 décembre 2010. Vol. 140, n° 6, pp. 893–902. Disponible sur : DOI 10.1530/REP-10-0141

CHOI, Y. H., HARTMAN, D. L., BLISS, S. B., HAYDEN, S. S., BLANCHARD, T. L. et HINRICHS, K., 2010. 89 high pregnancy rates after transfer of large equine blastocysts collapsed via micromanipulation before vitrification. *Reproduction, Fertility and Development*. 2010. Vol. 22, n° 1, pp. 203. Disponible sur : DOI 10.1071/RDV22N1AB89

CLAES, A., CUERVO-ARANGO, J., VAN DEN BROEK, J., GALLI, C., COLLEONI, S., LAZZARI, G., DEELEN, C., BEITSMA, M. et STOUT, T. A. E., 2019. Factors affecting the likelihood of pregnancy and embryonic loss after transfer of cryopreserved in vitro produced equine embryos. *Equine Veterinary Journal*. 1 juillet 2019. Vol. 51, n° 4, pp. 446–450. Disponible sur : DOI 10.1111/EVJ.13028

CLAES, A. et STOUT, T. A. E., 2022. Success rate in a clinical equine in vitro embryo production program. *Theriogenology*. 15 juillet 2022. Vol. 187, pp. 215–218. Disponible sur : DOI 10.1016/j.theriogenology.2022.04.019

CLUTTON-BROCK, A., CUERVO-ARANGO, J. et ARRONDO, P., 2023. Effect of breed and embryo sexing on the efficiency of a commercial OPU-ICSI program in mares. *Journal of*

Equine Veterinary Science. 1 juin 2023. Vol. 125, pp. 104640.
Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2023.104640

CRİŞAN, M. I., DAMIAN, A., MORAR, I., PÁLL, E., PEŞTEAN, C. et GROZA, I. Ş., 2016. Equine embryo sexing and ultrasonographic foetal sexing – Interests and applicability. *Anatomia Histologia Embryologia*. 1 octobre 2016. Vol. 45, n° 5, pp. 329–337. Disponible sur : DOI 10.1111/ahe.12205

CUERVO-ARANGO, J., CLAES, A. N., RUIJTER-VILLANI, M. et STOUT, T. A., 2018. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. *Equine Veterinary Journal*. 1 mai 2018. Vol. 50, n° 3, pp. 386–390. Disponible sur : DOI 10.1111/evj.12739

CUERVO-ARANGO, J., CLAES, A. N. et STOUT, T. A., 2018. Effect of embryo-recipient synchrony on post-ET survival of in vivo and in vitro-produced equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 juillet 2018. Vol. 66, pp. 163–164. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2018.05.058

CUERVO-ARANGO, J., CLAES, A. N. et STOUT, T. A., 2019. The recipient's day after ovulation and the number of corpora lutea influence the likelihood of pregnancy in mares following transfer of ICSI frozen embryos. *Theriogenology*. 1 septembre 2019. Vol. 135, pp. 181–188. Disponible sur : DOI 10.1016/j.theriogenology.2019.06.020

CUERVO-ARANGO, J., CLAES, A. N. et STOUT, T. A. E., 2019. In vitro-produced horse embryos exhibit a very narrow window of acceptable recipient mare uterine synchrony compared with in vivo-derived embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 2019. Vol. 31, n° 12, pp. 1904–1911. Disponible sur : DOI 10.1071/RD19294

CUERVO-ARANGO, J., NECCHI, D., CLUTTON-BROCK, A., PROFASKA, M., CRABTREE, J. et CLAES, A., 2025. Transvaginal follicle aspiration in mares: A description of different techniques and comparison of results across different OPU clinics. *Reproduction in Domestic Animals*. 2025. Vol. 60, pp. 70043. Disponible sur : DOI 10.1111/rda.70043

CUERVO-ARANGO, J., MARTÍN-PELÁEZ, M. S. et CLAES, A. N., 2020. A practical guide to estimate the age of the early CL by ultrasonography in mares examined for the first time to be used as recipients in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*. 1 septembre 2020. Vol. 153, pp. 48–53. Disponible sur : DOI 10.1016/j.theriogenology.2020.05.003

CURRAN, S. et GINTHER, O. J., 1989. Determining sex of the fetus by transrectal ultrasonography in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1989. Vol. 194, n° 9, pp. 1423–1425.

DIJKSTRA, A., CUERVO-ARANGO, J., STOUT, T. A. E. et CLAES, A., 2020. Monozygotic multiple pregnancies after transfer of single in vitro produced equine embryos. *Equine Veterinary Journal*. 1 mars 2020. Vol. 52, n° 2, pp. 258–261. Disponible sur : DOI 10.1111/evj.13146

DONATO, G. G., NECCHI, D., VANDAELE, H., VITA, M. E., BERTERO, A., VINCENTI, L. et NERVO, T., 2023. Influence of intrauterine fluid detection, number of transfers and age of the recipient on pregnancy rate and early embryonic loss in a commercial embryo transfer program. *Animals*. 1 juin 2023. Vol. 13, n° 11. Disponible sur : DOI 10.3390/ani13111799

- FANELLI, D., TESI, M., INGALLINESI, M., CAMILLO, F. et PANZANI, D., 2022. Recipients' pregnancy rate was affected by season but not by the temperature-humidity index (THI) in an equine commercial ET programme in Southern Europe. *Reproduction in Domestic Animals*. 1 avril 2022. Vol. 57, n° 4, pp. 343–348. Disponible sur : DOI 10.1111/rda.14070
- FELIX, M. R., TURNER, R. M., DOBBIE, T. et HINRICHS, K., 2022. Successful in vitro fertilization in the horse: Production of blastocysts and birth of foals after prolonged sperm incubation for capacitation. *Biology of Reproduction*. 1 décembre 2022. Vol. 107, n° 6, pp. 1551. Disponible sur : DOI 10.1093/biolre/ioac172
- FONTE, J. S., ALONSO, M. A., JUNIOR, M. P. M., GONÇALVES, M. A., PONTES, J. H., BORDIGNON, V., FLEURY, P. D. C. et FERNANDES, C. B., 2024. Successful equine in vitro embryo production by ICSI – Effect of season, mares' age, breed, and phase of the estrous cycle on embryo production. *Theriogenology*. 15 juillet 2024. Vol. 223, pp. 47–52. Disponible sur : DOI 10.1016/j.theriogenology.2024.04.007
- FOSS, R. R., 2023. Effect of melatonin in maturation medium on equine oocyte maturation, cleavage, and blastocyst production following ICSI. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 juin 2023. Vol. 125, pp. 104650. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2023.104650
- GALLI, C., COLLEONI, S., CLAES, A., BEITSMA, M., DEELEN, C., NECCHI, D., DUCHI, R., LAZZARI, G. et STOUT, T., 2016. Overnight shipping of equine oocytes from remote locations to an ART laboratory enables access to the flexibility of Ovum Pick Up-ICSI and embryo cryopreservation technologies. *Journal of Equine Veterinary Science*. juin 2016. Vol. 41, pp. 82. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2016.04.084
- GINTHER, O. J., 1995. *Ultrasonic imaging and animal reproduction*. Cross Plains, WI, USA : Equiservices Pub. ISBN 9780964007239.
- HALLMAN, I., KARIKOSKI, N. et KARESKOSKI, M., 2023. The effects of obesity and insulin dysregulation on mare reproduction, pregnancy, and foal health: A review. *Frontiers in Veterinary Science*. 20 avril 2023. Vol. 10, pp. 1180622. Disponible sur : DOI 10.3389/fvets.2023.1180622
- HASLER, J. F., 1998. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science*. 1 janvier 1998. Vol. 76, n° suppl_3, pp. 52–74. Disponible sur : DOI 10.2527/1998.76suppl_352x
- HERRERA, C., MORIKAWA, M. I., BELLO, M. B., VON MEYEREN, M., EUSEBIO CENTENO, J., DUFOURQ, P., MARTINEZ, M. M. et LLORENTE, J., 2014. Setting up equine embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*. 15 mars 2014. Vol. 81, n° 5, pp. 758–763. Disponible sur : DOI 10.1016/j.theriogenology.2013.12.013
- HINRICHS, K., CHOI, Y. H., NORRIS, J. D., LOVE, L. B., BEDFORD-GUAUS, S. J., HARTMAN, D. L. et VELEZ, I. C., 2012. Evaluation of foal production following intracytoplasmic sperm injection and blastocyst culture of oocytes from ovaries collected immediately before euthanasia or after death of mares under field conditions. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 15 octobre 2012. Vol. 241, n° 8, pp. 1070–1074. Disponible sur : DOI 10.2460/javma.241.8.1070

- HINRICHS, K., 2018. Assisted reproductive techniques in mares. *Reproduction in Domestic Animals*. 1 septembre 2018. Vol. 53, pp. 4–13. Disponible sur : DOI 10.1111/rda.13259
- JACOB, J. C. F., HAAG, K. T., SANTOS, G. O., OLIVEIRA, J. P., GASTAL, M. O. et GASTAL, E. L., 2012. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology*. 1 avril 2012. Vol. 77, n° 6, pp. 1159–1166. Disponible sur : DOI 10.1016/j.theriogenology.2011.10.022
- JACOBSON, C. C., CHOI, Y. H., HAYDEN, S. S. et HINRICHS, K., 2010. Recovery of mare oocytes on a fixed biweekly schedule, and resulting blastocyst formation after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*. 1 mai 2010. Vol. 73, n° 8, pp. 1116–1126. Disponible sur : DOI 10.1016/j.theriogenology.2010.01.013
- KOVASCY, S., ALLEN, W. R. et WILSHER, S., 2022. The mystery of capsular vesicles: Preliminary studies. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 juin 2022. Vol. 113, pp. 103978. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2022.103978
- LAZZARI, G., COLLEONI, S., CROTTI, G., TURINI, P., FIORINI, G., BARANDALLA, M., LANDRISCINA, L., DOLCI, G., BENEDETTI, M., DUCHI, R. et GALLI, C., 2020. Laboratory production of equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 juin 2020. Vol. 89, pp. 103097. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2020.103097
- LAZZARI, G., WRENZYCKI, C., HERRMANN, D., DUCHI, R., KRUIP, T., NIEMANN, H. et GALLI, C., 2002. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction*. 1 septembre 2002. Vol. 67, n° 3, pp. 767–775. Disponible sur : DOI 10.1095/biolreprod.102.004481
- LEEMANS, B., VAN SOOM, A. et HOOGEWIJS, M., 2015. Novel insights in capacitation of stallion spermatozoa : What is the role of the oviduct? Thèse de doctorat. Gand : Université de Gand, Faculty of Bioscience Engineering, 199 p. Disponible sur : <http://hdl.handle.net/1854/LU-6940115>
- MACLELLAN, L. J., ALBERTINI, D. F., STOKES, J. E. et CARNEVALE, E. M., 2023. Use of confocal microscopy and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to assess viability of equine oocytes from young and old mares after vitrification. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 1 novembre 2023. Vol. 40, n° 11, pp. 2565–2576. Disponible sur : DOI 10.1007/s10815-023-02935-4
- MARINONE, A. I., LOSINNO, L., FUMUSO, E., RODRÍGUEZ, E. M., REDOLATTI, C., CANTATORE, S. et CUERVO-ARANGO, J., 2015. The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a commercial embryo transfer program in Argentina. *Animal Reproduction Science*. 1 juillet 2015. Vol. 158, pp. 53–59. Disponible sur : DOI 10.1016/j.anireprosci.2015.04.007
- MARTIN-PELAEZ, S., FUENTE, A. de la, TAKAHASHI, K., PEREZ, I. T., OROZCO, J., OKADA, C. T. C., NETO, C. R., MEYERS, S. et DINI, P., 2025. IVF with frozen-thawed sperm after prolonged capacitation yields comparable results to ICSI in horses: A morphokinetics study. *Theriogenology*. 15 janvier 2025. Vol. 232, pp. 39–45. Disponible sur : DOI 10.1016/j.theriogenology.2024.10.032

- MCKINNON, A. O., SQUIRES, E. L., VAALA, W. E. et VARNER, D. D., 2011. *Equine reproduction*. 2e éd. Ames : Wiley-Blackwell. ISBN 9781444397635. Disponible sur : <http://lib.ugent.be/catalog/ebk01:2670000000077517>
- MORRIS, L. H. A. et MACLELLAN, L. J., 2024a. A simplified grading system for in vivo and in vitro derived vitrified equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 janvier 2024. Vol. 132, pp. 104983. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2023.104983
- MORRIS, L. H. A. et MACLELLAN, L. J., 2024b. A simplified grading system for in vivo and in vitro derived vitrified equine embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 janvier 2024. Vol. 132, pp. 104983. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2023.104983
- MORRIS, L. H. A., WEISS, J. et MACLELLAN, L. J., 2022. Is embryo grade classification associated with pregnancy outcome for in vivo and ICSI-derived vitrified embryos? *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 juin 2022. Vol. 113, pp. 103979. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2022.103979
- NEWCOMBE, J. R., WILSHER, S. et CUERVO-ARANGO, J., 2022. The timing of the maternal recognition of pregnancy signal is specific to individual mares. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 juin 2022. Vol. 113, pp. 103977. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2022.103977
- OGURI, N. et TSUTSUMI, Y., 1974. Non surgical egg transfer in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1974. Vol. 41, n° 2, pp. 313–320. Disponible sur : DOI 10.1530/jrf.0.0410313
- PEERE, S., PAPAS, M., GERITS, I., VAN DEN BRANDEN, E., SMITS, K. et GOVAERE, J., 2022. Management of monozygotic twins in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 juin 2022. Vol. 113, pp. 103988. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2022.103988
- POPE, W. F., 1988. Uterine asynchrony: A cause of embryonic loss. *Biology of Reproduction*. 1 décembre 1988. Vol. 39, n° 5, pp. 999–1003. Disponible sur : DOI 10.1095/biolreprod39.5.999
- RENAUDIN, C. D. et CONLEY, A. J., 2023. Pregnancy monitoring in mares: Ultrasonographic and endocrine approaches. *Reproduction in Domestic Animals*. 1 septembre 2023. Vol. 58, n° S2, pp. 34–48. Disponible sur : DOI 10.1111/rda.14392
- RENAUDIN, C. D., JUMENT, L. A. et PRATIQUE, G., 2017. 2 Pratique vétérinaire équine 2017 : N° spécial sexage du fœtus équin. *Pratique Vétérinaire Équine*. 2017.
- RIERA, F. L., ROLDÁN, J. E., ESPINOSA, J. M., FERNANDEZ, J. E., ORTIZ, I. et HINRICHS, K., 2019. Application of embryo biopsy and sex determination via polymerase chain reaction in a commercial equine embryo transfer program in Argentina. *Reproduction, Fertility and Development*. 2019. Vol. 31, n° 12, pp. 1917–1925. Disponible sur : DOI 10.1071/RD19228
- SQUIRES, E. L., IULIANO, M. F. et SHIDELER, R. K., 1982. Factors affecting the success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer. *Theriogenology*. 1 janvier 1982. Vol. 17, n° 1, pp. 35–41. Disponible sur : DOI 10.1016/0093-691X(82)90113-3

- SQUIRES, E. L., MCCUE, P. M. et VANDERWALL, D., 1999. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*. 1 janvier 1999. Vol. 51, n° 1, pp. 91–104. Disponible sur : DOI 10.1016/S0093-691X(98)00234-9
- SQUIRES, E. L., GARCIA, R. et GINTHER, O., 1985. Factors affecting success of equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*. 10 juin 1985. Vol. 17, pp. 92–95. Disponible sur : DOI 10.1111/j.2042-3306.1985.tb04604.x
- STANTON, M. B., STEINER, J. V. et PUGH, D. G., 2004. Endometrial cysts in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 janvier 2004. Vol. 24, n° 1, pp. 14–19. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2003.12.003
- STOUT, T. A. E., 2020. Clinical application of in vitro embryo production in the horse. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 juin 2020. Vol. 89, pp. 103011. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2020.103011
- VANDERWALL, D. K., 2008. Early embryonic loss in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*. 1 novembre 2008. Vol. 28, n° 11, pp. 691–702. Disponible sur : DOI 10.1016/j.jevs.2008.10.001
- VOGELSANG, S. G., BONDIOLI, K. R. et MASSEY, J. M., 1985. Commercial application of equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*. 1 mars 1985. Vol. 17, n° S3, pp. 89–91. Disponible sur : DOI 10.1111/j.2042-3306.1985.tb04603.x
- VOGELSANG, S. G. et VOGELSANG, M. M., 1989. Influence of donor parity and age on the success of commercial equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*. 1 août 1989. Vol. 21, n° S8, pp. 71–72. Disponible sur : DOI 10.1111/j.2042-3306.1989.tb04679.x
- WILSHER, S., LEFRANC, A. C. et ALLEN, W. R., 2012. The effects of an advanced uterine environment on embryonic survival in the mare. *Equine Veterinary Journal*. juillet 2012. Vol. 44, n° 4, pp. 432–439. Disponible sur : DOI 10.1111/j.2042-3306.2011.00473.x
- WILSHER, S., CLUTTON-BROCK, A. et ALLEN, W. R., 2010. Successful transfer of day 10 horse embryos: Influence of donor–recipient asynchrony on embryo development. *Reproduction*. 1 mars 2010. Vol. 139, n° 3, pp. 575–585. Disponible sur : DOI 10.1530/REP-09-0306
- ZEGERS-HOCHSCHILD, F., ADAMSON, G. D., DYER, S., RACOWSKY, C., DE MOUZON, J., SOKOL, R., RIENZI, L., SUNDE, A., SCHMIDT, L., COOKE, I. D., SIMPSON, J. L. et VAN DER POEL, S., 2017. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*. 1 septembre 2017. Vol. 108, n° 3, pp. 393–406. Disponible sur : DOI 10.1016/j.fertnstert.2017.06.005

Sitographie

ANPFS, 2024. Transfert d'embryon : quels risques pour quels rêves ? (Partie 1) [en ligne]. 26 avril 2024. [Consulté le 18 juin 2025]. Disponible à l'adresse : <https://www.anpfs.com/transfert-dembrion-quels-risques-pour-quels-reves-partie-1>

IFCE - Equipédia, 2015. La fécondation in vitro dans l'espèce équine [en ligne]. 2 février 2015. [Consulté le 18 juin 2025]. Disponible à l'adresse : <https://equipedia.ifce.fr/elevage-et-entretien/elevage/reproduction/la-fecondation-in-vitro-dans-l-espece-equine>

STUDFORLIFE, 2024. Malgré une vente de cessation, le Haras de Hus poursuit ses services de centre d'insémination. [en ligne]. 3 avril 2024. [Consulté le 18 juin 2025] Disponible à l'adresse : <https://studforlife.com/fr/actualite/malgre-une-vente-de-cessation-le-haras-de-hus-poursuit-ses-services-de-centre-dinsemination/>

Annexes

Annexe 1 - Répartition effective des pertes embryonnaires selon la jument donneuse (≥ 10 transferts)

| Juments donneuses | Transfert embryonnaire - J14 ^l | J14 - J28 ^l | J28 - J45 ^l | J45 - J63 ^l |
|-------------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| jd11 | 7/20 (35%) | 0/13 (0%) | 0/13 (0%) | 0/13 (0%) |
| jd18 | 4/15 (26.7%) | 1/11 (9.1%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) |
| jd25 | 6/11 (54.5%) | 0/5 (0%) | 0/5 (0%) | 0/5 (0%) |
| jd29 | 1/17 (5.9%) | 2/16 (12.5%) | 0/14 (0%) | 0/14 (0%) |
| jd37 | 2/11 (18.2%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) |
| jd45 | 3/10 (30%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) |
| jd53 | 4/11 (36.4%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) |
| jd64 | 2/10 (20%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) |
| jd68 | 3/11 (27.3%) | 1/8 (12.5%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) |
| jd70 | 4/20 (20%) | 1/16 (6.2%) | 0/15 (0%) | 0/15 (0%) |
| jd71 | 3/13 (23.1%) | 1/10 (10%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) |
| jd81 | 1/10 (10%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) |
| jd83 | 2/12 (16.7%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) |
| jd86 | 2/10 (20%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) |
| jd100 | 2/12 (16.7%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) |
| jd103 | 6/13 (46.2%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) | 1/7 (14.3%) |
| jd104 | 6/10 (60%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) | 1/4 (25%) |

| Juments donneuses | Transfert embryonnaire - J14^l | J14 - J28^l | J28 - J45^l | J45 - J63^l |
|------------------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| jd114 | 6/14 (42.9%) | 1/8 (12.5%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) |
| jd115 | 6/11 (54.5%) | 0/5 (0%) | 0/5 (0%) | 0/5 (0%) |
| jd125 | 2/13 (15.4%) | 1/11 (9.1%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) |
| jd126 | 3/15 (20%) | 2/12 (16.7%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) |
| jd146 | 6/16 (37.5%) | 0/10 (0%) | 1/10 (10%) | 1/9 (11.1%) |
| jd159 | 9/27 (33.3%) | 1/18 (5.6%) | 0/17 (0%) | 0/17 (0%) |
| jd175 | 4/15 (26.7%) | 0/11 (0%) | 0/11 (0%) | 0/11 (0%) |
| jd181 | 3/11 (27.3%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) |
| jd234 | 8/25 (32%) | 0/17 (0%) | 1/17 (5.9%) | 0/16 (0%) |
| jd246 | 5/15 (33.3%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) | 0/10 (0%) |
| jd252 | 5/14 (35.7%) | 1/9 (11.1%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) |
| jd284 | 9/21 (42.9%) | 2/12 (16.7%) | 0/10 (0%) | 2/10 (20%) |
| jd295 | 9/19 (47.4%) | 0/10 (0%) | 1/10 (10%) | 0/9 (0%) |
| jd310 | 7/20 (35%) | 0/13 (0%) | 0/13 (0%) | 0/13 (0%) |
| jd330 | 4/28 (14.3%) | 2/24 (8.3%) | 0/22 (0%) | 1/22 (4.5%) |
| jd335 | 3/17 (17.6%) | 1/14 (7.1%) | 1/13 (7.7%) | 0/12 (0%) |
| jd341 | 5/14 (35.7%) | 1/9 (11.1%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) |
| jd357 | 3/16 (18.8%) | 0/13 (0%) | 1/13 (7.7%) | 0/12 (0%) |
| jd360 | 5/25 (20%) | 1/20 (5%) | 0/19 (0%) | 0/19 (0%) |
| jd367 | 5/11 (45.5%) | 0/6 (0%) | 0/6 (0%) | 0/6 (0%) |

^ln/N (%)

Annexe 2 - Répartition effective des pertes embryonnaires et fœtales selon l'étalon (≥ 10 transferts)

| Etalons | Transfert embryonnaire - J14^l | J14 - J28^l | J28 - J45^l | J45 - J63^l |
|----------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| e1 | 3/11 (27.3%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) |
| e6 | 4/21 (19%) | 0/17 (0%) | 0/17 (0%) | 0/17 (0%) |
| e11 | 20/58 (34.5%) | 1/38 (2.6%) | 3/37 (8.1%) | 0/34 (0%) |
| e12 | 17/49 (34.7%) | 2/32 (6.2%) | 1/30 (3.3%) | 1/29 (3.4%) |
| e20 | 5/18 (27.8%) | 2/13 (15.4%) | 1/11 (9.1%) | 0/10 (0%) |
| e32 | 6/14 (42.9%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) |
| e33 | 40/102 (39.2%) | 3/62 (4.8%) | 0/59 (0%) | 5/59 (8.5%) |
| e36 | 3/11 (27.3%) | 1/8 (12.5%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) |
| e37 | 11/34 (32.4%) | 3/23 (13%) | 0/20 (0%) | 1/20 (5%) |
| e43 | 28/86 (32.6%) | 2/58 (3.4%) | 0/56 (0%) | 2/56 (3.6%) |
| e44 | 6/10 (60%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) |
| e49 | 9/42 (21.4%) | 2/33 (6.1%) | 0/31 (0%) | 0/31 (0%) |
| e55 | 17/53 (32.1%) | 2/36 (5.6%) | 2/34 (5.9%) | 0/32 (0%) |
| e56 | 4/11 (36.4%) | 1/7 (14.3%) | 0/6 (0%) | 0/6 (0%) |
| e61 | 4/24 (16.7%) | 1/20 (5%) | 0/19 (0%) | 0/19 (0%) |

| Etalons | Transfert embryonnaire - J14^l | J14 - J28^l | J28 - J45^l | J45 - J63^l |
|----------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| e67 | 9/26 (34.6%) | 2/17 (11.8%) | 1/15 (6.7%) | 0/14 (0%) |
| e76 | 3/14 (21.4%) | 2/11 (18.2%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) |
| e78 | 4/10 (40%) | 2/6 (33.3%) | 0/4 (0%) | 0/4 (0%) |
| e79 | 3/11 (27.3%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) |
| e80 | 16/50 (32%) | 3/34 (8.8%) | 2/31 (6.5%) | 0/29 (0%) |
| e84 | 7/32 (21.9%) | 0/25 (0%) | 0/25 (0%) | 1/25 (4%) |
| e91 | 2/17 (11.8%) | 0/15 (0%) | 1/15 (6.7%) | 1/14 (7.1%) |
| e99 | 5/20 (25%) | 0/15 (0%) | 0/15 (0%) | 1/15 (6.7%) |
| e101 | 4/11 (36.4%) | 1/7 (14.3%) | 0/6 (0%) | 0/6 (0%) |
| e103 | 15/44 (34.1%) | 2/29 (6.9%) | 2/27 (7.4%) | 0/25 (0%) |
| e115 | 4/16 (25%) | 1/12 (8.3%) | 1/11 (9.1%) | 0/10 (0%) |
| e118 | 6/23 (26.1%) | 1/17 (5.9%) | 0/16 (0%) | 0/16 (0%) |
| e132 | 20/67 (29.9%) | 2/47 (4.3%) | 1/45 (2.2%) | 0/44 (0%) |
| e140 | 11/28 (39.3%) | 0/17 (0%) | 0/17 (0%) | 0/17 (0%) |
| e161 | 1/11 (9.1%) | 1/10 (10%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) |
| e170 | 1/19 (5.3%) | 2/18 (11.1%) | 0/16 (0%) | 0/16 (0%) |

| Etalons | Transfert embryonnaire - J14^l | J14 - J28^l | J28 - J45^l | J45 - J63^l |
|----------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| e172 | 3/12 (25%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) | 0/9 (0%) |
| e178 | 5/13 (38.5%) | 1/8 (12.5%) | 0/7 (0%) | 0/7 (0%) |
| e184 | 5/11 (45.5%) | 1/6 (16.7%) | 0/5 (0%) | 0/5 (0%) |
| e186 | 7/16 (43.8%) | 1/9 (11.1%) | 2/8 (25%) | 0/6 (0%) |

^ln/N (%)

Annexe 3 : Suivis incomplets correspondant aux suivis dont il manque des diagnostics de gestation intermédiaires

| AV_J8_J60 | INTERVALLE_AV | TEMPS | DG15 | DG30 | DG45 | SEXAGE | DG60 |
|-----------|------------------|-------|------|------|------|--------|---------------|
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 60 | 1 | ? | ? | 0 | pas d'embryon |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 60 | 1 | ? | ? | 0 | pas d'embryon |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 15 | 0 | ? | ? | M | mort |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | ? | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 60 | 1 | 1 | ? | 0 | pas d'embryon |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 60 | 1 | ? | ? | 0 | pas d'embryon |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 60 | 1 | ? | ? | 0 | pas d'embryon |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |
| oui | DATE_AV_INCONNUE | 45 | 1 | ? | 0 | C | C |

Annexe 4 : Juments receveuses sans date de naissance renseignée

| A | D | R | S | T | P |
|--------------------|----------------|--------------|-------------------|---------|-------|
| IDENTIFIANT_UNIQUE | DATE_TRANSFERT | JOUR_POST_OV | DATE_NAISSANCE_JP | AGE_JP | JP |
| IT-1-079 | 10/07/2021 | 5 | NR | #VALUE! | jp127 |
| IT-1-116 | 05/08/2021 | 4 | NR | #VALUE! | jp73 |
| IT-3-453 | 01/07/2023 | 4 | NR | #VALUE! | jp66 |
| IT-4-575 | 10/08/2024 | 4 | NR | #VALUE! | jp840 |
| IV-1-728 | 29/06/2021 | NR | NR | #VALUE! | jp499 |
| IV-1-759 | 14/07/2021 | NR | NR | #VALUE! | jp418 |
| IV-1-826 | 18/07/2021 | NR | NR | #VALUE! | jp724 |
| IV-1-856 | 21/07/2021 | NR | NR | #VALUE! | jp724 |
| IV-1-909 | 07/07/2021 | NR | NR | #VALUE! | jp779 |
| IV-1-915 | 08/08/2021 | NR | NR | #VALUE! | jp780 |

Axelle MARIE

Comparative evaluation of embryonic and fetal mortality rates after transfer in recipient mares of fresh embryos produced *in vivo* and frozen-thawed embryos produced *in vitro* following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of *in vitro*-matured oocytes over four breeding seasons (2021–2024).

ABSTRACT

This retrospective study aimed to compare embryonic and fetal mortality rates according to the mode of embryo production: fresh embryos obtained through *in vivo* fertilization and frozen-thawed embryos produced *in vitro* via intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of *in vitro* matured oocytes. A total of 1,339 embryo transfers performed at the Haras de Hus between 2021 and 2024 were analyzed. The results show significantly higher embryonic mortality for embryos derived from OPU-ICSI, with the greatest difference observed during the first week post-transfer (day 14). By 63 days of gestation, the survival probability reached 68% for *in vivo*-produced embryos compared to 58% for ICSI-derived embryos, across all years combined. In contrast, loss rates between day 28 and day 63 were similar between both fertilization methods. Several factors influenced these outcomes, including the season, the year, a history of pregnancy loss in recipient mares, and whether embryonic sexing was performed *in vitro*. The year 2023 showed the best performance across the entire study period. Among *in vivo*-produced embryos, the recovery of multiple embryos from the same donor mare was associated with reduced mortality. Three twin pregnancies resulting from ICSI embryos were observed, but none were carried to term. Conversely, neither the age of the recipient mares nor the number of uses of the breeding animals showed a significant effect. This study highlights the clinical feasibility of using ICSI in equine reproductive practice and emphasizes the value of individualized optimization of production, transfer, and recipient mare management protocols to improve post-transfer survival of the conceptus.

Axelle MARIE

Évaluation comparative du taux de mortalité embryonnaire et fœtale après transfert chez les juments receveuses d'embryons frais produits *in vivo* et d'embryons congelés produits *in vitro* après injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) d'ovocytes maturés *in vitro* au cours de quatre saisons de reproduction (2021–2024).

Comparative evaluation of embryonic and fetal mortality rates after transfer in recipient mares of fresh embryos produced *in vivo* and frozen-thawed embryos produced *in vitro* following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of *in vitro*-matured oocytes over four breeding seasons (2021–2024).

Thèse d'État de Doctorat Vétérinaire : Nantes, le 15 juillet 2025

RESUME

Cette étude rétrospective visait à comparer les taux de mortalité embryonnaire et fœtale selon le mode de production des embryons : embryons frais issus de fécondation *in vivo* et embryons congelés issus de fécondation *in vitro* par injection intracytoplasmique de spermatozoïde (ICSI) d'ovocytes maturés *in vitro*. Au total, 1 339 transferts réalisés au Haras de Hus entre 2021 et 2024 ont été analysés. Les résultats montrent une mortalité embryonnaire significativement plus élevée pour les embryons issus d'OPU-ICSI, avec une différence principalement marquée au cours de la première semaine post-transfert (J14). À 63 jours de gestation, les probabilités de survie atteignent 68 % pour les embryons produits *in vivo* contre 58 % pour ceux issus de l'ICSI, toutes années confondues. En revanche, les effectifs de pertes entre J28 et J63 sont comparables entre les deux modes de fécondation. Plusieurs facteurs influencent ces résultats, notamment la saison, l'année, les antécédents de pertes gestationnelles chez les juments receveuses, et la réalisation d'un sexage embryonnaire *in vitro*. L'année 2023 présente les meilleures performances sur l'ensemble de la période étudiée. Concernant les embryons produits *in vivo*, la récolte de plusieurs embryons chez une même jument donneuse est associée à une diminution de la mortalité. Trois gestations gémellaires issues d'embryons ICSI ont été observées, mais aucune n'a été menée à terme. En revanche, ni l'âge des receveuses ni le nombre d'utilisations des reproducteurs ne montrent d'effet significatif. Cette étude met en évidence la faisabilité du recours à l'ICSI en pratique clinique équine et souligne l'intérêt d'une optimisation individualisée des protocoles de production, de transfert et de gestion des juments receveuses pour améliorer la survie du produit de conception après transfert.

MOTS CLES :

- Jument
- Transfert d'embryon
- Injection intracytoplasmique de spermatozoïdes
- *In vivo*
- Mortalité embryonnaire
- Mort du fœtus

DATE DE SOUTENANCE : le 15 juillet 2025