ECOLE NATIONALE VETERINAIRE D'ALFORT

ANNEE 2003 N°

LES HYBRIDES INTERSPECIFIQUES CHEZ LES EQUIDES

THESE

Pour le

DOCTORAT VETERINAIRE

Présentée et soutenue publiquement
Devant

LA FACULTE DE MEDECINE DE CRETEIL
Le

Par

Isabelle, Carine PETRUS
Née le 7 décembre 1978 à Romorantin-Lanthenay (Loir-et-Cher)

JURY
Président : M.
Professeur à la Faculté de Médecine de CRETEIL

Membres

Directeur : Mme CHASTANT-MAILLARD Sylvie
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
Assesseur : M. BOSSE Philippe
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

A notre président de thèse,

M
Professeur à la Faculté de Médecine de Créteil,

Qui nous fait l'honneur de présider notre jury de thèse.
Avec l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

A notre jury de thèse,

A Mme CHASTANT-MAILLARD,
Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Pour sa participation dans l'élaboration de ce travail,
Qu'elle accepte l'expression de notre respectueuse gratitude.

A M. BOSSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,

Qui a aimablement accepté de participer à notre jury de thèse,
Qu'il trouve ici l'expression de notre reconnaissance.

REMERCIEMENTS

A Jérôme,

Je ne te serais jamais assez reconnaissante de m'avoir supportée durant ses sept longues années d'études ; avec mes sautes d'humeur, mes angoisses de ne pas réussir ou de ne pas être à la hauteur, mon stress les veilles d'interro…
Je suis sincèrement désolée pour toutes ces soirées que tu as passées seul devant la télé pendant que je m'obstinais à mon bureau ! Mais je te promets, maintenant que cette galère est derrière nous, d'essayer d'être un peu plus disponible et de me consacrer davantage à nous deux. C'est décidé, nous allons enfin en profiter ! A nous les voyages…
Mille fois merci pour ta patience, ta compréhension et surtout pour ton amour dont tu fais preuve chaque jour à mon égard.

A Maman,

Tout d'abord, merci de m'avoir donné le goût des études depuis mon plus jeune âge et de m'avoir permis, malgré les circonstances, de réaliser mon rêve. Sans toi, je ne serais jamais devenue ce que je suis aujourd'hui !
Comment ne pas repenser à ces longues heures passées ensemble au téléphone, durant lesquelles tu parvenais toujours à me remonter le moral et à me redonner confiance en moi ! Ne t'inquiète pas, ce n'est certainement pas parce que j'ai enfin fini mes études que nous allons rompre nos habitudes : nos conversations téléphoniques seront toujours aussi sacrées à mes yeux !
Enfin merci d'être toujours présente quand j'en ai besoin et de remplir à merveille et doublement ton rôle de mère.

A Fred,

Cher frangin, tu as souvent essayé de me détourner un peu de mes bouquins, en vain. A partir de maintenant, c'est quand tu veux… je serais toujours partante pour partager un max de bons moments avec toi et la Miss. Et ne crois pas qu'en partant à l'autre bout de la France, tu vas te débarrasser de moi aussi facilement !

A Mémère,

Je te remercie de m'avoir tant dorlotée pendant toutes ces vacances que j'ai passées au grand air. Désolée, si avec Fred, on t'a quelquefois fait un peu marcher ! Je sais qu'aujourd'hui, tu es fière de moi.

A André et Monique,

Vous avez toujours cru en moi, même dans les moments les plus critiques. Je ne saurais jamais comment vous remercier de m'avoir confié si souvent votre jument. Merci pour toutes ces heures d'évasion si précieuses passées à chevaucher les bois de Sologne. N'ayez crainte, je saurai bien prendre soin de Carla, maintenant que je suis diplômée.

Au Docteur Monjal,

C'est à vous aussi que je dois ma situation actuelle, vous qui avez su me transmettre votre passion pour votre métier. A votre façon, je m'efforce de prendre soin autant des animaux que de leur propriétaire.

A Hélène,

Ma chère consœur, ces années d'école n'auraient pas été les mêmes sans nos longues heures passées à discuter devant un cappuccino ! Tu es la seule personne de cette école qui me manquera. Je ne souhaite qu'une chose : ne perdons pas le contact avec l'éloignement.

A tous ceux que j'aime, famille et amis,

Merci à vous tous pour votre soutien et je m'excuse encore de vous rebattre si souvent les oreilles avec mes anecdotes de vétérinaire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION **13**

I – PRESENTATION DE LA FAMILLE DES EQUIDES **15**

A – HISTOIRE ET EVOLUTION DE LA FAMILLE DES EQUIDES **15**

B – COMPOSITION DE LA FAMILLE DES EQUIDES **20**

1) Le cheval domestique (*Equus caballus*) **21**
2) Le cheval de Przewalski (*Equus przewalskii*) **21**
3) L'âne sauvage (*Equus asinus*) **22**
4) L'âne sauvage d'Asie ou hémione (*Equus hemionus*) **22**
5) Le zèbre de Grevyi (*Equus grevyi*) **23**
6) Le zèbre commun ou zèbre des plaines (*Equus burchelli*) **24**
7) Le zèbre des montagnes (*Equus zebra*) **25**
8) Le Quagga (*Equus quagga*) **25**

II – LES HYBRIDES INTERSPECIFIQUES CHEZ LES EQUIDES **28**

A – LES DIFFERENTS HYBRIDES INTERSPECIFIQUES ET LEURS CARACTERISTIQUES **28**

1) De nombreux croisements interspécifiques **28**
2) Exemples de particularités des principaux hybrides **29**
a) Equus asinus x Equus burchelli *29*
b) Equus asinus x Equus caballus *31*
c) Equus asinus x Equus grevyi *32*
d) Equus asinus x Equus hemionus *32*
e) Equus asinus x Equus zebra *32*
f) Equus burchelli x Equus caballus *32*
g) Equus burchelli x Equus hemionus *33*
h) Equus burchelli x Equus zebra *33*
i) Equus caballus x Equus grevyi *33*
j) Equus caballus x Equus hemionus *33*
k) Equus caballus x Equus przewalskii *34*
l) Equus caballus x Equus zebra *34*
m) Equus hemionus x Equus zebra *34*

B – INTERET DE CES HYBRIDES **35**

1) Intérêt réel du croisement Equus asinus x Equus caballus **35**
a) Mule : animal d'utilité *35*
b) Mule : intérêt scientifique *35*
2) Intérêt limité pour les autres hybrides **35**

III – PROBLEMES PHYSIOLOGIQUES LIES A LA PRODUCTION DES HYBRIDES 37

A- RITUELS D'ACCOUPLEMENT 37

B- TAUX DE FERTILITE 37

C- SEX RATIO DESEQUILIBRE POUR LES MULES 38

D- DUREES DE GESTATION 39

E – PARTICULARITES IMMUNOLOGIQUES DE LA GESTATION D'HYBRIDES INTERSPECIFIQUES 40

1) Caractéristiques du placenta des équidés 40
a) Description du placenta 40
b) Etapes de la placentation et importance de la ceinture chorionique 42
2) Réponse immunologique 45
a) Réponse immunologique lors de gestation intraspécifique 45
b) Réponse immunologique à médiation cellulaire 46
α) Infiltration leucocytaire autour des cupules 46
β) Importance de la réaction à médiation cellulaire locale 47
c) Réaction immunitaire à médiation humorale : anticorps anti-CMH I 49
α) Influence du génotype fœtal 49
β) Modulation de l'expression des molécules du CMH I sur le trophoblaste 51
γ) Variabilité de réponse en anticorps selon l'antigène du CMH I 52

F- PARTICULARITES HORMONALES DE LA GESTATION D'HYBRIDES INTERSPECIFIQUES .. 54

1) Modulation de la production en eCG 54
a) Particularités de l'eCG 54
α) Structure de l'eCG 54
β) Variations d'eCG au cours de la gestation 54
b) Influence du génotype fœtal sur la production d'eCG 55
c) Influence du génotype fœtal sur le ratio FSH/LH de l'eCG 57
d) Etude de la fonction biologique et des récepteurs liés à l'activité de l'eCG 60
2) Modulation de la production de progestagènes 65
a) Influence du génotype fœtal sur la production de progestagènes 65

G- CAS DE TRANSFERTS EMBRYONNAIRES INTERSPECIFIQUES 73

1) Particularités immunologiques de la gestation extraspécifique 73
a) Transfert d'embryon de cheval chez l'ânesse 73
b) Transfert d'embryon d'âne chez la jument 74
c) Transfert d'embryon d'équidés sauvages 77
2) Particularités hormonales de la gestation extraspécifique 80
a) Transfert d'embryon de cheval chez l'ânesse 80
b) Transfert d'embryon d'âne chez la jument 80
c) Transfert d'embryon d'équidés sauvages 81

3) Intérêts de la gestation extraspécifique 83
a) Préservation des espèces menacées 83
b) Modèles d'études 83
α) Transfert d'embryon d'âne chez la jument : modèle de mort fœtale 83
β) Transfert d'embryon et rôle des facteurs de croissance 85

H – PARTICULARITES IMMUNOLOGIQUES DU POST-PARTUM DES HYBRIDES : L'ICTERE HEMOLYTIQUE DU MULETON 88

1) Hypothèses étiologiques 88
a) Etiologie longtemps discutée 88
b) Etiologie parasitaire suspectée 88
c) Analogie avec la maladie hémolytique du nouveau-né humain 89
2) Etude physiopathologique 89
a) Phénomène d'isoimmunisation 89
b) Analyse des antigènes responsables 90
α) Chez le poulain nouveau-né 90
β) Chez le muleton 92
c) Tableau clinique 94
α) Symptômes 94
β) Etude hématologique 95
γ) Comparaison avec l'ictère grave familial du nouveau-né humain et la maladie hémolytique expérimentale 95
d) Diagnostic 97
α) Diagnostic clinique 97
β) Diagnostic de laboratoire 97
e) Traitement 99
α) Importance du traitement précoce 99
β) La transfusion : base du traitement 99
f) Pronostic 100
g) Prévention 100
α) Prophylaxie post-partum 100
β) Comparaison avec la prévention chez la femme 101
γ) Prévention pour les gestations ultérieures 101

IV – LES HYBRIDES SONT-ILS VRAIMENT TOUS INAPTES A LA REPRODUCTION ? 102

A – LA MAJORITE DES HYBRIDES EST STERILE… 102

1) Les hybrides ont toujours été considérés stériles 102
2) Etude cytogénétique des hybrides 103
a) Notion d'évolution cytogénétique des espèces 103
b) Etude cytogénétique des hybrides 104
α) Mule et bardot 104
β) Hybride *Equus grevyi x Equus burchelli* 106
γ) Autres hybrides 109

3) Etude histologique des gonades d'hybrides 110
a) La stérilité des hybrides reconnue de tous temps 110
b) Les ovaires de mule et de femelle bardot..... 110
c) Les tubes séminifères d'hybrides 113
α) Testicules de bardot 113
β) Testicules de mulet..... 117

B – MAIS CERTAINS HYBRIDES PEUVENT ETRE FERTILES !..... 120

1) Hybrides Equus przewalskii x Equus caballus..... 120
2) Certaines mules peuvent être fertiles 123
a) Cas rapportés de mules et femelles bardots fertiles 123
α) Nombreuses descriptions contestées..... 123
β) Preuves scientifiques 124
b) Etude cytogénétique et mystère de la ségrégation chromosomique 128
α) Théorie de l'élimination du lot de chromosomes paternels 128
β) Théorie du mélange au hasard de chromosomes parentaux 128
c) Progression graduelle vers la fertilité 130
α) Chez les femelles 131
β) Chez les mâles 131
γ) Chez les descendants des hybrides 131
δ) Chez d'autres espèces animales..... 132

CONCLUSION..... 135

BIBLIOGRAPHIE 137

LISTE DES ABREVIATIONS et DEFINITIONS

- Gestation intraspécifique de jument : jument gestante portant un conceptus cheval.
- Gestation interspécifique de jument : jument gestante portant un conceptus mule.
- Gestation extraspécifique de jument : jument gestante portant un conceptus issu de transfert embryonnaire interspécifique.
- 2n = Nombre de chromosomes.
- *E. caballus x E. asinus* : individu issu du croisement d'un mâle *Equus caballus* et d'une femelle *Equus asinus.*
- eCG : (equine Chorionic Gonadotrophin) Hormone gonadotrope chorionique équine.
- HCG : (Human Chorionic Gonadotrophin) Hormone gonadotrope chorionique humaine.
- PMSG : (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin) Hormone gonadotrope chorionique équine, extraite du sérum de jument gestante.
- LH : (Luteinising Hormone) Hormone hypophysaire lutéinisante.
- FSH : (Follicule Stimulating Hormone) Hormone hypophysaire stimulant la croissance folliculaire.
- TSH : (Thyreotrope Stimulating Hormone) Hormone hypophysaire stimulant le fonctionnement des glandes thyroïdes.
- ARN : Acide RiboNucléique.
- EGF : (Epidermal Growth Factor).
- TGF : (Transforming Growth Factor).
- IGF : (Insulin like Growth Factor).
- HGF : (Hepatocyt Growth Factor).

- Individus F1 : individus hybrides issus du croisement de deux espèces parentales différentes.
- Individus B1 : individus appartenant à la descendance de l'individu hybride F1.
- Individus B2 : individus appartenant à la descendance de l'individu B1.
- HMG box : (High Mobility Group) Protéines ayant un domaine central de liaison à l'ADN.
- Gène *SRY* : gène déterminant la formation du testicule sur le chromosome Y.
- CMH I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I.
- Rh : Rhésus.
- ELA : (Equine Lymphocyte Antigene) Antigène de lymphocyte équin.

INTRODUCTION

La Famille EQUIDAE est constituée de 8 espèces très différentes incluant à la fois les chevaux, les ânes et les zèbres. Mais on oublie bien souvent d'y intégrer également les hybrides issus de croisements interspécifiques. La mule et le bardot sont les hybrides les plus répandus et les plus connus ; toutefois, il existe bien d'autres hybrides au sein de la Famille EQUIDAE, même si leur importance est plus anecdotique.

En raison des divergences tant phénotypiques que caryotypiques qui existent entre ces 8 espèces, la production de tels hybrides se caractérise d'une part par une gestation présentant des particularités immunologiques et hormonales propres, d'autre part par une pathologie immunitaire du post-partum particulièrement fréquente que nous nous efforcerons de détailler au cours de cette étude.

Tout le monde, depuis toujours, s'accorde à croire que tous les hybrides interspécifiques sont stériles ; d'ailleurs, la mule n'est-elle pas justement réputée pour sa stérilité ? Qu'en est-il réellement de ces affirmations sans équivoque concernant la stérilité légendaire des hybrides ? N'existerait-il pas quelques exceptions confirmant la règle ? C'est principalement cette question qui a motivé notre étude. Ainsi nous attarderons nous à analyser cet aspect afin d'essayer de confirmer ou d'infirmer des siècles de croyance au sujet de la stérilité des hybrides.

I – PRESENTATION DE LA FAMILLE DES EQUIDES

La famille des équidés appartient à l'ordre des périssodactyles, dont les individus se caractérisent par des membres disposant de sabots et d'un nombre impair de doigts. L'ordre des périssodactyles inclut également la famille des rhinocéros et des tapirs.

A – Histoire et évolution de la famille des équidés

L'histoire de la famille des équidés remonte à 70 millions d'années et son évolution phylogénétique est résumée dans le tableau 1 (Gunter Nobis, 1992).

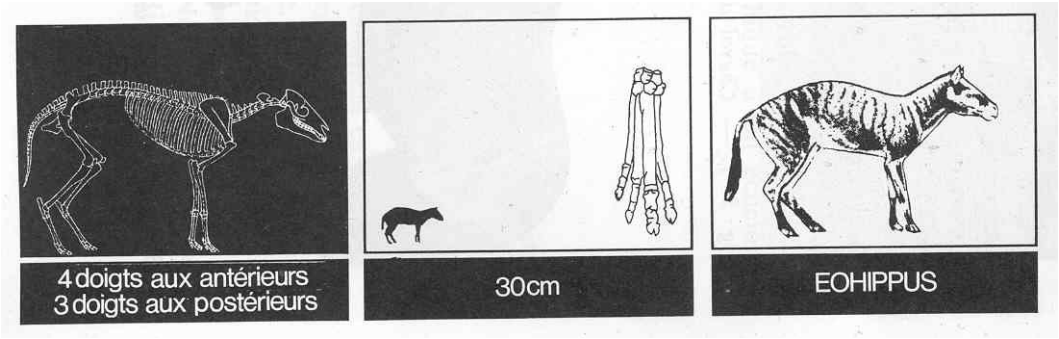
Les premiers mammifères, que l'on considère comme les ancêtres des Equidés, vivaient à l'Eocène inférieur, il y a près de 70 millions d'années, en Amérique du Nord et en Europe. Leurs ossements furent tout d'abord baptisés différemment selon le lieu de leur découverte :

- ***Hyracothérium***, pour les ossements provenant d'Europe (ce qui signifie : « animal qui se glisse dans les falaises »)
- ***Eohippus***, pour ceux découverts en Amérique du Nord (également surnommé : « petit cheval de l'aurore des temps »).

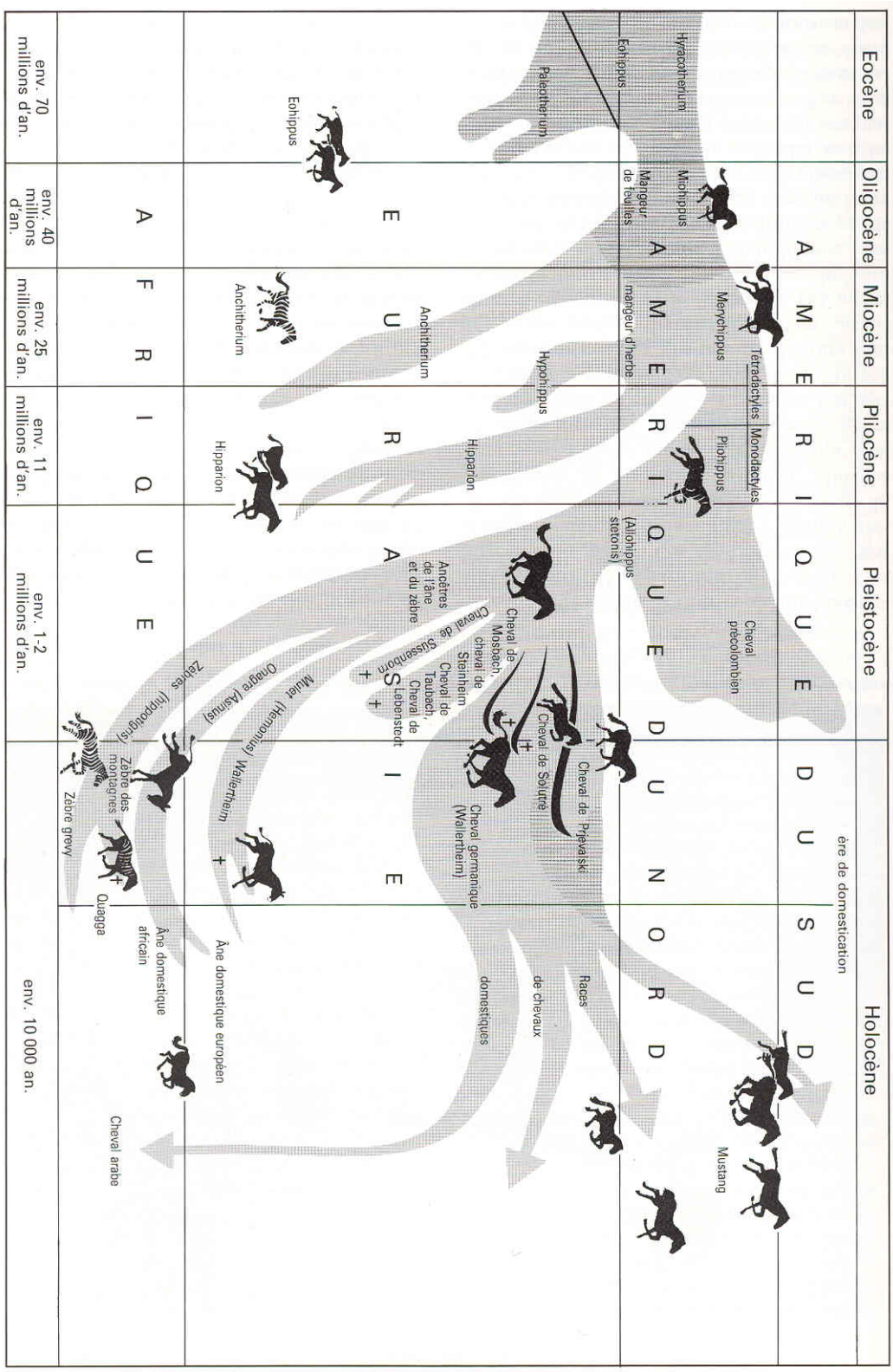
Mais des recherches ultérieures ont montré que les différences étaient minimes et insuffisantes pour établir une réelle distinction.

L'***Hyracothérium*** et l'***Eohippus*** (figure 1) ressemblaient très peu au cheval actuel ; en effet, le port de tête bas et le dos arrondi rappellent bien plus ceux de l'antilope. Il s'agissait d'animaux d'une taille pouvant varier de celle d'un chat à celle d'un renard, aux membres fins terminés par quatre doigts aux antérieurs et trois doigts aux postérieurs. Ils ne possédaient pas de véritables sabots, mais des ongles émoussés. Les molaires étaient à couronne basse (brachyodontes) et pourvues de tubercules permettant de broyer les aliments, puisque les ancêtres des Equidés étaient initialement des mangeurs de feuilles.

Figure 1 : Les ancêtres du cheval : l'*Eohippus* (Marcenac et al., 1982).



<u>Tableau 1 :</u> Tableau phylogénétique du cheval (d'après Gunter Nobis, 1992).

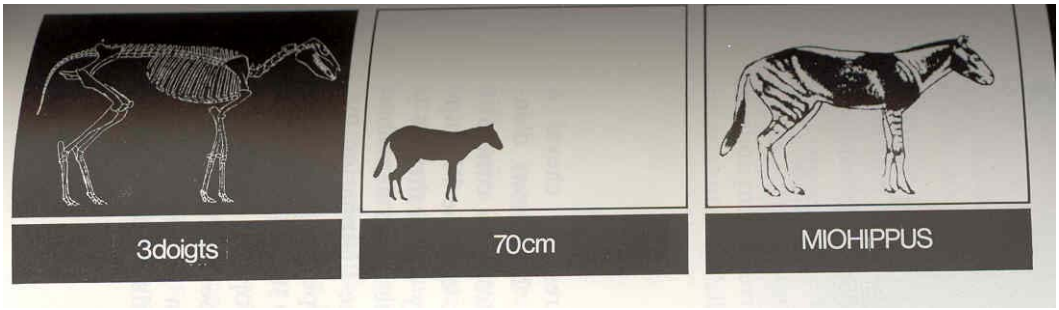


Si, à l'Eocène moyen, les ancêtres du cheval nord-américain ne se différenciaient pas du cheval européen, en revanche, différents genres apparaissent par la suite sur les deux continents (Eocène moyen et supérieur, Oligocène). Durant cette période, les prémolaires tendent à ressembler aux molaires par leur taille et leur forme, processus qui se poursuit chez les premiers équidés.

A cette époque existait en Europe, un rameau de l'*Hyracothérium* : le ***Paléothérium***. Cet animal ressemblait à un tapir. Après son extinction à l'Oligocène inférieur, aucun périssodactyle ne vivait plus en Europe à l'Oligocène et au Miocène inférieur.
En revanche, en Amérique du Nord, l'évolution des différents genres de périssodactyles se poursuit.

Au cours de l'Oligocène supérieur, il y a environ 40 millions d'années, le *Eohippus* change peu à peu pour devenir le ***Miohippus*** (figure 2). Cet animal présente alors trois doigts sur chaque membre, dont le médian est plus fort ; les prémolaires sont alors aussi grosses, voire plus grosses que les molaires. Ces caractéristiques constituent une marque de progrès et d'adaptation à la vie dans les steppes arides (Gunter Nobis, 1992).

Figure 2 : Les ancêtres du cheval : le *Miohippus* (Marcenac et al., 1982).



Après le *Miohippus*, l'évolution des Equidés se complique considérablement : les ancêtres du cheval d'Amérique du Nord ont tendance à buissonner, à se diviser en plusieurs groupes qui évoluent chacun dans des directions différentes.
L'existence du *Miohippus* se prolonge jusqu'au Miocène supérieur, il y a environ 20 millions d'années, à partir duquel il se développe sous plusieurs formes :

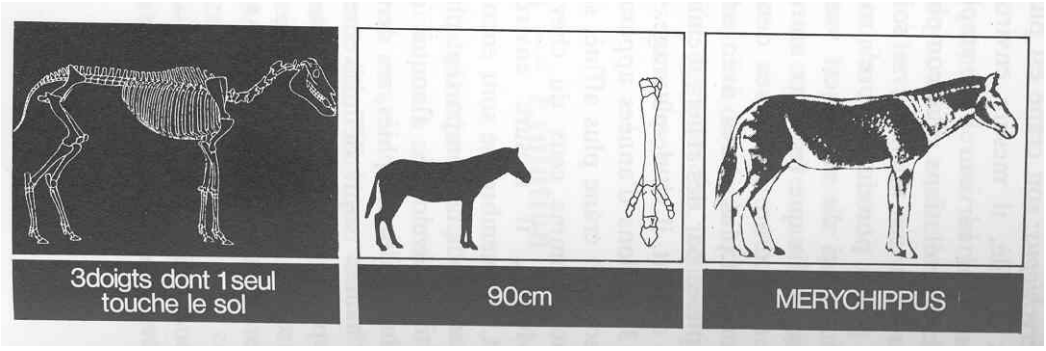
- l'***Anchitherium***, qui passa d'Amérique du Nord dans l'Ancien Monde en empruntant l'Isthme de Behring et vécut en Eurasie durant presque tout le Miocène et s'éteignit il y a environ 10 millions d'années.
- les autres Anchithériens demeurés en Amérique du Nord évoluèrent pour former l'***Hypohippus***.

Les membres de ces deux genres ne diffèrent pas de ceux du *Miohippus*, si ce n'est par une taille supérieure et une mâchoire plus complexe.

L'*Hypohippus* chemine un peu plus tard lui aussi vers l'Eurasie. Les deux genres s'éteignent dans l'Ancien Monde au début du Pliocène (environ 11 millions d'années).

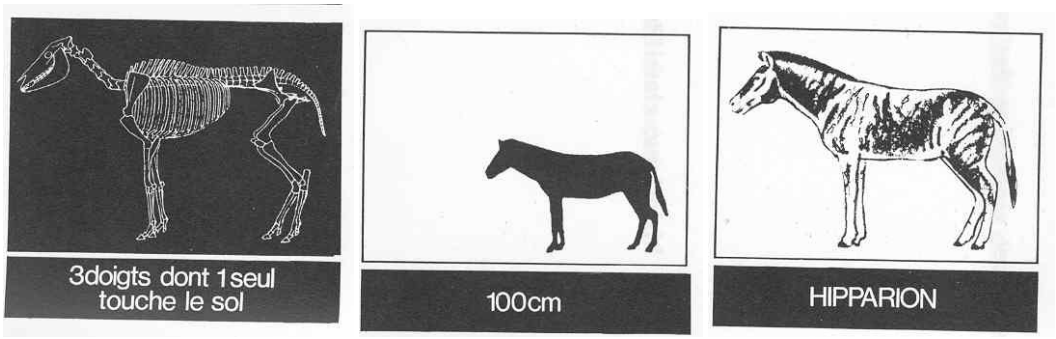
En Amérique du Nord apparaît au Miocène inférieur un nouveau descendant du *Miohippus* : le ***Merychippus*** (figure 3), chez lequel de multiples modifications anatomiques s'opèrent, donnant ainsi aux Equidés les moyens de « conquérir » les paysages ouverts tels que savanes boisées et steppes. Grâce à des molaires à couronne haute, le *Merychippus* peut broyer des plantes plus dures ; au cours du Miocène, les mangeurs de feuilles deviennent ainsi des mangeurs d'herbe. Les membres se sont eux aussi progressivement adaptés à la vie des steppes : le coude s'est soudé au radius, le péroné s'est atrophié et le troisième doigt est devenu sensiblement plus fort. Certaines classes de *Merychippus* auraient atteint une taille de un mètre au garrot (Gunter Nobis, 1992).

Figure 3 : Les ancêtres du cheval : le *Merychippus* (Marcenac et al., 1982).



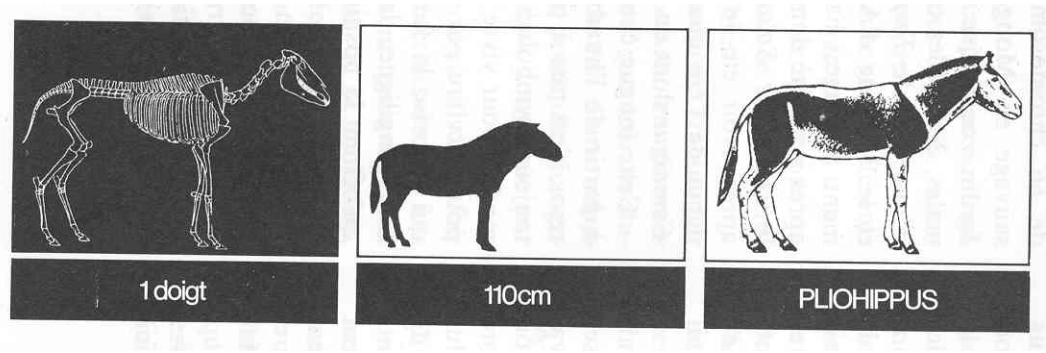
A la charnière entre le Miocène et le Pliocène il y a environ 11 millions d'années, plusieurs espèces de *Merychippus* ont donné des sous-espèces, dont l'***Hipparion*** (figure 4) et le ***Pliohippus*** (figure 5). L'*hipparion*, de taille variable (entre 70 et 100 centimètres), possédait trois doigts et des molaires à couronne haute (hypsodontes) pourvues de nombreuses crêtes d'émail. Peu après leur apparition, les *Hipparions* empruntèrent l'Isthme de Behring et migrèrent en Eurasie. Au cours de l'époque glaciaire, l'*Hipparion* disparut de l'Ancien comme du Nouveau Monde.

Figure 4 : Les ancêtres du cheval : l'*hipparion* (Marcenac et al., 1982).



Le ***Pliohippus*** (figure 5), descendant du *Merychippus*, apparaît au Miocène tardif. Il s'agit du premier monodactyle car les doigts latéraux (II et IV) atrophiés ne sont plus que des ergots sans aucune fonction. Sa mâchoire est caractérisée par de fortes dents hypsodontes à grandes crêtes d'émail (Gunter Nobis, 1992).

Figure 5 : Les ancêtres du cheval : le *Pliohippus* (Marcenac et al., 1982).

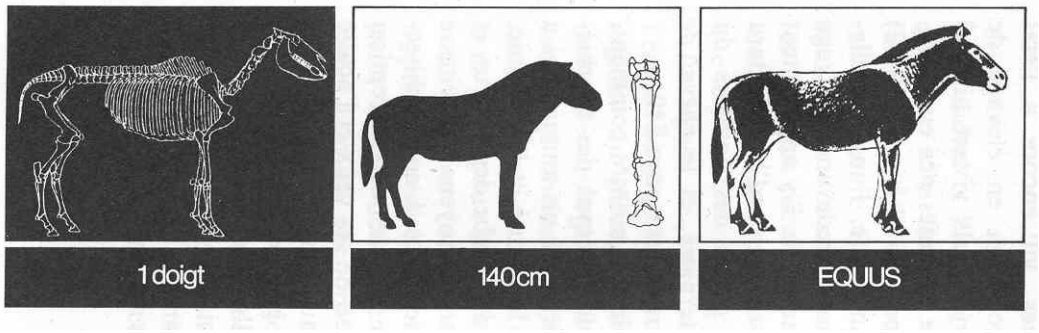


A la fin du Pliocène il y a environ 3 millions d'années, les représentants les plus évolués du *Pliohippus* sont si proches de l'*Equus* que l'évolution ultérieure n'engendrera que des modifications mineures.
Il y a environ 2 millions d'années, à un stade de développement encore primaire, l'*Equus* migre d'Amérique du Nord vers l'Ancien Monde ; il apparaît pour la première fois en Italie sous la forme de l'***Allohippus*** (*Equus stetonis*).

Les ancêtres des Equidés appartenant au groupe morphologique de l'***Allohippus*** d'Eurasie et vivant au début du Pléistocène (il y a environ 2 millions d'années), présentaient des caractéristiques morphologiques que l'on retrouve à la fois chez le cheval, le zèbre, l'âne et l'hémione, en particulier sur la face et la mâchoire.

Ce n'est qu'au début du Quaternaire (il y a près de 300 000 ans) que le genre ***Equus*** (figure 6) se distingue réellement en les différents sous-genres qu'on lui connaît actuellement : cheval, zèbre et âne (Gunter Nobis, 1992).

Figure 6 : Les ancêtres du cheval : l'*Equus* (Marcenac et al., 1982).



B – Composition de la famille des équidés

La famille des équidés se compose de huit espèces différentes, appartenant toutes au genre *Equus*, dont une a aujourd'hui complètement disparu (le quagga). Ces huit espèces peuvent être regroupées en 3 sous-genres selon leurs caractéristiques morphologiques :

- ♦ le sous-genre Cheval, comprenant 2 espèces :
  - *Equus caballus* (cheval domestique)
  - *Equus przewalskii* (cheval de Przewalski)
- ♦ le sous-genre Ane, comprenant 2 espèces :
  - *Equus asinus* (âne sauvage)
  - *Equus hemionus* (hémione)
- ♦ le sous-genre Zèbre, comprenant 4 espèces :
  - *Equus grevyi* (zèbre de Grevyi)
  - *Equus burchelli* (zèbre des plaines)
  - *Equus zebra* (zèbre des montagnes)
  - *Equus quagga* (quagga).

La répartition géographique approximative initiale des 7 espèces d'Equidés sauvages est représentée par la figure 7. Ce sont les différents croisements entre ces espèces qui permettront d'obtenir les hybrides actuels chez les équidés. Nous allons donc présenter les principales caractéristiques morphologiques et chromosomiques de chacune de ces espèces.

Figure 7: Répartition géographique initiale des 7 espèces d'Equidés sauvages (Short, 1975).

1 : *Equus przewalskii*
2 : *Equus asinus*
3 : *Equus hemionus*
4 : *Equus grevyi*
5 : *Equus burchelli*
6 : *Equus zebra*
7 : *Equus quagga*

1) Le cheval domestique (Equus caballus)

Equus caballus est l'espèce la plus connue et la plus répandue de la famille des équidés. Elle se subdivise elle-même en de nombreuses races.
Cette espèce est caractérisée par un caryotype de 32 paires de chromosomes (soit 2n = 64), comprenant :

- 26 chromosomes autosomes métacentriques,
- 36 chromosomes autosomes acrocentriques,
- 1 chromosome sexuel X submétacentrique,
- 1 chromosome sexuel Y acrocentrique (Benirschke et Ryder, 1985).

Ce caryotype est identique chez toutes les races de cheval domestique.

2) Le cheval de Przewalski (Equus przewalskii)

Equus przewalskii (figure 8) est une espèce qui a actuellement complètement disparu à l'état sauvage, et qui ne persiste aujourd'hui qu'en petit nombre dans les parcs zoologiques. Il s'agit d'un petit cheval trapu et robuste caractérisé par une robe claire avec des crins foncés, associée à une raie du mulet.
Son caryotype se compose de 33 paires de chromosomes (2n = 66) et comprend :

- 24 chromosomes autosomes métacentriques,
- 40 chromosomes autosomes acrocentriques
- 2 chromosomes sexuels X et Y acrocentriques (Benirschke et Ryder, 1985).

Figure 8: ***Equus przewalskii*** (Hanak, 1985).

Il existe une forte homologie de caryotype entre *Equus przewalskii* et *Equus caballus*. Il semble même probable qu'une fusion Robertsonienne entre deux paires de chromosomes acrocentriques du cheval de Przewalski, ait mené au caryotype du cheval domestique. Nous verrons dans la suite de cette étude que cette proximité caryotypique influencera les aptitudes reproductrices de l'hybride.

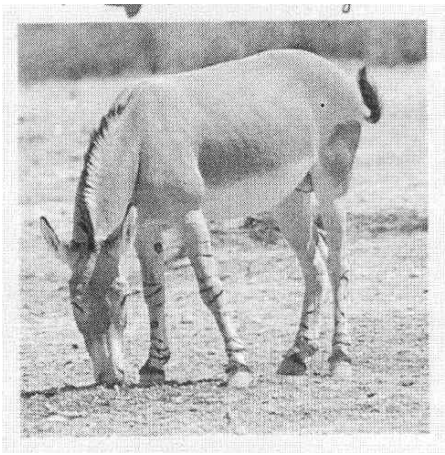
3) L'âne sauvage (Equus asinus)

Equus asinus est originaire de l'Afrique du Nord.
On en distingue plusieurs sous-espèces :

- *Equus asinus africanus* : l'âne sauvage africain
- *Equus asinus somalicus* : l'âne sauvage de Somalie (figure 9)
- *Equus asinus asinus* : l'âne commun domestique
- *Equus asinus atlanticus* : l'âne sauvage d'Algérie
- *Equus asinus taeniopus* : l'âne sauvage abyssin.

Les ânes sont caractérisés par une décoloration ventrale de la robe, par la présence de trois particularités : une raie de mulet, une bande scapulaire et des zébrures ; et surtout par des oreilles démesurément longues.

Figure 9 : ***Equus asinus somalicus*** (Hanak, 1985).



Le caryotype des ânes est composé de 31 paires de chromosomes (2n = 62) et se décompose de la façon suivante :

- 38 chromosomes autosomes métacentriques,
- 22 chromosomes autosomes acrocentriques,
- 1 chromosome X beaucoup plus submétacentrique que celui du cheval,
- 1 chromosome Y acrocentrique (Benirschke et Ryder, 1985).

4) L'âne sauvage d'Asie ou hémione (Equus hemionus)

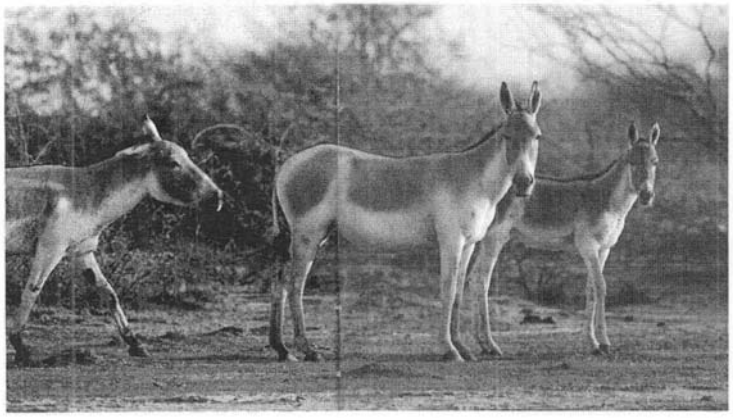
Equus hemionus est une espèce qui se situe morphologiquement entre le cheval et l'âne (figure 10).
Elle se subdivise en cinq sous-espèces :

- *Equus hemionus hemionus* : l'âne sauvage de Mongolie
- *Equus hemionus hemippus* : l'âne sauvage de Syrie
- *Equus hemionus khur* : l'âne sauvage indien
- *Equus hemionus kiang* : l'âne sauvage du Tibet
- *Equus hemionus onager* : l'onagre de Perse ou âne sauvage de Perse.

Le caryotype de l'hémione est caractérisé par 28 paires de chromosomes (2n = 56) et se compose de :

- 36 chromosomes autosomes métacentriques,
- 18 chromosomes autosomes acrocentriques,
- 1 chromosome X submétacentrique,
- 1 chromosome Y acrocentrique (Benirschke et Ryder, 1985).

Figure 10 : ***Equus hemionus hemionus*** (Hanak, 1985).

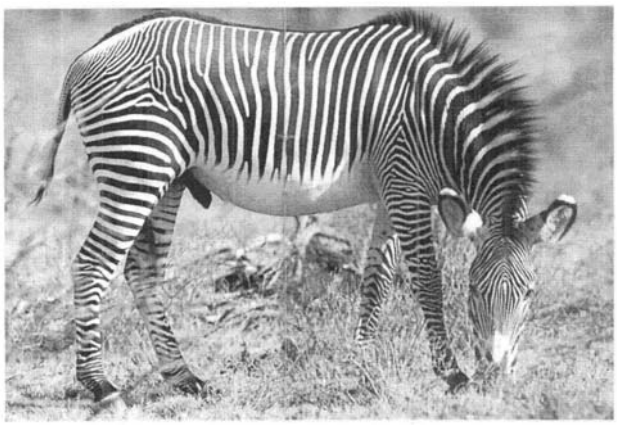


Mais il existe parfois une variabilité de caryotype à l'intérieur même de cette espèce ; en raison d'un réarrangement Robertsonien entre deux petits chromosomes acrocentriques (23 et 24), il est parfois possible d'observer également des caryotypes d'hémione à 55 ou même 54 chromosomes.

5) Le zèbre de Grevyi (Equus grevyi)

Equus grevyi est originaire de Somalie et du nord du Kenya, il était autrefois nommé le Zèbre impérial. Il se distingue facilement des autres espèces de zèbre par ses larges oreilles et son modèle de rayures : quinze rayures de chaque côté sur les flancs, qui se rejoignent sur la ligne médiane du ventre (figure 11).

Figure 11 : ***Equus grevyi*** (Hanak, 1985).



Son caryotype se compose de 23 paires de chromosomes (2n = 46) :

- 30 chromosomes autosomes métacentriques,
- 14 chromosomes autosomes acrocentriques,
- 1 chromosome X submétacentrique,
- 1 chromosome Y minuscule acrocentrique ou métacentrique (Benirschke et Ryder, 1985).

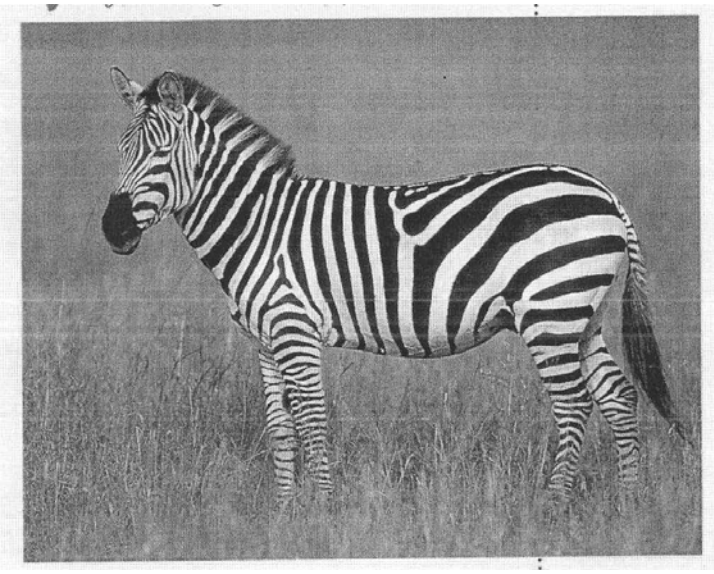
6) Le zèbre commun ou zèbre des plaines (Equus burchelli)

Plusieurs sous-espèces de *Equus burchelli* sont répertoriées :

- *Equus burchelli burchelli* : le zèbre de Burchell (figure 12)
- *Equus burchelli antiquorum* : le zèbre de Chapman
- *Equus burchelli boehmi* : le zèbre de Grant.

Toutes ces sous-espèces se caractérisent par cinq à six rayures sur les flancs, mais il existe une grande variabilité de l'étendue des rayures claires : ainsi il a déjà été vu des zèbres presque entièrement noirs ou blancs.

Figure 12 : ***Equus burchelli boehmi*** (Hanak, 1985).



Le caryotype du zèbre commun est composé de 22 paires de chromosomes (2n =44) :

- 34 chromosomes autosomes métacentriques,
- 8 chromosomes autosomes acrocentriques,
- 1 chromosome X submétacentrique,
- 1 chromosome Y minuscule acrocentrique ou métacentrique (Benirschke et Ryder, 1985).

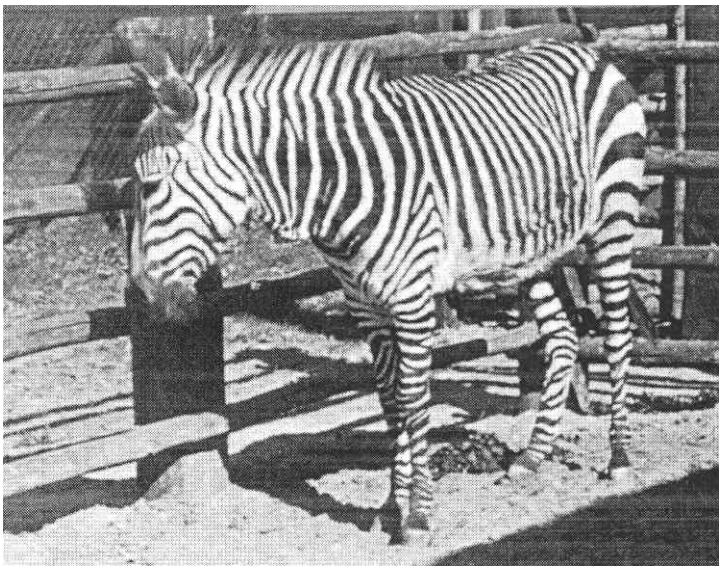
7) Le zèbre des montagnes (Equus zebra)

Cette espèce se subdivise en deux sous-espèces :

- *Equus zebra hartmannae* : le zèbre des montagnes de Hartmanne
- *Equus zebra zebra* : le zèbre des montagnes.

Ces deux sous-espèces se distinguent facilement des autres espèces de zèbre par la présence d'une rayure transversale à la base de la queue, et d'un nombre intermédiaire de rayures sur les flancs (12 rayures) (figure 13).

Figure 13 : ***Equus zebra zebra*** (Hanak, 1985).



Son caryotype se constitue de 16 paires de chromosomes (2n = 32). Le zèbre des montagnes d'Afrique du Sud est l'espèce de la famille des équidés qui possède le moins de chromosomes. Le caryotype se décompose en :

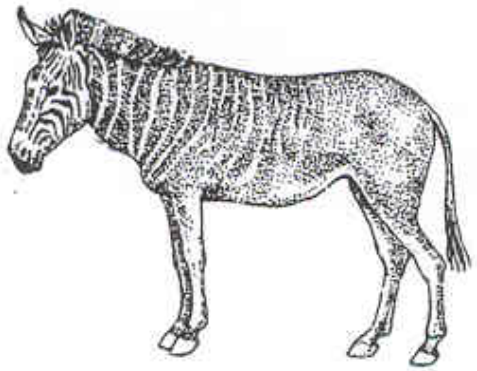
- 26 chromosomes autosomes métacentriques,
- 4 chromosomes autosomes acrocentriques,
- 1 chromosome X submétacentrique,
- 1 chromosome Y minuscule acrocentrique (Benirschke et Ryder, 1985).

8) Le Quagga (Equus quagga)

L'espèce *Equus quagga* a été complètement exterminée au siècle dernier par les colons. Elle se distinguait des autres zèbres par l'absence de rayures sur l'arrière-main (figure 14).

En raison de sa disparition précoce, le caryotype de cette espèce n'a jamais été déterminé.

<u>Figure 14 :</u> Représentation de *Equus quagga* (Hanak, 1985).



La famille des équidés est remarquable par le fait que le seul genre qui la compose, ait subi une telle évolution cytogénétique : le caryotype des espèces qui la représentent s'étale de 2n = 32 à 2n = 66, comme le montre le tableau 2.

<u>Tableau 2 :</u> Nombre de chromosomes des espèces d'Equidés
(d'après Ryder et al., 1978).

Nom de l'espèce	Nombre de chromosomes
• ***Equus przewalskii***	**2n = 66**
• ***Equus caballus***	**2n = 64**
• ***Equus asinus***	**2n = 62**
• ***Equus hemionus***	**2n =56**
• ***Equus grevyi***	**2n = 46**
• ***Equus burchelli***	**2n = 44**
• ***Equus zebra***	**2n = 32**

La famille des équidés est une famille variée, aujourd'hui composée de 7 espèces très différentes aussi bien morphologiquement que chromosomiquement. Cependant malgré leurs différences, la quasi-totalité des individus de ces espèces sont capables de se reproduire entre eux pour donner naissance à des hybrides interspécifiques, que nous allons étudier.

II – LES HYBRIDES INTERSPECIFIQUES CHEZ LES EQUIDES

A partir des huit espèces d'équidés présentées précédemment (dont sept sont encore présentes), il est possible d'obtenir de nombreux hybrides par croisement interspécifique. Nous allons nous intéresser aux différents hybrides interspécifiques qui ont été répertoriés dans la littérature. Nous ne tiendrons pas compte des croisements entre les sous-espèces.

A – Les différents hybrides interspécifiques et leurs caractéristiques

1) De nombreux croisements interspécifiques

Le tableau 3 montre que malgré les différences morphologiques et chromosomiques (citées précédemment) entre les huit espèces constituant la famille des équidés, la quasi-totalité des individus de ces espèces est capable de se croiser pour donner naissance à des hybrides interspécifiques.

Tableau 3 : Différents croisements interspécifiques répertoriés (d'après Gray, 1972).

	Equus asinus	***Equus burchelli***	***Equus caballus***	***Equus grevyi***	***Equus hemionus***	***Equus Przewalskii***	***Equus quagga***	***Equus zebra***
Equus asinus		52 R	143 R	16 R	35 R	3	1 **?**	28 R
Equus burchelli			42 R	1 **?**	16 R	7 R	1	18 R
Equus caballus				17 R	25 R	34 R	12	15 R
Equus grevyi					**?**	**?**	**?**	4
Equus hemionus						1	2	10 R
Equus Przewalskii							1	**?**
Equus quagga								3
Equus zebra								

R : croisements rapportés réciproques
n : nombre de publications répertoriées par GRAY (1972)

Ainsi, sur les 28 types d'hybrides potentiels qu'il serait possible d'obtenir par croisement des huit espèces d'équidés entre elles, 24 types d'hybrides interspécifiques ont été répertoriés dans la littérature.

Le tableau 3 présente une synthèse des types d'hybrides décrits jusqu'en 1972. Cependant, on peut penser que tous les hybrides obtenus n'y ont pas systématiquement été rapportés.

Les seuls croisements interspécifiques n'ayant pas été décrits dans cet ouvrage sont :

- *Equus grevyi x Equus hemionus*
- *Equus grevyi x Equus przewalskii*
- *Equus grevyi x Equus quagga*
- *Equus przewalskii x Equus zebra*

Toutefois, rien ne nous empêche de supposer que de tels croisements ont peut-être eu lieu dans la nature, sans forcément avoir été publiés par les scientifiques.

A l'opposé, les preuves réelles manquent pour certains croisements pourtant répertoriés. Ainsi, pour le croisement *Equus asinus x Equus quagga*, Gray (1972) reste prudente en précisant qu'il est possible que l'*Equus quagga* référencé en 1938 puisse être en réalité un *Equus burchelli*. De même pour le croisement *Equus burchelli x Equus grevyi*, aucun hybride n'a été décrit dans la zone où coexistaient ces deux espèces ; mais en 1965, un taxidermiste de Nairobi a trouvé une peau qui aurait pu appartenir à un hybride naturel (Gray, 1972).

Ainsi, presque toutes les espèces seraient capables de croiser entre elles, même si certaines données demeurent imprécises et parfois, non validées scientifiquement.

La très grande majorité des croisements objectivés sont réciproques. Ainsi, par exemple : un mâle *Equus asinus* est capable de croiser avec une femelle *Equus zebra* ; et réciproquement, une femelle *Equus asinus* peut engendrer des hybrides avec un mâle *Equus zebra*. Notons que les données disponibles dans la littérature (même celles fournies par Gray, 1972) ne permettent de connaître que les espèces parentales, sans qu'on ne puisse préciser combien d'hybrides sont issus de chaque sens de croisement.

2) Exemples de particularités des principaux hybrides

La plupart des hybrides héritent d'un phénotype intermédiaire entre les deux espèces parentales ; ce qui leur confère souvent une conformation tout à fait originale. Nous allons présenter quelques exemples de particularités morphologiques décrites chez les hybrides les plus fréquents (Gray, 1972).

En général, dans la nomination d'un croisement, le premier individu cité est le mâle et le second la femelle (par exemple : pour le croisement *E. asinus x E. burchelli*, *E. asinus* est le mâle et *E. burchelli* la femelle), mais dans la suite de l'étude, nous parlerons uniquement de croisements réciproques, sans que le sens du croisement ne soit précisé de façon absolue.

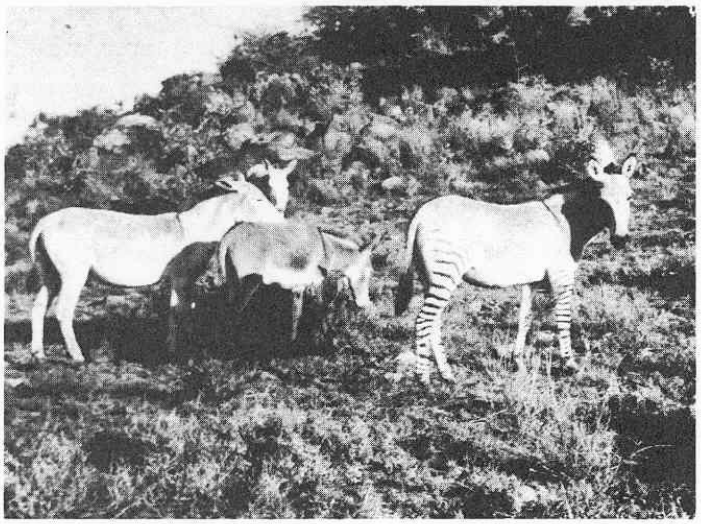
a) Equus asinus x Equus burchelli

Les hybrides résultant du croisement *E. asinus x E. burchelli* présentent une conformation et un caractère intermédiaires entre les deux espèces parentales. Leur robe est grise à marron, comme celle d'*E. asinus*, avec les rayures du zèbre. Toutefois, ces rayures sont plus nombreuses que chez *E. burchelli* et sont distinctes sur les membres mais plus discrètes sur la tête et la croupe (figure 15 et 16). Ces hybrides constituent de puissants animaux de bât, et ont été utilisés en tant que tels au Kenya.

<u>Figure 15 :</u> Hybride interspécifique *Equus burchelli x Equus asinus* (Gray, 1972).

Cet hybride est issu du croisement interspécifique entre un mâle Zèbre de Grant (*Equus burchelli böhmiii* 2n = 44) et une ânesse sauvage d'Algérie (*Equus asinus atlanticus* 2n = 62).

<u>Figure 16 :</u> Hybride interspécifique *Equus burchelli x Equus asinus* (King, 1965).



Cet individu hybride est issu du croisement d'un mâle Zèbre de Grant (*Equus burchelli böhmiii 2n = 44)* et d'une ânesse domestique (*Equus asinus asinus* 2n = 62). Cet hybride a été baptisé le « Zebronkey » .

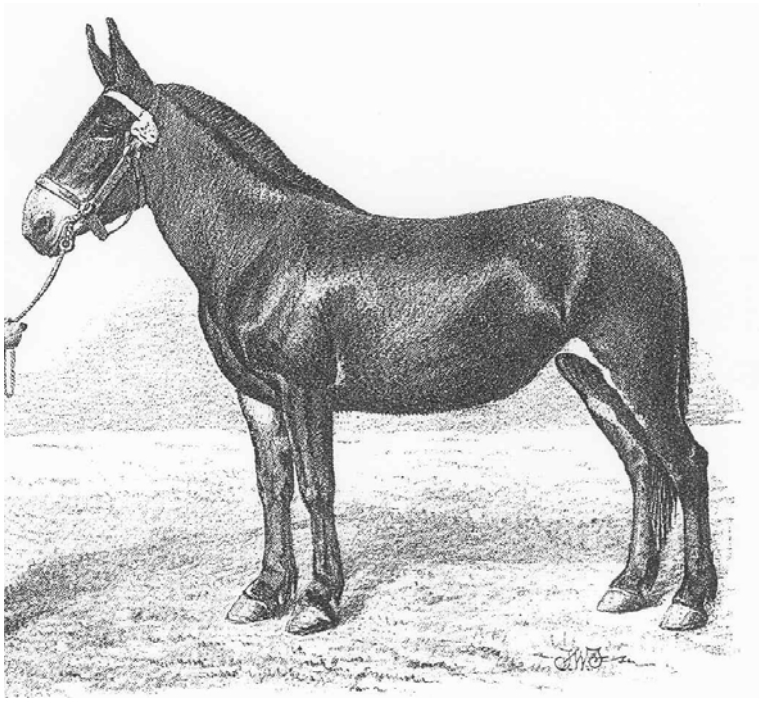
b) Equus asinus x Equus caballus

Dans le croisement *E. asinus x E. caballus*, on distingue deux types d'hybrides selon le sens du croisement :

- le mulet : résulte du croisement d'un âne et d'une jument (*E. asinus x E. caballus*).
- le bardot : résulte du croisement d'un étalon et d'une ânesse (*E. caballus x E. asinus*).

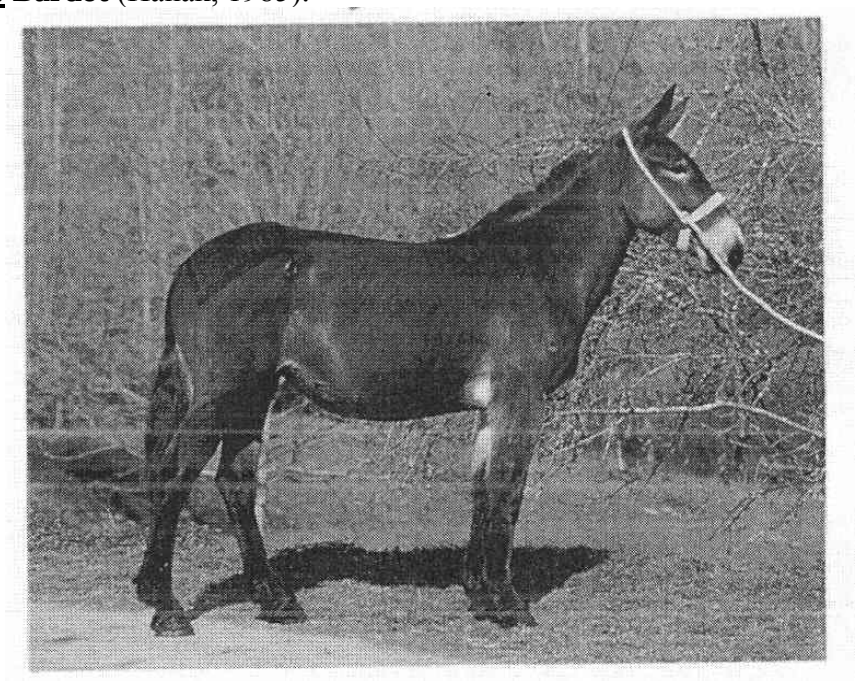
Le mulet juxtapose les caractères morphologiques de ses deux parents : il dispose d'une taille intermédiaire entre l'âne et la jument, avec la physionomie de l'âne (svelte, poitrine étroite, encolure courte, garrot bas, membres grêles mais très robustes, oreilles longues (figure 17). La force et la taille du cheval, associées à la rusticité, la robustesse et au caractère paisible de l'âne, en font un animal de bât idéal, très apprécié, notamment sur les sentiers difficiles de montagne grâce à un pied très sûr. Cette combinaison de qualités respectives des deux géniteurs a favorisé l'élevage du mulet.

Figure 17 : Représentation de mulet (d'après Metz, 1998).



Le bardot est d'apparence similaire au mulet, mais plus petit. Sa conformation rappelle davantage celle du cheval (figure 18). Il est nettement moins apprécié que son hybride réciproque car il semble ne présenter ni la force du cheval, ni le caractère placide de l'âne, qualités tant recherchées chez un animal de bât (Marcenac et al., 1980).

Figure 18 : **Bardot** (Hanak, 1985).



c) Equus asinus x Equus grevyi

Les hybrides issus du croisement *E. asinus x E. grevyi* possèdent la conformation et la couleur de robe de l'âne, mais avec des rayures sur le corps et les membres ; ces rayures sont plus étroites que celles de *E. grevyi*.

d) Equus asinus x Equus hemionus

Les hybrides résultant du croisement *E. asinus x E. hemionus* héritent de la couleur rougeâtre de la robe de l'hémione. Ils semblent disposer de la force de l'âne et de la rapidité de l'hémione, ce qui leur confèrerait une aptitude au travail, mais ils sont réputés pour avoir mauvais caractère.

e) Equus asinus x Equus zebra

Le croisement *E. asinus x E. zebra* produit des hybrides à la robe marron avec des rayures très prononcées sur les membres et sur l'arrière-main, mais beaucoup plus discrètes et étroites sur le reste du corps.

f) Equus burchelli x Equus caballus

Les hybrides du croisement *E. burchelli x E. caballus* présentent une conformation et un caractère intermédiaire entre les deux espèces parentales. Leur robe possède plus de rayures que celle de *E. burchelli*. Leur éventuelle aptitude au travail se limiterait à des tâches lentes.

g) Equus burchelli x Equus hemionus

Les hybrides du croisement *E. Burchelli x E. hemionus* ressemblent davantage au zèbre qu'à l'hémione, avec une robe gris-rougeâtre présentant des rayures étroites et discrètes principalement localisées à la tête, l'encolure et les épaules.

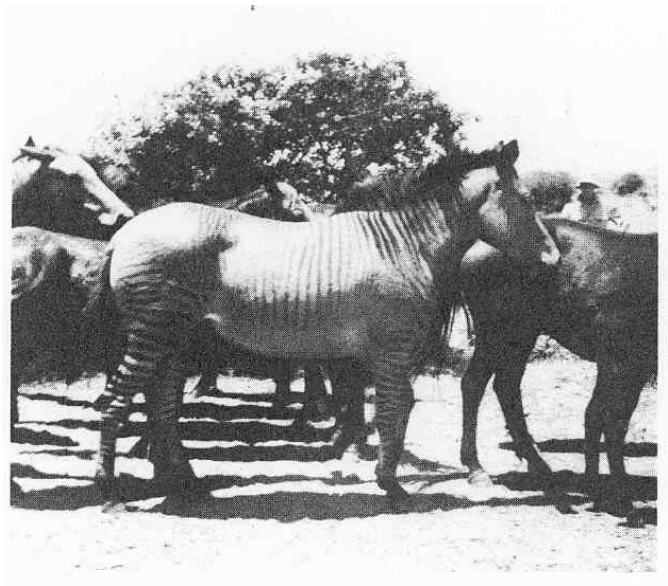
h) Equus burchelli x Equus zebra

Le croisement *E. burchelli x E. zebra* produit des hybrides qui ressemblent surtout à *E. burchelli*, avec des rayures étroites et une rayure dorsale large. En revanche, ils héritent des oreilles, du modèle de rayures sur l'arrière-main et de l'absence de fanon de E. *zebra*.

i) Equus caballus x Equus grevyi

Les hybrides issus du croisement *E. caballus x E. grevyi* présentent un poids et une taille intermédiaires entre le cheval et le zèbre. Leur robe porte les rayures de *E. grevyi* (figure 19). Cet hybride est appelé « zebrorse ». Certains de ces hybrides sont d'excellents travailleurs en raison de leur douceur et de leur capacité à travailler sous la chaleur.

Figure 19 : Hybride interspécifique *Equus caballus x Equus grevyi* (Allen et al., 1993).



Cet individu hybride est issu du croisement entre un mâle Zèbre de Grevyi (*Equus grevyi* 2n = 46) et une jument domestique (*Equus caballus* 2n = 64).

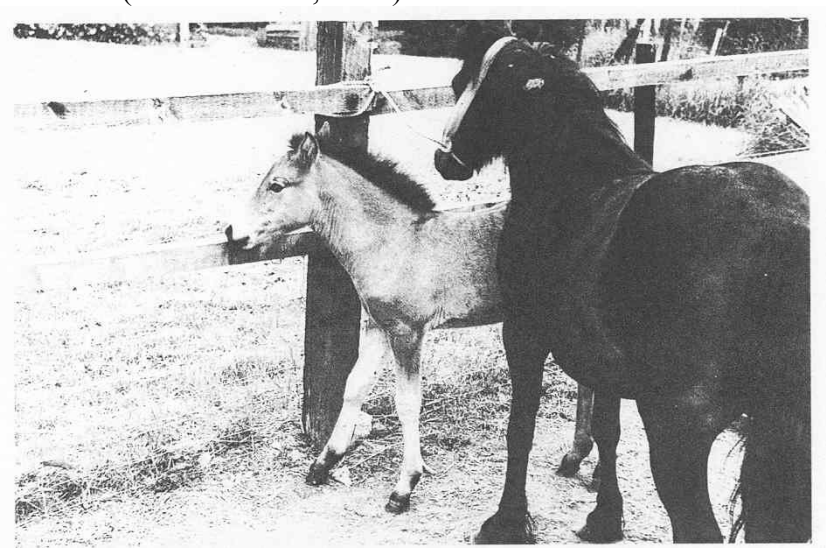
j) Equus caballus x Equus hemionus

Les hybrides du croisement *E. caballus x E. hemionus* tendent à ressembler davantage à l'hémione qu'au cheval, mais ils sont sensiblement plus grands. Leur queue et leur crinière sont plus longues que celles de l'hémione. Ils semblent être facilement apprivoisés.

k) Equus caballus x Equus przewalskii

L'individu hybride issu du croisement *Equus caballus x Equus przewalskii* a tendance à ressembler surtout au cheval de Przewalski, avec la même corpulence trapue et la raie de mulet (figure 20).

Figure 20 : Hybride interspécifique *Equus caballus x Equus przewalskii* (Allen et Short, 1997).



Cet hybride est issu du croisement d'une jument domestique Poney Welsh (*Equus caballus* 2n = 64) et d'un étalon de Przewalski (*Equus przewalskii* 2n = 66).

l) Equus caballus x Equus zebra

Le croisement *E. caballus x E. zebra* produit des hybrides de taille quasiment équivalente à celle du cheval. Leur robe est marron avec des rayures surtout localisées à la tête et l'encolure. Ils ont le caractère nerveux du zèbre. Cet hybride est nommé « zorse ».

m) Equus hemionus x Equus zebra

Les hybrides résultant du croisement *E. hemionus x E. zebra* présentent une robe marron, mais ressemblent au zèbre en raison de la taille de leurs oreilles et des zébrures sur leurs membres. Ils héritent souvent de la vivacité de l'hémione.

Il existe donc au sein de la famille des équidés, presque autant d'hybrides que de croisements interspécifiques potentiels entre ces huit espèces d'équidés. Mais au-delà de la possibilité biologique de la naissance de ces animaux, il faut s'interroger sur l'intérêt de ces différents hybrides interspécifiques.

B – Intérêt de ces hybrides

Nous avons vu précédemment que la famille des équidés est capable d'engendrer de nombreux hybrides interspécifiques. Toutefois, l'importance relative en effectifs de ces différents hybrides est très disparate ; en effet, seul le croisement *E. asinus x E. caballus* est réellement exploité par l'homme. Selon Short (1975b), mulets et bardots constituent les seuls hybrides interspécifiques d'équidés commercialement viables que l'homme ait produit.

1) Intérêt réel du croisement Equus asinus x Equus caballus

a) Mule : animal d'utilité

Les mules (croisement d'un âne et d'une jument) ayant hérité des qualités respectives de leurs deux parents (taille et force du cheval, rusticité, robustesse et calme de l'âne) constituent un animal de bât très apprécié. C'est pourquoi l'élevage du mulet, déjà pratiqué au temps des Romains, s'est largement répandu depuis le V ème siècle jusqu'à nos jours.

En revanche, le croisement réciproque d'un cheval et d'une ânesse est nettement moins recherché, car le bardot est un animal dont les qualités au travail sont moindres par rapport à celles du mulet. De plus, ce croisement étant beaucoup plus difficile à obtenir, comme nous le préciserons plus tard dans l'étude, les bardots sont beaucoup plus rares que les mulets et leur production ne constitue pas un véritable élevage (Marcenac et al., 1980).

b) Mule : intérêt scientifique

Les mules et la question de leur infertilité ont toujours attiré l'intérêt des scientifiques. Les premières études concernant les mules remontent à Aristote, autour de 350 ans avant Jésus Christ, qui s'interrogeait déjà sur leur infertilité. Au 17ème siècle, les scientifiques s'intéressaient à l'anatomie des ovaires de mules. Depuis le début du 20ème siècle, des études concernant l'infertilité des mules restent d'actualité : l'incompatibilité chromosomique, durée du cycle œstral ... Nous analyserons ultérieurement le mystère tant de fois soulevé par les scientifiques, au sujet de l'infertilité des mules.
Plus récemment, la mule a servi de modèle d'étude pour comprendre la physiologie des stades précoces de gestation chez le cheval et l'âne (Short, 1975 b). La mule est même aujourd'hui utilisée expérimentalement en tant que receveuse d'embryon (Davies et al., 1985 ; Antczak et al., 1985).

2) Intérêt limité pour les autres hybrides

Short (1975 b) estime que les autres hybrides interspécifiques d'équidés n'ont jamais dépassé le stade de la pure curiosité scientifique ou zoologique.

Si les catégories d'hybrides sont nombreuses et variées chez les équidés, leur importance quantitative est variable selon le type de croisement. Seul le croisement *Equus asinus x Equus caballus* (quelque soit le sens du croisement) est quantitativement important et significativement représenté. C'est pourquoi, dans la suite de l'étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux mulets et aux bardots. Nous allons nous interroger sur les problèmes rencontrés pour la production d'hybrides interspécifiques.

III – PROBLEMES PHYSIOLOGIQUES LIES A LA PRODUCTION DES HYBRIDES

Les mulets et bardots étant les hybrides les plus représentés et donc par conséquent les plus étudiés, on dispose de davantage de données concernant ces derniers que pour les autres hybrides. Ainsi s'intéressera-t-on plus particulièrement aux particularités du croisement *Equus asinus* x *Equus caballus* et *Equus caballus x Equus asinus* dans la suite de cette étude.

A- Rituels d'accouplement

La reproduction de l'âne se caractérise par un rituel d'accouplement qui lui est propre, avec une phase précopulatoire intense et prolongée, à laquelle l'ânesse en œstrus participe activement. Au cours de cette phase, s'établissent des interactions intenses mais de courte durée entre les deux partenaires, qui se manifestent chez le mâle par des brayements, le reniflement, le signe du flehmen, l'exploration du bout du nez des différentes parties du corps de la femelle, plus fréquemment la région du cou, des genoux et de la vulve. Le mâle réalise aussi des chevauchements sans érection et mord l'encolure ainsi que la corde du jarret de la femelle. Les baudets ne procèdent jamais immédiatement à la copulation des ânesses en œstrus. Entre la phase précopulatoire et la saillie, se succèdent plusieurs périodes de stimulation sexuelle et de désintérêt apparent de l'ânesse. Les ânesses en œstrus contribuent substantiellement à ce rituel sexuel en s'approchant du baudet et en le stimulant une vingtaine de fois par jour (Henry, 2001).

Ce rituel d'accouplement est donc complexe. La participation de l'ânesse pendant la phase précopulatoire, prépondérante à la stimulation du baudet, rend les ânes difficiles à exploiter pour le recueil de semence en vue de l'insémination artificielle. Toutefois, lors de croisement d'un âne et d'une jument, les interactions entre les deux partenaires ne semblent pas constituer un obstacle majeur à l'accouplement, puisque la production de mulet s'avère fructueuse.

B- Taux de fertilité

Le taux de gestation précoce du croisement âne x jument est sensiblement identique à celui de la gestation intraspécifique, ce qui est donc favorable à la production de mules.
Il n'en est pas de même pour le croisement réciproque cheval x ânesse.

Allen et al. (1993) ont montré que sur un groupe de 125 ânesses, accouplées en monte naturelle ou inséminées avec de la semence d'étalons connus pour présenter une fertilité élevée, seulement 18 d'entre elles étaient gestantes à 28 jours (soit 14,4 %). Des lavages utérins ont également été pratiqués sur un groupe de 34 ânesses en vue de récolter les embryons. Seuls 5 embryons ont été récoltés, d'où un taux de récolte d'embryon de 14,7 % ; ce qui est beaucoup plus faible que le taux de récolte de 60 à 70 % obtenu sur des accouplements intraspécifiques.

On rencontre également cette frappante disparité de taux de gestation entre croisements interspécifiques réciproques hors de la famille des équidés. Ainsi, le croisement brebis x bouc montre un taux de conception nettement inférieur (de 10 % environ) à celui du croisement chèvre x bélier. Il en est de même pour le croisement lapine x lièvre (Allen et al., 1993).

On retrouve de la même manière cette différence notable de taux de fertilité entre les croisements réciproques chez les autres hybrides d'équidés. Ainsi, on a constaté que, lorsque la femelle du croisement est une jument, le taux de conception semble similaire à celui de la production de mules ; mais lors de croisements réciproques, par exemple lorsque l'on croise un étalon avec une femelle zèbre ou ânesse sauvage, le taux de fertilité semble être nettement inférieur, sans toutefois que des chiffres précis n'aient pu être avancés étant donné le faible nombre de croisements réalisés entre ces espèces.

Le mécanisme responsable de cette grande différence du taux de fertilité dans les accouplements interspécifiques demeure inconnu. Selon Gray (1972) le fait que le taux de conception soit plus faible que lors du croisement d'une ânesse et d'un cheval proviendrait de la longueur du pénis qui serait plus faible chez l'étalon que chez l'âne. Mais cette hypothèse n'a jamais été validée. Les scientifiques pensent que le phénomène d'empreinte génétique pourrait jouer un rôle (Allen et al., 1993.)

Selon Allen et al. (1993), il est tentant de s'interroger sur le fait que la fécondation s'opérerait plus facilement dans tous les croisements où le mâle dispose d'un nombre de chromosomes inférieur à celui de la femelle tels que :

- mâle *Equus asinus* (2n = 62) x femelle *Equus caballus* (2n = 64)
- mâle *Equus burchelli* (2n = 44) x femelle *Equus caballus* (2n = 64).

Et inversement, le taux de fertilité est notablement réduit dans toutes les combinaisons où le mâle dispose d'un nombre de chromosomes supérieur à celui de la femelle tels que :

- mâle *Equus caballus* (2n = 64) x femelle *Equus asinus* (2n = 62)
- mâle *Equus zebra* (2n = 44) x femelle *Equus asinus* (2n = 62).

Ceci ne constitue qu'une simple observation, qui n'a pas encore été suivie d'études approfondies permettant d'aboutir à une explication plausible reliant ce phénomène, à la variabilité du taux de fertilité selon le sens du croisement.

C- Sex ratio déséquilibré pour les mules

Un grand nombre de données concernant le sex ratio des croisements âne x jument à la naissance révèle un déséquilibre marqué en faveur des femelles : 56 femelles / 44 mâles. Cette constatation pourrait être une confirmation de la Loi de Haldane, selon laquelle « dans le cas d'hybrides interspécifiques, le sexe hétérogamétique est celui qui est le plus vraisemblablement absent, rare ou stérile ». Une explication de ce phénomène résiderait dans le fort taux de mutation des gènes présents sur le chromosome Y, et plus particulièrement sur le gène *SRY (*Allen et Short, 1997). Cette hypothèse est basée sur les résultats de Whitfield et al. (1993) qui ont étudié le gène *SRY* chez les primates. Chez les mammifères, l'induction de la détermination du sexe mâle nécessite le gène *SRY*, qui code pour une protéine ayant un domaine central, nommé HMG box ('high mobility group'), de 78 acides aminés. L'activité de liaison à l'ADN de la protéine SRY réside dans la boite HMG. Des mutations intervenant dans cette région sont associées à une inversion de sexe chez les individus XY acquiérant un phénotype femelle.

Allen et Short (1997) ont extrapolé les résultats de cette étude, et en déduisent que peut-être les gènes *SRY* du cheval et de l'âne ont divergé suffisamment l'un de l'autre pendant la course de leur évolution indépendante, au point que le gène *SRY* de l'âne (ainsi que des autres gènes liés à Y concernant la spermatogenèse) soit maintenant incapable d'induire un développement testiculaire normal chez certains hybrides mâles. Il en suivrait que la déficience en nombre de mâles pourrait s'expliquer par la présence d'un nombre correspondant de « femelles XY » dans la descendance hybride. Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de caryotyper un grand nombre demules, afin de déterminer s'il existe une proportion significative de femelles XY.

D- Durées de gestation

La durée de gestation varie d'une espèce à l'autre à l'intérieur de la famille des équidés. Par exemple, elle est plus longue chez l'ânesse que chez la jument :

- ânesse : en moyenne 374 jours de gestation
- jument : en moyenne 336 jours de gestation.

La durée de gestation constatée lors de gestation interspécifique est intermédiaire entre les durées de gestation intraspécifique des deux parents, et variable selon le sens du croisement. Par exemple en moyenne :

- croisement âne x jument : 355 jours de gestation
- croisement cheval x ânesse : 350 jours de gestation (Fielding, 1988).

Pour les autres croisements, on dispose une fois de plus de très peu de données précises concernant la durée de gestation :

E. asinus x E. burchelli = 378 j (Gray, 1972).

En ce qui concerne les autres croisements, on ne dispose d'aucune information sur les durées de gestation.

Ainsi, la production d'hybrides interspécifiques présente-t-elle des particularités notables telles que des durées de gestation intermédiaires, des taux de fertilité variables selon le sens de croisement. Nous allons maintenant examiner les conséquences de la divergence des espèces parentales sur la physiologie de la gestation et plus particulièrement sur les aspects immunologiques et hormonaux.

E – Particularités immunologiques de la gestation d'hybrides interspécifiques

Lors de la production d'hybrides interspécifiques, nous sommes confrontés à une gestation originale présentant des particularités immunologiques et hormonales propres et distinctes de celles des espèces parentales. Dans la suite de cette étude, nous nous proposons d'analyser l'influence du génotype fœtal hybride sur la modulation immunologique et hormonale de la gestation interspécifique par rapport à la gestation intraspécifique.

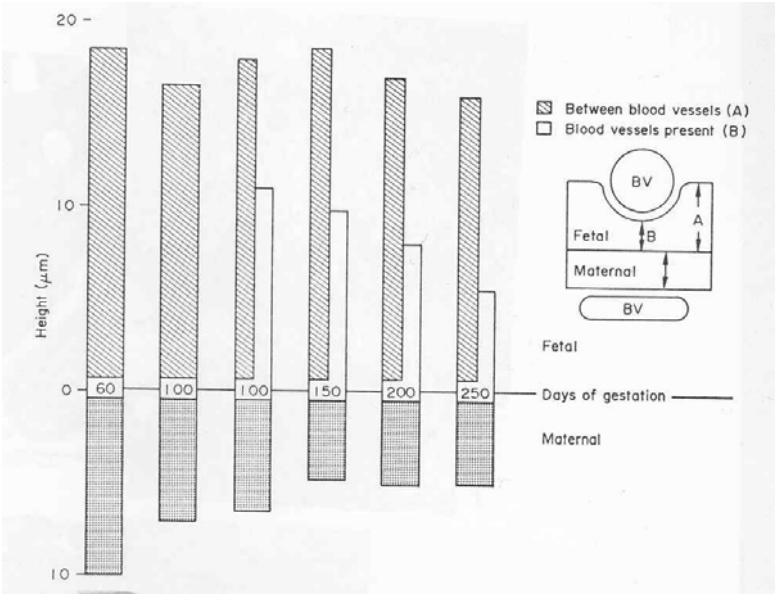
1) Caractéristiques du placenta des équidés

Les Equidés sont caractérisés par un placenta de type épithéliochorial présentant microcotylédons et villosités. Le développement du placenta s'effectue par l'intermédiaire de cupules endométriales, structures typiques et originales de la placentation des Equidés.

a) Description du placenta

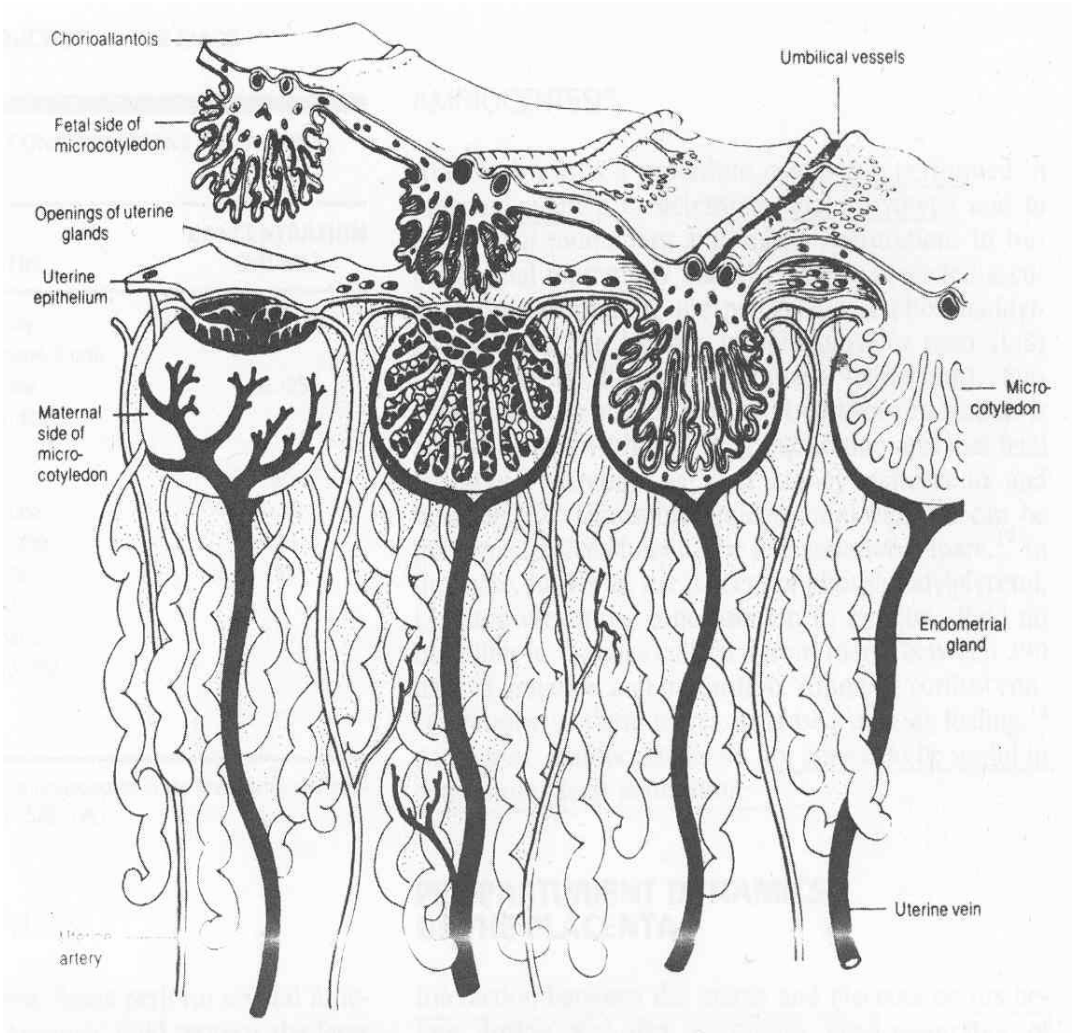
Le placenta équin est caractérisé par sa structure épithéliochoriale. Cette nomination désigne les couches séparant le sang maternel du sang fœtal. Dans un placenta épithéliochorial, chaque couche est constituée d'un endothélium vasculaire, de tissu conjonctif et d'un épithélium. Ces couches composent la barrière placentaire, qui devient de plus en plus fine à l'approche du terme en raison de l'indentation de l'épithélium chorionique par les capillaires fœtaux et la réduction progressive du tissu conjonctif, comme le montre la figure 21.

Figure 21 : Variation de l'épaisseur des épithéliums maternels et fœtaux dans la barrière placentaire en cours de la gestation chez la jument (Samuel et al., 1975).



L'apposition étroite des structures fœtales et maternelles intervient au niveau des microcotylédons. L'interdigitation complexe entre l'épithélium chorionique fœtal et l'épithélium endométrial maternel et les relations étroites entre les circulations utérine et ombilicale sont clairement représentées sur la figure 22. La circulation maternelle à l'intérieur des microcotylédons s'effectue par l'intermédiaire de branches rectilignes de l'artère utérine qui se séparent au niveau du microcotylédon pour donner naissance à un réseau vasculaire dense dans la paroi de la crypte maternelle, puis rejoint ensuite la veine utérine (Steven et Samuel, 1975). Les villosités chorioniques sont drainées par les branches des artères et de la veine ombilicales. Les capillaires maternels et fœtaux transportent le sang en flux opposés, ce qui facilite les échanges (Asbury et Leblanc, 1993).

Figure 22 : Section de placenta équin mature montrant la structure des microcotylédons (Steven et Samuel, 1975).



La véritable placentation épithéliochoriale ne débute qu'à partir de 40 jours de gestation, quand le trophoblaste non invasif de l'allantochorion commence à créer des interdigitations avec l'endomètre, constituant ainsi un étroit contact entre les villosités. Des ondulations discrètes commencent à apparaître à 45 jours et se transforment en villosités filiformes vers 60 jours. Ces villosités primaires vont donner naissance à des ramifications secondaires et tertiaires durant les 60-80 prochains jours, afin d'aboutir à la structure microcotylédonnaire épithéliochoriale complexe caractéristique du placenta mature des équidés. Le développement du placenta équin s'achèvera ainsi vers 150 jours de gestation (Gerstenberg et al., 1999).

b) Etapes de la placentation et importance de la ceinture chorionique

Le jeune conceptus équin demeure sphérique et libre à l'intérieur de la lumière utérine jusqu'à 16 jours post-ovulation, date à partir de laquelle il se fixe à la base d'une des deux cornes utérines. Le sac vitellin commence à régresser autour de 22 jours, tandis que l'allantoïde s'étend rapidement et fusionne avec le chorion pour former l'allantochorion. Dans cette région de contrefort où le sac vitellin régresse et l'allantoide progresse, les cellules du trophoblaste commencent à se différencier pour former la ceinture chorionique**.** A partir de 35 jours, le trophoblaste est entièrement différencié en une zone restreinte invasive - la ceinture chorionique - et une zone étendue non invasive - l'allantochorion.

La ceinture chorionique apparaît au cours de la 4ème semaine de gestation, et atteint sa maturité vers 35 jours. Elle mesure alors 6 à 8 mm de largeur et entoure le conceptus au niveau de la limite entre les zones du chorion approvisionnées par les circulations allantoidienne et vitelline. La ceinture est constituée d'un épithélium stratifié comportant de nombreuses cellules en mitose.

Entre 35 et 38 jours, la plupart des cellules trophoblastiques de la ceinture chorionique, binucléées à ce stade, migrent depuis le chorion vers l'épithélium utérin, pour s'établir dans le stroma endométrial. Certaines cellules qui ne parviennent pas à atteindre le stroma endométrial, sont détruites et remplacées par une simple couche épithéliale (figure 23 a). Les cellules de la ceinture chorionique envahissent l'endomètre maternel pour constituer les cupules endométriales. Il s'agit de petites plaques irrégulières et distinctes de 2 cm de diamètre, qui forment un anneau discontinu centré sur un point de la face mésométriale de l'utérus, sur l'extrémité caudale de la corne. Les cupules sont constituées de colonies de cellules trophoblastiques, dérivées de la ceinture chorionique et sécrètent l'eCG (equine Chorionic Gonadotrophin). Ces cupules endométriales, structures originales de la placentation équine, ont une importance primordiale lors de l'établissement du placenta ainsi que dans la sécrétion hormonale placentaire.

Les cellules trophoblastiques des cupules endométriales sont épithélioïdes et très grandes (figure 23 b). Elles occupent la majeure partie du stroma endométrial, sans engendrer beaucoup de dégâts sur les glandes utérines. Les glandes sont souvent dilatées, suggérant que leur conduit puisse être en partie bouché. Dès que les cellules trophoblastiques pénètrent le tissu conjonctif utérin, les colonies ainsi formées sont entourées par un mur de lymphocytes. Ceci est à mettre en relation avec le fait que l'endomètre équin, même dans la région des

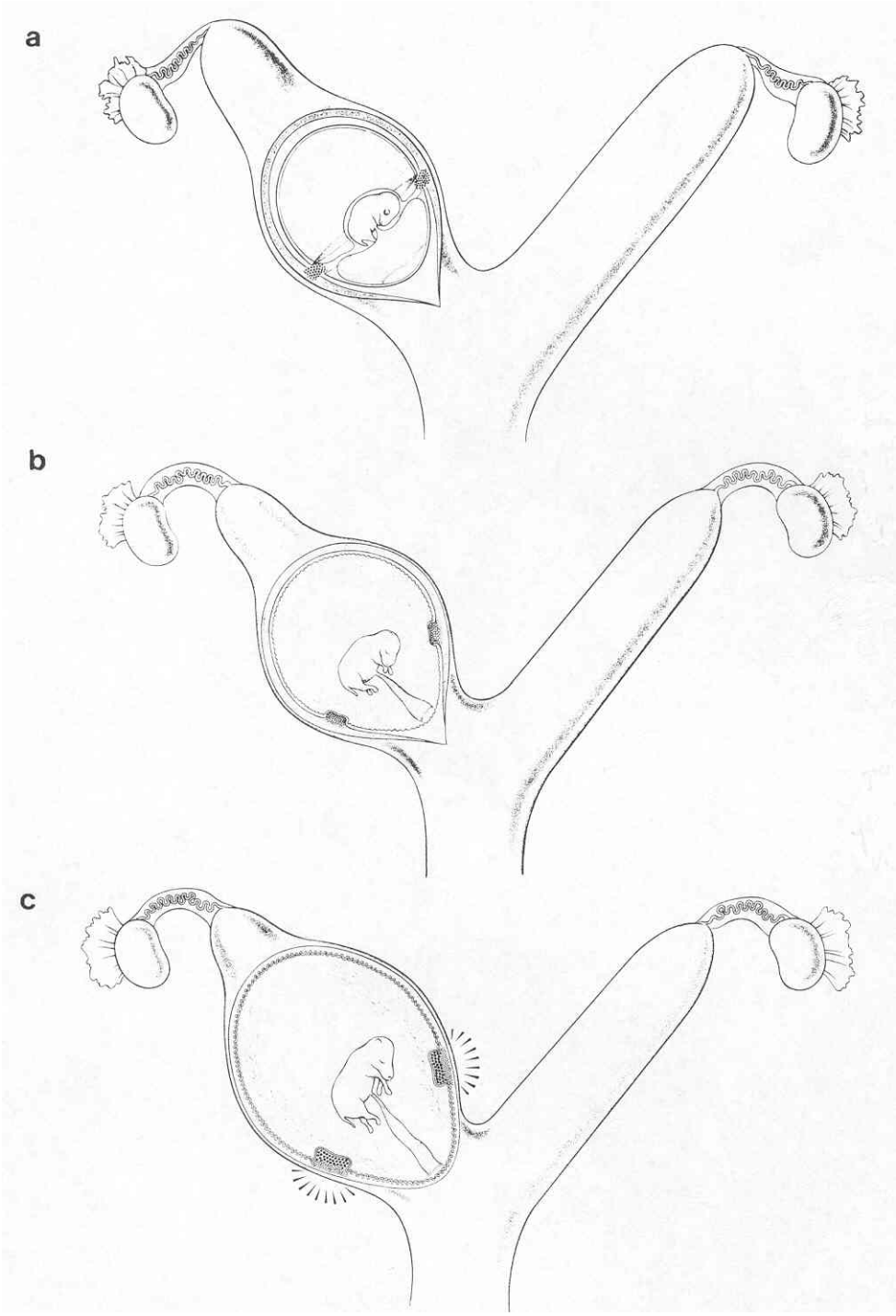
cupules, est inhabituellement bien fourni en vaisseaux lymphatiques, en comparaison avec les autres espèces. Il est probable que ces vaisseaux lymphatiques constituent un important lien dans la voie immune efférente, qui conduit à la reconnaissance immunologique des cellules du trophoblaste.

Les cupules endométriales persistent pendant une période variable, mais ont en général complètement disparu vers 130 jours. Le mécanisme de leur destruction a suscité beaucoup d'intérêt. Peu de temps après l'envahissement (vers le 35 ème jour) de l'utérus par les cellules de la ceinture chorionique, des anticorps cytotoxiques dirigés contre les antigènes paternels apparaissent dans le sang maternel. De tels anticorps sont absents chez les étalons, les juments maidens (c'est à dire juments n'ayant jamais été mises à la reproduction) ou, chez les femelles gestantes des autres espèces. Soixante à quatre-vingt jours plus tard, les cupules endométriales sont envahies par des leucocytes, alors qu'avant ce stade, la plupart des cellules blanches étaient retenues à la périphérie des colonies de cellules trophoblastiques. Les cupules deviennent alors nécrotiques et repoussées à la surface de l'endomètre (figure 23 c).

La réponse leucocytaire à l'invasion trophoblastique est beaucoup plus importante chez les juments accouplées avec des ânes, comme nous le verrons dans la suite de cette étude, mais bizarrement ces cupules survivent apparemment plus longtemps que lors de gestation intraspécifique. La destruction des cupules semblerait donc avoir une composante immunologique. Les facteurs contrôlant la durée de survie des cupules demeurent inexpliqués ; une allogreffe de peau serait certainement rejetée plus rapidement. Les cellules de cupules produisent probablement des stéroïdes qui confèreraient une protection, même si les jeunes cellules des cupules sont inhabituellement riches en antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH). Ces antigènes semblent être perdus avec le temps, ce qui pourrait également aider à prolonger la survie des cellules des cupules (Flood, 1993).

Le placenta épithélio-chorial des équidés présente donc des structures originales et typiques : les cupules endométriales. Ces cupules vont être à l'origine d'une production hormonale, mais sont également la cible de réactions immunologiques lors de gestation intraspécifique. Quel sera l'influence du génotype fœtal de l'hybride sur le devenir de ces cupules ?

<u>Figure 23 :</u> Représentation schématique de la cinétique du développement des cupules endométriales (d'après Allen et Short, 1997).



♦a : Invasion de l'endomètre par les cellules trophoblastiques spécialisées de la région de la ceinture chorionique du conceptus.
♦b : Elargissement et différenciation des cellules de la ceinture dans le stroma endométrial pour former les cupules endométriales définitives.
♦c : Développement de la réponse immunitaire à médiation cellulaire maternelle envers les cellules de cupules fœtales, ce qui hâte la nécrose des cupules et leur éventuelle desquamation de la surface de l'endothélium.

2) Réponse immunologique

La reconnaissance immunitaire maternelle du développement fœtal au cours de la gestation équine se caractérise par la plus vigoureuse réponse immunitaire avec allo-anticorps qui soit décrite chez toutes les espèces. Cette réponse est exclusivement dirigée contre les antigènes paternels du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I.

Depuis Medawar, qui fut le premier à soulever le problème de la tolérance du fœtus comme celle d'une allo-greffe, il y a une cinquantaine d'années, l'étude de la gestation, également appelée « greffe de la Nature », a fourni de nombreuses théories et expériences à l'interface entre la mère et le fœtus et entre l'immunologie et la reproduction (Baker et al, 1999). Le cas de la gestation d'hybride interspécifique renforce encore la particularité du statut immunitaire du fœtus.

a) Réponse immunologique lors de gestation intraspécifique

Le cheval constitue un bon modèle pour l'étude des modifications du statut immunologique pendant la gestation. On observe deux types de réactions immunologiques, l'une humorale, l'autre cellulaire :

- Les juments, primipares comme multipares, développent une vigoureuse réponse immunologique à l'aide d'anticorps cytotoxiques spécifiques dirigés contre les antigènes paternels du CMH de classe I, au cours de la période allant du 60ème au 336ème jour de gestation.

- Chez la jument, il existe une accumulation de lymphocytes T CD4+ et CD8+ autour des cupules endométriales du trophoblaste invasif, peu après leur développement.

Curieusement, ni la réponse immunitaire à médiation humorale avec les anticorps, ni la réponse à médiation cellulaire développées par la mère ne semblent compromettre la gestation (Baker et al, 1999).

Toutefois, la cytotoxicité de ces réactions immunitaires semble réduite chez les femelles gestantes contrairement aux femelles non gestantes. En effet, lors de gestation intraspécifique chez la jument ou chez l'ânesse, on observe une spectaculaire diminution de l'activité cytotoxique des lymphocytes contre les allo-antigènes paternels, comparée à la cytotoxicité générée *in vitro* contre ce même mâle chez des femelles non gestantes.

Une hyporéactivité similaire des cellules T à l'encontre des allo-antigènes paternels est également décrite chez la souris. Ainsi ces altérations de la réactivité du système immunitaire maternel surviennent chez des espèces de structures placentaires très différentes, puisque la souris possède un placenta hémochorial invasif alors que la jument a un placenta épithéliochorial non invasif. De plus, le type de cellules immunitaires présentes dans l'utérus ne semble pas modifier les effets : chez la souris, les cellules qui prédominent sont des cellules de type Natural Killer (NK) alors que l'utérus de jument contient principalement des cellules T CD4+ et CD8+.

Cette hyporéactivité immunitaire est transitoire. Une réactivité complète contre les allo-antigènes paternels réapparaît en post-partum (Baker et al., 1999).

b) Réponse immunologique à médiation cellulaire

α) Infiltration leucocytaire autour des cupules

La réaction des cupules endométriales implique l'invasion de l'endomètre maternel par les cellules du trophoblaste fœtal très spécialisées, sécrétant les gonadotrophines. Cette réaction intervient dans la première moitié de la gestation, et les modifications histologiques grossières, surtout dans les gestations interspécifiques, fournissent une preuve que les antigènes d'histocompatibilité paternels sont exprimés à la surface des cellules des cupules endométriales. Ces antigènes fœtaux sont certainement reconnus par les mécanismes de défenses immunitaires de la jument, qui développent une réaction classique de type « rejet de l'hôte envers le greffon », afin de détruire et de rejeter les tissus étrangers (Allen, 1975).

Chez la jument gestante, il existe une réponse leucocytaire triphasique envers les cellules des cupules endométriales :

- La première phase intervient immédiatement après l'invasion des cellules du trophoblaste de la plaque chorionique pour former les cupules endométriales. Elle se caractérise par une infiltration massive de lymphocytes T CD4+ et CD8+ autour des cupules vers le 40ème jour de gestation.

- La seconde phase intervient autour du 60ème jour, à la moitié de la durée de vie des cupules. A ce moment, le nombre de lymphocytes a énormément diminué.

- Au cours de la troisième phase, on observe une infiltration leucocytaire complexe qui pourrait engendrer la mort des cupules entre le 80ème et le 120ème jour de gestation.

Ces observations suggèrent que lors de gestation intraspécifique, il existe un basculement de l'immunité à médiation cellulaire vers l'immunité à médiation humorale (de la réponse immunitaire Th1 vers Th2), basculement qui ne s'opère pas lors de gestation interspécifique.

Dans la gestation interspécifique, la réponse leucocytaire envers les cupules endométriales semble progresser uniformément, sans réduction du nombre de leucocytes vers le 60ème jour de gestation. En effet, les cupules endométriales de mule sont habituellement détruites à ce stade de gestation.

Toutes ces différences peuvent suggérer une subtile barrière immunologique pour les accouplements interspécifiques, qui n'empêcherait pas à elle seule la gestation interspécifique, mais qui pourrait compromettre l'aptitude des femelles à porter à terme les hybrides conçus entre des espèces étroitement apparentées (Baker et al., 1999).

β) Importance de la réaction à médiation cellulaire locale

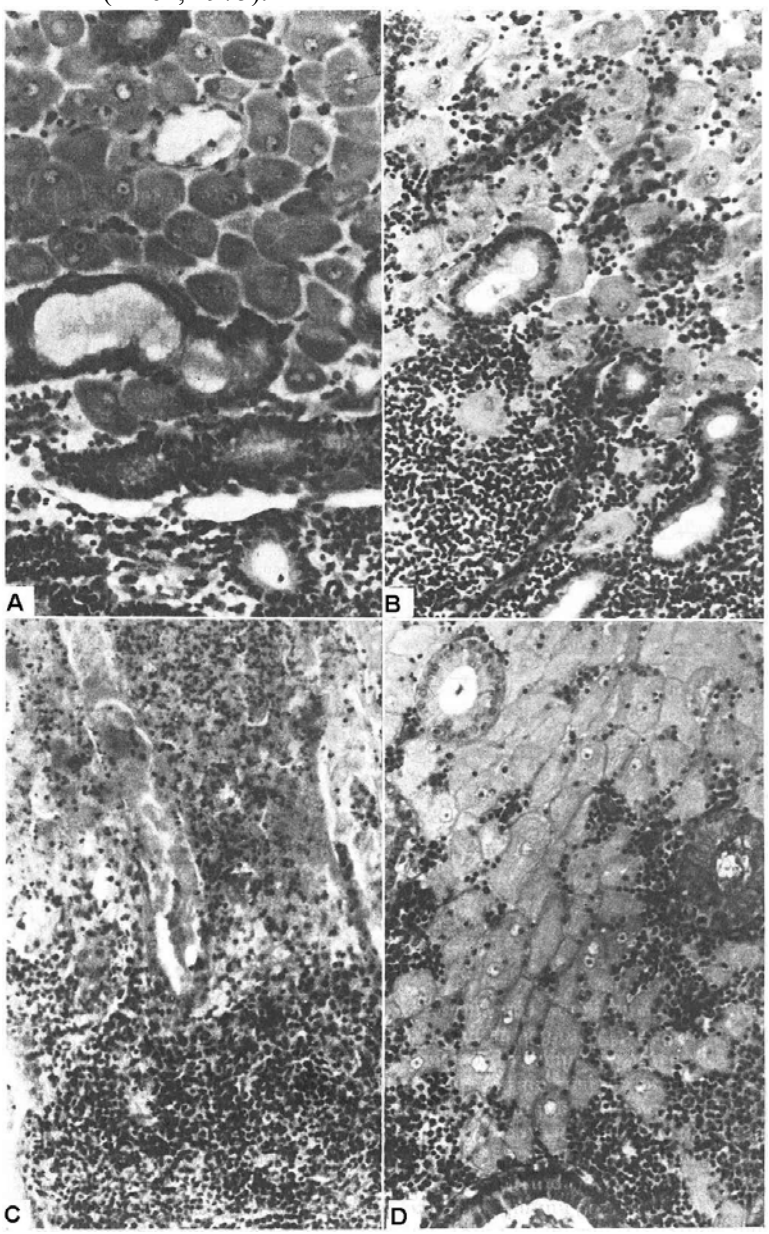
Chez les juments portant un conceptus mule, le phénomène d'accumulation et d'invasion leucocytaires est considérablement amplifié et accéléré comparé à la gestation intraspécifique de jument. Dès le 45ème jour, un très grand nombre de lymphocytes s'est déjà accumulé dans la région des cupules et au lieu de rester confinés autour du stroma endométrial environnant comme dans une gestation intraspécifique de jument (figure 24 A), ils envahissent activement le tissu des cupules et phagocytent les cellules des cupules (figure 24 B). Vers 60 jours, l'ensemble du tissu des cupules est nécrosé, ainsi qu'une importante région de stroma endométrial adjacent. Cette zone nécrotique est comblée par l'invasion des leucocytes, incluant un grand nombre de plasmocytes et d'éosinophiles (figure 24 C) (Allen, 1975).

Chez les ânesses portant un conceptus bardot, la réponse leucocytaire est de la même manière considérablement amplifiée par rapport à la gestation intraspécifique. A 60 jours, les cupules endométriales sont étroitement regroupées. Un grand nombre de leucocytes s'est accumulé dans le stroma, et des groupes de cellules pénètrent profondément dans le tissu des cupules (figure 24 D). Contrairement aux cupules de mule au même stade, il n'y a pas d'invasion généralisée à travers le tissu des cupules ; et la majorité des cellules des cupules, bien que souvent entourées par les lymphocytes, éosinophiles et plasmocytes, demeure intacte et d'apparence morphologique normale.

Il n'est pas surprenant que la réaction immunitaire maternelle contre les cupules endométriales soit considérablement supérieure dans les gestations interspécifiques, compte-tenu de la plus grande divergence des antigènes paternels. Mais la différence marquée concernant la vitesse ou le taux de succès de la réaction lymphocytaire pour détruire les cellules des cupules entre les gestations de fœtus mule et bardot reste inexpliquée. Bien que la réponse leucocytaire soit énorme dans les deux situations, les cellules des cupules de bardot semblent beaucoup plus aptes que celles de mule à résister à l'attaque immunologique dirigée contre ces cellules. Les cellules de cupules de bardot présentent par ailleurs certaines différences avec celles de mule : elles sécrètent une beaucoup plus grande quantité d'eCG que celles de mule, à la fois *in vivo* et *in vitro*, et elles se développent aussi en présence d'une plus forte concentration de progestagènes. L'un ou les deux de ces facteurs pourraient contribuer de manière significative à l'augmentation d'aptitude des cellules de cupules de bardot à résister aux attaques immunologiques (Allen, 1975).

La plus forte production d'eCG lors de la gestation de fœtus de bardot pourrait masquer davantage les antigènes paternels. L'eCG, comme l'hCG, est une protéine contenant une forte proportion d'acide sialique. Les expériences de Kirby en 1968 (citées par Allen, 1975) ont clairement montré que les cellules du cytotrophoblaste de placenta de souris et de femme sont entourées par une couche de sialomucoprotéines, qui masquent les antigènes fœtaux dérivés des antigènes paternels présents à la surface des cellules, et ainsi empêchent leur reconnaissance par le système immunitaire maternel. Bortland en 1975 (cité par Allen, 1975) a montré que l'hCG (human Chorionic Gonadotrophin) forme chez la femme une partie, si ce n'est la totalité, de cette couche immunoprotectrice sur le cytotrophoblaste. Il semble donc raisonnable de suggérer que l'eCG puisse constituer une barrière immunoprotectrice similaire entre les surfaces maternelles et fœtales au cours de la gestation chez les équidés.

<u>Figure 24 :</u> Envahissement des cupules endométriales par les leucocytes
(Allen, 1975).



A : Coupe de cupules endométriales chez une jument portant un conceptus cheval à 53 jours de gestation : Les cellules de cupules sont larges et étroitement liées entre elles. L'accumulation leucocytaire est confinée principalement au stroma utérin en regard des cupules.
B : Coupe de cupules endométriales chez une jument portant un conceptus mule à 45 jours de gestation. Les cellules des cupules sont larges, mais moins regroupées que lors de la gestation intraspécifique. L'accumulation leucocytaire envahit et détruit les cellules des cupules.
C : Coupe de cupules endométriales chez une jument portant un conceptus mule à 60 jours de gestation L'ensemble du tissu des cupules est maintenant complètement nécrosé. Ces débris nécrotiques sont mélangés avec des lymphocytes, des cellules plasmatiques et des éosinophiles.
D : Coupe de cupules endométriales chez une ânesse portant un conceptus bardot à 60 jours de gestation Les larges cellules des cupules présentent une membrane cellulaire épaisse, et sont étroitement rassemblées. Bien que des lymphocytes envahissent le tissu des cupules, les cellules des cupules apparaissent viables et morphologiquement normales.

L'eCG pourrait ainsi agir partiellement pour masquer les antigènes paternels sur les cellules des cupules, afin d'empêcher la reconnaissance maternelle et gêner l'accès des lymphocytes sensibilisés aux cellules des cupules, mais l'eCG ne serait pas la seule molécule à intervenir dans ce phénomène de masquage.

En dépit de cette évidente immunisation de la jument contre les antigènes paternels exprimés par les cellules des cupules endométriales, dans le cas de gestation interspécifique, aucune reconnaissance maternelle ou réponse immunitaire de ce type n'intervient envers les cellules du trophoblaste de l'allantochorion normal. L'hypothèse que l'eCG puisse constituer une barrière physico-chimique à la surface des cellules de cupules ne peut pas être adaptée pour le reste de l'allantochorion qui, bien que non envahi comme les cupules, est pourtant en contact intime avec l'endomètre à partir de 45 jours de gestation. On doit donc postuler que soit, les cellules du trophoblaste de l'allantochorion n'expriment pas les antigènes d'histocompatibilité paternels, soit de tels antigènes sont masqués par une autre forme de barrière physique que l'eCG (Allen, 1975).

c) Réaction immunitaire à médiation humorale : anticorps anti-CMH I

α) Influence du génotype fœtal

La production d'anticorps cytotoxiques au cours de la gestation chez la jument présente une incidence nettement plus élevée que chez les autres espèces : 85 % chez la jument, contre 10 à 30 % chez la femme et 30 % chez la souris. De plus, ces anticorps cytotoxiques apparaissent beaucoup plus tôt au cours de la gestation dans le sérum de jument que chez les autres espèces (Kydd et al., 1982).

Lors de gestation intraspécifique, les juments possèdent un titre élevé en anticorps dirigés contre les antigènes paternels du CMH I. Au contraire, chez les juments portant un fœtus hybride mule, la réponse immunitaire à médiation humorale est plus tardive et le titre en anticorps et plus faible (Baker et al., 1999).

Kydd et al. (1982) ont étudié l'incidence et la cinétique de production des anticorps cytotoxiques maternels dans les différents types de gestation. Le tableau 4 présente la production d'anticorps cytotoxiques contre les lymphocytes paternels dans les gestations intra et interspécifiques de jument et d'ânesse.

- Gestation intraspécifique chez la jument :

Une forte proportion (15/16, soit 94 %) de juments portant un conceptus normal de cheval développe des anticorps cytotoxiques envers les allo-antigènes de lymphocytes paternels. Dans tous ces cas, les anticorps sont détectés à partir de 40 à 70 jours après ovulation.

- Gestation intraspécifique chez l'ânesse :

Sur les 19 gestations examinées, seulement 5 ânesses présentent des anticorps cytotoxiques (26 %). Toutefois, la période d'apparition de ces anticorps dans le sérum est la même que celle de la gestation intraspécifique chez la jument, entre 35 et 71 jours

- Gestation interspécifique chez l'ânesse :

Seulement 2 ânesses portant un conceptus bardot étaient exploitables dans cette étude. Les anticorps cytotoxiques dirigés contre les antigènes de lymphocytes de l'étalon ont été produits chez ces 2 ânesses, à partir de 44 et 51 jours.

- Gestation interspécifique chez la jument :

Sur les 6 gestations de juments portant un conceptus mule testées, 5 sont allées jusqu'à leur terme, et une a subi un avortement à 132 jours par rupture délibérée manuelle de l'allantochorion, par le col. Les anticorps ont été détectés chez 3 de ces 6 juments à 44 jours et 196 jours.

Tableau 4 : Production d'anticorps cytotoxiques contre les lymphocytes paternels dans les gestations intra et interspécifiques de jument et d'ânesse (Kydd et al., 1982).

Type of pregnancy	Horse × horse	Donkey × donkey	Horse × donkey (hinny)	Donkey × horse (mule)
No. examined	16	19	2	6
No. to term	16	19	2	5
No. aborted	—	—	—	1
No. of mares with antibody to paternal lymphocytes (%)	15 (94)	5 (26)	2 (100)	3 (50)
Earliest onset of antibody (days after ovulation)	44	35	44	44
Latest onset of antibody (days after ovulation)	70	71	51	196
Production of CG	++	+	+++	+

La réponse en anticorps cytotoxiques maternels envers les antigènes d'histocompatibilité fœtaux est à mettre en relation avec la réaction des cupules endométriales. Cette réaction est caractérisée par une accumulation de lymphocytes maternels autour des cellules des cupules fœtales. Bien que la micro-anatomie de ces cupules et l'étendue de la réaction lymphocytaire varient selon qu'il s'agisse d'une gestation intra ou interspécifique, la réaction des cupules intervient dans ces 4 types de gestation.

En raison de la relation temporelle qui existe entre le développement des cupules, l'accumulation de lymphocytes maternels autour de ces cupules et l'apparition d'allo-anticorps dans le sérum maternel, on pourrait faire l'hypothèse que les cellules des cupules fœtales soient source de stimulation allo-antigénique dans la gestation équine. Ainsi, la réaction lymphocytaire représenterait la réponse immunitaire maternelle à médiation cellulaire envers ces antigènes d'histocompatibilité, et les anticorps cytotoxiques refléteraient la composante humorale de cette réponse.

Les raisons pour lesquelles l'incidence de la production d'anticorps lors de gestations interspécifiques de jument et intraspécifiques d'ânesse est plus faible mais pas nulle, d'après le tableau 4 restent méconnues.

Il est probable que les subtiles différences de type de placentation au cours de ces divers types de gestation résultent en une fréquence plus faible de réponses en anticorps cytotoxiques. On ne peut pas faire la distinction entre un manque de stimulation antigénique, éventuellement basé sur une réduction d'expression des antigènes d'histocompatibilité, et une intensification de la suppression de réponse maternelle anti-fœtale, pour expliquer la variabilité dans la réponse en anticorps cytotoxiques.

La gestation de jument portant un conceptus mule fournit des informations importantes : 3 juments sur 6 n'aboutissent pas à la production d'anticorps cytotoxiques. Etant donné que la réaction des cupules endométriales dans la gestation interspécifique de jument est toujours caractérisée par une considérable infiltration lymphocytaire, ceci suggère que l'accumulation de lymphocytes autour des cellules des cupules peut avoir lieu indépendamment de la réponse en anticorps cytotoxiques présente dans le sérum de jument.

Ainsi, cette étude fait une séparation entre la reconnaissance immunitaire cellulaire locale du développement du conceptus et la réponse immunitaire sérologique systémique. Bien que la production d'anticorps cytotoxiques soit bien corrélée dans le temps avec la formation des cupules endométriales, des preuves histologiques et sérologiques démontrent que l'accumulation de lymphocytes, qui intervient autour de ces cupules pendant les gestations intra et interspécifiques, peut aussi bien avoir lieu en absence de réponse décelable en anticorps cytotoxiques (Kydd et al., 1982).

β) Modulation de l'expression des molécules du CMH I sur le trophoblaste

La réaction immunitaire à médiation humorale étant dirigée contre les molécules du CMH, Kydd et al., 1991 ont cherché à étudier la répartition de l'expression des molécules du CMH I à l'interface fœto-maternel du trophoblaste précoce dans différents types de gestation (intra, inter et extraspécifiques). Pour cela, ils ont utilisé un anticorps monoclonal de rat (MAC 291), spécifique d'une région monomorphique des molécules du CMH I équin, à l'aide d'une technique immunohistochimique.

Il convient de rappeler que le placenta équin est composé de deux parties :

- la plaque chorionique invasive, qui infiltre l'endomètre maternel entre le 36ème et le 38ème jour après l'ovulation afin de former les cupules endométriales sécrétant l'eCG,
- l'allantochorion non invasif du placenta définitif qui développe de façon croissante une interdigitation complexe avec l'endomètre à partir du 40ème jour de gestation afin d'assurer les échanges placentaires avec le fœtus.

- Gestation intraspécifique chez la jument :

A 33 – 34 jours, la plaque chorionique exprime à haut niveau les molécules du CMH I ; contrairement au trophoblaste non-invasif de l'allantochorion qui montre seulement de rares cellules positives.
A 40 et 45 jours, les sections de cupules endométriales montrent un faible et granuleux marquage à la fois du cytoplasme et des membranes de surface des cellules des cupules en cours de transformation.
A 55 – 65 jours, les cellules des cupules complètement matures et différenciées ne présentent plus aucun marquage.

- Gestation intraspécifique chez l'ânesse :

L'allantochorion de l'ânesse semble globalement plus lent à se développer que celui de la jument ; ainsi à des stades équivalents de gestation, les tissus du fœtus âne sont notablement plus fins et moins profondément interdigités avec l'endomètre.
Au 41ème jour, le trophoblaste non invasif de l'allantochorion qui entoure les cupules endométriales n'est pas marqué par l'anticorps anti-CMH I.
Au 59ème jour, celui-ci est faiblement marqué autour de certaines cupules, mais pas la totalité des cupules.
Au 82ème jour, la totalité du trophoblaste de la portion allantochoriale entourant les cupules endométriales est fortement positive.
En dehors de la zone des cupules, l'allantochorion du conceptus âne, de la même manière que celui du conceptus cheval montre des zones auréolaires isolées de trophoblaste pseudostratifié entourant les glandes endométriales clairement marquées par l'anticorps MAC 291. Contrairement à la situation de la jument, les molécules du CMH I ne sont pas détectées sur les cellules des cupules d'ânesse à n'importe lequel des trois stades de gestation examinés.

- Gestation interspécifique de jument :

Les cellules des cupules endométriales ne paraissent pas exprimer les antigènes du CMH I aux stades précoces de gestation examinés (46 et 47ème jour). De manière similaire, le trophoblaste non invasif de l'allantochorion, entourant les cupules endométriales et commençant à former un attachement de microvillosités avec l'épithélium endométrial, est uniformément négatif. A ces stades précoces de gestation, aucune zone auréolaire de trophoblaste pseudostratifié, comme celles observées au cours de stade plus tardif de gestation intraspécifique chez la jument et chez l'ânesse, n'est retrouvée.

L'allantochorion non invasif de conceptus de cheval, d'âne et de mule n'exprime de molécules du CMH I à aucun stade de gestation, à l'exception de petites zones isolées de trophoblaste pseudostratifié adjacent aux glandes endométriales. Au contraire, les molécules du CMH I sont fortement exprimées sur les cellules de la plaque chorionique de jument à 33 et 34 jours de gestation, juste avant leur invasion. Cependant, l'expression des molécules du CMH I est réduite avec la différenciation de ces cellules de la plaque chorionique en cellules matures des cupules endométriales entre le 40 et le 45ème jour ces molécules de classe I ne sont plus détectées sur les cupules entre 55 et 65 jours. De la même manière, toutes les cupules endométriales originaires de conceptus d'âne à 41-59 et 82 jours et de conceptus de mule à 46-47 jours sont négatives pour ces molécules de classe I.

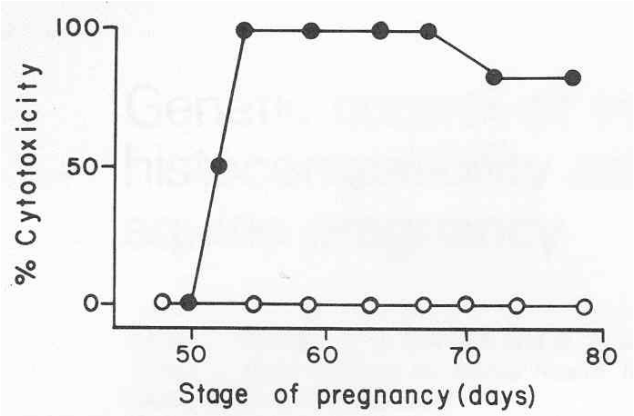
Le mode d'expression des molécules du CMH I est donc globalement similaire sur le trophoblaste intra et interspécifique (Kydd et al., 1991).

γ) Variabilité de réponse en anticorps selon l'antigène du CMH I

Les molécules de CMH I étant à l'origine de la réaction immunitaire à médiation humorale, Crump et al., 1985 se sont interrogés sur la nature de l'antigène responsable de la stimulation immunitaire. Pour cela, ils ont utilisé un transfert embryonnaire pour établir une gestation dans laquelle deux antigènes du CMH équin sont présentés ensemble au système immunitaire maternel dans un même conceptus : antigène de lymphocyte équin (equine lymphocyte antigen) ELA W3 (antigène « faible ») et ELA W2 (antigène « fort »).

La production d'anticorps cytotoxiques est mesurée chez une jument ayant subi un transfert d'embryon portant les 2 antigènes (ELA W2 et ELA W3), tandis que cette jument ne porte aucun de ces 2 antigènes (figure 25).

<u>Figure 25 :</u> Spécificité de la production d'anticorps cytotoxiques contre ELA W2 et ELA W3 (Crump et al., 1985).



●--● : Activité cytotoxique contre ELA W2
°--° : Activité cytotoxique contre ELA W3

Les anticorps cytotoxiques sont détectés chez la jument à partir de 51 jours. A 60 jours, le titre en anticorps sériques dirigés contre l'antigène ELA W2 a été multiplié par un facteur quatre. Les anticorps anti-ELA W2 persistent jusqu'à 100 jours. A l'inverse, les anticorps anti-ELA W3 ne sont détectés à aucun moment.

Cette étude confirme les différences de vigueur de la réponse immunitaire maternelle envers les différents antigènes ELA. Aucun anticorps dirigé contre l'antigène ELA W3 (antigène « faible »), n'est détecté pendant le déroulement de la gestation ; alors que l'anticorps anti-antigène ELA W2 (antigène « fort »), apparaît avec une cinétique caractéristique de la réponse immunitaire maternelle aux antigènes fœtaux ELA.

Des observations effectuées dans d'autres espèces ont démontré que ces différences de réponse immunitaire envers les antigènes du CMH, génétiquement déterminées, pourraient être sous le contrôle des gènes du CMH eux-mêmes.

Quel qu'en soit le mécanisme, il est clair qu'au cours de la gestation équine, la réponse en anticorps cytotoxiques maternels à ELA W3 est beaucoup plus faible en comparaison avec la réponse envers les autres antigènes du CMH (Crump et al., 1985).

La production d'hybrides interspécifiques présente donc des particularités immunologiques propres et distinctes de celles des espèces parentales. La réponse immunitaire à une gestation interspécifique s'effectue à la fois par une réaction à médiation cellulaire locale exacerbée et par une réaction à médiation humorale dirigée contre les antigènes du CMH I. Toutefois, cette réponse immunologique n'est pas identique qu'il s'agisse d'une gestation interspécifique de jument ou d'ânesse. Ainsi le génotype du fœtus hybride influence-t-il différemment la modulation immunologique de la gestation interspécifique. Qu'en est-il de l'influence de ce génotype fœtal sur la régulation hormonale de la gestation ?

F- Particularités hormonales de la gestation d'hybrides interspécifiques

De la même façon qu'il existe une modulation immunologique en comparaison avec les gestations intraspécifiques, on observe au cours des gestations interspécifiques des variations hormonales en fonction du génotype fœtal.

1) Modulation de la production en eCG

a) Particularités de l'eCG

L'hormone Chorionique Gonadotrope Equine (eCG), anciennement appelée PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin), est produite par les cellules trophoblastiques spécialisées de la ceinture chorionique (cellules des cupules endométriales) du placenta de la jument gravide.

Cette hormone appartient à la famille des hormones glycoprotéiques qui comprend les hormones lutéotrope (LH), folliculotrope (FSH) et thyréotrope (TSH) d'origine pituitaire.

α) Structure de l'eCG

Elle est constituée de deux sous-unités α et β dont l'association, par liaison non covalente, est indispensable à l'activité biologique.

La sous-unité α, identique pour toutes les hormones thyréo-gonadotropes de l'espèce, se compose d'une chaîne peptidique de 96 acides aminés repliée par cinq ponts disulfures et porte deux chaînes N-oligosaccharidiques.

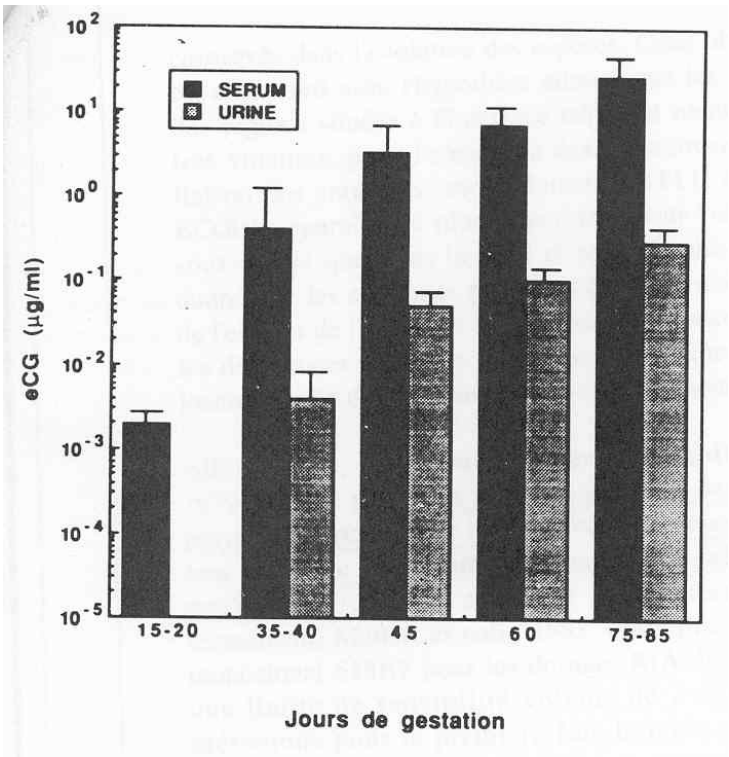
La sous-unité β comporte 149 aminoacides et celle-ci est responsable de la spécificité d'action de l'hormone. Sa séquence peptidique présente la particularité d'être strictement identique à celle de la sous-unité β de la LH équine, et les deux sous-unités ne diffèrent que par le nombre et la nature des chaînes polysaccharidiques. Ces chaînes carbohydrates de l'eCG représentent 45 % de la masse moléculaire de l'hormone (45 kDa) et se caractérisent notamment par un très fort contenu en acide sialique, ce qui augmente la charge négative totale de l'eCG par rapport à celle de la LH.

La structure de l'eCG est très semblable à celle des hormones gonadotropes des autres espèces de mammifères, et en particulier celles des hormones humaine (hCG) et bovine (LH). A titre d'exemple, les sous-unités α présentent une identité structurale proche de 80 % et les homologies entre les sous-unités β de l'eCG et de la hCG, d'une part, et de la LH bovine d'autre part, sont respectivement égales à 54 % et 80 %. Cette observation permet de comprendre pourquoi des anticorps dirigés contre hCG, LH et/ou leurs sous-unités libres sont capables de se lier aux hormones équines (Couture et al., 1994).

β) Variations d'eCG au cours de la gestation

La concentration en eCG est variable au cours de la gestation chez la jument. Elle peut être détectée dans le sang et plus tardivement dans l'urine, comme le montre la figure 26.

<u>Figure 26 :</u> Détection de la production d'eCG dans le sérum et dans l'urine de juments gravides (Couture et al., 1994).



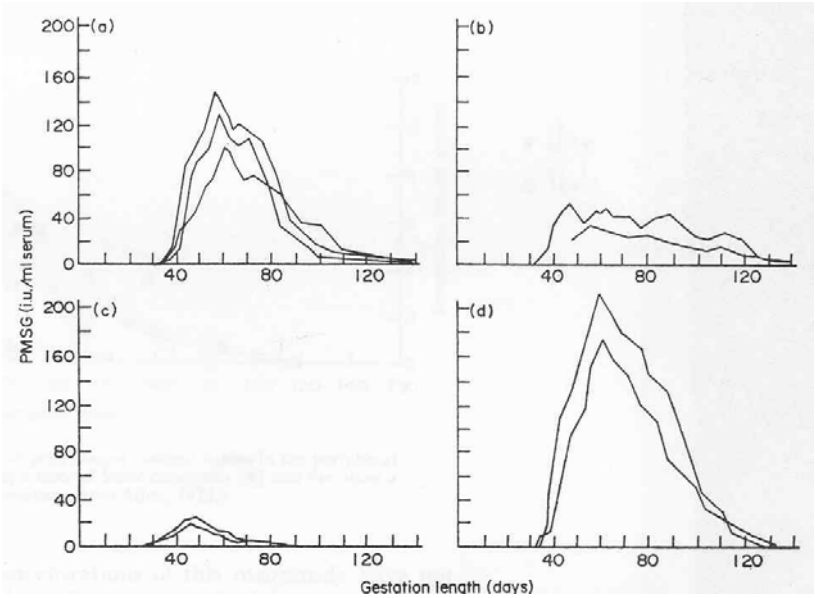
Une augmentation des taux sériques et urinaires d'eCG est observée à partir du 35ème jour de gestation les valeurs maximales (>30 µg/ml dans le sérum) étant trouvées entre 70 et 80 jours. Il est intéressant de noter qu'un facteur 100 existe entre les concentrations sériques et urinaires en eCG. La concentration d'eCG après le 5ème mois de gestation n'est plus détectable. L'analyse des concentrations sériques et urinaires en sous-unités libres au cours de la gestation montre que la sous-unité α libre est indécelable au début comme en fin de gestation. En revanche, la sous-unité β libre est mise en évidence à partir du 35ème jour. De faibles taux d'eCGβ (5 à 10 ng/ml) peuvent coexister avec la présence d'eCG dans le sérum et l'urine.

Enfin, la concentration en eCGβ augmente jusqu'au 70-75ème jour de gestation puis diminue ensuite. La sécrétion d'eCGβ libre semble donc être parallèle à celle de l'hormone sous sa forme dimérique (Couture et al., 1994).

<u>b) Influence du génotype fœtal sur la production d'eCG</u>

La concentration d'eCG dans le sérum a été mesurée par Allen, 1975 lors de gestations intra et interspécifiques de juments et d'ânesses (Figure 27 a-d).

<u>Figure 27 :</u> Comparaison des concentrations plasmatiques d'eCG lors de gestations intra- et interspécifiques (Allen, 1975).



(a) : 3 juments portant un conceptus cheval
(b) : 2 ânesses portant un conceptus âne
(c) : 2 juments portant un conceptus mule
(d) : 2 ânesses portant un conceptus bardot.

- Chez les juments, le taux d'eCG devient décelable dans le sérum à partir de 37 à 41 jours après ovulation. Le taux s'élève rapidement jusqu'à un maximum de 40 à 180 UI/ml entre 55 et 75 jours, puis décroît progressivement jusqu'à atteindre le seuil de détection pendant les 60 à 80 jours suivants (figure 27a).

- Chez l'ânesse, le pic d'eCG est plus faible (30 à 60 UI/ml) et est maintenu plus longtemps que chez la jument à stade de gestation équivalent (figure 27b).

- Chez la jument portant un conceptus mule, le pic d'eCG (12 à 22 UI/ml) intervient plus tôt dans la gestation entre 47 et 55 jours, et le taux est huit à dix fois plus faible que dans la gestation intraspécifique de jument. eCG devient indécelable (<0,5 UI/ml) dans le sérum à partir de 90 jours de gestation (figure 27c).

- Chez l'ânesse portant un conceptus bardot, le taux maximum d'eCG (180 à 250 UI/ml) est six à huit fois plus élevé que dans la gestation intraspécifique d'ânesse (figure 27d).

Cette modulation de la production d'eCG entre les différents types de gestations intra- et interspécifiques est à mettre en relation avec la variation de développement des cupules endométriales pour chacune de ces gestations.

Ainsi, Allen et Short (1997) ont-ils constaté qu'il existait des différences spectaculaires concernant la taille, la productivité et la durée de vie des cupules endométriales entre les gestations intra- et interspécifiques chez la jument, et les gestations intra- et interspécifiques chez l'ânesse ; ces différences morphologiques étaient de plus parfaitement corrélées à la modulation hormonale en eCG :

- Une ceinture chorionique large, épaisse et active se développe lors de gestation intraspécifique chez la jument et interspécifique chez l'ânesse, les deux croisements ayant un étalon comme géniteur. Celle-ci donne naissance à des cupules endométriales larges et actives pour ces deux types de gestation qui sécrètent alors de fortes concentrations d'eCG dans le sang maternel, avec persistance de l'activité gonadotrope jusqu'à 120-140 jours de gestation.

- A l'inverse, une ceinture chorionique beaucoup plus fine et étroite est observée dans la gestation intraspécifique chez l'ânesse et interspécifique chez la jument, les deux ayant un âne comme géniteur. Cette petite ceinture donne, après invasion de l'endomètre maternel, des cupules endométriales beaucoup plus petites et moins productives. Ainsi, le taux d'eCG dans le sérum maternel est considérablement plus faible.

- Dans la gestation interspécifique chez la jument, la sécrétion de gonadotrophines a lieu pendant une courte période (seulement 30 jours) en raison d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire maternelle envers les cellules du trophoblaste envahissantes qui engendre une nécrose prématurée et la mort des cupules (Allen et Short, 1997).

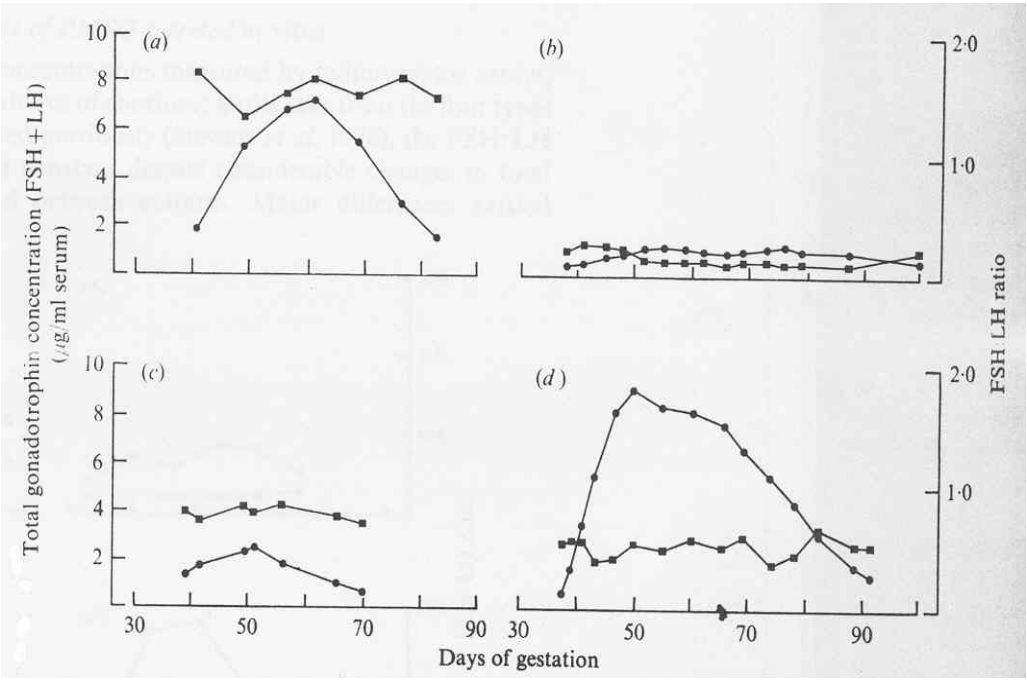
c) Influence du génotype fœtal sur le ratio FSH/LH de l'eCG

L'eCG possède une activité à la fois de type FSH et LH. Aussi, les scientifiques se sont demandés si le génotype fœtal pouvait également influencer le ratio des activités FSH et LH de l'hormone Chorionique Gonadotrope. Pour cela, Stewart et al. (1977) ont mesuré les activités FSH et LH de l'eCG *in vivo* sur des testicules de rat selon le type de gestations.

Les résultats obtenus (figure 28) confirment les précédentes observations concernant les effets prononcés du génotype fœtal sur le taux de gonadotrophines.

- Chez les juments portant un conceptus mule : malgré une variation individuelle considérable, il semble que le taux de gonadotrophines soit beaucoup plus faible, et que l'activité gonadotrophique devienne indécelable dans le sérum beaucoup plus tôt que lors de gestation intraspécifique. Le pic de gonadotrophines (FSH + LH) intervient entre 50 et 60 jours de gestation et s'élève entre 3,46 (à 50 jours) et 7,40 µg/ml (à 60 jours), lors de gestation intraspécifique chez la jument, comparé avec 0,41 –2,3 µg/ml lors de gestation interspécifique (figure 28a-c).

<u>Figure 28 :</u> Concentration totale de gonadotrophines (FSH + LH) et ratio FSH/LH de l'eCG au cours des gestations intra- et interspécifiques de jument et d'ânesse (Stewart et al., 1977).



• : Concentrations en gonadotrophines totales (FSH + LH)
♦ : Ratio FSH/LH de l'eCG
(a) : Gestation intraspécifique de jument
(b) : Gestation intraspécifique d'ânesse
(c) : Gestation interspécifique de jument
(d) : Gestation interspécifique d'ânesse.

- Chez les ânesses portant un conceptus bardot : la concentration en gonadotrophines dans le sérum est beaucoup plus élevée qu'en cas de gestation intraspécifique. Le pic de gonadotrophines a lieu entre 50 et 60 jours et s'élève entre 8,22 et 13,29 μg/ml lors de gestation interspécifique, en comparaison avec un pic entre 1,02 et 1,26 μg/ml lors de gestation intraspécifique (figure 28b-d).

Les résultats révèlent également des différences très prononcées dans le ratio FSH/LH de l'eCG produit dans les quatre types de gestation (tableau 5).

- Gestation intraspécifique de jument : ratio FSH/LH = 1,5. Ce ratio reste constant tout au long de la gestation.

- Gestation intraspécifique d'ânesse : ratio FSH/LH = 0,2. Ce faible ratio indique un excès considérable d'activité LH par rapport à l'activité FSH.

- Dans les deux types de gestation interspécifique, malgré la différence marquée dans la concentration de gonadotrophines, le ratio FSH/LH est similaire, et se situe approximativement à mi-chemin entre celui des deux types de gestation intraspécifique.

  Conceptus mule : ratio FSH/LH = 0,61

  Conceptus bardot : ratio FSH/LH = 0,65.

<u>Tableau 5 :</u> Ratio FSH/LH de l'eCG (PMSG) sécrété par des conceptus cheval, âne, mule et bardot (hinny) (Stewart et al., 1997)**.**

	Genotype of conceptus			
Source of PMSG	Horse*	Donkey	Mule	Hinny
Maternal serum	1·45 ± 0·03	0·17 ± 0·01	0·64 ± 0·03	0·50 ± 0·02
Number of animals	9	3	3	3
Number of samples	67	23	21	28
Culture medium	0·74 ± 0·03	0·12 ± 0·01	0·45 ± 0·03	0·37 ± 0·02
Number of animals	5	3	4	4
Number of samples	21	14	20	16

* Results published by Stewart *et al.* (1976) are included in these figures.

Les études préalables ont toutes montré une influence marquée du génotype fœtal sur le taux de sécrétion de la gonadotrophine placentaire (eCG). Cette étude révèle également une différence notable dans l'activité gonadotrophique de ces hormones selon le génotype du conceptus.

L'eCG, comme les gonadotrophines placentaires et pituitaires des autres espèces, est un dimère composé par deux sous-unités α et β. La sous-unité α de l'eCG est apparemment semblable à celle des autres gonadotrophines, et se combine avec la sous-unité β, responsable de l'activité biologique de la molécule.

La grande différence de ratio FSH/LH observée entre l'eCG du cheval et celle de l'âne suggère des différences majeures dans l'activité de la sous-unité β de la gonadotrophine placentaire de ces deux espèces. Stewart et al. (1997) estiment qu'il serait intéressant d'étudier le ratio FSH/LH de l'eCG sécrétée par les zèbres et les autres espèces de la famille d'équidés, afin de déterminer si les sous-unités α et β de l'eCG du cheval peuvent se combiner avec les sous-unités α et β de l'eCG de l'âne, et ainsi étudier l'activité gonadotrophique de ces molécules hybrides.

La similitude de ratio FSH/LH des gonadotrophines produites par les conceptus de mule et de bardot, et le fait que ce ratio se situe approximativement à mi-chemin entre les ratios des deux espèces parentales, pourrait avoir deux explications. Soit les cellules fœtales de l'hybride produisent un nouveau type de gonadotrophines contenant une sous-unité β hybride ou, plus probablement, les cellules de l'hybride sécrètent en quantité à peu près égale les types de gonadotrophines de cheval et d'âne.

Hamerton en 1971 (cité par Stewart et al., 1997) a démontré en mesurant le taux de glucose-6-phosphate déshydrogénase (enzyme liée au chromosome X), qu'il existe une inactivation du chromosome X chez ces deux types d'hybride. Le fait que le ratio FSH/LH de l'eCG de mule et de bardot soit à mi-chemin entre les deux espèces parentales, qui n'a aucun rapport avec le sexe du fœtus, pourrait ainsi témoigner à l'encontre de la possibilité que le locus de synthèse de la gonadotrophine puisse être lié au sexe (Stewart et al., 1977).

d) Etude de la fonction biologique et des récepteurs liés à l'activité de l'eCG

Le placenta équin ne commence à sécréter des quantités notables de progestérone qu'à partir de 80 jours de gestation. Avant, la gestation est maintenue par la progestérone sécrétée à la fois par le corps lutéal principal et par un ou plusieurs corps lutéaux secondaires qui se développent dans les ovaires maternels autour de 40 jours. La coïncidence du développement de ces corps lutéaux secondaires avec le début de la sécrétion d'eCG à 40 jours, ainsi que le fait que cette hormone dispose à la fois d'une activité biologique FSH et LH ont conduit à l'hypothèse que l'eCG stimulait la croissance des follicules accessoires, et induisait leur ovulation et/ou leur lutéinisation pour former les corps lutéaux secondaires. Cependant, il a été rapporté une importante croissance folliculaire chez la jument gestante entre 17 et 30 jours, donc bien avant les premières sécrétions d'eCG. De même, des études ont démontré que les augmentations plasmatiques de concentration en FSH qui interviennent régulièrement par intervalle de 10-12 jours chez la jument cyclée, persistaient de manière inchangée pendant la gestation précoce (Stewart et Allen, 1981).

Le manque apparent d'activité gonadotrope de l'eCG endogène chez la jument elle-même est également démontré par le fait que malgré des différences majeures de concentration en eCG dans le sérum maternel entre les gestations intra- et interspécifiques de jument et intraspécifique d'ânesse, l'activité ovarienne, mise en évidence par la concentration plasmatique périphérique de progestérone, ne diffère pas significativement entre tous ces types de gestation. En revanche, la gestation interspécifique d'ânesse constitue une exception majeure, puisque le taux d'eCG y est 5 à 8 fois plus élevé que lors de gestation intraspécifique, et que la sécrétion ovarienne de progestérone y est considérablement accrue, atteignant jusqu'à 600 ng/ml dans le plasma périphérique (Stewart et Allen, 1981).

Stewart et Allen (1981) ont cherché dans cette étude à examiner l'activité gonadotrope de l'eCG lors de la gestation, en comparant les relations entre le taux de gonadotrophines et l'activité ovarienne dans les différents types de gestation et le ratio des activités de type FSH et LH de l'eCG sécrétée par chaque conceptus. Ils ont également étudié la liaison de l'eCG aux récepteurs FSH et LH gonadiques d'ânesse.

Sheldrick et al. (cités par Stewart et Allen, 1981) ont montré précédemment que l'eCG de bardot possédait une activité de type FSH supérieure à celle d'eCG d'âne, et que l'eCG des hybrides provenait certainement d'un mélange entre les deux eCG de cheval et d'âne. Ceci nous mène à suggérer que l'activité ovarienne dans la gestation interspécifique d'ânesse pourrait être stimulée par la composante « cheval » de l'eCG de bardot, laquelle possède une activité FSH supérieure à celle de l'eCG lors de gestation intraspécifique d'ânesse. Pour tester cette hypothèse, Stewart et Allen (1981) ont comparé la fixation de l'eCG de cheval aux récepteurs gonadiques d'âne et de cheval (tableau 6).

<u>Tableau 6 :</u> Fixation de FSH, LH et eCG à différents tissus (Stewart et Allen, 1981).
La quantité d'hormone liée est indiquée en μ mol X 10^{-11} / μg d'ADN

Tissue	Hormone		
	FSH	LH	Horse CG (PMSG)
Rat testis	2·76 ± 0·50	6·82 ± 0·75	7·02 ± 1·50
Boar testis	6·30 ± 1·02	5·80 ± 0·80	5·51 ± 0·15
Cow CL	—	9·01 ± 1·20	7·28 ± 1·34
Horse follicle	2·54 ± 0·35	8·89 ± 0·30	0·15 ± 0·05
Horse CL	0·96 ± 0·09	10·03 ± 2·05	0·42 ± 0·14
Horse testis	2·95 ± 0·25	4·02 ± 0·41	0·13 ± 0·04
Donkey follicle	3·25 ± 0·30	5·20 ± 0·59	0·20 ± 0·03
Donkey CL	—	8·01 ± 0·40	0·56 ± 0·10
Donkey testis	3·02 ± 0·49	3·92 ± 0·52	0·26 ± 0·09

CL : corps lutéaux

L'aptitude de l'eCG à se lier aux récepteurs gonadiques d'âne a été investiguée tout d'abord en mesurant l'activité du récepteur de liaison à FSH, LH et eCG dans trois types de tissu (follicule, corps lutéal et testicule).

Comme prévisible, la liaison de FSH au tissu lutéal est extrêmement faible. Les tissus gonadiques de cheval et d'âne montrent une aptitude similaire de liaison aux gonadotrophines ; ce qui diffère de façon importante avec le potentiel de liaison exprimé par les tissus gonadiques des espèces non-équines. Alors que le tissu des deux espèces d'Equidés montrent des activités de liaison des récepteurs à FSH et LH pituitaires équivalente de celles des espèces non-équines, la liaison de l'eCG de cheval aux tissus gonadiques de cheval et d'âne est minime comparée à celle de cette même hormone envers les tissus gonadiques des autres espèces.

Dans les espèces non-équines pour lesquelles en général la liaison de LH est supérieure à celle de FSH, l'eCG et la LH humaine se lient avec une efficacité égale.

Pour évaluer les capacités relatives de liaison des gonadotrophines aux tissus gonadiques d'âne et de cheval, les auteurs ont ensuite mesuré l'aptitude de FSH, LH équine et eCG à substituer FSH et LH humaines marquées à l'iode 125 sur les récepteurs gonadiques d'âne (tableau 7).

Le faible degré de liaison de l'eCG équine sur les récepteurs FSH et LH à la fois de cheval et d'âne est mis en évidence par la grande quantité d'hormone requise pour engendrer une substitution de 50 % dans les tissus équins (92-890 ng) en comparaison de la dose nécessaire sur des tissus non-équins (7,3-17,8 ng). La conversion de cette comparaison en moles révèle que l'eCG se lie avec approximativement la même affinité que LH et FSH humaines aux récepteurs non-équins, mais sa fixation aux récepteurs équins demeure beaucoup plus faible dans tous les cas.

<u>Tableau 7 :</u> Substitution de LH et FSH humaines par les gonadotrophines équines (Stewart et Allen, 1981).

Les résultats sont exprimés en quantité d'hormone requise (en ng) pour substituer 50 % d'hormone marquée fixée.

	^{125}I-labelled LH			^{125}I-labelled FSH		
Tissue	Horse LH	Human LH	Horse CG (PMSG)	Horse FSH	Human FSH	Horse CG (PMSG)
Rat testis	2·0	3·5	7·3	5·1	8·1	15·2
Boar testis	2·5	3·4	7·5	—	—	—
Cow CL	—	—	—	5·8	9·0	17·8
Horse follicle	2·0	4·0	150	2·0	18·5	890
Horse CL	2·0	3·2	113	—	—	—
Horse testis	1·5	2·8	110	1·8	12·2	680
Donkey follicle	2·6	4·2	140	3·2	27·0	350
Donkey CL	1·9	3·8	92	—	—	—
Donkey testis	2·1	2·3	103	10·5	26·0	385

Le tableau 8 montre que l'eCG se lie avec approximativement la même affinité aux récepteurs LH de cheval et d'âne, mais avec seulement 3-4 % de la capacité de liaison de la LH équine. Cependant, tandis que la fixation de l'eCG aux récepteurs FSH de cheval est presque négligeable (0,5 % de la capacité de liaison de la FSH équine), sa liaison aux récepteurs de FSH d'âne est 7 fois plus grande (3,6 %), d'où l'équivalence avec la fixation de l'eCG sur les récepteurs LH de cheval (3,0 %) et d'âne (3,9 %).

<u>Tableau 8 :</u> Fixation relative de l'eCG aux récepteurs LH et FSH (Stewart et Allen, 1981).

Les résultats sont exprimés en % de liaison aux récepteurs.

	Binding to horse receptors				Binding to donkey receptors			
	LH receptors		FSH receptors		LH receptors		FSH receptors	
	Horse LH	Horse CG	Horse FSH	Horse CG	Horse LH	Horse CG	Horse FSH	Horse CG
Follicle	100	2·7	100	0·4	100	3·7	100	1·8
CL	100	3·5	—	—	100	4·1	—	—
Testis	100	2·7	100	0·6	100	4·0	100	5·4
Mean	100%	3·0%	100%	0·5%	100%	3·9%	100%	3·6%

Les études portant sur l'activité ovarienne pendant la gestation précoce suggèrent que c'est la FSH pituitaire, plutôt que l'eCG, qui stimule de développement de follicules accessoires. L'importante croissance folliculaire intervient avant la production d'eCG et, au moins dans les gestations de cheval, d'âne et de mule, l'activité folliculaire est moins marquée pendant la période où l'eCG est sécrétée que pendant la gestation précoce. De plus, bien qu'il existe une augmentation significative en progestérone maternelle à 6 semaines, en réponse

apparemment à l'eCG, il n'y a par la suite aucune relation détectable entre le niveau d'activité lutéale et la quantité de gonadotrophines sécrétées. Par exemple, alors que le taux d'eCG dans les gestations intraspécifiques de jument est 5 fois plus élevé que celui dans les gestations interspécifiques de jument, l'activité ovarienne est la même dans ces deux types de gestation (Stewart et Allen, 1981).

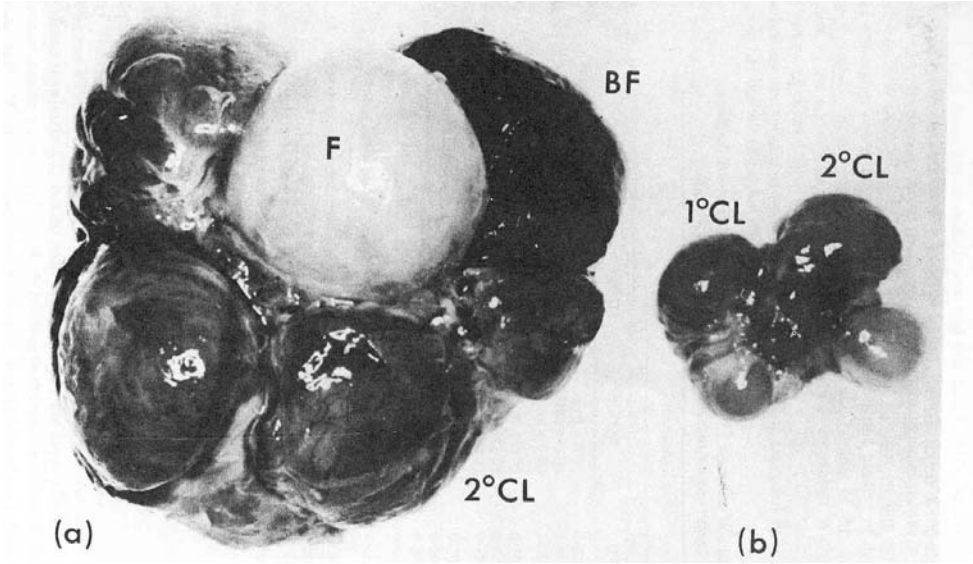
Toutefois, bien que l'eCG ne stimule pas la croissance folliculaire, il semblerait qu'elle engendre l'ovulation et/ou la lutéinisation des follicules accessoires. L'eCG pourrait également participer au maintien de l'activité sécrétoire des corps lutéaux secondaires en effet, lors de gestations interspécifiques de jument, au cours desquelles la sécrétion d'eCG cesse beaucoup plus tôt que dans des gestations intraspécifiques de jument, la production de progestérone ovarienne commence à diminuer également plus tôt.
Cependant, les observations de Allen en 1969 et Mitchell en 1975 concernant le fait que le corps lutéal régresse souvent si le conceptus est enlevé après 40 jours, malgré la présence de forte concentration d'eCG dans le sang, indiquent qu'un ou plusieurs facteurs d'origine fœtale autres que l'eCG sont impliqués dans le maintien de la fonction lutéale pendant la première moitié de la gestation (Stewart et Allen, 1981).

Les résultats de Stewart et Allen (1981) exposés ci-dessus indiquent fortement que la croissance des follicules accessoires dans les gestations interspécifiques d'ânesse est directement stimulée par la sécrétion d'eCG. Ceci est improbable dans le cas de gestations intra- et interspécifiques de jument et intraspécifiques d'ânesse. Il semblerait que l'eCG de bardot, contrairement à l'eCG de cheval, âne et mule, soit capable d'exercer son activité FSH sur les ovaires maternels. L'eCG de bardot exprime considérablement plus d'activité FSH que l'eCG d'âne, et consiste sans doute en un mélange d'eCG de cheval (ratio FSH/LH = 1,0) et d'eCG d'âne (ratio FSH/LH = 0,1). Les ovaires d'ânesse seraient normalement exposés à un très faible niveau d'activité FSH lors de gestation intraspécifique. Les récepteurs FSH ovariens d'ânesse ont une plus grande affinité de liaison à l'eCG de cheval que les récepteurs FSH ovariens de jument. Ainsi, quand les ovaires d'ânesse sont exposés à une très grande quantité d'activité FSH exprimée par l'eCG de bardot, ils sont capables de répondre et, sont donc hyperstimulés, comme le montre la comparaison macroscopique des ovaires d'ânesse et de jument respectivement lors de gestations inter- et intraspécifiques réalisée par Stewart et Allen (1981 ; figure 29).

- Une activité folliculaire importante est observée avant la production d'eCG et semble être plus élevée entre 25 et 30 jours chez toutes les juments et ânesses gestantes. Mais autour de 60 jours, quand le taux d'eCG a atteint le pic, une différence marquée est évidente entre les gestations de conceptus cheval, de mule et d'âne d'une part, et la gestation de bardot d'autre part. Dans ce premier groupe, les ovaires montrent moins d'activité folliculaire qu'à 30 jours et ils contiennent seulement 2 à 3 corps lutéaux de taille normale, avec parfois un follicule lutéinisé (figure 29b).

- Dans la gestation de conceptus bardot, les deux ovaires sont considérablement hypertrophiés et présentent de nombreux gros follicules anormaux, des corps lutéaux et des follicules lutéinisés (figure 29a).

<u>Figure 29 :</u> Comparaison d'ovaire d'ânesse lors de gestation interspécifique et d'ovaire de jument lors de gestation intraspécifique à 60 jours
(Stewart et Allen, 1981)**.**



(a) : Ovaire d'ânesse portant un conceptus bardot à 60 jours.
(b) : Ovaire de jument portant un conceptus cheval à 60 jours.

CL : corps lutéal
BF : follicule rempli de sang
F : follicule

Stewart et Allen (1981) ont émis l'hypothèse que la jument a développé une résistance au moins envers l'activité FSH de son propre eCG de façon à protéger ses ovaires contre une hyperstimulation lors de gestation intraspécifique. Un mécanisme de protection similaire des ovaires se produit certainement chez l'ânesse, bien que ses ovaires ne soient pas réfractaires à l'eCG de cheval comme ceux de la jument. Ce n'est alors que lorsqu'une gestation hybride entre un cheval et une ânesse que cette adaptation échoue.

L'eCG dispose donc d'une fonction lutéotrope lors de la gestation, nécessaire pour provoquer l'ovulation et/ou la lutéinisation des follicules accessoires stimulés par la FSH pituitaire, et en corrélation avec d'autres facteurs fœtaux, pour prolonger la durée de vie et l'activité sécrétoire des corps lutéaux secondaires. Toutefois, ces deux fonctions gonadotropes sont attribuables à l'activité LH plutôt qu'à l'activité FSH, et il n'est pas encore évident de comprendre quelle est la fonction physiologique de l'activité FSH de l'eCG (Stewart et Allen, 1981).

Le génotype fœtal exerce donc une forte influence sur la production hormonale d'eCG lors de gestation interspécifique. Cette modulation hormonale est complexe puisque le type de conceptus influence non seulement le niveau de production de l'eCG, mais également son ratio d'activité FSH/LH. Quelle est l'influence du génotype fœtal sur la production de progestagènes ?

2) Modulation de la production de progestagènes

a) Influence du génotype fœtal sur la production de progestagènes

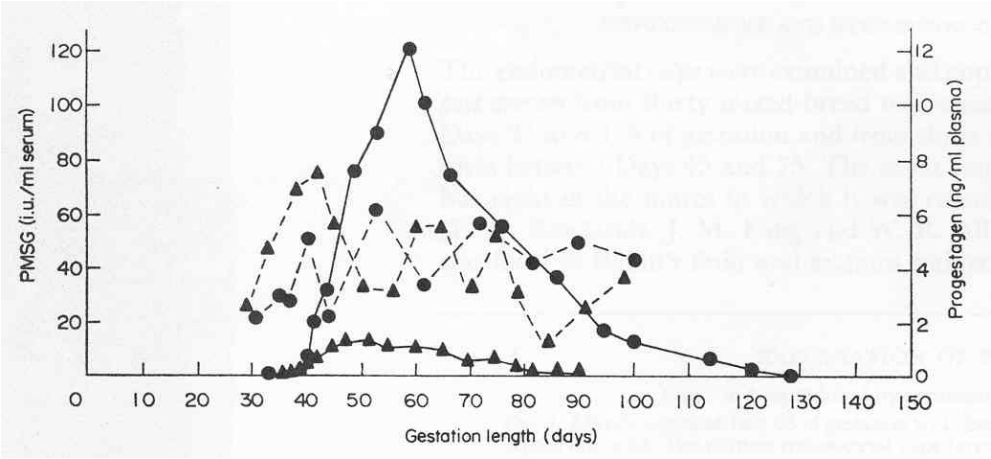
Allen, en 1975 a étudié l'influence du génotype fœtal sur la modulation hormonale au cours de la gestation interspécifique, en comparant la production de progestagènes et d'eCG chez la jument et l'ânesse lors de gestations intra- et interspécifiques.

- Le génotype fœtal n'a pas d'effet apparent sur la production de progestagènes chez la jument. Le taux périphérique entre 40 et 100 jours (5 à 15 ng/ml) est semblable à celui obtenu lors de gestation intraspécifique de jument, malgré les différences majeures de concentration en eCG entre ces deux types de gestation à cette même période (figure 30).

- En revanche, le génotype fœtal influence profondément la production de progestagènes chez l'ânesse. Des concentrations de 500 à 800 ng/ml sont mesurées entre 60 et 80 jours dans la gestation interspécifique d'ânesse, au lieu de 5 à 15 ng/ml lors de gestation intraspécifique, alors que l'eCG est aussi maximale (figure 31).

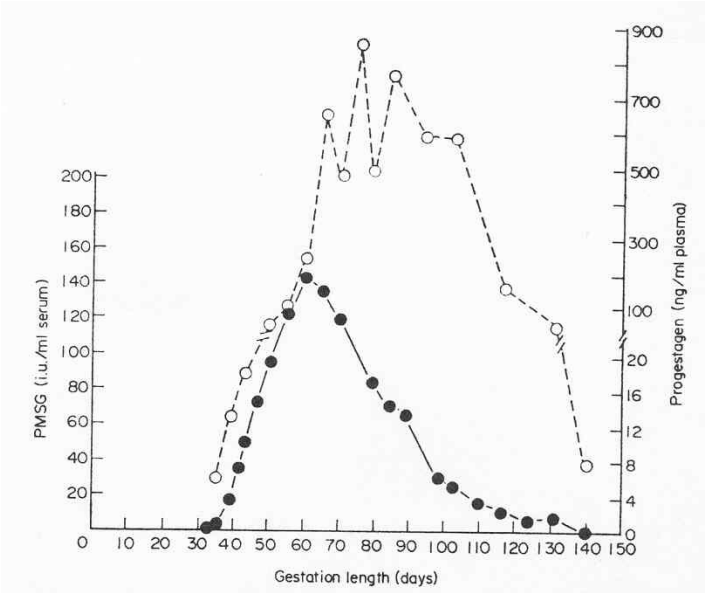
Ainsi, des concentrations plasmatiques de progestagènes très élevées sont retrouvées chez des ânesses portant un conceptus bardot, jusqu'à 800ng/ml. On n'observe que très rarement des concentrations en progestagènes de cette ampleur lors de gestations intraspécifiques. Chez le cochon d'Inde et les autres rongeurs hystricomorphes, de telles concentrations en progestérone sont associées à une réduction importante du taux de clairance métabolique. Au contraire, chez la femme gestante, le niveau de production de progestérone peut présenter une considérable augmentation, en raison d'un accroissement de la sécrétion placentaire.

Figure 30 : Concentrations en progestagènes et en eCG dans le plasma périphérique de jument lors de gestations intra- et interspécifiques (Allen, 1975)**.**



• : Gestations intraspécifiques de jument (conceptus cheval)
♦ : Gestations interspécifiques de jument (conceptus mule)
--- : Concentration en progestagènes
__ : Concentration en eCG (nommée PMSG en ordonnée)

<u>Figure 31 :</u> Concentrations en progestagènes et en eCG dans le plasma périphérique d'ânesse lors de gestations interspécifiques (Allen, 1975)**.**



●--● : Concentration en progestagènes
°--° : Concentration en eCG (nommée PMSG en ordonnée)

C'est pourquoi Sheldrick et al. (1977) ont cherché à déterminer si l'un de ces mécanismes pouvait être influencé par le génotype fœtal chez les Equidés. Leur étude a consisté à mesurer le Taux de Clairance Métabolique (MCR) dans le sang, ainsi que le Taux de Production (PR) de progestérone au cours de gestations intra- et interspécifiques d'ânesse (tableau 9).

<u>Tableau 9 :</u> Taux de clairance et niveau de production de progestérone au cours de gestations intra- et interspécifiques d'ânesse (Sheldrick et al., 1977)**.**

Days of pregnancy (ovulation = Day 0)	No. of experiments (animals)	Blood progesterone conc. (ng/ml)	MCR		PR	
			l/min	l/min/kg$^{0\cdot75}$	µg/min	µg/min/kg$^{0\cdot75}$
Normal conceptus						
28, 35	2 (2)	2·6, 17·1	9·39, 16·48	0·18, 0·32	24, 281	0·47, 5·39
*52, 56, 59	3 (3)	10·8 ± 2·0	17·45 ± 2·76	0·32 ± 0·06	196 ± 63	3·71 ± 1·32
Overall mean*	5 (4)	10·4 ± 2·6	15·65 ± 2·19	0·29 ± 0·04	178 ± 54	3·40 ± 1·08
Hinny conceptus						
31, 34	2 (2)	5·2, 7·4	8·50, 10·87	0·17, 0·22	62, 56	1·22, 1·14
60, 60, 70	3 (3)	189·3 ± 46·7	10·54 ± 5·44	0·21 ± 0·11	1513 ± 515	29·57 ± 10·06
Overall mean	5 (4)	116·1 ± 51·6	10·20 ± 3·01	0·20 ± 0·13	932 ± 454	18·21 ± 8·87

MCR : Taux de Clairance Métabolique de progestérone
PR : Niveau de Production de progestérone

Le taux de clairance métabolique de la progestérone dans le sang est relativement similaire chez l'ânesse dans les gestations intra et interspécifiques (12,34 l/min en moyenne) Ces résultats suggèrent que le fort taux de progestérone plasmatique constaté lors de gestation interspécifique chez l'ânesse n'est pas associé à une augmentation substantielle d'une quelconque protéine spécifique de liaison à la progestérone.

Le rythme de production de la progestérone au cours de gestations intraspécifiques d'ânesse à 28 et 35 jours est semblable à celui trouvé à 56 et 59 jours. L'importante augmentation entre 31-34 et 60-70 jours lors de gestations interspécifiques d'ânesse reflète les augmentations comparables de concentration plasmatique en progestérone.

Sheldrick et al. (1977) ont également mesuré les différences de concentration en progestérone dans les veines ovariennes, utérines et jugulaires afin de déterminer la source de ce niveau de production élevé (tableau 10).

- Dans les 3 gestations interspécifiques d'ânesse examinées, la concentration de progestérone dans la veine ovarienne était supérieure (4687 ng/ml) à celle des veines utérine (258 ng/ml) et jugulaire (204 ng/ml).

- Lors de gestation intraspécifique, la concentration de progestérone dans la veine ovarienne était seulement de 59 ng/ml, comparée à celle de la veine utérine (264 ng/ml) et jugulaire (37 ng/ml).

<u>Tableau 10 :</u> Concentration en progestérone (ng/ml plasma) dans les veines ovarienne, utérine et jugulaire lors de gestations intra- et interspécifiques d'ânesse (Sheldrick et al., 1977)**.**

	Conceptus			
	Donkey	Hinny	Hinny	Hinny
Day of gestation (ovulation = Day 0)	57	60	62	64
Progesterone conc.				
Jugular vein	37	138	355	119
Ovarian vein—pregnant side	62	360	8100	1938
—non-pregnant side	56	—	9160	3877
Uterine vein—pregnant side	390	140	495	129
—non-pregnant side	138	98	584	103

Hinny = bardot

Les résultats confirment que les ovaires maternels sont la source principale de progestérone dans le stade précoce de gestation interspécifique chez l'ânesse.

Ainsi, la concentration plasmatique inhabituellement élevée de progestérone constatée lors de gestation interspécifique d'ânesse est due à une notable augmentation du niveau de production plutôt qu'à une diminution du taux de clairance métabolique. Cette influence du génotype fœtal sur le niveau de production de progestérone est associée à une stimulation du fonctionnement ovarien, à un moment où la concentration d'eCG dans le sang maternel est élevée (Sheldrick et al., 1977).

Stewart et Allen (1981) se sont également intéressés à la modulation hormonale intervenant lors de gestation interspécifique. Ils ont de la même façon mesuré les concentrations et pics de progestagènes et d'eCG au cours de gestations intra- et interspécifiques de jument et d'ânesse (tableau 11 et figure 32).

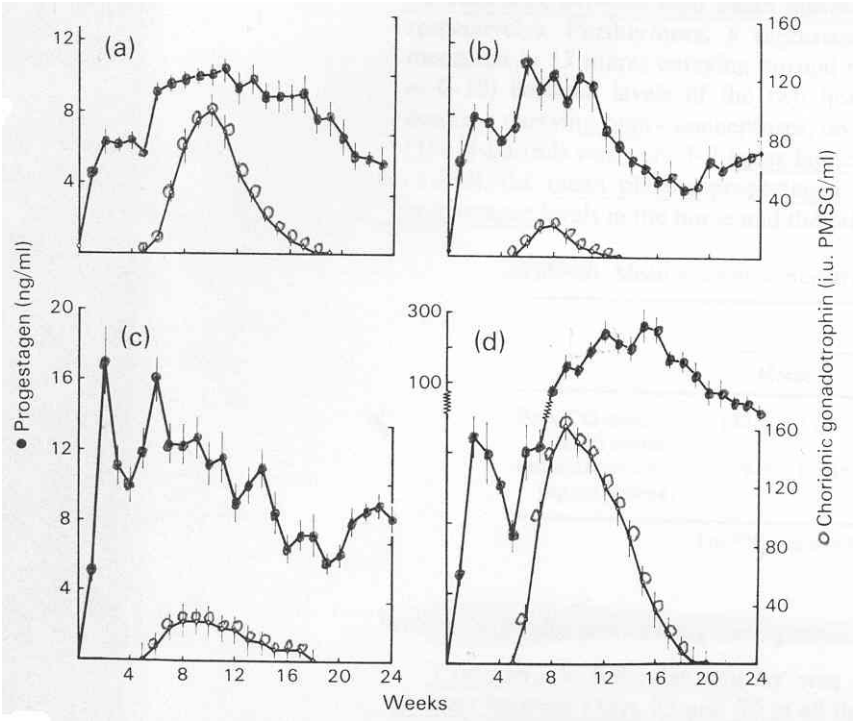
<u>Tableau 11 :</u> Concentrations en progestagènes et en eCG lors de gestations intra- et interspécifiques de jument et d'ânesse (Stewart et Allen, 1981).

	Conceptus			
	Horse	Mule	Donkey	Hinny
Peak CG conc. (i.u./ml serum)	112·6 ± 17·4	26·4 ± 5·9	27·4 ± 5·9	161·4 ± 14·7
Progestagen conc. (ng/ml plasma)	9·7 ± 0·54*	9·8 ± 1·2‡	12·2 ± 0·95‡	160·0 ± 21·9*

For *Weeks 6–17 and ‡Weeks 6–11 of pregnancy.

Hinny = bardot

<u>Figure 32 :</u> Concentrations en progestagènes et en eCG (PMSG) dans des gestations intra- et interspécifiques de juments et d'ânesses (Stewart et Allen, 1981)**.**



(a) : 30 gestations intraspécifiques de ponette (conceptus cheval)
(b) : 11 gestations interspécifiques de jument (conceptus mule)
(c) : 14 gestations intraspécifiques d'ânesse (conceptus âne)
(d) : 6 gestations interspécifiques d'ânesse (conceptus bardot)

- Dans ces quatre types de gestations, la concentration plasmatique en progestagènes augmente rapidement après l'ovulation, jusqu'à atteindre un pic dans la seconde semaine de gestation. Le pic est plus élevé chez l'ânesse (12-16 ng/ml) par rapport à la jument (6-8 ng/ml), indépendamment du génotype du fœtus. Le taux décroît ensuite régulièrement entre 2 et 5 semaines dans tous les types de gestation, mais s'élève à nouveau brusquement entre 5 et 6 semaines, indiquant la première ovulation secondaire conjointement avec le début de la sécrétion d'eCG.

- Lors de gestation intraspécifique de jument, le niveau de progestagènes reste ensuite élevé pendant plusieurs semaines et commence seulement à diminuer autour de 18 semaines, quand la concentration d'eCG est devenue très faible (figure 32a).

- Dans la gestation interspécifique de jument, où le taux d'eCG est beaucoup plus faible et atteint la ligne de base beaucoup plus tôt dans la gestation, le déclin du taux de progestagènes commence également beaucoup plus tôt, autour de 11 semaines. L'élévation supplémentaire qui débute autour de 20 semaines reflète sans doute l'augmentation de sécrétion de progestérone placentaire (figure 32b).

- Lors de gestation intraspécifique d'ânesse, on observe aussi une diminution qui intervient plus tôt autour de 14 semaines, suivie par une élévation à 20 semaines (figure 32c).

- Contrairement aux autres types de gestations, le taux de progestagènes dans la gestation interspécifique d'ânesse s'élève de façon très rapide après la 7ème semaine pour atteindre une concentration plasmatique extrêmement élevée (100-300 ng/ml) à 9 semaines. La concentration commence à décroître à nouveau autour de 17 semaines, mais, reste toutefois considérablement plus importante que dans les trois autres types de gestation, jusqu'au terme (figure 32d).

Puisque les augmentations du taux de progestagènes interviennent entre 6 et 17 semaines lors de gestations intraspécifiques de jument et interspécifiques d'ânesse, et entre 6 et 11 semaines lors de gestations interspécifiques de jument et intraspécifiques d'ânesse, le taux de progestérone est considéré comme fournissant une mesure valide du degré de réponse ovarienne maternelle à l'eCG dans chaque type de gestation. En effet, l'eCG stimule le développement du corps lutéal accessoire sécrétant la progestérone dans l'ovaire maternel ce qui participe au maintien de la gestation. Les moyennes de concentration en progestagènes pendant cette période ont été comparées avec les pics de concentration en eCG (tableau 11).

- Ces comparaisons démontrent clairement que malgré les différences majeures concernant le pic de concentration en eCG entre les gestations de conceptus de cheval, de mule et d'âne (respectivement 112,6 ; 26,4 et 27,4 UI/ml), il n'existe pas de différence entre leur concentration plasmatique en progestagènes (respectivement 9,7 ; 9,8 et 12,2 ng/ml).

- En revanche dans la gestation de conceptus bardot, alors que le pic de concentration en eCG (161,4 UI/ml) est 1.4 fois supérieur à celui de la gestation de conceptus cheval (112,6 UI/ml), la concentration plasmatique en progestagènes (160,0 ng/ml) est 16 fois plus élevée que le taux de progestagènes dans les trois autres types de gestations.

L'hypertrophie massive des ovaires constatée lors de gestation interspécifique d'ânesse (Stewart et Allen, 1981 : figure 29) confirme l'origine ovarienne de la très grande concentration de progestérone dans le sang. La quantité totale de tissu lutéal chez ces animaux est au moins 10 fois plus élevée qu'à n'importe quel stade dans les trois autres types de gestation. Les follicules individuels et corps lutéaux sont plus grands (6 cm de diamètre) que ceux d'ânesse (2-3 cm). De plus, le taux de progestérone 10 fois plus élevé n'apparaît pas avant 8-9 jours de gestation, suggérant ainsi que plusieurs jours sont nécessaires pour le développement et l'ovulation et la lutéinisation des follicules.

Ces observations sont bien corrélées avec le taux plasmatique de progestagènes mesuré dans ces quatre types de gestation, et confirme bien les observations de Sheldrick et al. (1977) qui indiquaient que le fort taux de progestérone dans le sang d'ânesse portant un conceptus bardot était d'origine ovarienne (Stewart et Allen, 1981).

Contrairement à la production d'eCG, la production de progestagènes semble donc peu affectée par le génotype fœtal, excepté lors de gestation interspécifique d'ânesse, où celle-ci peut-être jusqu'à 10 fois plus élevée que lors des trois autres gestations.

Ainsi donc, en raison des divergences régnant entre les espèces parentales, la gestation interspécifique conduisant à la production d'hybrides se caractérise par des modulations à la fois immunologiques et hormonales propres et distinctes de celles observées lors de gestation intraspécifique. La figure 33 et le tableau 12 résume les grandes lignes des particularités immunologiques et hormonales de la gestation interspécifique chez la jument et l'ânesse, en comparaison avec celles de la gestation intraspécifique.

<u>Figure 33 :</u> Comparaison de la croissance et de l'apparence histologique des cupules endométriales et des profils d'eCG dans les gestations intra et interspécifiques de jument et d'ânesse (Allen, 1982)**.**

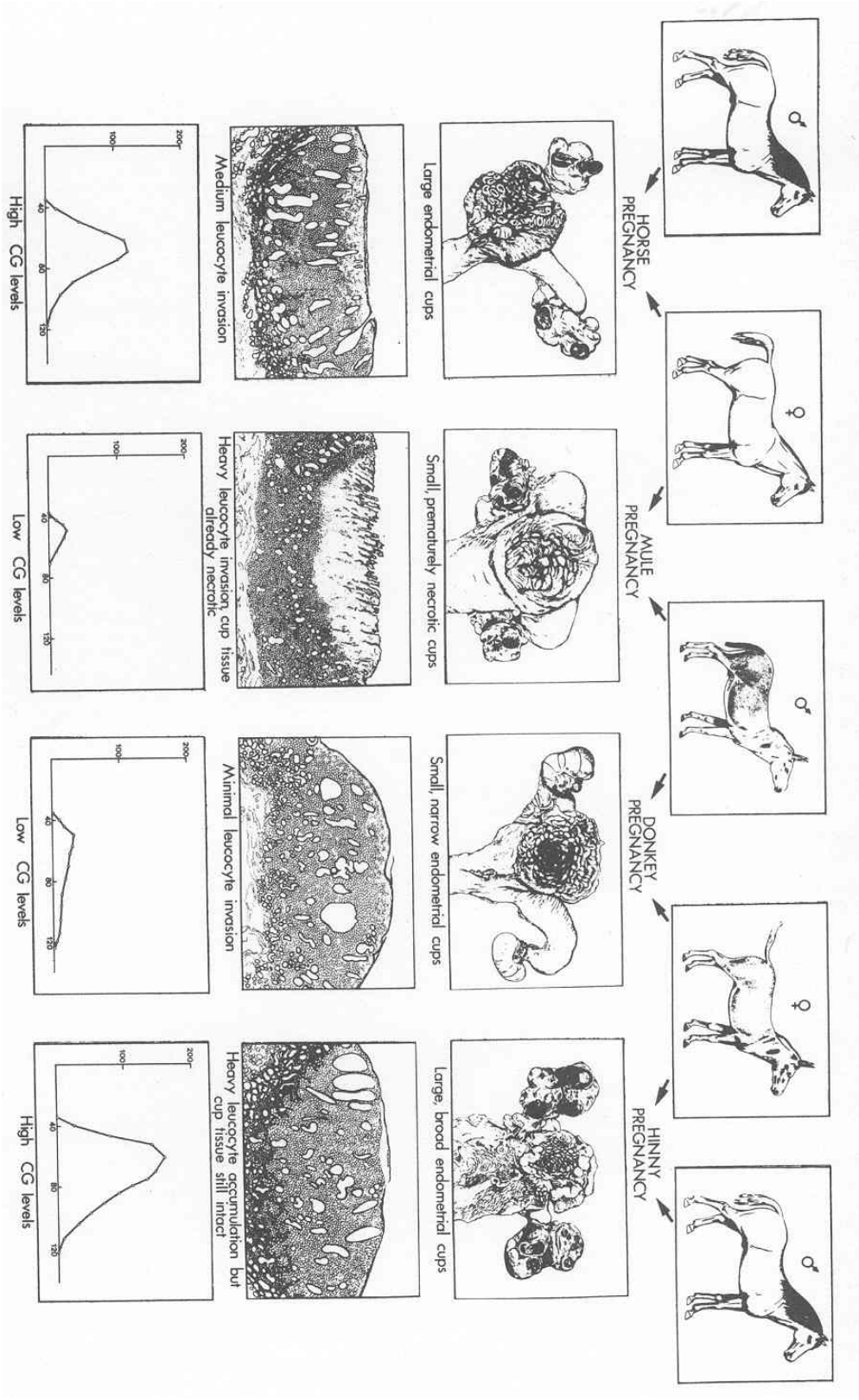


Tableau 12 : Résumé des principales caractéristiques immunologiques et hormonales des gestations intra- et interspécifiques de jument et d'ânesse

(d'après Allen, 1975 ; Kydd et al., 1982 et Stewart et al., 1977).

	Réaction Immunitaire à Médiation Cellulaire	Réaction Immunitaire à Médiation Humorale	Production d'equine Chorionic Gonadotrophine	Production de Progestagènes
GESTATION INTRASPECIFIQUE de JUMENT	± Diminution vers 60 jours Mort des cupules 60-120 jours Invasion localisée	+++ Titre élevé Chez toutes les juments	++ Pic 40-180 UI/ml Ratio FSH/LH = 1,5	± 5-15 ng/ml
GESTATION INTRASPECIFIQUE d'ANESSE	± Diminution vers 60 jours Mort des cupules 60-120 jours Invasion localisée	++ Titre plus faible Pas toutes les ânesses	± Pic durable 30-60 UI/ml Ratio FSH/LH = 0,2	± 5-15 ng/ml
GESTATION INTERSPECIFIQUE de JUMENT	+++ Mort précoce des cupules (60j) Infiltration amplifiée Invasion généralisée	++ Titre plus faible Pas toutes les juments	± Pic précoce 12-22 UI/ml Ratio FSH/LH = 0,61	± 5-15 ng/ml Diminution précoce
GESTATION INTERSPECIFIQUE d'ANESSE	++ Infiltration amplifiée Invasion non généralisée	++ Titre plus faible Pas toutes les ânesses	+++ Pic 180-250 UI/ml Ratio FSH/LH = 0,65	+++ 500-800 ng/ml Augmentation rapide

± : Réaction immunitaire ou production hormonale faible
++ : Réaction immunitaire ou production hormonale modérée
+++ : Réaction immunitaire ou production hormonale intense

G- Cas de transferts embryonnaires interspécifiques

Il peut sembler éloigné du sujet de cette thèse d'aborder le transfert embryonnaire interspécifique. Il s'agit dans cette technique de transférer un embryon d'une espèce d'équidés chez une femelle receveuse d'une autre espèce. A la différence de la gestation interspécifique, le génotype de la mère de l'embryon est d'une espèce différente de celle de la femelle qui va assurer la gestation. On parle alors de gestation extraspécifique, au cours de laquelle on retrouve les mêmes types de particularités immunologiques et hormonales que lors de gestation interspécifique. Ainsi, comme nous le détaillerons plus loin dans cette étude, le transfert d'embryon de cheval chez une ânesse fournit exactement les mêmes particularités que la gestation interspécifique de conceptus bardot chez une ânesse (Allen et al., 1993).

En effet, d'après Allen et al., 1985 dans tous les types de gestations intra-, inter- et extraspécifiques, il s'opère une stimulation antigénique du système immunitaire maternel contre un conceptus reconnu comme étranger afin de fournir une protection immunitaire et de permettre le maintien de la gestation. Cette stimulation antigénique est croissante depuis la gestation intra-, inter-, et extraspécifique puisque le conceptus est de plus en plus différent de l'espèce maternelle receveuse, et donc de plus en plus étranger au système immunitaire maternel.

On dispose de très peu de données scientifiques précises sur la gestation interspécifique concernant les espèces d'Equidés sauvages. Mais le transfert embryonnaire étant développé dans l'espèce équine, les scientifiques se sont davantage intéressés à la gestation extraspécifique chez les espèces sauvages. Ainsi, Summer et al. (1987) estiment que pour réduire les obstacles majeurs (tels que la nécessité de reconnaissance maternelle du signal de gestation pour éviter la régression du corps lutéal ou la réponse cytotoxique maternelle contre les xéno-antigènes) rencontrés lors de gestations extraspécifiques d'espèces exotiques, il suffirait de sélectionner un représentant d'espèce receveuse qui s'hybride naturellement avec l'espèce donneuse d'embryon.

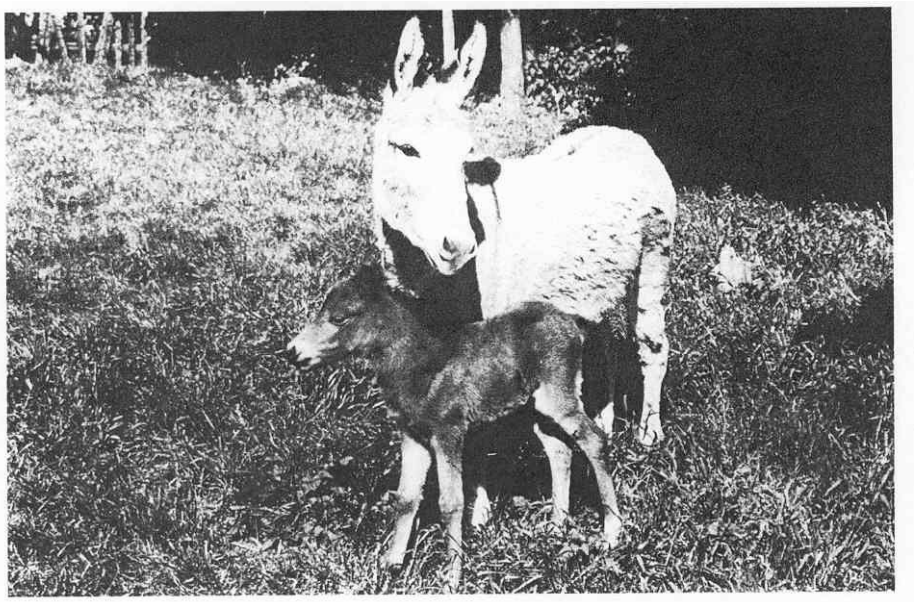
1) Particularités immunologiques de la gestation extraspécifique

Selon Allen et al. (1985) le transfert embryonnaire constitue un outil d'étude unique pour atteindre un niveau de dissemblance antigénique entre les tissus fœtaux et maternels qui ne peut pas être obtenu par croisements intra- et interspécifiques naturels.

a) Transfert d'embryon de cheval chez l'ânesse

L'observation de cinq gestations extraspécifiques d'embryons de cheval chez des ânesses (figure 34) indique que les caractéristiques immunologiques sont essentiellement similaires à celles constatées lors de gestation interspécifique de conceptus bardot chez une ânesse (Allen et al., 1985).

<u>Figure 34 :</u> Anesse receveuse et son poulain issu de transfert embryonnaire (Allen et Short, 1997).



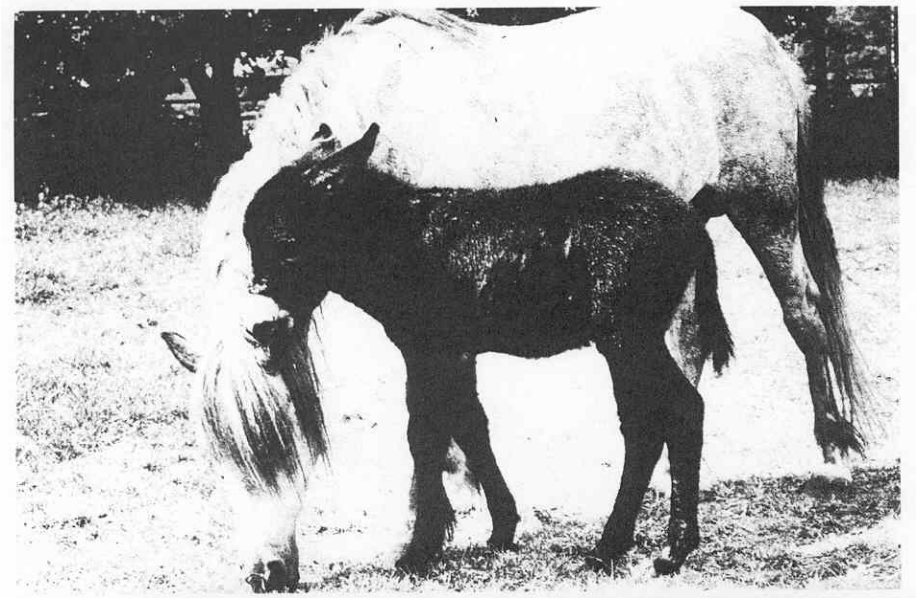
La réaction immunitaire locale à médiation cellulaire se caractérise par une accumulation d'un grand nombre de leucocytes dans le stroma endométrial autour de chaque cupule, mais malgré l'intensité de l'attaque cellulaire, les cupules persistent jusqu'à 100 jours de gestation. De la même façon que lors de gestation interspécifique d'ânesse, et contrairement à la gestation interspécifique de jument, les cellules accumulées restent groupées dans le stroma endométrial environnant et présentent une faible invasion et une destruction modérée du tissu des cupules elles-mêmes.

L'implantation et la placentation interviennent progressivement et de manière normale, sans trace d'accumulation leucocytaire à l'interface allantochorion-endomètre. L'allantochorion est bien interdigité avec l'endomètre d'ânesse et un solide attachement de microvillosités existe entre le trophoblaste et l'épithélium endométrial (Allen et al., 1985).

<u>b) Transfert d'embryon d'âne chez la jument</u>

Contrairement au modèle de gestation extraspécifique réciproque d'embryon de cheval chez une ânesse, la grande majorité des embryons d'âne ne parviennent pas à s'implanter normalement dans un utérus de jument. Ainsi, dans 70 % des cas, le fœtus meurt et le conceptus est résorbé ou avorté entre 80 et 95 jours de gestation. Cette circonstance fréquente d'échec de gestation fait de la gestation extraspécifique d'embryon d'âne chez la jument un modèle d'étude des interactions fœto-maternelles pendant la gestation précoce (Allen et al., 1985). Des naissances sont cependant possibles (figure 35).

<u>Figure 35 :</u> Anon et sa jument receveuse (Allen et Short, 1997).

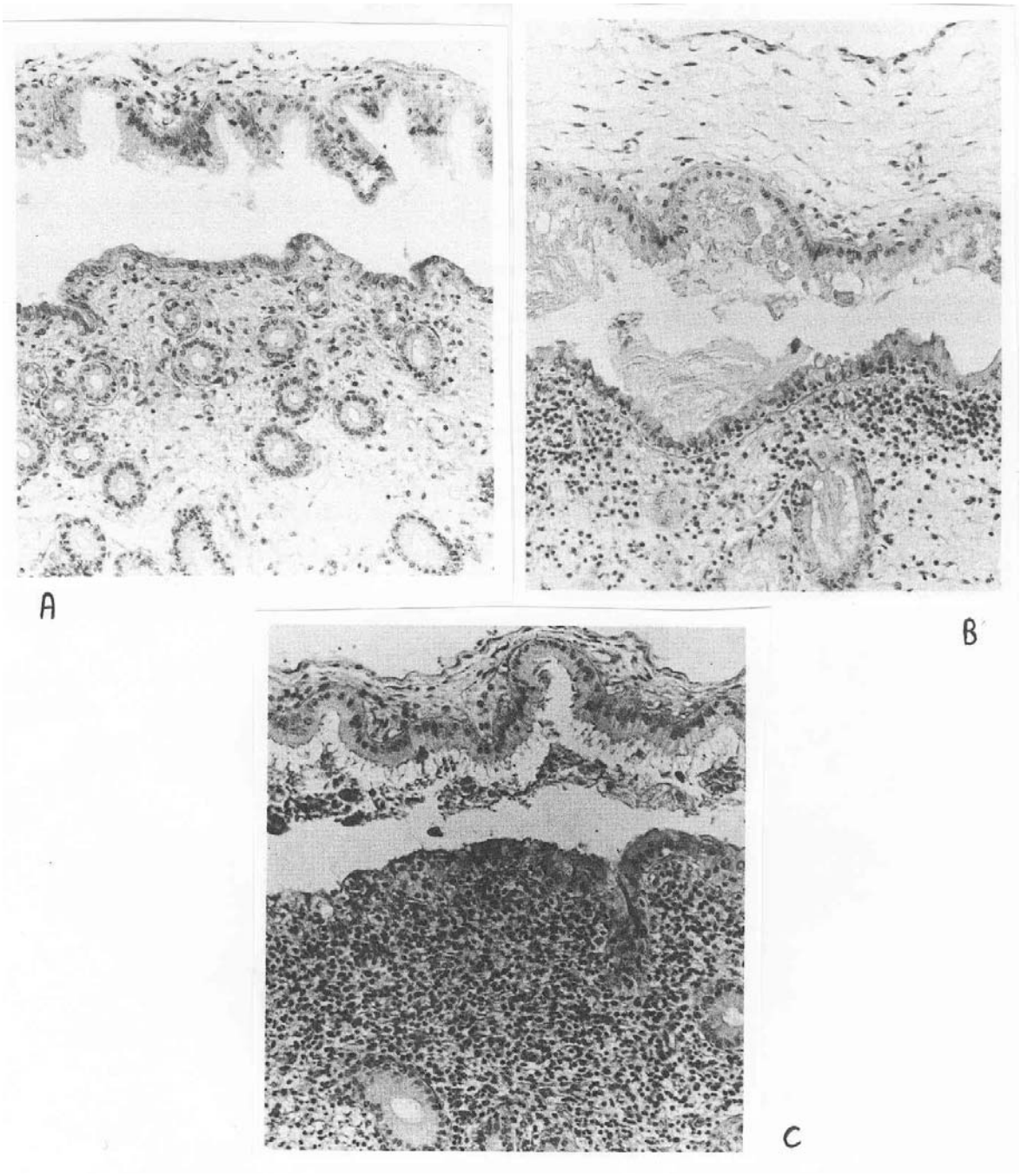


L'examen histologique de l'allantochorion-endomètre révèle les signes de dégénérescence qui précèdent la mort fœtale. Entre 45 et 70 jours, l'allantochorion est étroitement appliqué à l'épithélium de l'endomètre. Des villosités chorioniques rudimentaires se développent (figure 36A) mais l'endomètre maternel ne forme pas de dentelures ou cryptes pour contenir les villosités comme lors d'une implantation normale. A partir de 60 jours, le nombre de lymphocytes augmente et ceux-ci commencent à s'accumuler dans le stroma endométrial. Initialement, l'infiltration cellulaire est plutôt inégale dans sa distribution, mais vers 75 à 80 jours, elle se généralise et se densifie dans toute la région de contact avec le trophoblaste d'âne. Pendant la même période (60 à 80 jours), une quantité croissante de substance non cellulaire apparaît entre le trophoblaste et l'épithélium endométrial. Ces sécrétions exocrines semblent être plus sécrétées par les cellules du trophoblaste que par celles des glandes de l'endomètre et s'accumulent pour séparer les couches maternelles et fœtales (figure 36B). Après 80 jours, l'accumulation de leucocytes commence à traverser l'épithélium endométrial et semble attaquer les cellules du trophoblaste (figure 36C). Toutefois, il est impossible de déterminer si la mort fœtale précède cette attaque active de la couche du trophoblaste ou en résulte directement (Allen et al., 1985).

La gestation extraspécifique d'embryon d'âne chez des juments présente des anomalies majeures de placentation et constitue un modèle d'étude de l'échec de la gestation. En effet, la réponse immunitaire lymphocytaire maternelle est très différente de celle des autres types de gestation intra-, inter- ou extraspécifique. Le taux de prolifération cellulaire de l'épithélium endométrial et du trophoblaste environnant est nettement réduit, principalement dans les régions où le stroma endométrial superficiel est fortement infiltré par les lymphocytes, et les villosités placentaires y sont particulièrement faiblement développées (Allen et al., 1985).

<u>Figure 36 :</u> Coupes histologiques de l'interface allantochorion-endomètre chez une jument portant un embryon d'âne à différents stades de gestation

(Allen et al., 1985).



A : à 67 jours de gestation :

Les villosités chorioniques sont rudimentaires et les cryptes endométriales correspondantes sont absentes. Les leucocytes sont en train de s'accumuler dans le stroma endométrial.

B : à 77 jours de gestation :

Une sécrétion exocrine est accumulée entre les couches fœtales et maternelles et un nombre conséquent de leucocytes est présent dans l'endomètre.

C : à 84 jours de gestation :

Le stroma endométrial apparaît très dense avec beaucoup de leucocytes qui sont en train de traverser l'épithélium pour attaquer le trophoblaste d'âne.

c) Transfert d'embryon d'équidés sauvages

Summers et al. (1987) ont étudié la quantité d'anticorps lymphotoxiques spécifiques des antigènes parentaux présents dans le sérum de juments receveuses (tableau 13) d'embryon de cheval de Przewalski (*Equus przewalskii*) (figure 37) ou de zèbre de Grant (*Equus burchelli*) (figure 38).

A l'exception d'une gestation extraspécifique d'embryon de cheval de Przewalski chez une jument, on mesure une forte réponse en anticorps cytotoxiques dirigés contre les lymphocytes des parents génétiques. En général, les anticorps sont détectés peu de temps après le début du développement des cupules endométriales, soit à partir de 36 jours. Chez une jument receveuse toutefois, les anticorps dirigés contre les lymphocytes des deux parents géniteurs apparaissent à 33 jours ; chez une autre jument receveuse, les anticorps dirigés contre la mère génétique de l'embryon sont déjà présents à 21 jours de gestation, le premier jour à partir duquel ont été réalisés les tests.

Tableau 13 : Développement des anticorps lymphotoxiques dans le sérum de juments et d'ânesses receveuses portant des embryons de zèbre et cheval de Przewalski (Summers et al., 1987).

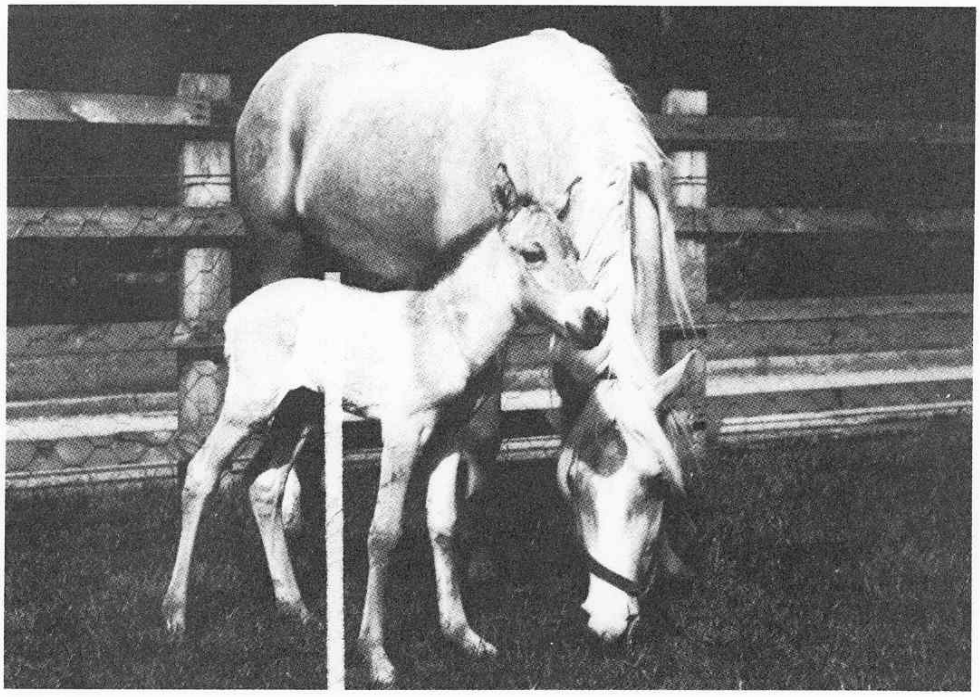
Type of pregnancy	Recipient	Period during which sera tested for antibody*	Antibody present against sire*	Antibody present against dam*	Outcome of pregnancy
Przewalski's horse-in-horse	HP	18–194	—	—	Live foal, Day 329
	KH	14–134	33–134	33–134	Live foal, Day 324
	MQ	20–128	41–128	34–128	Resorbed, Day 85–101
	MN	19–68	40–68	40–68	Live foal, Day 322
	TM	21–70	56–70	21–70	Live foal, Day 334
Zebra-in-horse	KS	14–69	43–69	43–69	Resorbed, Day 61–70
	MG	4–181	46–181	46–181	Live foal, Day 367
	MR	21–139	49–99	35–128	Foal stillborn, Day 350
Zebra-in-donkey	UM	18–188	48–158	48–168	Aborted, Day 292

*Days after ovulation in recipients.

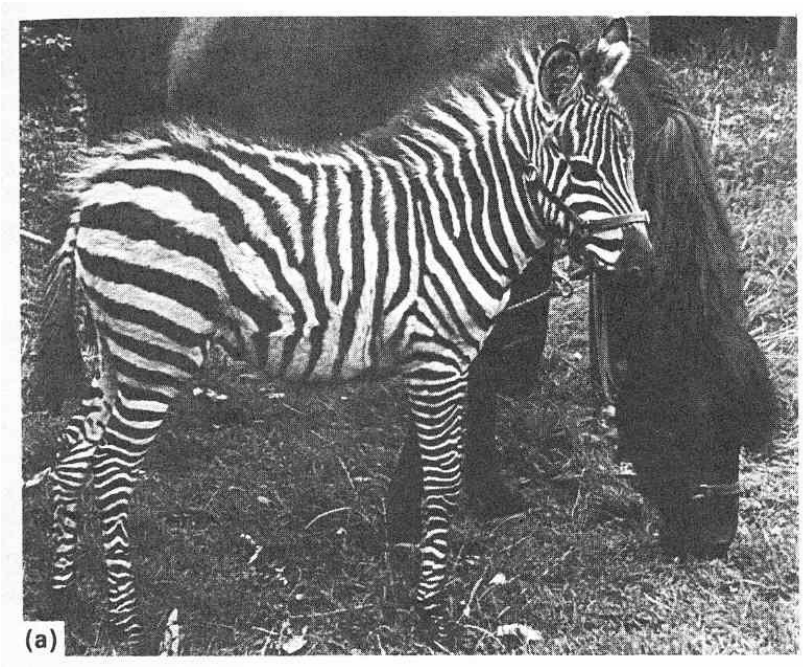
*: Jours après ovulation chez les receveuses
Recipient : code des receveuses

La réaction immunitaire à médiation humorale est donc amplifiée et intervient plus tôt que lors de gestation intraspécifique. La particularité de cette réponse par rapport à celle observée lors de gestation interspécifique réside dans la présence d'anticorps dirigés à la fois contre les antigènes paternels et contre les antigènes maternels d'un conceptus entièrement étranger du système immunitaire de la jument receveuse.

<u>Figure 37 :</u> Cheval de Przewalski nouveau-né issu de transfert embryonnaire et sa mère porteuse (*Equus caballus*) (Allen et al., 1993)**.**



<u>Figure 38 :</u> Zèbre (*Equus burchelli*) de 8 jours issu de transfert embryonnaire et sa mère porteuse poney Welsh (Summers et al., 1987).



Allen et al. (1993) ont constaté lors d'avortements de gestation extraspécifique, une vigoureuse réponse de rejet à médiation cellulaire généralisée de la part du système immunitaire maternel de la receveuse. Les fœtus expulsés près du terme présentaient des signes sévères de polyarthrite non-infectieuse avant l'avortement et les receveuses montraient de fortes concentrations en complexes anticorps-antigènes dans le sang. L'avortement lors de gestations extraspécifiques évoque une pathologie immunologique de la gestation, résultant de la reconnaissance et de la réponse maternelle vis à vis des antigènes spécifiques de zèbre exprimés à l'interface foeto-maternel.

Le transfert embryonnaire extraspécifique se caractérise donc par une réponse immunitaire encore plus prononcée que lors de gestation interspécifique mais toutefois, cette réponse excessive n'est pas forcément corrélée au succès ou à l'échec du transfert.

La variabilité de réaction immunologique entre les différents types de gestations intra-, inter- et extraspécifiques aboutit à des différences considérables dans le niveau de développement, la taille finale et la durée de vie des cupules endométriales (tableau 14). Cette extrême variation de développement des cupules endométriales entre les différentes gestations engendrera donc des modulations hormonales en eCG.

Tableau 14 : Développement des cupules endométriales et survie fœtale lors des gestations intra-, inter- et extraspécifiques équines (Allen et Short, 1997).

Fetal genotype	Mare genotype	Fetal : maternal diploid numbers	Endometrial cup development and life span[a]		Outcome of pregnancy
Intraspecific mating					
Horse	Horse	64:64	+++	L	Term
Donkey	Donkey	62:62	+	L	Term
Grant's zebra	Grant's zebra	44:44	+	L	Term
Interspecific mating					
Mule	Horse	63:64	+	S	Term
Hinny	Donkey	63:62	++++	L	Term
Extraspecific embryo transfer					
Przewalski's horse	Horse	66:64	++	L	Term
Horse	Donkey	64:62	++++	L	Term
Horse	Mule	64:63	+++	L	Term
Donkey	Mule	62:63	+	L	Term
Grant's zebra	Donkey	44:62	+	S	Term
Grant's zebra	Horse	44:64	±	VS	
Donkey	Horse	62:64	No cups at all		75% abort at day 80–95

[a] Endometrial cups persist for L ≥ 60 days; S = 15–30 days; VS ≤ 10 days.

2) Particularités hormonales de la gestation extraspécifique

a) Transfert d'embryon de cheval chez l'ânesse

Les cinq gestations extraspécifiques d'embryons de cheval obtenues chez des ânesses observées par Allen et al. (1985) présentent des caractéristiques placentaires et hormonales similaires à celles constatées lors de gestation interspécifique de conceptus bardot chez une ânesse.

Les pics de concentration en eCG (de 43 à 260 UI/ml) et en progestérone (420-840 ng/ml) dans le sang maternel entre 50 et 90 jours de gestation sont beaucoup plus élevés que ceux observés sur la même période lors de gestation intraspécifique.

L'augmentation d'eCG s'explique par des cupules endométriales beaucoup plus larges et actives produites par la ceinture chorionique plus large du conceptus cheval. Comme chez les ânesses portant un conceptus interspécifique bardot, les cupules endométriales sont larges, disposées de façon semi-circulaire et font protrusion de manière proéminente à la surface de la lumière endométriale.

Une autre comparaison peut être effectuée avec la gestation interspécifique d'ânesse concernant la taille des ovaires. Lors de gestation extraspécifique, ceux-ci sont considérablement hypertrophiés en raison du développement de nombreux corps lutéaux secondaires et de follicules lutéinisés. Ce qui conduit à une concentration en progestérone extrêmement élevée dans le plasma maternel, résultant certainement d'un ratio d'activités biologiques FSH / LH de l'eCG plus élevé, causant ainsi l'hyperstimulation des ovaires d'ânesse, comme ce qui a été décrit lors de gestation interspécifique d'ânesse (Allen et al., 1985).

b) Transfert d'embryon d'âne chez la jument

L'échec complet du développement des cupules endométriales reflète l'absence d'eCG dans le sang maternel, ce qui distingue le transfert d'embryon d'âne dans une jument, de tous les autres types de gestations intra-, inter- et extraspécifiques.

Chez la majorité des juments portant un embryon d'âne, la concentration en progestérone demeure relativement constante autour de 3 à 10 ng/ml ou bien, diminue faiblement entre 40 et 80 jours de gestation. L'absence d'augmentation secondaire de progestérone après 40 jours indique un échec de développement des corps lutéaux accessoires, ce qui constitue pourtant une caractéristique typique de cette période de gestation dans les autres types de gestations pour lesquelles se développent les cupules endométriales. Toutefois, quelques petites augmentations du niveau de progestérone indiquent que le développement de corps lutéaux secondaires peut occasionnellement se produire chez certaines juments receveuses. Ceci suggère que l'eCG n'est pas un précurseur obligatoire du développement de corps lutéaux accessoires. Qu'il y ait ou pas développement de corps lutéaux accessoires, il est toutefois clair que le maintien de la fonction lutéale après 40 jours est dépendant de la viabilité du fœtus. Ceci est démontré par une diminution plus rapide de la concentration en progestérone qui coïncide étroitement avec l'heure de la mort fœtale (Allen et al., 1985).

c) Transfert d'embryon d'équidés sauvages

Summers et al. (1987) ont mesuré les concentrations en eCG dans le sérum de juments receveuses d'embryons de zèbre et de cheval de Przewalski (tableau 15).

Tableau 15 : Production d'eCG dans des gestations extraspécifiques d'Equidés (Summers et al., 1987)

Type of pregnancy	Recipient	Period when CG present (days after ovulation)	Peak CG conc. measured in serum (i.u./ml)	Outcome of pregnancy
Przewalski's horse-in-horse	HP	38–80	70	Live foal, Day 329
	KH	40–55	5	Live foal, Day 324
	MQ	40–82	33	Resorbed, Day 85–101
	MN	35–95	135	Live foal, Day 322
	TM	44–70	4	Live foal, Day 334
Zebra-in-horse	KS	36–45	0·5	Resorbed, Day 61–70
	MG	37	0·5	Live foal, Day 367
	MR	40–56	1·5	Foal stillborn, Day 350
Zebra-in-donkey	UM	39–83	22	Aborted, Day 292
	PF	40–59	7	Resorbed, Day 53–79
Zebra-in-zebra	NJ	39–108	9	Live foal, Day 364
	J	38–115*	28	Live foal, Day 355

*Last day on which a blood sample was taken.

Recipient : code des receveuses

Le transfert d'embryon de cheval de Przewalski chez une jument est caractérisé par un profil d'eCG semblable à celui mesuré dans la gestation intraspécifique de jument, mais il existe d'importantes variations entre les quatre animaux que ce soit pour le pic de concentration en eCG ou pour la durée de disparition de l'activité de l'eCG dans le sérum. Au contraire, des quantités minimales d'eCG sont détectées pendant une période anormalement brève (36-56 jours de gestation) dans le sérum des trois juments portant un embryon de zèbre.

Les gestations intraspécifiques de zèbres présentent des profils d'eCG hauts et plats avec des pics de concentration (9 et 28 UI/ml) et des durées de sécrétion (108 et 115 jours) qui rappellent les profils de gonadotrophines de la gestation intraspécifique d'ânesse. Des pics similaires ont été mesurés chez les ânesses portant un conceptus zèbre (7 et 22 UI/ml). Cependant, l'eCG disparaît du sérum beaucoup plus tôt dans la gestation (59 et 83 jours).

Il n'existe pas de corrélation entre le succès ou l'échec de la gestation extraspécifique et ces profils d'eCG.

Cette étude fournit une vision précise du niveau de sécrétion d'eCG et ainsi, de la quantité et la durée du développement des cupules endométriales chez différents types de gestations extraspécifiques.

- Le sérum de zèbre gestante présente une courbe dose-réponse parallèle à celle du sérum de jument gestante.

- Les juments portant un conceptus cheval de Przewalski montrent des profils d'eCG de variabilité et de pics similaires à ceux de gestation intraspécifique de jument.

- Les ânesses portant un conceptus zèbre et les gestations intraspécifiques de zèbre ont des pics de concentration en eCG semblables à ceux mesurés lors de gestation intraspécifique d'ânesse.

La très brève période de gestation (36-53 jours) durant laquelle l'eCG est décelable dans le sérum des juments portant un conceptus zèbre et la disparition prématurée de l'activité d'eCG dans le sérum d'ânesse portant un conceptus zèbre et de jument portant un conceptus cheval de Przewalski ont pour origine le développement d'une vigoureuse réaction cytotoxique à médiation cellulaire maternelle envers les cellules des cupules endométriales xénogéniques chez ces deux espèces de receveuse.

De plus, les taux extrêmement faibles d'activité d'eCG chez les juments portant un conceptus zèbre suggèrent que seulement une très faible quantité de tissu de la ceinture chorionique de zèbre a réussi à envahir l'endomètre de la receveuse autour de 36 jours.
Le développement minimal des cupules chez les juments portant un embryon de zèbre est également similaire à la situation de gestation extraspécifique de jument portant un embryon d'âne, dans laquelle les cupules endométriales sont absentes en raison de l'échec complet de la ceinture chorionique à envahir l'endomètre de la receveuse.

L'environnement utérin exerce donc une profonde influence à la fois sur le développement et sur les propriétés d'invasion de la ceinture chorionique (Summers et al., 1987).

Ces grandes différences de concentration en eCG dans le sérum entre les différents génotypes reflètent les différences dans la largeur et le développement général de la ceinture chorionique de l'ancêtre. De la même manière, la grande variation de durée de sécrétion d'eCG reflète également les différences de réponses immunitaires à médiation cellulaire maternelles envers les antigènes fœtaux xénogéniques exprimés à l'interface fœto-maternel. L'exemple le plus frappant est celui des juments portant un conceptus zèbre : la faible concentration d'eCG indique un développement fortement réduit de la ceinture chorionique dans l'utérus de jument comparé au degré de développement dans l'utérus de zèbre où l'on mesure une concentration d'eCG beaucoup plus élevée dans le sang des donneuses zèbres quand elles portent leurs propres conceptus. De même, la brève période pendant laquelle l'eCG est présent dans le sang maternel indique une destruction à médiation cellulaire encore plus rapide des petites cupules d'embryon de zèbre chez une jument, par rapport à celle qui intervient lors de gestation interspécifique chez une jument (Allen et al., 1993).

Ainsi, de la même manière que lors de la gestation interspécifique, le transfert embryonnaire interspécifique présente des particularités immunologiques et hormonales. Le transfert d'embryon de cheval chez une ânesse présente exactement les mêmes caractéristiques que la gestation interspécifique d'ânesse, contrairement au transfert interspécifique d'embryon d'âne chez une jument, qui dispose de caractéristiques propres et distinctes de celles de la gestation interspécifique de jument.

3) Intérêts de la gestation extraspécifique

a) Préservation des espèces menacées

Le succès de différents transferts d'embryon de chevaux sauvages (tels que *Equus przewalskii* et *Equus burchelli*) chez des équidés domestiques fournit un espoir pour améliorer la préservation des espèces menacées d'extinction.

La principale préoccupation des parcs zoologiques est la conservation des espèces menacées, en assurant leur reproduction en captivité, en vue d'un éventuel lâcher pour suppléer la diminution de la population sauvage. Les espèces sauvages se reproduisent relativement bien en captivité, mais leur fécondité est sévèrement limitée par une longue période de gestation et l'inaptitude des femelles d'Equidés à mener à terme plus d'un seul fœtus par gestation.

Nous avons déjà souligné l'extraordinaire aptitude de la famille Equidae à porter à terme avec succès des fœtus de phénotype et de génotype extrêmement différents lors de croisements interspécifiques, mais également par transfert embryonnaire interspécifique. Ainsi différents transferts d'embryons de chevaux exotiques ont déjà été réalisés :

- embryon de *Equus przewaskii* chez une receveuse *Equus caballus* (Summers et al., 1987)
- embryon de *Equus burchelli* chez une receveuse *Equus caballus* (Summers et al., 1987)
- embryon de *Equus burchelli* chez une receveuse *Equus asinus* (Kydd et al., 1985).

Il est évident que le transfert embryonnaire extraspécifique ne constitue pas uniquement un outil de recherche pour l'étude immunologique et endocrinologique de la gestation chez les équidés, mais également un moyen pratique d'augmenter le potentiel reproducteur des équidés sauvages en captivité.

Plusieurs espèces pourraient bénéficier dans un avenir proche de cette technique de reproduction assistée : *Equus przewalskii*, considérée comme étant l'ancêtre de toutes les autres espèces d'Equidés, mais ne comptant plus maintenant que 500 individus en captivité ; *Equus zebra hartmannae*, restreinte à un très faible nombre d'individus dans les réserves africaines et *Equus zebra grevyi*, chassé pour la beauté de sa peau (Kydd et al., 1982).

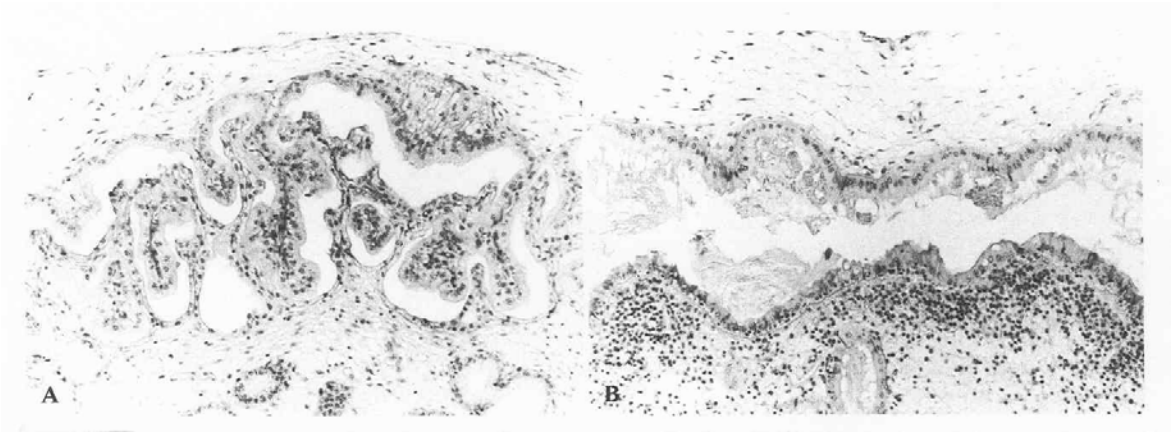
b) Modèles d'études

α) Transfert d'embryon d'âne chez la jument : modèle de mort fœtale

Le transfert d'embryon d'âne chez une jument constitue l'exemple de gestation extraspécifique qui diffère énormément des autres types de gestations. En effet, la ceinture chorionique de l'embryon âne se développe très faiblement en comparaison avec la gestation intraspécifique, et ne parvient pas à envahir complètement l'endomètre de la jument receveuse à 36-38 jours pour former les cupules endométriales. Ceci aboutit à l'absence totale d'eCG dans le sang maternel quel que soit le stade de gestation (Allen et al., 1993). Pourtant, le fœtus âne et ses enveloppes continuent à se développer jusqu'à 60-65 jours, mais la plupart des cas

en l'absence d'interdigitation normale des villosités de l'allantochorion avec les cryptes de l'endomètre, ce qui se produit autour de 42 jours dans la gestation intraspécifique conventionnelle (figure 39)

<u>Figure 39 :</u> Comparaison de coupe histologique de l'interface allantochorial-endométrial chez une jument portant un conceptus cheval à 60 jours de gestation, et une jument portant un embryon d'âne à 71 jours (Allen et al., 1993).



A : Jument portant un conceptus cheval à 60 jours de gestation
B : Jument portant un conceptus extraspécifique âne à 71 jours de gestation

Comme nous l'avons vu précédemment, l'interdigitation des villosités chorioniques avec les cryptes endométriales, typique de l'implantation lors de gestation intraspécifique de jument (figure 39A) est absente chez l'ânesse portant un conceptus cheval (figure 39B). A la place, on observe une importante quantité de sécrétions exocrines qui tend à séparer le trophoblaste de l'épithélium endométrial, tandis qu'un grand nombre de lymphocytes et autres leucocytes s'accumulent dans le stroma endométrial (Allen et al., 1993).

Dans 70 % des cas, l'implantation ne s'effectue pas du tout, ce qui aboutit à la mort du fœtus qui avorte entre 80 et 100 jours de gestation. Ce phénomène de dégénérescence fœtale s'accompagne d'une infiltration généralisée de lymphocytes dans la zone de contact entre l'endomètre et le trophoblaste.

Dans les 30 % restant toutefois, le taux d'attachement et d'interdigitation de l'allantochorion et de l'endomètre est quelque peu plus faible que dans les gestations intraspécifiques de jument ou d'ânesse. L'implantation peut se produire, et le conceptus semble se développer relativement normalement jusqu'à son terme.
Dans la moitié des cas, naît un ânon particulièrement robuste, qui a clairement bénéficié d'une large surface d'échanges placentaires. Mais dans l'autre moitié, soit la jument avorte au cours des 4 à 8 dernières semaines de gestation, soit le foal naît faible, immature et dénutri.
Dans ce groupe, le placenta est plus mince et petit que la normale en raison d'une combinaison d'un plus petit nombre de microcotylédons. Ceci est clairement mis en relation avec un niveau plus faible de différenciation et d'interdigitation de l'allantochorion beaucoup plus tôt au cours de la gestation.

Ainsi, une gradation complexe apparaît au sein même de ce type de gestation extraspécifique, en terme d'implantation, de placentation et de survie fœtale.

La fréquence d'échecs de gestation fait de la gestation extraspécifique d'embryon d'âne chez la jument un modèle intéressant pour l'étude des interactions fœto-maternelles pendant la gestation précoce, et donc un modèle expérimental idéal de mort fœtale chez les Equidés (Allen et al., 1993).

β) Transfert d'embryon et rôle des facteurs de croissance

- Embryon d'âne chez la jument :

Nous avons vu précédemment que la gestation extraspécifique d'embryon d'âne chez la jument présentait des anomalies majeures de placentation (Allen et al., 1993). En effet, la réponse immunitaire lymphocytaire maternelle est très différente de celle des autres types de gestations intra-, inter- ou extraspécifiques. Le taux de prolifération cellulaire de l'épithélium endométrial et du trophoblaste environnant est nettement réduit, principalement dans les régions où le stroma endométrial superficiel est fortement infiltré par les lymphocytes, et les villosités placentaires y sont particulièrement faiblement développées.

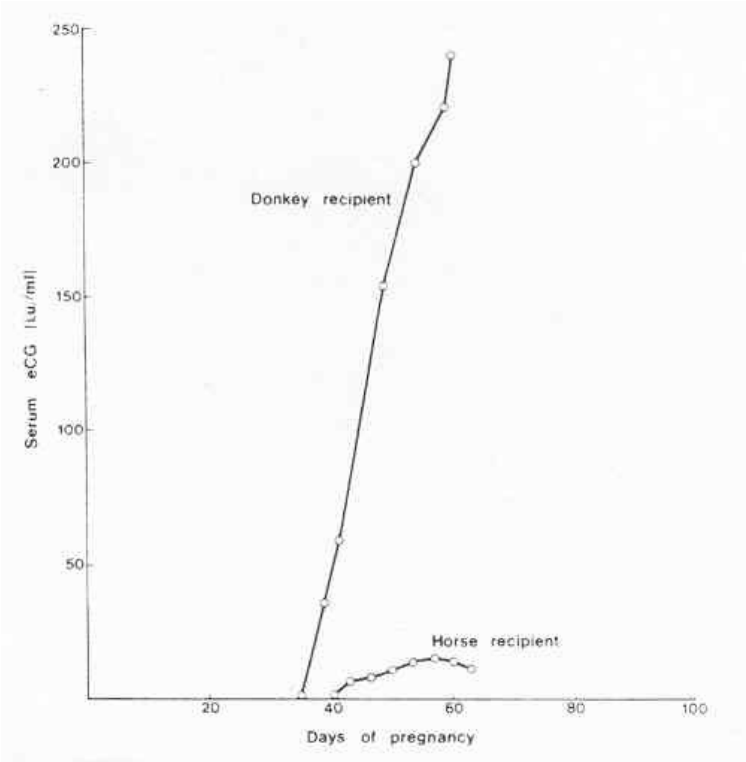
Bien que le mécanisme de cet effet préjudiciable demeure méconnu, l'expression du gène EGF (Epithelium Growth Factor) dans l'épithélium sécrétoire des glandes endométriales est déprimée dans ces glandes qui sont entourées par une forte infiltration de lymphocytes. Cette déficience pourrait contribuer à la réduction de prolifération cellulaire constatée dans l'épithélium maternel et fœtal. Toutefois, une explication alternative pourrait être l'accumulation de lymphocytes qui produiraient des cytokines ou autres produits inflammatoires causant des dommages aux cellules épithéliales de façon à ce que celles-ci deviennent insensibles aux facteurs mitotiques, ou qui auraient une action directe anti-proliférative (Allen et al., 1985).

- Demi-embryon de mule chez une ânesse et chez une jument :

Une expérience réalisée par Skidmore en 1989 (citée par Allen et Short, 1997) consistait à sectionner en deux moitiés égales par micromanipulation un embryon de mule, puis à les transférer chirurgicalement l'une chez une jument, l'autre chez une ânesse. L'auteur a comparé les profils d'eCG dans le sérum des deux femelles receveuses (figure 40)

- Chez la jument portant le demi-embryon de mule, les cupules endométriales étaient petites, minces et prématurément nécrotiques à 63 jours, et à 56 jours le pic d'eCG était seulement de 11 UI/ml. Cette situation est typique d'une jument portant son propre conceptus mule, et reflète le développement de la ceinture chorionique caractéristique du conceptus de mule.

<u>Figure 40 :</u> Comparaison des profils d'eCG dans le sérum de jument et d'ânesse receveuses de la moitié d'un même embryon interspécifique de mule (Allen et Short, 1997).



En ordonnées : concentration en eCG dans le sérum en UI/ml
En abscisses : nombre de jours de gestation

- Chez l'ânesse portant l'autre demi-embryon de mule, les cupules endométriales larges et productives se sont développées, résultant d'une invasion plus précoce de l'endomètre par une plus épaisse et plus active ceinture chorionique qui s'est formée à la surface du conceptus de mule dans l'utérus xénogénique d'ânesse. Ces larges cupules produisent un pic d'eCG élevé de 236 UI/ml chez l'ânesse receveuse.

Ainsi, l'environnement utérin exerce une influence primordiale sur l'ensemble du phénomène. Il est raisonnable de supposer que le stimulus de la formation initiale de la ceinture chorionique et le contrôle quotidien de sa croissance, de sa maturation et de ses propriétés d'invasion, pourraient être médiés par des facteurs de croissance mitotique produits localement.

Des études plus récentes ont ensuite révélé, lors de gestation précoce, dans l'utérus de jument la présence de fortes concentrations d'ARN messagers et/ou de protéines et de récepteurs pour EGF (Epidermal Growth Factor), TGF β (Transforming Growth Factor) dans l'endomètre, IGF-II (Insulin like Growth Factor) et HGF (Hepatocyt Growth Factor), dans les tissus des membranes du conceptus.

Ainsi, les modèles expérimentaux de transferts embryonnaires de type demi-embryon de mule ont été utiles pour mettre en évidence le rôle des facteurs de croissance pendant la période de développement de la ceinture chorionique et de l'invasion ultérieure de l'endomètre maternel (Allen et Short, 1997).

Les transferts embryonnaires interspécifiques ne constituent pas une simple curiosité scientifique. Ils servent avant tout de modèles d'étude et ils sont de plus en plus utilisés pour la recherche des mécanismes de mort fœtale.

Après avoir étudié les particularités immunologiques et hormonales de la gestation inter- et extraspécifique, nous allons nous intéresser aux particularités immunologiques du post-partum des hybrides.

H – Particularités immunologiques du post-partum des hybrides : l'ictère hémolytique du muleton

L'ictère hémolytique du muleton constitue une affectiondu post-partum très fréquente et redoutée dans les élevages de mulets.
Le mulet est réputé pour sa sobriété, sa résistance aux maladies, sa solidité et la sûreté de son pas qui le rendent si précieux dans les pays de montagne. De plus, il ne nécessite que peu de soins à partir de la deuxième semaine de vie. Cependant tout au début, sa vie est en péril, particulièrement menacée par une affection redoutée des éleveurs et communément appelée « hématurie », « jaunisse » ou « pissement de sang » des muletons (Caroli et Bessis, 1947).

Nous allons maintenant étudier cette affection du post-partum qui ne frappe pas exclusivement les muletons, etque l'on retrouve avec une incidence moindre chez les autres espèces. Nous ne disposons d'aucune donnée concernant l'existence éventuelle de ce type de maladiedu post-partum chez les autres hybrides interspécifiques d'équidés.

1) Hypothèses étiologiques

a) Etiologie longtemps discutée

La cause d'une affection aussi dramatique touchant les élevages de mulets a été discutée depuis plus d'un siècle par les vétérinaires exerçant dans les régions où se pratique l'industrie mulassière. On a invoqué le rôle de l'hybridité, on a même incriminé les conditions d'hygiène dans lesquelles certaines juments étaient détenues. On a également pensé au rôle des troubles digestifs en suspectant une septicémie streptococcique. Mais il a été facile de démontrer que toutes ces hypothèses étaient sans fondement (Caroli et Bessis, 1947).

b) Etiologie parasitaire suspectée

L'étiologie parasitaire a été mise en avant en 1924 par Donatien, grand parasitologue de l'Institut Pasteur d'Alger. Ce dernier a en effet observé dans le sang de plusieurs muletons qui devaient succomber à la maladie, que 5 % des hématies contenaient un parasite polymorphe qui pouvait se présenter sous différentes formes : anasplasmoïde, piriforme, annulaire ou cruciforme. Il en a donc conclu que l'affection était due à un piroplasme se rapprochant de *Nuttalia equi*, et il pensait que cette étiologie expliquait parfaitement les symptômes, en particulier l'hématurie (Caroli et Bessis, 1947).

Toutefois, Caroli et Bessis (1947) ont démontré que, malgré la présence, dans certains cas de *Nuttalia* dans le sang des malades, l'étiologie parasitaire de l'ictère des muletons n'était prouvée. En effet, on ne retrouve réellement de parasites que dans 4 cas sur 30, et dans ces cas 5 % seulement des hématies sont parasitées, alors que dans les formes gravissimes de nuttaliose, chez les autres animaux, l'infestation globulaire dépasse en général 50 %.

De plus, cette étiologie pouvait difficilement, d'après les auteurs expliquer l'évolution générale de la maladie, puisqu'à partir du moment où une jument a eu un mulet mort de la maladie hémolytique, elle devient, comme l'appelle les éleveurs « tachée de jaunisse », et si on continue à la faire saillir par le baudet, chacun de ses produits succombera d'ictère grave. Par contre, si la jument est saillie par un cheval, elle donnera naissance à des poulains

parfaitement bien portants. On ne comprend pas alors comment un animal, pourtant réceptif à la nuttaliose, pourrait en être régulièrement préservé.

Ainsi, l'hypothèse parasitaire longtemps suspectée a-t-elle été rejetée (Caroli et Bessis, 1947).

c) Analogie avec la maladie hémolytique du nouveau-né humain

La première maladie immunitaire du nouveau-né à avoir été reconnue comme syndrôme d'isoimmunisation en 1941 est la maladie hémolytique du nouveau-né humain. Cette affection résulte d'une immunisation de la mère (Rhésus négatif) par son fœtus (Rhésus positif), et de l'action des anticorps ainsi formés sur l'organisme de l'enfant nouveau-né.
Bien des auteurs, et en particulier Levine (à qui l'on doit la découverte de l'étiologie de la maladie humaine), ont insisté, depuis 1942 sur le rôle que devait jouer l'immunisation de la mère dans la morti-natalité, les avortements et la stérilité chez les animaux. Ces études ont apporté les premières preuves du rôle de l'immunisation maternelle dans une affection animale qui, par beaucoup de traits, rappelle la maladie hémolytique du nouveau-né humain : il s'agit de l'ictère grave du muleton nouveau-né.

Peu de temps après, en 1948, les scientifiques ont découvert que la maladie hémolytique du poulain et du muleton nouveau-né était également due à une isoimmunisation. Toutefois, le fœtus équin n'est pas affecté avant la naissance comme c'est le cas chez l'enfant, puisqu'il n'existe pas de transfert prénatal placentaire d'anticorps chez cette espèce. La maladie apparaît suite à l'ingestion du colostrum dans ses premières heures de vie. Nous détaillerons plus loin dans cette étude les ressemblances et différences entre la maladie hémolytique du nouveau-né humain et l'ictère hémolytique du muleton (Caroli et Bessis, 1947).

2) Etude physiopathologique

a) Phénomène d'isoimmunisation

L'ictère hémolytique, ou isoerythrolyse néonatale des foals et des muletons, est une anomalie hématologique à médiation immunitaire associée à l'ingestion du colostrum. Elle débute par une incompatibilité de groupes sanguins entre l'étalon ou l'âne et la jument et se termine par la destruction à médiation immunitaire des globules rouges du nouveau-né. Le problème apparaît lorsque le foal ou le muleton hérite d'un antigène de groupe sanguin de son père qui n'est pas présent chez la mère. Si la mère est exposée à cet antigène, qui lui est étranger, elle produit des anticorps contre celui-ci. Ces anticorps présents dans le sérum de la jument sont également concentrés dans le colostrum. Lorsque le muleton tète à la naissance, les anticorps sont absorbés à travers la barrière intestinale durant les premières heures de vie. Une fois dans la circulation sanguine du muleton, les anticorps se fixent sur les globules rouges, aboutissant ainsi à leur destruction (Traub-Dargatz et al., 1995).

L'ictère hémolytique survient suite à la sensibilisation de la mère lorsqu'une quantité d'antigènes sensibilisant accède à la circulation maternelle au cours d'hémorragies fœto-maternelles. Certaines hémorragies fœto-maternelles peuvent apparaître au cours de gestation normale chez la jument, mais les juments qui donnent naissance à des foals hémolytiques sont plus sujettes à ces hémorragies fœto-maternelles.

Si les hémorragies fœto-maternelles constituent une règle plutôt qu'une exception, il doit exister des mécanismes actifs de protection contre la sensibilisation. Prenons un exemple chez la femme où le mécanisme le plus important est l'incompatibilité ABO entre la mère et son fœtus. Si la mère est de groupe O et de rhésus négatif et que son fœtus est de groupe A et de rhésus positif, les cellules fœtales de rhésus positif devraient théoriquement sensibiliser la mère lors d'hémorragie fœto-maternelle. Cependant, en pratique, les anticorps naturels anti-A de la mère (puisqu'elle est de groupe O, elle possède des anticorps circulants anti-A et anti-B) détruisent les cellules fœtales A+ avant que le composant rhésus + n'ait le temps de la sensibiliser.

Chez les juments, les anticorps naturels ne semblent pas exister aussi souvent que chez l'homme. Leur signification, en relation avec une possible protection contre l'isosensibilisation chez la jument demeure incertaine (Scott et Jeffcott, 1978).

b) Analyse des antigènes responsables

α) Chez le poulain nouveau-né

La maladie hémolytique chez les Equidés constitue une manifestation naturelle de l'existence de différences individuelles parmi les groupes sanguins. Il existe 7 groupes sanguins reconnus, c'est-à-dire 7 groupes d'antigènes à la surface des érythrocytes. Ces systèmes sont tous complètement indépendants les uns des autres, et les antigènes sont hérités de manière directe. Les allèles contrôlant les différents antigènes à chaque locus sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Antigènes de groupe sanguin chez le cheval (Scott et Jeffcott, 1978).

Locus	Factors demonstrable by reagents	Alleles controlling system
A	Aa, Ab, Ac	Aa, Ab, Ac Abc, A-
C	Ca	Ca, C-
D	Da, Db, Dc Dd, De, Df	Dbc, Dc, Dce Dcef, Dad Dd, Dde, Ddf
K	Ka	Ka, K-
P	Pa, Pb	Pa, Pb, P-
Q	Qa, R, S	Qa, QR, QRS, QS
U	Ua	Ua, U-

Les méthodes sérologiques classiques d'agglutination et de lyse sont utilisées pour détecter ces différents antigènes dans les laboratoires.

Le facteur Aa est fortement antigénique et les anticorps anti-Aa produits chez un individu immunisé sont très immunogènes. L'antigène Qa est également très immunogène mais moins que Aa. Les facteurs R et S ne sont pas aussi immunogènes que Aa et Qa.

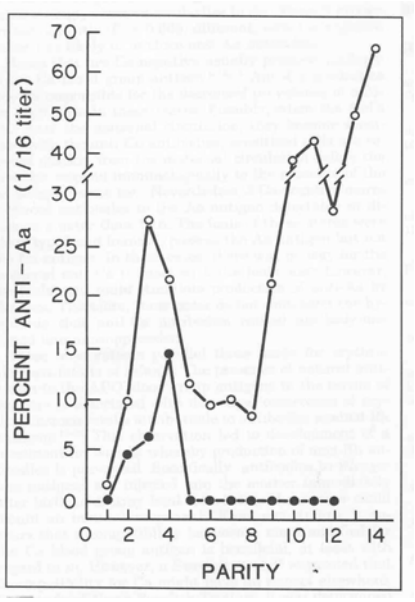
Des études précises ont été réalisées chez le cheval pour déterminer les antigènes les plus fréquemment associés à l'anémie hémolytique chez le poulain nouveau-né.

L'anémie hémolytique est due à des anticorps anti-globules rouges présents à des taux élevés dans le sérum et dans le colostrum de la jument. Ces anticorps se fixent sur les globules rouges du foal et induisent leur destruction. Ces anticorps sont spécifiques des antigènes Aa et Qa de groupe sanguin. Seules les juments qui ne possèdent pas l'antigène Aa ou Qa peuvent produire des anticorps anti-Aa ou anti-Qa. Parmi ces juments, seule une petite proportion synthétise des anticorps lorsqu'elles deviennent gestantes.

Les données de différentes études révèlent que les anticorps anti-Aa et anti-Qa sont habituellement responsables d'anémie hémolytique, alors que les autres anticorps ne le sont pas ou seulement très occasionnellement comme anti-Ab, anti-Pa et anti-Ua. La situation est analogue à celle de la maladie hémolytique du nouveau-né humain, communément appelée maladie du Rhésus, dans laquelle les anticorps habituellement responsables sont spécifiques de la spécificité D du système de groupe sanguin Rhésus (Bailey, 1982).

Bailey et al. (1988) ont observé l'influence de l'antigène Ca sur la production d'anticorps anti-Aa (figure 41). Ainsi, les juments ne présentant pas l'antigène Ca semblent moins aptes à produire l'anticorps anti-Aa que celles disposant de l'antigène Ca. Cette observation peut être compatible avec une hypothèse d'immunosuppression à médiation humorale de la réponse immunitaire envers l'antigène Aa par les anticorps dirigés contre l'antigène Ca. Ainsi, quand une jument est exposée aux antigènes de globules rouges de son foal, et possède déjà des anticorps contre l'antigène Ca du foal, elle est ensuite moins susceptible d'induire une réponse immunitaire envers l'antigène Aa et donc envers les globules rouges de son poulain (Bailey et al., 1988).

<u>Figure 41 :</u> Pourcentage de juments produisant des anticorps anti-Aa selon leur parité (Bailey et al., 1988**).**



-●- : Juments Ca –
-°- : Juments Ca +

Si les antigènes responsables de la pathologie du post-partum sont clairement identifiés chez le foal, il n'en est pas de même chez le muleton.

β) Chez le muleton

Caroli et Bessis (1947) ont étudié les anticorps anti-baudet dans le sérum et dans le lait de jument « tachée de jaunisse ».

Le titre en anticorps anti-baudet a été étudié (tableau 17) comparativement dans le sérum de :

- un groupe (1) de juments vierges, d'étalons et de juments n'ayant eu que des poulains ;
- un groupe (2) de juments ayant eu des muletons normaux ;
- un groupe (3) de juments ayant eu des muletons atteints d'ictère grave.

On constate la présence d'un taux relativement élevé en anticorps anti-homme et anti-rat chez tous les animaux. Pour le groupe (1), l'anticorps anti-baudet est absent dans plus de la moitié des cas (9 sur 17) ; il est présent dans 8 cas à un taux excessivement faible de 1 (4 cas), de 2 (3 cas) et il n'atteint qu'une seule fois le chiffre un peu plus élevé de 4. Il en résulte que le taux moyen d'agglutinines anti-baudet, dans le sang des chevaux ou des juments n'ayant jamais été saillies par un baudet, est de 0,82.

Tableau 17 : Pourcentage d'agglutinines anti-homme, anti-rat et anti-baudet dans le sérum de différentes juments (Caroli et Bessis, 1947).

Anticorps	Moyenne des taux d'agglutinines dans le sérum de :		
	Juments ayant eu des mulets atteints d'ictère	Juments ayant eu des mulets sains	Juments ayant eu des chevaux, ou chevaux
Anti-baudet	**43,4** (15 cas).	**12,63** (11 cas).	**0,82** (17 cas).
Anti-homme	**16,8** (14 cas).	**22,8** (11 cas).	**24,66** (12 cas).
Anti-rat	**22,6** (12 cas).	**32,18** (11 cas).	**13,11** (9 cas).

Le taux d'anticorps anti-baudet chez les juments ayant été saillies par un baudet, et ayant mis bas un nombre de mulets variant de 1 à 7 et bien portants, est nettement supérieur. Dans les 11 cas observés, les anticorps anti-baudets sont présents et leur taux reste faible de 1 à 16 pour 9 cas sur 11, mais est élevé (32 et 64) dans deux observations. Ainsi, le taux moyen d'anticorps anti-baudet est de 12,63. Ces chiffres concordent à montrer qu'une jument saillie par un baudet a tendance à produire des anticorps anti-baudet, même si, jusque là, elle n'a mis au monde que des muletons parfaitement sains.

Enfin, si l'on se reporte aux 15 examens réalisés sur des juments « tachées de jaunisse », soit peu de temps après la naissance du muleton malade, soit un ou deux ans plus tard, on constate que, parmi ces observations, il y en a 5 où les taux d'agglutinines restent bas ; dans les 10 autres cas, il est élevé, entre 16 et 128. Sur ces 15 cas, la moyenne du taux d'agglutinines est de 43,4.

Le titre de l'anticorps anti-baudet dans le lait est représenté dans le tableau 18.

<u>Tableau 18 :</u> Taux moyen d'agglutinines anti-homme, anti-rat et anti-baudet dans le lait de différentes juments (Caroli et Bessis, 1947).

Anticorps	Moyenne des taux d'agglutinines dans le lait de :		
	Juments ayant eu des mulets atteints d'ictère	Juments ayant eu des mulets sains	Juments ayant eu des chevaux
Anti-baudet	**10** (7 cas).	**1,55** (7 cas).	**0** (13 cas).
Anti-homme	**0,5** (4 cas).	**0** (2 cas).	**0,1** (12 cas).
Anti-rat	**1,25** (4 cas).	**1** (2 cas).	—

Il est remarquable de constater que les résultats de la recherche des anticorps anti-baudet dans le lait sont entièrement superposables avec ceux observés dans le sérum.
Ainsi, on peut conclure qu'un anticorps anti-baudet anormal passe à un taux faible dans le lait de la jument mulassière, à un taux plus fort si la jument a eu des muletons ictériques.

Caroli et Bessis (1947) en ont déduit que toutes les investigations concordaient sur le point que la jument mulassière s'immunisait contre les globules de son fœtus. Cette immunisation est nettement plus puissante chez les juments ayant mis au monde des muletons malades que chez celles ayant eu des muletons sains.

Mc Clure et al. (1993) ont cherché à identifier un antigène présent sur les globules rouges d'âne et de mule en utilisant les anticorps issus du sérum de jument ayant produit un muleton atteint d'anémie hémolytique.

Le sérum de jument ayant produit un muleton atteint d'anémie hémolytique a été testé par des anticorps anti-globule rouge dirigés contre un ensemble de globules rouges d'âne et de cheval. Les facteurs cellulaires représentés parmi l'ensemble des facteurs de cheval sont les suivants : Aabcd, Ca, Dabcdefghijklm, Ka, Pabcd, Qabc et Ua. Le sérum présentait une activité hémolytique avec un titre de 1 : 2 envers les globules rouges de l'âne étalon, mais aucune activité envers les globules rouges de cheval. Le sérum de 10 autres juments accouplées avec des ânes pour produire des mules a également été testé et 6 d'entre eux disposaient d'anticorps dirigés contre les globules rouges d'âne uniquement.

Quatre chevaux ne disposant pas d'anticorps anti-globule rouge ont été immunisés par injection sous-cutanée hebdomadaire de sang hépariné d'âne pendant 6 semaines ; puis leur sérum a été testé chaque semaine pour détecter une activité anti-globule rouge contre le donneur. Les titres d'anticorps de 1 : 2 à 1 : 512 sont atteints avec un taux maximal en 2 à 4 semaines après reprise de l'immunisation.

Les sept antisérums obtenus naturellement et les quatre anti-sérums produits par immunisation montrent une activité identique lorsqu'ils sont testés contre une large population de chevaux, d'ânes et de mules. Le facteur identifié par ces anti-sérums a été nommé « facteur d'âne ».

Le sang de 258 chevaux de races variées, de 138 ânes et de 40 mules a été prélevé dans différents états des Etats Unis pour être testé. Tous les ânes et les mulets ont montré la présence de ce « facteur d'âne » à la surface de leurs globules rouges. En revanche, ce « facteur d'âne » ne correspond à aucun alloantigène de globule rouge de cheval.

L'incidence de l'anémie hémolytique chez le muleton est environ de 10 %, ce qui est beaucoup plus élevé que celle des poulains (environ 1 %). Ceci pourrait refléter simplement le plus grand pourcentage de gestations interspécifiques de conceptus mule incompatible, comparé aux gestations intraspécifiques. En effet, quasiment toutes les gestations de conceptus mule sont incompatibles vis à vis du « facteur d'âne ». Ce « facteur d'âne » pourrait constituer un xénoantigène puisqu'il est présent exclusivement chez les ânes et les mules et absent chez les chevaux.

Cette étude suggère que toutes les gestations interspécifiques de conceptus mule seraient incompatibles vis à vis de ce « facteur d'âne » et ainsi qu'une potentialité d'anémie hémolytique existerait dans tous les cas de croisement interspécifique d'une jument et d'un âne (Mc Clure et al., 1993).

Ainsi, les antigènes responsables de l'ictère hémolytique du muleton n'ont pas encore été identifiés, comme c'est le cas chez le poulain. En revanche, il est clair qu'il existe un « facteur d'âne » présent exclusivement chez les ânes et mulets, mais absent chez les chevaux, qui est à l'origine de cette pathologie du post-partum dans les élevages de mules.

c) Tableau clinique

α) Symptômes

A la naissance, le muleton est normal et en pleine santé. Dans la majorité des cas, les premiers signes de faiblesse apparaissent entre 24 et 36 heures. Le muleton devient peu enthousiaste pour téter, puis suivent une faiblesse générale et une léthargie marquée qui rendent le muleton incapable de se lever.

La couleur des muqueuses gingivales et oculaires devient progressivement pâle puis ictérique. Dans les cas sévères, l'urine peut apparaître rouge foncé, signe d'hémoglobinurie. Ces muletons meurent en général dans un bref laps de temps et n'ont parfois pas le temps d'exprimer les symptômes francs de jaunisse.

La respiration est également affectée, elle devient rapide et superficielle et le muleton peut se mettre à bailler de façon régulière. Au fur et à mesure que s'installe l'anémie, les difficultés respiratoires s'aggravent et la respiration devient laborieuse avec des accès d'halètement. La fréquence cardiaque augmente de façon importante, et le cœur lui-même peut être facile à sentir à travers la cage thoracique. Dans les cas sévères, on peut même le voir battre. Le stade ultime des signes cliniques évolue en convulsions, sans doute engendrées par l'anémie sévère et le relargage des produits toxiques de dégradation des érythrocytes : la bilirubine (Scott et Jeffcott, 1978).

Toutefois, les manifestations cliniques ne sont pas toujours aussi prononcées. Ainsi, Traub-Dargatz et al. (1995) ont constaté différents types de manifestations cliniques selon l'intensité des symptômes chez quatre muletons observés :

- Signes cliniques typiques d'anémie hémolytique associés à un choc sévère, un ictère prononcé et une hémoglobinurie.
- Anémie modérée : animal cliniquement normal excepté les muqueuses ictériques.
- Aucune anomalie clinique ni anémie constatée, mais une sévère thrombocytopénie.

β) Etude hématologique

• Numération globulaire :

La déglobulination est intense et brusque ; le nombre de globules rouges passe de 6 à 7 millions à la naissance à 3,2 à 1 million en 24 heures (Caroli et Bessis, 1947).

• Examen du sang à l'état frais :

Les hématies ne s'empilent pas les unes sur les autres, mais elles ont tendance à s'agglutiner. Dans un grand nombre de cas, on observe des hématies en fuseaux. 95 % de ces hématies sont des sphérocytes absolument typiques qui ont tendance à se mettre bout à bout, de manière à former des aspects de chaînes de streptocoques ou des colliers de perles ; lorsque l'auto-agglutination des sphérocytes existe, on a l'aspect en grappes de raisin typique.
Il existe une érythro-phagocytose extrêmement nette de la part des monocytes du sang circulant.

Le chiffre des éléments nucléés est variable et oscille entre 5 et 20 000 par mm3. L'érythroblastose existe toujours, mais le plus souvent à des taux très faibles, environ 5 %, mais il s'agit surtout d'une polynucléose qui s'accompagne d'un certain degré de leucoblastose (Caroli et Bessis, 1947).

γ) Comparaison avec l'ictère grave familial du nouveau-né humain et la maladie hémolytique expérimentale

Caroli et Bessis, 1947 ont comparé les principaux signes cliniques, hématologiques et sérologiques de trois maladies hémolytiques (tableau 19) ayant une base physio-pathologique comparable :
- maladie spontanée humaine : l'ictère grave familiale du nouveau-né, lié à l'incompatibilité Rhésus,
- maladie spontanée animale : l'ictère grave du muleton nouveau-né,
- maladie hémolytique expérimentale : réalisée par injection de sérum anti-globule rouge de lapin à un rat.

L'étude parallèle de la maladie expérimentale du rat blanc et de l'ictère du muleton fait ressortir une ressemblance frappante, voir même une identité parfaite. Les rats blancs, comme les mulets, une fois inoculés, développent une maladie caractérisée essentiellement par un syndrôme ictéro-anémique aigu ou suraigu avec hémoglobinurie et signes de collapsus cardio-respiratoire dus à la réduction brutale du volume sanguin. Comme les mulets, ils peuvent d'ailleurs être sauvés par une transfusion. Il est vraisemblable que l'anticorps présent dans le sang des juments « tachées de jaunisse » et celui du sang des muletons malades aient une constitution voisine de celle de l'anticorps anti-lapin injecté à un rat, c'est-à-dire d'un hétéro-anticorps hémolytique transmis au mulet à la naissance. On peut donc en conclure que deux anticorps d'espèce développent deux maladies hémolytiques similaires, l'une naturelle, l'autre provoquée expérimentalement.

A la lecture de ce tableau, les auteurs ont été frappés de voir comment, du triple point de vue de la clinique, de l'hématologie et de l'immunologie, la similitude est loin d'être complète entre les deux maladies hémolytiques naturelles de l'homme et du mulet. Cliniquement, les deux maladies sont profondément différentes. L'anticorps anti-Rh donne une maladie plus ictérique qu'anémique. La déglobulination chez l'enfant ne s'observe que tardivement et exceptionnellement dans les cas d'évolution très rapide. L'érythroblastose domine le tableau hématologique, mais on ne constate pas, en règle générale, de sphérocytose d'auto-agglutination des hématies. L'anticorps anti-Rh se comporte enfin comme un agent de destruction ou d'altération tissulaire, frappant les noyaux centraux et le foie : l'ictère nucléaire et la cirrhose du foie sont inconnus chez le mulet. Il apparaît donc que l'anticorps anti-Rh, à la différence de l'anticorps anti-baudet, est autre chose qu'une simple hémolysine d'espèce (Caroli et Bessis, 1947).

Tableau 19 : Etude comparative des symptômes dans la maladie hémolytique du nouveau-né humain, celle du muleton et la maladie hémolytique expérimentale chez le rat (Caroli et Bessis, 1947).

Symptômes	*Rat*	*Mulet*	*Homme*
HÉMOGLOBINURIE ..	Très marquée.	Très marquée.	**Absente (ou rarissime).**
ICTÈRE	Fugace.	Fugace.	Très intense et prolongé.
ANÉMIE	Suraiguë.	Suraiguë.	Subaiguë.
SPLÉNOMÉGALIE	Nette.	Nette.	Nette.
ANASARQUE	**Absent.**	**Absent.**	Présent quelquefois.
SPHÉROCYTOSE	Très marquée.	Très marquée.	**Absente.**
AUTO-AGGLUTINATION DES HÉMATIES	Très marquée.	Très marquée.	**Absentes.**
SENSIBILISATION DES HÉMATIES	Nette.	Nette.	Nette.
ERYTHROPHAGIE ...	Très marquée.	Marquée.	Peu marquée.
ERYTHROBLASTOSE .	Importante.	Faible.	Importante.
RÉTICULOCYTOSE ...	Importante.	Importante.	Importante.
LEUCOCYTOSE AVEC LEUCOBLASTOSE ...	Importante.	Importante.	Importante.
PIGMENTS DANS LES ORGANES	Très abondants.	Très abondants.	Très abondants.
LÉSIONS HÉPATIQUES	Dilatations des capillaires.	Dilatations des capillaires.	Dilatation des capillaires. Cirrhose hépatique.
LÉSIONS NERVEUSES	**Absentes.**	**Absentes.**	Ictère nucléaire.
ANTICORPS RESPONSABLES	Hétéro-anticorps (hémolytique *in vitro*).	Hétéro-anticorps (hémolytique *in vitro*).	Iso-anticorps (non hémolytique *in vitro*).

Ainsi, l'ictère hémolytique du muleton semble se rapprocher de la maladie hémolytique du nouveau-né sur le plan de la physiopathologie. Toutefois, la symptomatologie de ces deux maladies immunitaires du post-partum est relativement différente.

d) Diagnostic

α) Diagnostic clinique

Le diagnostic définitif peut être basé uniquement sur les signes cliniques. Il y a peu d'autres maladies du nouveau-né qui présentent un tel tableau clinique. L'ictère physiologique du nouveau-né, dû à une hyperbilirubinémie, peut apparaître occasionnellement, mais il est alors rarement associé avec un quelconque autre signe clinique. Les muletons atteints de septicémie présentent parfois des signes de jaunisse, mais l'analyse sanguine révèle un état d'hémoconcentration et non d'anémie.

β) Diagnostic de laboratoire

L'examen hématologique est essentiel dans les cas suspects comme étant non seulement utile pour le diagnostic mais également très important pour décider du traitement.
La quantité totale de globules rouges peut tomber à 2,0 $x10^{12}$ par litre de sang, la concentration en hémoglobine à 2,0 g par dl, et le volume de cellules (PCV Packed Cell Volume) à 0,05 g par litre. Un rapide examen sanguin peut être obtenu par l'observation du PCV par la méthode du microhématocrite. Grâce à cette dernière, le degré d'anémie peut être estimé, fournissant ainsi une idée de l'étendue de l'hémolyse et de l'hyperbilirubinémie.

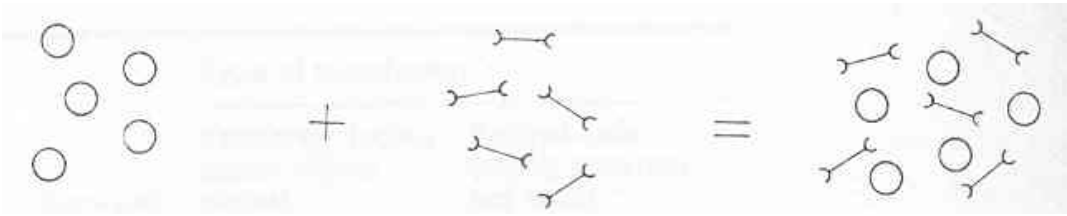
Le diagnostic définitif doit être pratiqué sérologiquement en démontrant la présence d'isoanticorps maternels sur les érythrocytes du muleton. La technique sérologique la plus efficace est celle qui utilise l'antiglobuline du test de Coombs direct , ou le test direct de sensibilisation (figure 42) qui a été développé pour les nouveau-nés humains.

Si la maladie est suspectée cliniquement, il faut effectuer un prélèvement sanguin (environ 10 ml) sur anticoagulant à la fois du muleton et de la mère pour l'envoyer directement au laboratoire.

Puisque la jument est immunisée contre les antigènes de son propre fœtus, il est possible de détecter la présence des anticorps ainsi produits dans le sang au cours de la gestation. La détection de la sensibilisation chez la jument est basée sur la technique d'antiglobuline indirecte du test de Coombs indirect (figure 43). Cette méthode utilise des globulines anti-cheval produites par des lapins pour mettre en évidence la présence d'agglutinations incomplètes des érythrocytes qui ont été sensibilisés par le sérum de la mère ou par le colostrum. L'intérêt de ce test est de pouvoir détecter précocement les juments sujettes à donner naissance à un muleton ictérique ; il est donc utilisé plutôt à visée prophylactique (Scott et Jeffcott, 1978).

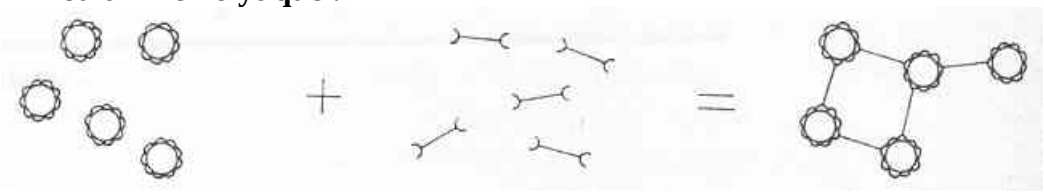
<u>Figure 42 :</u> Test direct de sensibilisation sur des globules rouges de poulain (Test de Coombs direct) (Scott et Jeffcott, 1978).

Poulain sain :



Globules rouges de poulain | Anticorps anti-cheval | Absence d'agglutination,

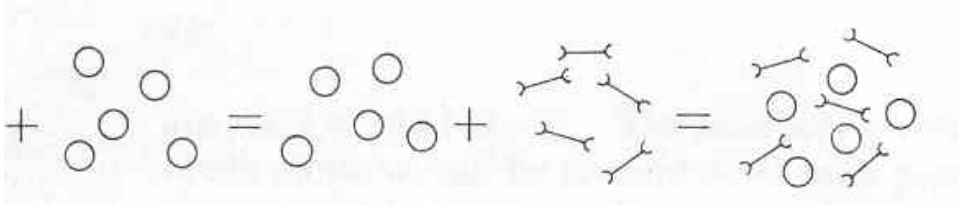
Poulain hémolytique :



Globules rouges de poulains sensibilisés (entourés d'anticorps maternels) | Anticorps anti-cheval | Agglutination

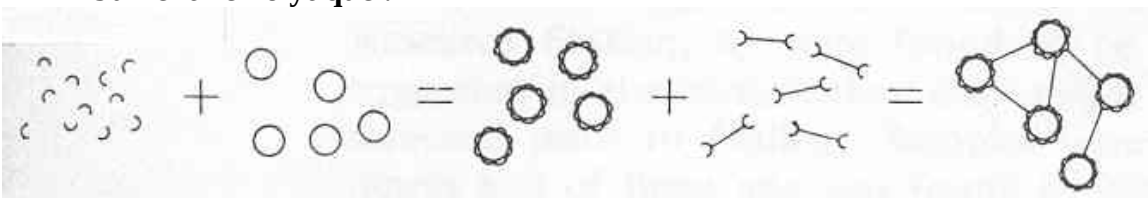
<u>Figure 43 :</u> Test indirect d'agglutination ou Coombs indirect (Scott et Jeffcott, 1978).

Jument saine :



Sérum sans anticorps | Globules rouges test | Cellules non sensibilisées | Anticorps anti-cheval | Absence d'agglutination

Jument hémolytique :



Sérum de jument avec anticorps anti-foetus | Globules rouges test | Cellules sensibilisées | Anticorps anti-cheval | Agglutination

e) Traitement

α) Importance du traitement précoce

Saint-Martin, 1952 estime que le traitement doit être entrepris le plus rapidement possible, car l'ictère évoluant souvent en quelques heures, si le traitement est trop tardif, des lésions irréversibles, telles que myocardite, hépatite, néphrite, sont déjà installées. La transfusion risque alors de surcharger un système circulatoire épuisé, et d'induire ainsi une aggravation des symptômes.

β) La transfusion : base du traitement

La transfusion sanguine est la seule option thérapeutique de l'ictère hémolytique déclaré.

Dans les cas sévères, la transfusion sanguine est le traitement d'urgence des muletons affectés. Une méthode rapide et simple, préconisée par Scott et Jeffcott (1978) consiste à pratiquer immédiatement une transfusion à partir des cellules purifiées de la mère. Trois ou quatre litres de sang sont prélevés de la mère dans des poches à transfusion de 500 ml contenant 50 ml de citrate trisodique à 3,13 %. Les prélèvements sont alors centrifugés afin que le plasma puisse en être séparé, puis les cellules sont lavées dans du liquide physiologique salin stérile pour diluer le reste de plasma. Les cellules remises en suspension dans la moitié de leur volume de sérum physiologique. L'ensemble de la procédure doit être pratiquée de manière aussi aseptique que possible. La moitié de la suspension est administrée immédiatement par perfusion lente (en 15 à 20 minutes) dans la veine jugulaire. La seconde moitié sera administrée 6 heures plus tard. Cette technique a prouvé sa grande efficacité, même dans des cas graves. Malgré la transfusion, la couleur des muqueuses peut conserver un aspect ictérique pendant plusieurs semaines.

Si l'on ne dispose pas de son propre laboratoire, cette méthode de traitement est très difficile à réaliser. Cependant en situation d'urgence, le sang peut être prélevé sur la jument et laissé à sédimenter pendant au moins une heure. Une fois que les cellules ont sédimenté, la majorité du plasma est alors aspiré. Du plasma maternel restera piégé par les cellules, mais son effet sera de loin compensé par les effets bénéfiques des érythrocytes intacts et compatibles du donneur.

Mais il est encore plus simple de prélever 600 à 700 ml de sang directement sur des animaux non susceptibles de présenter le « facteur d'âne », c'est-à-dire des chevaux mâles ou des juments n'ayant jamais été accouplées avec un âne.

La transfusion n'est pas forcément nécessaire dans les cas moins sévères. Les muletons devront alors être étroitement surveillés et gardés dans un endroit isolé, chaud et sec, pour minimiser le stress et les stimuli d'excitation. Des prélèvements sanguins réguliers devront être effectués pour évaluer l'évolution de l'anémie. Cela peut prendre plusieurs semaines avant que le taux de globules rouges ne redeviennent normal (Scott et Jeffcott, 1978).

f) Pronostic

Le pronostic de l'ictère hémolytique du nouveau-né dépend de trois facteurs principaux :

- la nature et la quantité d'anticorps impliqués,
- le moment d'apparition des premiers symptômes,
- le délai écoulé avant l'administration du traitement.

En général, les muletons ont de bonnes chances de survivre s'ils ont subi une transfusion de cellules lavées de jument avant d'être dans un état d'épuisement irréversible en raison de leur anémie (Scott et Jeffcott, 1978).

g) Prévention

α) Prophylaxie post-partum

Un premier système de prophylaxie proposé par Brion, Laffolay et Richard (cité par Caroli et Bessis, 1947) consistait à classer les juments d'après la richesse en anticorps de leur sang et d'empêcher le nouveau-né, issu d'une mère à taux élevé en anticorps, de téter jusqu'au moment où l'analyse du lait indique qu'il y a plus de danger. Mais ce système de prophylaxie a été abandonné car il présentait des inconvénients majeurs pour l'éleveur, puisqu'un poulain ou un muleton éloigné de sa mère, ne serait-ce que 24 heures, et ayant goûté à l'alimentation artificielle ne veut souvent plus téter sa mère ou bien celle-ci risquait de ne plus le reconnaître ou de ne plus avoir de lait.

Caroli et Bessis (1947) ont cherché un système plus précis et plus compatible avec la pratique, au cours duquel le muleton puisse continuer à téter. Le lait étant seul en cause dans l'ictère hémolytique du nouveau-né, ce système de prévention se limite donc à l'examen du colostrum. Ainsi, le taux d'agglutination du colostrum doit être très rapidement connu avant que le colostrum ne puisse éventuellement être utilisé.

Suivant le taux d'agglutination, trois types de mesures sont pris :

- Taux d'agglutination du colostrum compris entre 1/2 et 1/32 :
  On peut laisser téter le muleton sans aucune restriction, tout au plus peut-on conseiller à l'éleveur de traire la jument pendant 24 heures.

- Taux d'agglutination du colostrum compris entre 1/32 et 1/128 :
  Pendant 48 heures, faire téter le muleton toutes les trois heures, chaque tétée ne devant durer que 3 à 5 minutes. Les premières tétées seront les plus légères car les auteurs ont constaté que l'organisme du muleton qui avale un lait chargé en anticorps fabrique très vite ses propres anticorps. Ces anticorps ainsi formés lui permettront de supporter rapidement des doses de lait toxique qui auraient été mortelles si elles avaient été ingérées à la première tétée. Les auteurs pensent que tous les muletons présentent un ictère latent, car tous ingèrent des anticorps, mais si la première dose absorbée est faible, ils ne développent pas tous la maladie.

- Taux d'agglutination du colostrum dépassant 1/128 :

Le nouveau-né ne doit pas téter avant une transfusion de 600 à 700 ml de sang de cheval non chargé en anticorps. Le donneur choisi est une pouliche ou une jument n'ayant jamais eu de mulet ou bien un cheval. Puis on prend les mêmes précautions pour les tétées que dans le cas précédent.

Pendant les 24 à 48 heures, le muleton est laissé en liberté avec sa mère, mais muselé.

Certaines études préconisent de tester le sang du cordon ombilical avec le colostrum, avant de laisser le muleton téter sa mère. Mais les résultats sont équivoques ; en effet, du colostrum totalement inoffensif peut engendrer une apparente agglutination des globules rouges du cordon. Ces images faussement positives résultent de la formation intense de rouleaux de globules rouges du foal en présence du colostrum. Le testage du colostrum envers les cellules du muleton ne peut donc être sérieusement pris en compte que dans les laboratoires utilisant le test à l'antiglobuline (Scott et Jeffcott, 1978).

S'il existe un doute (jument « tachée de jaunisse ») ou si la jument a été confirmée porteuse d'anticorps anti-« facteur d'âne » par un test de Coombs indirect en fin de gestation, la meilleure solution est de nourrir le muleton avec un colostrum de substitution pendant le temps nécessaire à la jument pour se débarrasser de son propre colostrum.

β) Comparaison avec la prévention chez la femme

Chez la femme, on administre des anticorps anti-D (D étant l'anticorps rhésus le plus communément rencontré) pour prévenir la maladie hémolytique du nouveau-né. L'anticorps anti-D est donné aux mères rhésus – peu de temps après la naissance d'un enfant rhésus +, afin de détruire d'éventuels érythrocytes fœtaux présents dans la circulation maternelle suite à un phénomène d'hémorragie fœto-maternelle. Ainsi empêche-t-on la mère de s'immuniser contre les antigènes rhésus + d'un fœtus ultérieur. Toutefois, cette méthode n'est pas applicable chez les Equidés puisque les poulains et muletons ne sont pas affectés *in utero*, mais par ingestion du colostrum. Un foal nouveau-né d'une jument, connue pour avoir des tests anté-nataux sensibles doit être nourri avec du colostrum de substitution. Chez la femme, le nouveau-né souffre déjà de maladie hémolytique à la naissance ; une telle méthode de prévention est donc inutile (Scott et Jeffcott, 1978).

γ) Prévention pour les gestations ultérieures

Une fois que la jument a donné naissance à un muleton hémolytique, tous les autres produits issus d'un croisement interspécifique avec un baudet sont susceptibles d'être atteints d'ictère hémolytique s'ils ont accès à la mamelle dans les premiers jours de vie. Ainsi, la meilleure prévention concernant les muletons à venir consiste à empêcher le muleton nouveau-né de téter le colostrum de sa propre mère en lui mettant une « muselière » pendant le temps nécessaire pour que la barrière intestinale devienne imperméable aux anticorps (c'est-à-dire pendant les 24 à 48 heures post-partum) et donc de lui administrer un colostrum de remplacement exempt d'anticorps anti-globule rouge, afin lui permettre malgré tout d'acquérir une immunité passive (Saint-Martin, 1952).

L'ictère hémolytique du muleton constitue donc une pathologie du post-partum relativement fréquente dans les élevages de mules. Cette pathologie immunitaire repose, de la même façon que lors des particularités immunologiques de la gestation interspécifique, sur la divergence antigénique qui existe entre les deux espèces parentales.

IV – LES HYBRIDES SONT-ILS VRAIMENT TOUS INAPTES A LA REPRODUCTION ?

A – La majorité des hybrides est stérile…

1) Les hybrides ont toujours été considérés stériles

La famille des équidés dispose d'une remarquable aptitude à produire des hybrides interspécifiques. Le tableau 20 présente un résumé des hybridations qui ont été reportées au sein de la famille Equidae. Il est frappant que ces hybridations puissent avoir lieu entre des espèces possédant des nombres très différents de chromosomes (depuis *Equus asinus* (2n = 62) à *Equus zebra* (2n = 32)). Ces divergences chromosomiques expliqueraient vraisemblablement la stérilité des hybrides. En effet, le tableau met en évidence que tous les hybrides sont stériles, hormis celui issu du croisement *Equus przewalskii x Equus caballus* (dont nous reparlerons ultérieurement dans cette étude) qui est fertile. L'hybride *Equus grevyi x Equus burchelli,* faute d'information, reste inconnu quant à sa fertilité (Ryder et al., 1978).

Tableau 20 : Fertilité et cytogénétique des hybrides d'Equidés (Ryder et al., 1978).

	E. przewalskii	*E. caballus*	*E. asinus*	*E. hemionus*	*E. grevyi*	*E. burchelli*	*E. zebra*
E. przewalskii	F						
E. caballus	F (2n=65)[b]	F					
E. asinus		S (2n=63)[c]	F				
E. hemionus	S	S	S	F			
E. grevyi		S (2n=55)[d]	S		F		
E. burchelli	S	S	S	S	? (2n=45)[e]	F	
E. zebra		S	S (2n=48)[d]	S	S	S	F

F = fertile hybrids produced; S = sterile hybrids produced.
[a] GRAY (1971) is the source of information unless otherwise listed.
[b] BUCKLAND et al. (1976).
[c] BENIRSCHKE et al. (1962); TRUJILLO et al. (1962).
[d] KING et al. (1966).
[e] This report; fertility not determined (see text).

S : Sujets considérés stériles
F : Sujets considérés fertiles

Kobozieff et Pomriaskinsky-Kobozieff (1943) ont analysé l'interaction entre hérédité et stérilité chez les hybrides interspécifiques. Ils en ont conclu que les croisements entre espèces différentes sont souvent sans succès ; toutefois, il arrive que les croisements entre espèces voisines soient possibles mais dans ce cas les produits sont stériles. En effet, le mulet, produit du croisement jument x âne, le bardot, produit du croisement étalon x ânesse, les produits des croisements pintade x paon et pintade x coq, etc…, sont stériles.

Cette stérilité est de nature héréditaire puisqu'elle est due à une incompatibilité chromosomique. En effet, chaque espèce possède un nombre différent et constant de chromosomes qui lui est propre. Dans le croisement entre deux espèces ayant un nombre différent de chromosomes dans leurs gamètes, soit respectivement n et n', l'hybride possédera dans ces cellules somatiques n + n' chromosomes. Chez ces hybrides, au cours de la réduction chromosomique intervenant dans la gamétogenèse, le lot de chromosomes ainsi constitué ne peut pas se disjoindre en deux lots équivalents. La ségrégation étant irrégulière, il en résulte un trouble de la formation des gamètes et par suite ces sujets sont stériles (Kobozieff et Pomriaskinsky-Kobozieff, 1943).

2) Etude cytogénétique des hybrides

a) Notion d'évolution cytogénétique des espèces

Le fait que des croisements interspécifiques puissent avoir lieu entre presque toutes ces espèces de la famille Equidae indique que le contenu génétique général n'a manifestement pas été modifié.
Pour tester cette hypothèse, la quantité d'ADN nucléaire au sein de deux espèces très divergentes de part leur nombre de chromosomes (*Equus asinus* et *Equus zebra*) a été mesurée par microspectrophotométrie. Cette étude de Bernischke et Malouf en 1967 (cité par Ryder et al., 1978) a prouvé que le contenu d'ADN était pratiquement similaire, ce qui suggère que la même information génétique a été réarrangée différemment (en particulier en un nombre de chromosomes différents) chez les différentes espèces d'Equidés.

Le mécanisme le plus commun de tels réarrangements est la fusion Robertsonienne, au cours de laquelle des éléments acrocentriques fusionnent pour devenir alors métacentriques. Une fusion Robertsonienne entre deux paires de chromosomes acrocentriques du cheval de Przewalski a ainsi probablement conduit au caryotype du cheval domestique (Ryder et al., 1978).

La prédominance du système Robertsonien a conduit à une évaluation comparative du nombre de bras de chromosomes, plutôt que du nombre de chromosomes eux-mêmes : il s'agit d'un Nombre Fondamental (NF). Ce Nombre Fondamental varie chez les Equidés de 62 pour *Equus zebra* à 102 pour *Equus asinus et Equus hemionus* (tableau 21). La variabilité au sein de la famille Equidae reste cependant encore grande : il existe donc d'autres mécanismes d'évolution chromosomique que la fusion qui jouent un rôle majeur dans la divergence du nombre de chromosomes entre les différentes espèces de la Famille Equidae.

Tableau 21 : Nombre de chromosomes et nombre fondamental des différentes espèces d'Equidés (Ryder et al., 1978).

Linnean designation	Common name	2n	NF
E. przewalskii	Przewalski's wild horse	66	92[a]
E. caballus	domestic horse	64	92[a]
E. asinus	ass, donkey	62	102[a]
E. hemionus onager	onager	56	102[b]
E. grevyi	Grevy's zebra	46	80[a]
E. burchelli boehmi	Grant's zebra	44	80[a]
E. zebra hartmannae	Hartmann's mountain zebra	32	62[b]

[a] HSU and BENIRSCHKE (1967–1977).
[b] This report.

2n = Nombre de chromosomes
NF = Nombre fondamental

b) Etude cytogénétique des hybrides

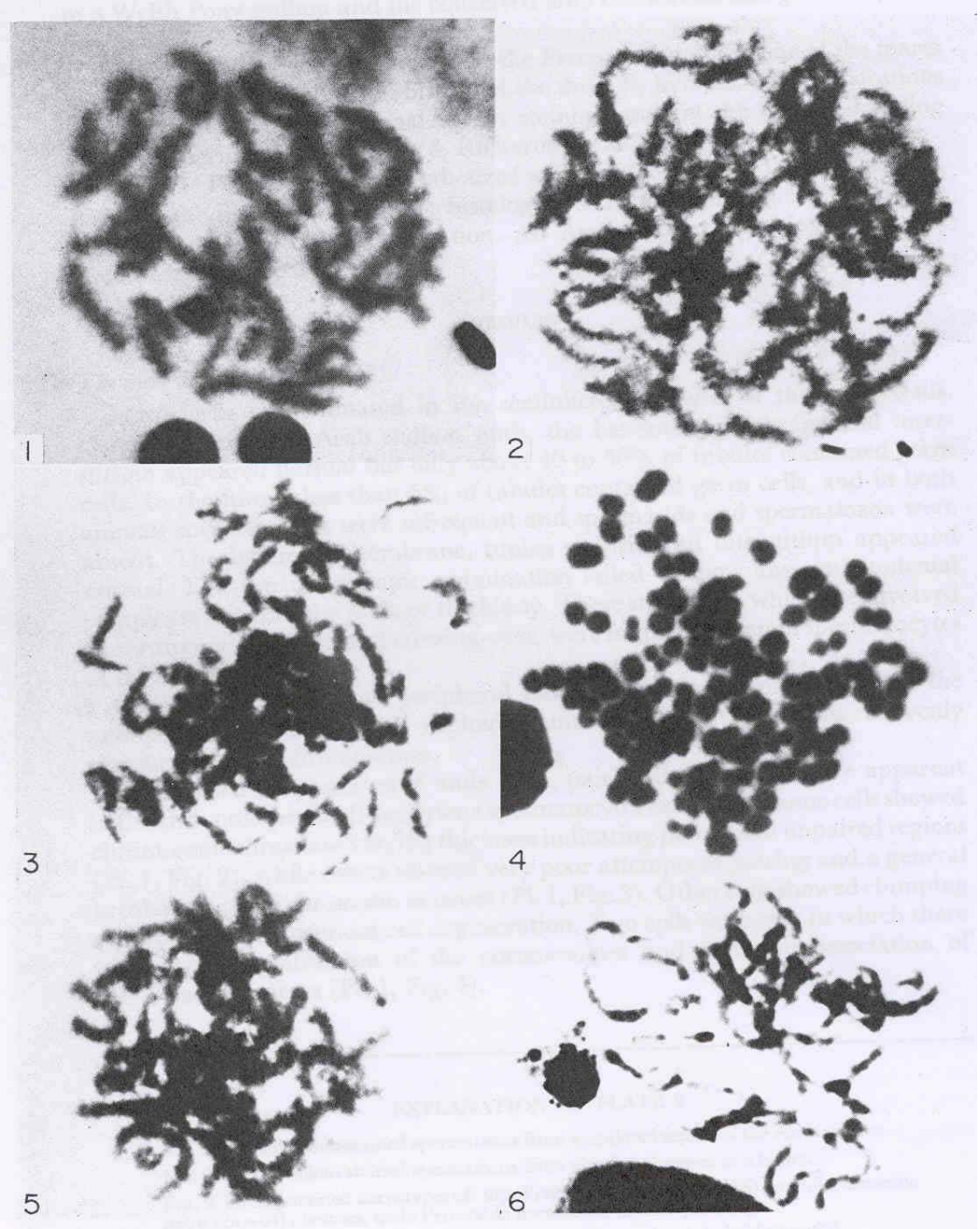
α) Mule et bardot

De nombreuses recherches ont été entreprises pour découvrir la cause de l'infertilité des mâles et femelles mules et bardots. Des études concernant la méïose chez le mulet et le bardot ont mis en évidence des irrégularités d'appariement des chromosomes au stade pachytène, dues aux différences de caryotypes entre les espèces parentales : *Equus caballus* 2n = 64 chromosomes et *Equus asinus* 2n = 62 chromosomes (voir I B)

Chandley et al. (1975) ont par exemple observé des spermatocytes au stade pachytène de prophase de méïose chez mulet et bardot (figure 44), après avoir confirmé à partir de lymphocytes du sang périphérique que ces animaux étaient réellement des hybrides (2n = 63 et de nombreuses paires de chromosomes inégalement appariées).

Chez le mulet, ces irrégularités d'appariement apparaissent dans les chromosomes de tous les spermatocytes au stade pachytène examinés (figure 44 2-4). Certaines cellules présentent des branches de chromosome d'épaisseur variée, indiquant des régions appariées et non-appariées, tandis que les autres semblent avoir des difficultés à s'apparier et il règne un désordre général dans le réseau de chromatine. Certaines autres cellules présentent des amas de chromatine et semblent subir une dégénérescence. Dans deux cellules observées, les chromosomes sont extrêmement condensés, et il existe une apparente association en éléments de taille similaire.

<u>Figure 44 :</u> Spermatocytes de cheval, mulet et bardot au stade pachytène de prophase de méïose (Chandley et al., 1975).



(1) : Spermatocyte au stade pachytène chez un étalon arabe.
(2-3) : Spermatocyte au stade pachytène chez un mulet.
(4) : Spermatocyte au stade pachytène chez un mulet montrant une association d'éléments chromosomiques de taille égale. Ceci pourrait être une image de diakinèse de métaphase I tétraploïde.
(5) : Spermatocyte au stade pachytène chez un bardot, présentant un appariement quasi-normal.
(6) : Spermatocyte dégénéré de bardot.

Chez le bardot, l'observation des testicules montre très peu de cellules germinales. Dans le cas étudié, on dénombre trois spermatogonies au stade métaphase, dont un semble être tétraploïde. Quelques rares spermatocytes primaires au stade pachytène présentent une apparence normale avec des éléments régulièrement appariés, comme ceux observés chez l'étalon. Toutefois, la plupart des cellules présentent des chromosomes filiformes d'épaisseur inégale avec des segments appariés et non-appariés, et des signes de dégénérescence (figure 44 5-6). Aucune cellule en métaphase de 1ère division de méïose, ni à un stade ultérieur n'est observée.

Chandley et al. (1975) sont convaincus que l'infertilité des mâles mulets et bardots est directement attribuable à un blocage de la méïose qui intervient au stade spermatocyte primaire, en raison des différences de complémentarité chromosomique entre les deux espèces parentales. Cependant, bien que l'appariement des chromosomes au stade pachytène chez les deux hybrides soit perturbé et incomplet dans la plupart des cellules, il existe un petit nombre de spermatocytes au stade pachytène chez le bardot pour lesquels l'appariement est presque parfait. Il est impossible de préciser comment s'effectue cet appariement, mais ceci nous permet de conclure qu'il existe une étroite homologie entre les caryotypes du cheval et de l'âne. Toutefois, il semblerait que cette homologie ait été altérée par rapport à la forme ancestrale par une inversion péricentrique et d'autres modifications structurales des chromosomes.

β) Hybride *Equus grevyi x Equus burchelli*

Ryder et al. (1978) ont réalisé la première description de l'étude cytogénétique d'un hybride interspécifique issu du croisement de *Equus grevyi* et de *Equus burchelli*, montrant les homologies entre les chromosomes de ces deux espèces.

Le caryotype des deux espèces parentales diffère par une paire de chromosomes.
En effet, l'examen du caryotype en bandes G (figures 45a et 46a) met en évidence :

- chez une femelle *Equus grevyi* (figure 45a)

23 paires de chromosomes (2n = 46), comprenant

- 15 paires de chromosomes autosomes métacentriques,
- 7 paires de chromosomes autosomes acrocentriques,
- 2 chromosomes X submétacentriques,

- chez une femelle *Equus burchelli* (figure 46a)

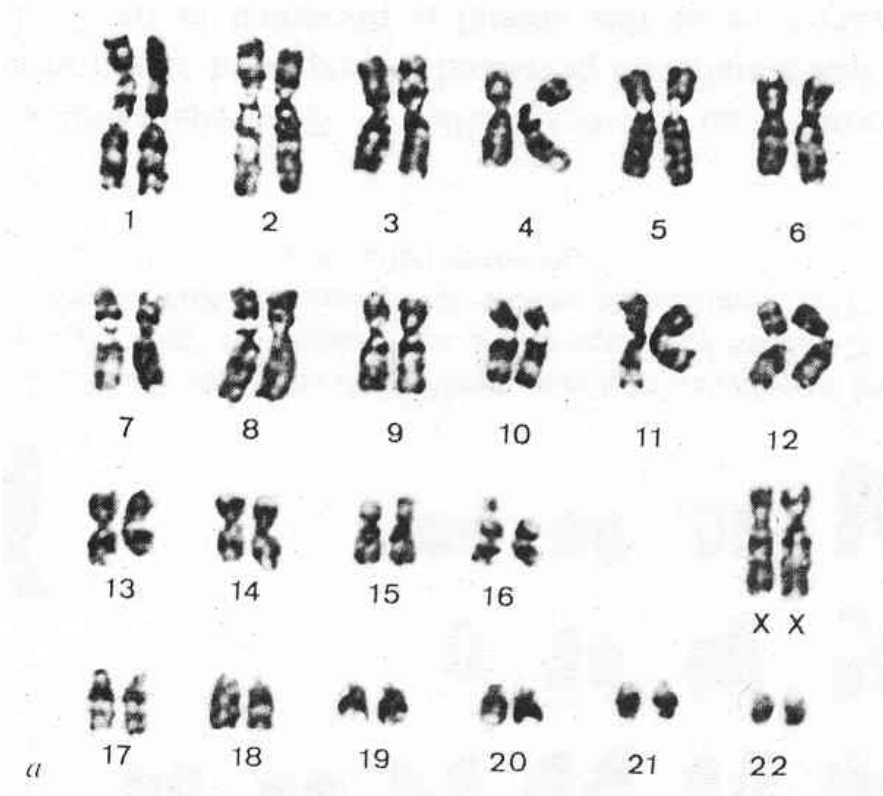
22 paires de chromosomes (2n = 44), comprenant :

- 17 paires de chromosomes autosomes métacentriques,
- 4 paires de chromosomes autosomes acrocentriques,
- 2 chromosomes X submétacentriques,

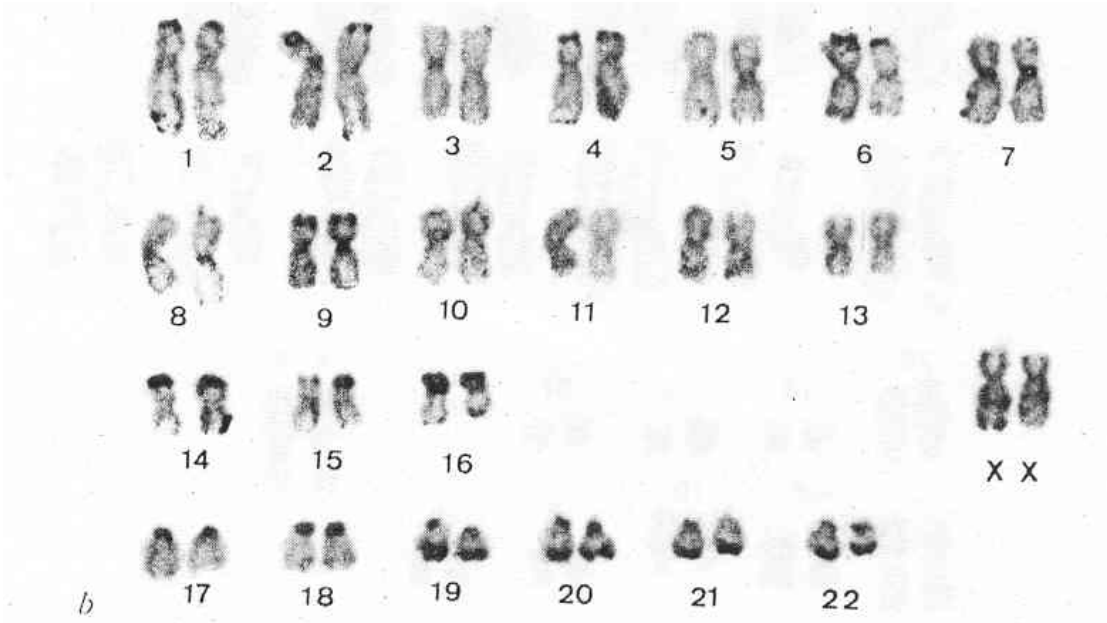
L'examen du caryotype en bandes C (figures 45b et 46b) peut être considéré comme fondamentalement analogue entre ces deux espèces, hormis une différence notable qui réside dans le fait qu'aucun chromosome acrocentrique ne présente à la fois des bandes C centromériques et télomériques chez *Equus burchelli*, comme c'est le cas pour deux paires de chromosomes (paires 19 et 20) chez *Equus grevyi*.

<u>Figure 45 :</u> Caryotypes en bandes G et C de *Equus grevyi* à partir de cultures fibroblastiques (Ryder et al., 1978).

Caryotype en bandes G :

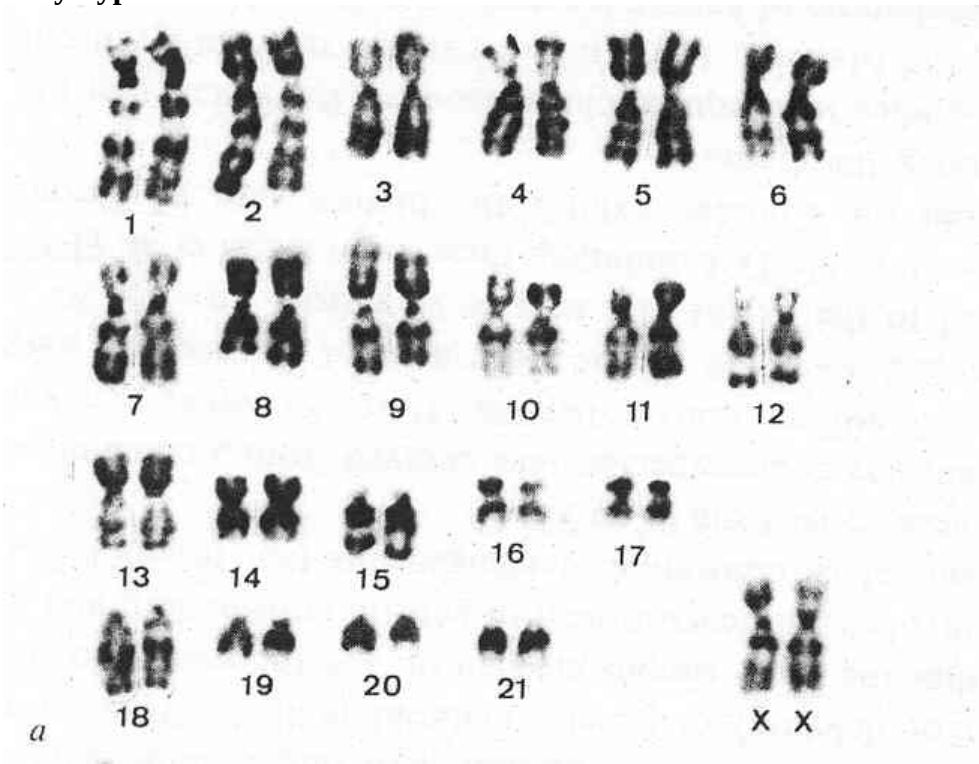


Caryotype en bandes C :

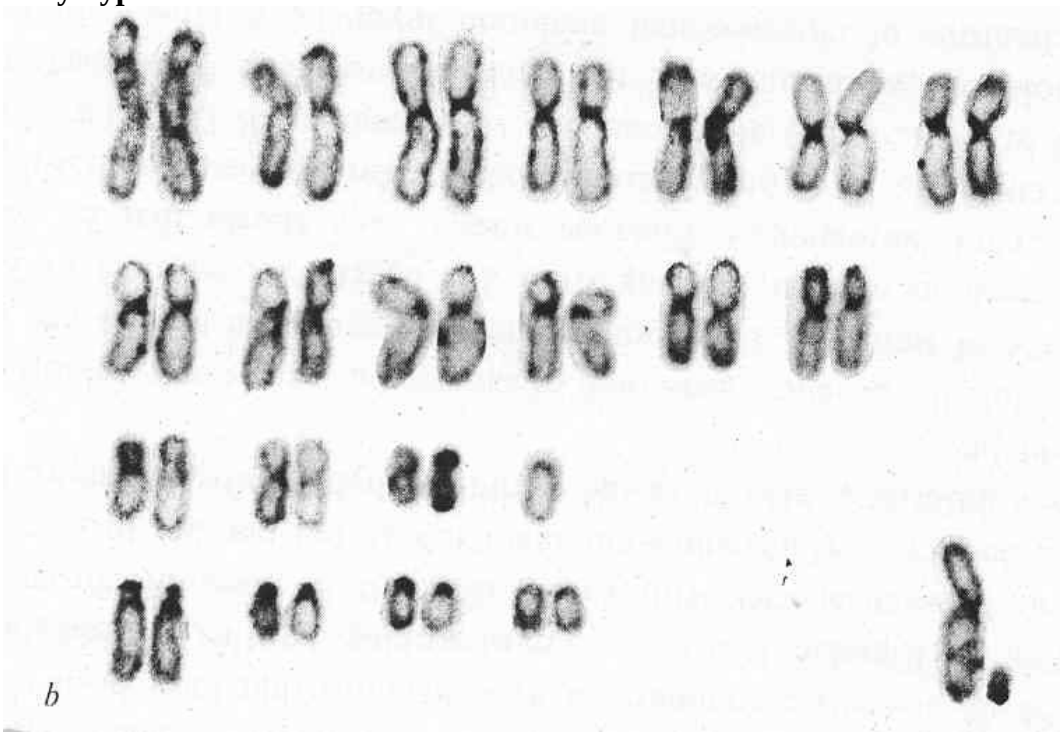


<u>Figure 46 :</u> Caryotypes en bandes G et C de *Equus burchelli* à partir de cultures fibroblastiques (Ryder et al., 1978).

Caryotype en bandes G :



Caryotype en bandes C :



Le caryotype d'un hybride (figure 47) issu du croisement d'un mâle *Equus grevyi* et d'une femelle *Equus burchelli* a été étudié par Ryder et al. (1978). Phénotypiquement, cet hybride possédait un modèle de rayures semblable à celui de sa mère *Equus burchelli*, mais la conformation de sa tête ressemblait franchement à celle de son père *Equus grevyi*. Cet hybride mâle possède, comme on pouvait s'y attendre, un caryotype à 45 chromosomes (2n = 45). L'observation en bandes G met en évidence la frappante homologie de caryotype entre les deux espèces parentales. Seulement 3 éléments ne sont pas appariés (les 3 chromosomes du bas). Sur deux des paires, un élément est distinctement plus large que l'autre (marqué d'une flèche), preuve que celles-ci ne constituent pas de véritables paires.

Figure 47 : Caryotype en bandes G de l'hybride issu du croisement *Equus grevyi X Equus burchelli* (Ryder et al., 1978)**.**

Les flèches indiquent les chromosomes non-homologues

γ) Autres hybrides

On dispose de peu de données concernant le caryotype des autres hybrides interspécifiques d'Equidés car peu d'études cytogénétiques ont été réalisées.
En revanche, le peu de données accessibles sur le nombre de chromosomes des autres hybrides permet de confirmer que le nombre de chromosomes de l'hybride est exactement intermédiaire entre celui des deux espèces parentales.

Hybride *Equus przewalskii* (2n = 66) x *Equus caballus* (2n = 64) : 2n = 65
Hybride *Equus grevyi* (2n = 46) x *Equus caballus* (2n = 64) : 2n = 55 (Ryder et al., 1978).

Le fait que chevaux, ânes et zèbres puissent s'hybrider aussi facilement, sans présenter d'anomalies dans le développement de l'hybride obtenu, suggérerait que la distance génétique entre ces différentes espèces est beaucoup plus courte que celle à laquelle on aurait pu s'attendre sur la base de la divergence caryotypique et que seules les difficultés d'appariement rencontrées lors de la méiose engendre la stérilité des hybrides (Mc Feely, 1990).

3) Etude histologique des gonades d'hybrides

a) La stérilité des hybrides reconnue de tous temps

La stérilité légendaire des mules et des mulets est reconnue depuis l'époque d'Aristote en 350 avant Jésus Christ. Stensen en 1675 a cependant décrit que des follicules et des corps jaunes peuvent parfois être présents dans les ovaires de mules.

La première explication concernant la stérilité des mulets a été fournie par Wodsedalek en 1916, qui a étudié les testicules de nombreux mulets et qui a conclu qu'il existait un blocage au cours de la méiose en raison d'une incompatibilité entre le lot de chromosomes paternels d'âne et le lot de chromosomes maternels de cheval.

Hsu et Benirschke en 1969 (cités par Taylor et Short, 1973) ont renforcé cette idée, puisqu'une étude a montré que l'âne avait 62 chromosomes dont 38 étaient métacentriques, alors que le cheval disposait de 64 chromosomes dont 26 métacentriques. Ainsi, la mule et son hybride réciproque, le bardot, ont chacun 63 chromosomes avec de multiples possibilités d'arrangement de paires. Il existe également un blocage de la spermatogenèse au stade pachytène de la méiose dans les testicules d'hybrides interspécifiques issus de croisement zèbre x cheval et zèbre x âne, où le phénomène d'incompatibilité chromosomique est encore plus grand.

b) Les ovaires de mule et de femelle bardot

Relativement peu d'études ont porté sur les mules. Toutefois, il a été observé en 1952 et 1955 par Nishikawa et Bielanski que les mules étaient capables de rentrer en œstrus à intervalle irrégulier. En 1966 Bernischke a découvert des follicules et des corps jaunes dans leurs ovaires. Mais après avoir examiné 47 paires d'ovaires de mules, il ne constata pas un seul ovocyte normal. Ceci mena Ohno en 1967 à en conclure que les ovaires de mammifères devaient donc être capables d'induire des cycles œstraux normaux, avec une folliculogenèse normale même en l'absence d'ovocytes normaux (Taylor et Short, 1973).

Taylor et Short (1973) ont cherché à étudier le devenir des ovogonies présentes dans les ovaires fœtaux et néonataux de mules et femelles bardots (tableau 22), afin de voir si certaines étaient capables d'entrer en méiose pour devenir des ovocytes.

- Les ovaires de fœtus mule de 60 jours contenaient un grand nombre de cellules germinales, dont la plupart étaient en division de mitose.

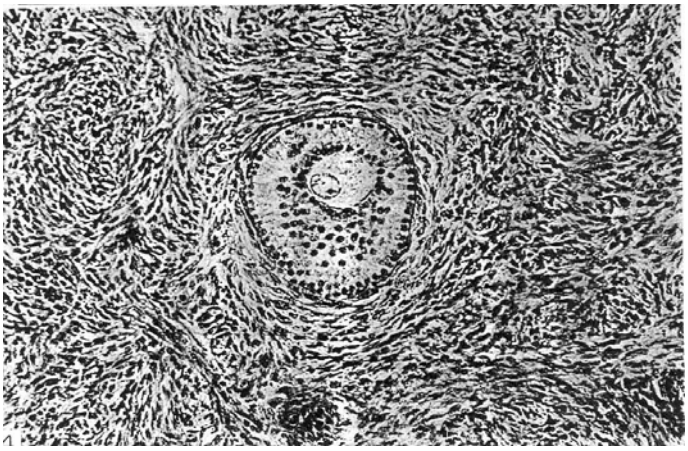
- Dans les ovaires de mule 10 jours après la naissance, des cellules germinales regroupées en nids étaient présentes dans les tubules de Plüger, qui composent les couches profondes du cortex ovarien. Certaines de ces cellules rentraient en méiose, et un grand nombre était dégénéré. Il n'a pas été observé de follicules.

- Sur les ovaires de mule âgée de 53 jours, on observait beaucoup moins de cellules germinales par unité de section que chez les mules de 10 jours. Le cortex ovarien était composé presque exclusivement de tissu fibreux, mais il était possible de trouver quelques rares ovocytes isolés, entourés par une seule couche de cellules folliculaires aplaties.
  Des images semblables ont été observées chez la femelle bardot de 73 jours et la mule de 93 jours (figure 48). Chez une seule mule, deux petits follicules étaient également présents.

Tableau 22 : Nombre de cellules germinales dans le cortex ovarien d'une pouliche, d'une mule et d'une femelle bardot nouveau-nés (Taylor et Short, 1973).

Description of animal	*No. of histological sections examined*	*No. of germ cells found*	*No. of germ cells/ cm² cortex*
Newborn horse	1*	2935	71,100·0
10-day-old mule	9	1066	342·5
53-day-old mule	64	10	0·8
73-day-old hinny	10	14	9·8
93-day-old mule	126	8	0·3
93-day-old horse	1*	161	1,000·0

Figure 48 : Image d'ovocyte à l'intérieur d'un follicule dans le cortex ovarien d'une mule âgée de 93 jours (Taylor et Short, 1973).



- Il existe un frappant contraste avec les observations d'ovaires de pouliches quaterhorse nouveau-nés, sur lesquels on trouvait de nombreux follicules de De Graaf macroscopiquement visibles, ainsi qu'un nombre conséquent d'ovocytes.
  Les mêmes constatations ont été relevées sur des ponettes âgées de 93 jours, excepté que les oocytes ne s'y trouvaient pas en aussi grande quantité. En revanche, la taille des ovaires extraits des hybrides était relativement similaire à celle des ponettes (25 x 10 x 10 mm).

Cette étude montre de façon concluante que les cellules germinales sont capables de migrer dans les gonades des fœtus hybrides, où elles subissent apparemment des divisions de mitose normales. Quelques jours après la naissance, alors qu'elles sont sur le point d'entrer en méiose, la plupart de ces cellules dégénèrent. Toutefois, un petit nombre d'entre elles parviennent à survivre aux stades initiaux de la méiose et peuvent alors se développer en ovocytes. Ces rares ovocytes survivants semblent induire un développement de cellules folliculaires normales et ainsi, les ovaires sont capables d'acquérir une activité endocrinienne, d'où l'existence de cycles œstraux. Il semblerait même que ces ovocytes puissent survivre jusqu'à l'ovulation puisque Bielanski (1968) a recueilli des ovocytes non fécondés dans les oviductes de deux mules qui avaient ovulé récemment.

La dégénérescence de la plupart des cellules germinales dans les ovaires d'hybride est un résultat direct de l'incompatibilité chromosomique parentale, qui rend extrêmement difficile l'appariemment des chromosomes homologues. Il est d'autant plus difficile de comprendre comment quelques rares cellules parviennent à survivre au-delà du stade pachytène pour devenir des ovocytes ! Il est possible que les réarrangements chromosomiques entre les cellules germinales puissent s'effectuer par le biais d'interconnexions, puisqu'il existe chez le mâle des ponts intercellulaires entre les cellules germinales primordiales. De cette façon, les cellules germinales pourraient échanger du matériel génétique, par l'intermédiaire du passage de cellule à cellule d'organites intracellulaires tels que ribosomes, réticulum endoplasmique, mitochondries et ainsi rendre la méiose possible. Il existe des preuves que quelques cellules peuvent achever leur division de méiose également chez les mâles, puisque Bratanov et Ohno (cités par Taylor et Short, 1973) ont trouvé un très faible nombre de spermatozoïdes dans le sperme de mulets et bardots.

Taylor et Short (1973) estiment que la littérature est remplie de rapports concernant des mules prétendues fertiles, mais en 1973, il n'y a encore aucun cas réellement documenté. On ne peut pas affirmer qu'une mule est fertile, simplement parce qu'elle est vue accompagnée par un poulain, étant donné que les mules adoptent et allaitent quelquefois des poulains orphelins. De plus, il est impossible d'identifier une mule seulement sur son apparence phénotypique. Il est essentiel de confirmer le diagnostic par sérologie ou caryotype. En effet, une mule prétendue fertile s'est déjà avérée n'être qu'un âne normal au regard d'analyses chromosomiques.

Les auteurs estiment qu'il semble très improbable qu'un ovocyte de mule ayant ovulé puisse trouver dans un spermatozoïde un complément de chromosomes qui pourrait lui permettre une fécondation et un développement normaux.

Les gonades de femelles hybrides interspécifiques ne présentent donc que quelques rares cellules germinales, cette constatation renforçant ainsi la thèse de leur stérilité. Qu'en est-il chez les hybrides mâles ?

c) Les tubes séminifères d'hybrides

α) Testicules de bardot

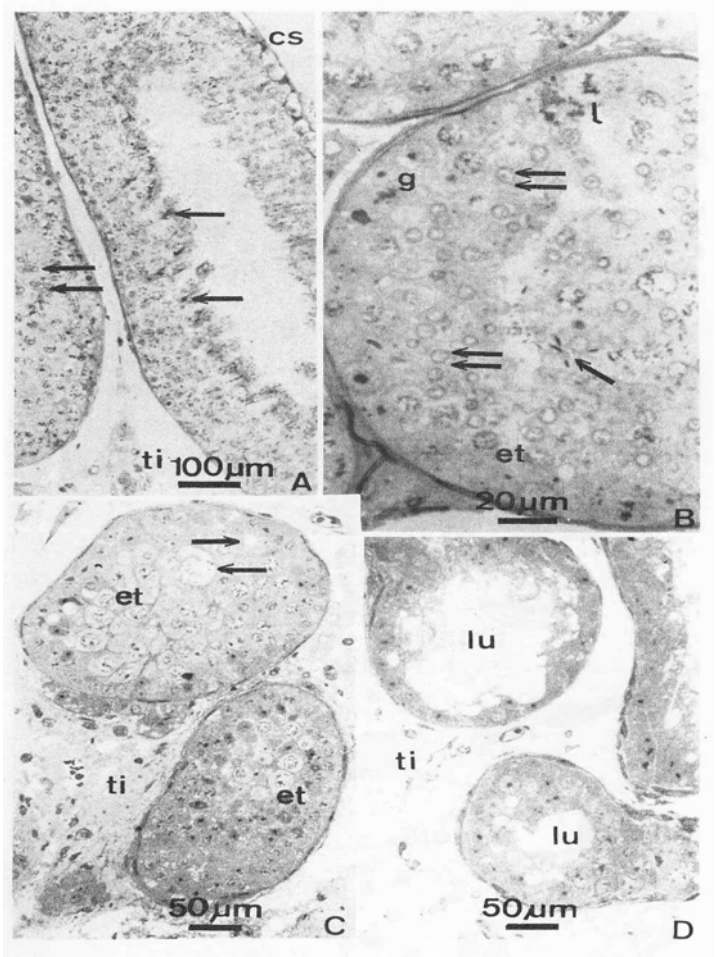
En dépit des irrégularités majeures d'appariement des chromosomes observées lors du processus de méiose chez les hybrides, quelques spermatozoïdes ont pu être collectés à partir d'épididyme de mulet et de bardot (Trujillo, 1969 et Chandley, 1974 et 1975 : cités par Landim et al., 1994). La controverse au sujet du mécanisme qui conduit à la production de gamètes chez les hybrides a ainsi inspiré différentes études à ce sujet.

Landim et al. (1994) ont étudié des testicules et cellules germinales de trois bardots en microscopie électronique, afin d'observer le développement des cellules germinales et de vérifier les modifications morphologiques liées à l'hybridation.

- On note dans les tubes séminifères d'hybrides, une importante diminution du nombre de cellules germinales en comparaison des testicules de cheval et d'âne (figure 49). Certains de ces tubes sont exclusivement composés par des cellules de Sertoli. Les autres contiennent seulement un faible nombre de spermatogonies normales, avec parfois des spermatocytes de type I dégénérés, présentant un large noyau et un cytoplasme avec de nombreuses vacuoles. On constate l'absence complète de spermatocytes II, de spermatides ou de spermatozoïdes. La lumière des tubes contient une grande quantité de débris cellulaires.

- Chez le bardot, le nombre de cellules de Sertoli semble réduit, toutefois, cette observation peut être une conséquence de l'importante réduction du nombre de cellules germinales. L'épithélium séminifère des bardots est constitué exclusivement par des cellules de Sertoli et des spermatogonies normales. Mais l'espace intercellulaire est élargi, conférant à cet épithélium un aspect lacunaire. La lame basale a également un aspect irrégulier. Certains des spermatocytes I sont tout à fait normaux, mais la chromatine est un peu moins condensée et les complexes synaptonémaux sont absents. Les signes de dégénérescence des cellules germinales débutent chez les spermatocytes I et se caractérisent par une apparence des structures de la membrane du noyau plus dilatée et des vésicules dans le réticulum endoplasmique (figure 50). Au fur et à mesure de l'avancement de la dégénérescence, la tuméfaction du réticulum endoplasmique progresse et les organites cytoplasmiques ont tendance à disparaître, à l'exception des mitochondries qui sont alors tuméfiées et vésiculaires. Les cellules au stade final de la dégénérescence sont picnotiques et leur noyau est vacuolisé en raison du dépôt de matériel électrodense homogène au niveau de l'enveloppe nucléaire. La vacuolisation nucléaire et cytoplasmique aboutit à la désintégration des membranes cellulaires et ainsi à une désorganisation cellulaire totale. Les cellules les plus dégénérées sont voisines de la lumière, et elles sont toujours enveloppées par des prolongements des cellules de Sertoli.

<u>Figure 49 :</u> Comparaison de coupes histologiques des testicules d'âne, de cheval et de bardot (Landim et al., 1994).



A : Coupe histologique de tubes séminifères d'âne
Montrant une spermatogenèse normale, avec présence de spermatozoïdes (flèches) et de spermatides (doubles flèches)

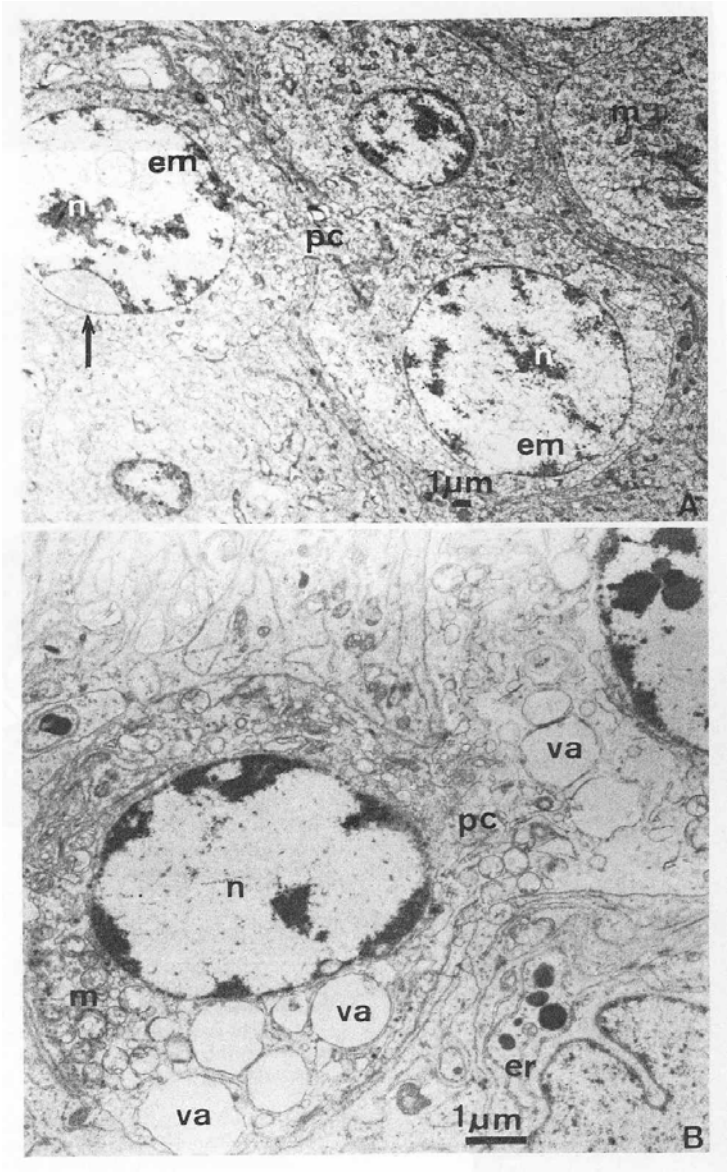
B : Coupe histologique des tubes séminifères de cheval
Montrant une spermatogenèse normale, avec présence de spermatozoïdes (flèches) et de spermatides (doubles flèches)

C : Coupe histologique des tubes séminifères de bardot
Montrant l'absence de spermatogenèse et le début de la dégénérescence cellulaire.

D : Coupe histologique des tubes séminifères de bardot
Avec large lumière (lu) en raison de l'intense dégénérescence cellulaire

Cs : Cellules de Sertoli
Ti : Tissu intersticiel
G : Spermatogonies
Et : Spermatocytes
Lu : Lumière

<u>Figure 50 :</u> Spermatocytes de bardot à différents stades de dégénérescence
(Landim et al., 1994).



A : Deux spermatocytes reliés par un pont cytoplasmique.
L'un présente un aspect normal, excepté la structure de la membrane interne du noyau.
L'autre montre un dépôt de matériel électrodense au niveau de l'enveloppe nucléaire(flèche).

B : Spermatocytes montrant une vacuolisation du cytoplasme (va) et un élargissement des mitochondries (m)

Pc : Pont cytoplasmique
N : Noyau
Va : Vacuole de phagocytose
Er : Réticule endoplasmique
Em : Membrane nucléaire

La gamétogenèse est interrompue au stade spermatocyte I chez le bardot. Les relations entre les cellules de Sertoli disparaissent, les espaces intercellulaires s'élargissent. Les altérations morphologiques sont visibles sur toute la périphérie du tube séminifère.

La lame basale du tube séminifère présente un aspect édenté et plus épais que celui des espèces parentales. Cet aspect est certainement dû à la réduction du nombre de cellules germinales, laquelle semble engendrer des altérations dans les jonctions entre les cellules de Sertoli et la lame basale. La dilatation de l'espace intercellulaire chez les hybrides est due à la perte des jonctions cellulaires entre les cellules de Sertoli et les cellules germinales. La fragilité des jonctions cellulaires résulte dans le déplacement des cellules de Sertoli depuis la position basale vers la lumière de tube. La réduction du nombre de cellules germinales entraîne également une pression moins importante contre le cytoplasme des cellules de Sertoli, et ainsi leur noyau adopte une position plus centrale.

Malgré le changement dans les relations entre les cellules de Sertoli et les spermatogonies, l'apparence des cellules de Sertoli est normale et très similaire à celle observée dans les espèces parentales.

La dégénérescence cellulaire débute au stade spermatocyte I. Même si leur apparence est normale, l'absence de complexes synaptonémaux est notable, étant donné que ces structures sont fréquentes chez le cheval et l'âne. La dégénérescence commence par une modification de l'apparence des structures membranaires à l'intérieur du noyau. Un dépôt de matériel électrodense apparaît au niveau de l'enveloppe nucléaire. Ce dépôt augmente et aboutit à la rupture de la membrane nucléaire. En considérant que les filaments d'ADN sont maintenus par les adhérences avec la lame nucléaire, puis durant la méiose, le début des synapses homologues correspond au point d'adhérence. De plus, la commande est certainement une protéine arrivant du cytoplasme, la perte d'homologie entre les chromosomes, et donc l'impossibilité d'appariement, conduit à une accumulation de messagers entre la lame et la membrane nucléaire, à l'origine des vacuoles observées.

Avec le temps, ces altérations apparaissent dans le noyau et le cytoplasme où les citernes du réticulum endoplasmique et les mitochondries se tuméfient et finissent par disparaître. L'aspect morphologique de ces altérations suggère que celles-ci sont engendrées par des changements de perméabilité dans les membranes cellulaires ; ce qui aboutit à l'accumulation de matériel amorphe à l'intérieur des organites cellulaires et explique la formation périnucléaire de vacuoles. Ces altérations de perméabilité peuvent être secondaires au déséquilibre génétique et peuvent engendrer des altérations biochimiques et morphologiques au sein des cellules affectées.

Même en l'absence de spermatogenèse, les cellules de Sertoli conservent leur fonction de modulation de la différenciation des cellules germinales et de transport de ces dernières vers la lumière des tubes séminifères. Les cellules dégénérées, proches de la lumière sont enveloppées par des prolongements des cellules de Sertoli.

Il semble que chez les hybrides, l'activité des cellules de Sertoli et de toutes les cellules diploïdes soit normale. Donc, le déséquilibre génétique dû au manque d'homologie des chromosomes est important seulement au moment de la formation des gamètes, portant atteinte à la reproduction c'est-à-dire à la fertilité des hybrides, mais sans altérer le métabolisme des hybrides.

Cette étude a permis de montrer que l'infertilité des hybrides est attribuable à une détérioration de la méiose induisant une dégénérescence des cellules germinales à partir du stade spermatocyte I et engendrant des modifications structurelles au sein de l'épithélium séminifère et des testicules des hybrides (Landim et al., 1994).

β) Testicules de mulet

- Comparaison entre les testicules de mulet, de cheval et d'âne :

Hernandez-Jauregui et Marquez-Monter (1977) ont de la même façon comparé les testicules de mulet avec ceux d'étalon et d'âne. Les testicules de 3 mulets ont été observés au microscope optique et électronique et comparés à ceux de 3 étalons et de 3 ânes.

Le poids moyen des testicules de mulet (350 g) est nettement inférieur à celui d'un étalon (900 g) ou d'un âne (750 g), alors que le poids du mulet est intermédiaire entre celui du cheval et de l'âne.

Les testicules d'hybrides contiennent 2 populations cellulaires à l'intérieur des tubes séminifères :

- des cellules de Sertoli dans 70 % des tubes séminifères
- des spermatogonies et spermatocytes primaires au stade leptotène et pachytène dans 30 % des tubes séminifères.

On compte en moyenne 70 tubes séminifères par champ microscopique chez le mulet tandis que l'étalon et l'âne en ont respectivement 42 et 30.

Le diamètre moyen des tubes séminifères est de 0,881 cm chez le mulet, 1,12 cm chez l'étalon et 1,145 cm chez l'âne. La comparaison entre ces 3 espèces révèle une différence significative.

L'interstitium de testicule de mulet est riche en éléments du tissu conjonctif, mais contient peu de groupes de cellules de Leydig. Les cellules interstitielles sont matures et apparaissent en groupe de 52 cellules en moyenne, alors qu'elles apparaissent en groupe de 123 chez l'étalon et 77 chez l'âne.

L'épididyme et le canal déférent de mulet présentent les mêmes caractéristiques morphologiques que ceux d'étalon et d'âne, excepté la présence de fibrose intertubulaire chez le mulet.

L'observation au microscope électronique des tubes séminifères de mulet montre une spermatogenèse arrêtée au stade pachytène de méïose, avec des spermatogonies et des expansions de cellules de Sertoli soulignant la membrane basale. La rétraction du cytoplasme des spermatogonies semble mener à la formation d'espaces vides entre ces structures.

Les noyaux des spermatogonies sont ronds ou ovales, la chromatine a une faible densité électronique, et les nucléoles proéminents sont toujours présents. Dans le cytoplasme, il y a des mitochondries allongées, des vésicules de réticulum endoplasmique et des polyribosomes.

Les stades leptotènes de méïose sont représentés par les spermatocytes primaires avec des noyaux ronds ou ovales pâles. La chromatine est éparpillée à l'intérieur du noyau et présente une faible densité électronique.

Les noyaux au stade pachytène des spermatocytes primaires montrent une chromatine condensée, formant des touffes étendues. Occasionnellement on peut observer des complexes synaptonémaux. Ces structures, impliquées dans l'appariement des chromosomes et le crossing-over, sont fréquemment observées dans les spermatocytes de l'étalon (Chandley et al., 1975).

A ce stade de méïose, des modifications interviennent. Dans le noyau, la dégénérescence de la membrane nucléaire donne naissance à la formation de vésicules contenant du matériel amorphe pâle. Dans le cytoplasme, le réticulum endoplasmique lisse devient dilaté, formant

des vésicules de différentes tailles. Le réticulum endoplasmique granuleux et l'appareil de Golgi disparaissent progressivement.

Dans les modifications dégénératives finales, les noyaux sont picnotiques, accompagnés par des cytoplasmes remplis de vésicules tandis que les organites intracellulaires manquent. De plus les mitochondries sont œdémateuses et vésiculées. La désintégration cellulaire est le stade ultime du processus de dégénérescence.

L'activité stéroïdogène testiculaire semble donc normale chez le mulet comme le suggère les cellules interstitielles bien développées, mais la méiose est bloquée au stade pachytène, comme le montre la dégénérescence des cellules germinales (Hernandez-Jauregui et Marquez-Monter, 1977).

Ainsi, l'observation de testicules de bardot et de mulet révèle dans les deux cas, l'existence d'une dégénérescence des cellules germinales au stade pachytène qui est responsable de la stérilité des hybrides mâles.

- <u>Découverte de quelques spermatozoïdes chez des mulets et des bardots :</u>

Tout le monde s'accorde à dire que les mulets et bardots mâles sont complètement stériles en raison d'une azoospermie. En effet, sur une coupe histologique de testicule de mulet, bien que de nombreuses images de mitose et de méïose soient présentes, aucun spermatozoïde n'est visible. Makino (1955 ; cité par Chandley, 1975) déduisait à partir d'une étude de testicules de mulet que la dégénérescence des cellules germinales mâles intervenait durant les stades précoces de la prophase de méïose.

Dans la première étude détaillée de testicules de mulet, Wodsedalek (1916 ; cité par Chandley, 1975) constata quelques images de fusion chromosomique en méïose, mais aucune synapsis complète. Horie et Nishikawa (1959 ; cités par Chandley, 1975) n'ont pas non plus observé de spermatozoïdes dans une étude attentive de testicules de mulet.

Toutefois, Bratanov et al. (1964 ; cités par Chandley, 1975) ont constaté quelques spermatozoïdes occasionnels dans le sédiment d'un éjaculât de mulet après centrifugation. Une étude plus critique de la spermatogenèse chez un bardot a été réalisée par Trujillo et al. (1969 ; cités par Chandley, 1975). Cet animal éjacula dans un vagin artificiel à plusieurs reprises et le premier éjaculât prélevé contenait un nombre plutôt important de spermatozoïdes immobiles, ainsi qu'un petit nombre de spermatozoïdes bien formés avec tête et queue. Tous ces spermatozoïdes étaient dénués de motilité et lors de sections histologiques, aucun spermatozoïde intact n'avait été localisé. Toutefois, les auteurs ont observé des cellules tétraploïdes dans les testicules et ils se sont interrogés sur le fait que les chromosomes de cheval et d'âne puissent se séparer à partir de ces cellules pour produire d'occasionnels spermatozoïdes euploïdes de cheval et d'âne.

Dans une étude similaire de bardot, Chandley et al. (1975) ont trouvé quelques spermatozoïdes dans un éjaculât centrifugé et dans le liquide de flushage de l'épididyme après castration. Après différentes mesures, ils se sont interrogés sur le fait que ces spermatozoïdes étaient quasihaploïdes, bien qu'ils aient été incapables d'observer un appariement complet de chromosomes sur l'analyse cytologique des testicules. Les auteurs ont alors suggéré que

l'amphidiploïdisme (c'est-à-dire, le fait qu'un individus possède 2 sets de chromosomes dérivés de différentes espèces parentales) pouvait être l'explication la plus probable de la découverte occasionnelle de spermatozoïdes et ils ont illustré cette explication par une photographie d'un spermatocyte presque tétraploïde en prophase trouvé dans un testicule de mulet. La seule étude ultrastructurale de testicule de mulet montra de profondes dégénérescences cytoplasmiques des cellules germinales au stade leptotène (Hernandez-Jauregui et Marquez-Monter, 1977).

De même, l'éjaculât centrifugé et les lavages de l'épididyme de bardot peut contenir quelques rares spermatozoïdes. Ces spermatozoïdes sont significativement plus petits et de taille plus variable que ceux d'étalon ou d'âne. Etant donné que les spermatozoïdes ne peuvent être observés qu'après centrifugation, on ne détient aucune information concernant leur mobilité (Chandley et al., 1975).

Au vu des irrégularités marquées d'appariement en prophase de méïose, il est surprenant que certaines cellules germinales puissent survivre et former des gamètes. En théorie, il est possible que des lots amphidiploïdes puissent se former dans les spermatocytes tétraploïdes afin que les paires de chromosome cheval/cheval et âne/âne s'associent en méïose, et puissent éventuellement produire des spermatozoïdes diploïdes. Cependant, Beatty et Fechheimer en 1972 (cités par Chandley, 1975) ont montré que les spermatozoïdes diploïdes étaient significativement plus gros que les spermatozoïdes haploïdes ; alors que les mesures réalisées sur les spermatozoïdes de bardot ont révélé que ceux-ci étaient plus petits. Ceci suggère les spermatozoïdes de bardot observés ne sont pas diploïdes mais plutôt haploïdes ou quasi-haploïdes.

Autre explication possible de l'aboutissement de la méïose chez les hybrides : si par chance, certaines cellules germinales peuvent survivre à la première division de méïose, un noyau fils pourrait occasionnellement recevoir un lot complet haploïde de chromosomes de cheval et un lot complet de chromosomes d'âne (Chandley et al., 1975).

Ainsi, les mulets et bardots seraient-ils occasionnellement aptes à produire quelques rares spermatozoïdes. Toutefois, il persiste un doute considérable sur le fait que les mâles mulet et bardot puissent un jour produire une quantité suffisante de spermatozoïdes disposant d'une aptitude correcte à la fécondation (Benirschke et Ryder, 1985).

L'extraordinaire capacité d'hybridation des différentes espèces au sein de la famille Equidae renforce leur étroite relation taxonomique. Toutefois, même si la distance génétique qui sépare les différentes espèces est suffisamment petite pour permettre leur hybridation respective, la divergence caryotypique qui règne entre ces espèces est à l'origine des difficultés d'appariement chromosomique rencontrées au cours de la méïose, et par conséquent responsable de la stérilité des hybrides.

Ainsi, les hybrides seraient alors tous stériles ; mais n'existe-t-il pas justement quelques exceptions à cette règle ?

B – Mais certains hybrides peuvent être fertiles !

Il semblerait que certains hybrides interspécifiques d'équidés ne soient pas aussi stériles que la mule ou le bardot sont prétendus l'être. En effet, le mâle et la femelle hybrides issu du croisement *Equus przewalskii* x *Equus caballus* seraient tous les deux parfaitement fertiles. De plus, Gray, 1972 a listé un certain nombre d'exemples où les hybrides entre *Equus asinus* et *Equus burchelli* se sont révélés être fertiles. Toutefois, aucun de ces cas de pseudo-fertilité n'a réellement été vérifié. Qu'en est-il vraiment des preuves scientifiques de ces cas rapportés d'hybrides fertiles ?

1) Hybrides Equus przewalskii x Equus caballus

Contrairement à la stérilité de la plupart des hybrides interspécifiques d'Equidés, l'individu issu du croisement entre *Equus przewalskii et Equus caballus* est toujours fertile.

Le caryotype de l'hybride mâle *Equus przewalskii x Equus caballus* (figure 51 bas) est constitué par 65 chromosomes (2n = 65), et présente un chromosome métacentrique seul et sans homologues, en plus des 12 paires de chromosomes méta ou sub-métacentriques et des 19 paires de chromosomes autosomes acrocentriques.

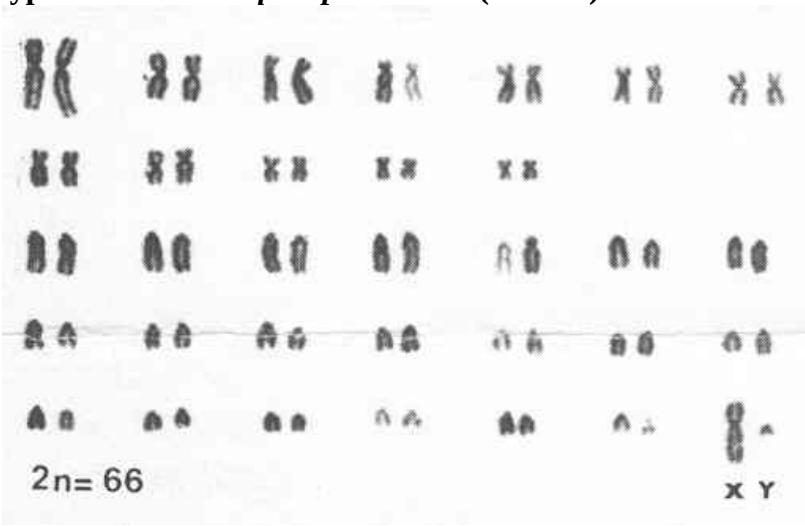
Un autre caryotype a été réalisé à partir d'un hybride mâle (2n = 65) issu du croisement d'un hybride mâle F1 (2n = 65) et d'une femelle hybride F1 (2n = 65). L'étude en bandes G révèle les homologies entre les deux caryotypes parentaux, et illustre ainsi l'homologie entre les 2 chromosomes acrocentriques de *Equus przewalskii* et le chromosome métacentrique de *Equus caballus* qui sont impliqués dans le réarrangement par fusion centrique.

Chandley et al. (1975) ont étudié la méiose dans les testicules d'un hybride *Equus przewalskii x Equus caballus*, afin d'investiguer la fertilité de ces hybrides. La préparation histologique de testicule en méiose montre d'abondantes cellules à tous les stades de la spermatogenèse. Au cours de la prophase de méiose, les chromosomes appariés apparaissent normaux par rapport à ceux d'un étalon arabe. Au stade métaphase I, 31 bivalents et 1 trivalent sont formés. Les formes de trivalent (figure 52) dans les différentes cellules varient selon la position du chiasma et le degré de terminalisation du chiasma. Les fréquences de chiasma sont normales comparées à celle d'un étalon arabe.

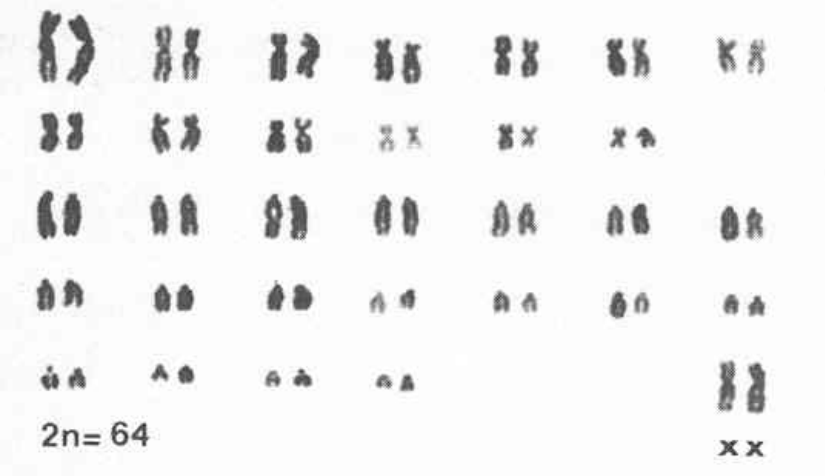
L'étude des chromosomes somatiques de 2 foals B1 obtenus à partir de l'hybride mâle F1 et d'une jument *Equus caballus* présente 2n = 64 pour le poulain et 2n = 65 pour la pouliche. Une pouliche produite à partir de l'hybride femelle F1 et d'un étalon *Equus caballus* compte 2n = 65. Les caractéristiques phénotypiques des deux descendants B1 présentant 2n = 65 sont très proches de celles du cheval de Przewalski, tandis que l'individu B1 disposant de 2n = 64 est semblable au cheval domestique.

<u>Figure 51 :</u> Caryotype d'un étalon *Equus przewalskii*, d'une jument *Equus caballus* et de l'hybride (Chandley et al., 1975)**.**

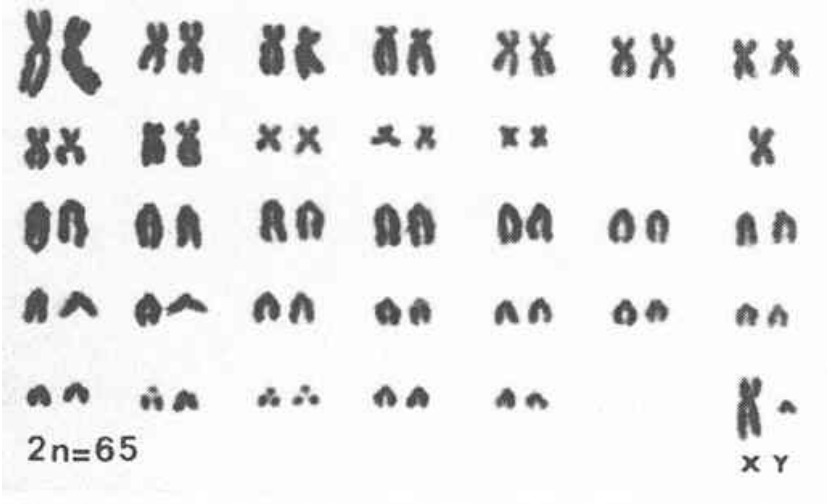
Caryotype d'un étalon *Equus przewalskii* (2n = 66)



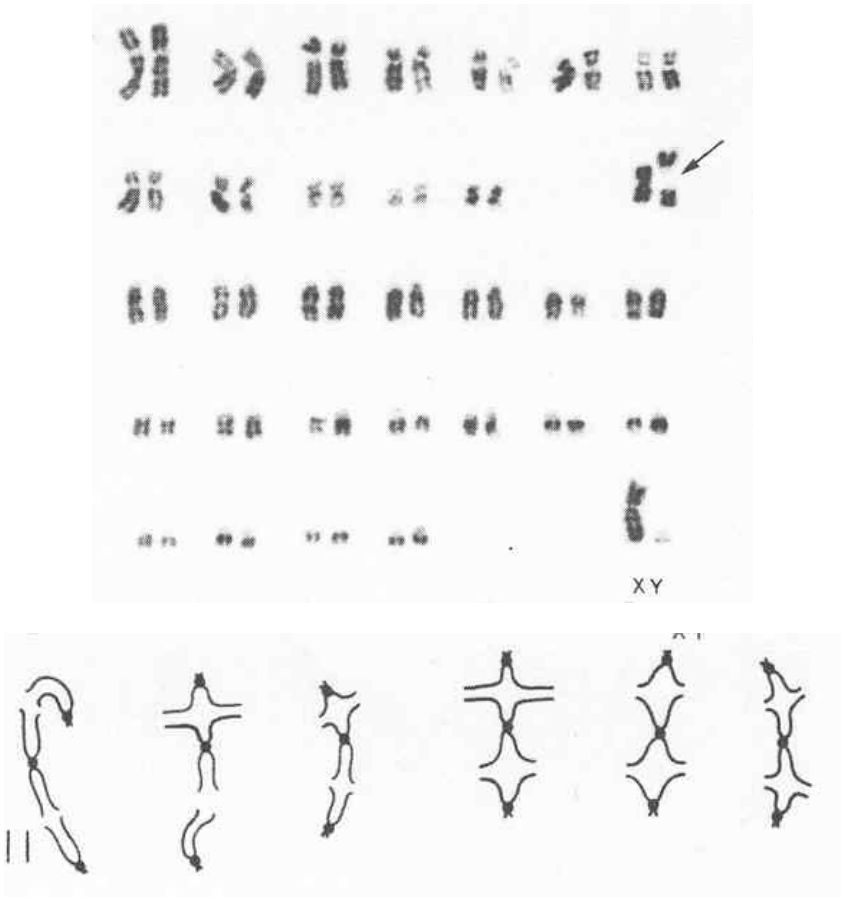
Caryotype d'une jument *Equus caballus* (2n = 64)



Caryotype d'un hybride *Equus przewalskii x Equus caballus* (2n = 65)



<u>Figure 52 :</u> Caryotype d'un hybride *Equus przewalskii x Equus caballus* montrant la formation d'un trivalent (flèche) et représentation de configuration de trivalent.



Quelques soient les problèmes d'appariement rencontrés chez le mulet et le bardot, il est clair que de telles difficultés n'existent pas au cours de la méïose chez les hybrides *Equus przewalskii x Equus caballus.* Les caryotypes de ces deux espèces parentales semblent être suffisamment bien assortis pour permettre un appariement normal lors de la méïose, et ainsi une gamétogenèse normale. De plus, il semble que la fertilité de ces hybrides ne soit pas altérée par des ségrégations irrégulières du trivalent conduisant à la perte d'embryons aneuploïdes non viables. Les hybrides mâles et femelles sont tous les deux parfaitement fertiles, si l'on en juge par le faible nombre d'accouplements nécessaires à la conception, et chacun de leurs foals disposent d'un caryotype chromosomiquement équilibré.

Ainsi, les études chromosomiques montrent une étroite homologie entre les caryotypes de *Equus przewalskii et Equus caballus ;* et il est évident qu'une simple translocation Robertsonienne s'est produite transformant 4 chromosomes acrocentriques de *Equus przewalskii* en 2 chromosomes métacentriques de *Equus caballus*. Les recherches ont montré qu'il se forme un trivalent au cours de la méïose chez l'hybride, ségrégation qui donne naissance à deux classes de spermatozoïdes génétiquement équilibrés, dont chacune est capable de produire une descendance normale après fertilisation d'ovules de jument *Equus caballus* conduisant ainsi soit à la production d'un individus à 2n = 65 chromosomes, soit à 2n = 64.

Ainsi, les hybrides mâles et femelles issus du croisement *Equus prjewaskii x Equus caballus* sont-ils réellement fertiles, grâce à l'homologie de caryotype qui existe entre les deux espèces parentales. Qu'en est-il exactement de la fertilité rapportée de certaines mules?

2) Certaines mules peuvent être fertiles

a) Cas rapportés de mules et femelles bardots fertiles

α) Nombreuses descriptions contestées

Il existe dans la littérature de nombreuses descriptions de mules femelles prétendues fertiles, car cette particularité surprenante de la part d'un hybride attise la curiosité des scientifiques. Ainsi, Anderson (1939) établit la description de trois individus dont la mère serait une mule. De même Gray (1972) qui liste les différents hybrides interspécifiques répertoriés, précise si l'hybride en question dispose d'une descendance ou non. La plupart des hybrides décrits sont déclarés être stériles, mais certains pourraient occasionnellement selon l'auteur être fertiles :

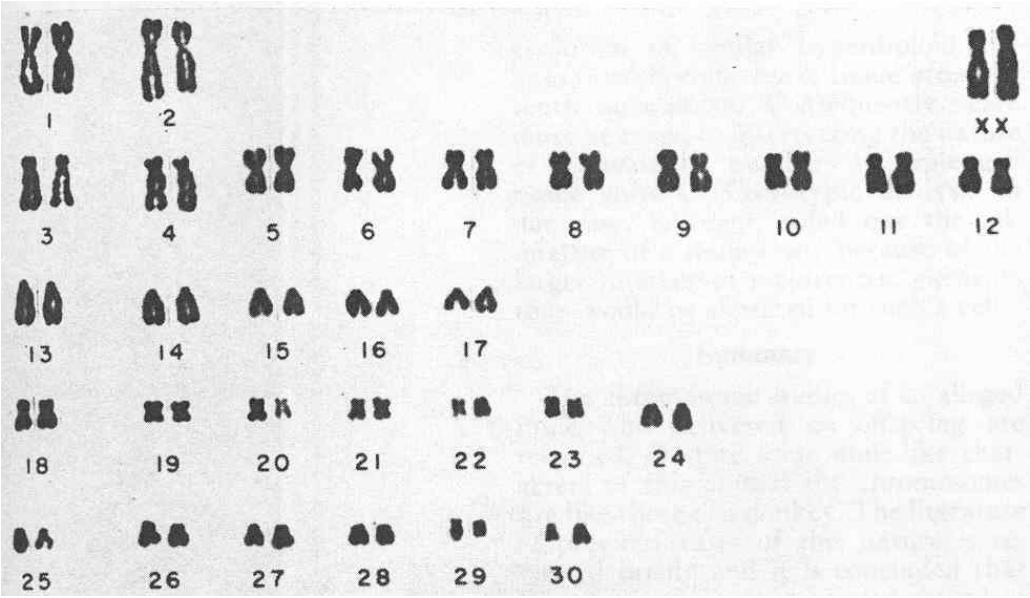
- Femelle hybride *Equus asinus x Equus burchelli*
- Femelle hybride *Equus asinus x Equus caballus*
- Femelle et mâle hybride *Equus caballus x Equus przewalskii*
- Femelle hybride *Equus caballus x Equus zebra*

Cependant toutes les données sur l'éventuelle fertilité de ces hybrides ne s'appuie que sur des suppositions ; aucune preuve scientifique n'a jamais été fournie.

Benirschke et al. (1964) se sont interrogés sur l'exactitude des cas rapportés de mules fertiles. Aussi ont-ils utilisé les cultures leucocytaires et de tissu fibreux d'une mule prétendue fertile pour en étudier le caryotype (figure 53). L'analyse caryotypique de cette fameuse mule s'avère présenter les caractéristiques exactes de l'âne, avec 62 chromosomes dont 38 chromosomes autosomes métacentriques. Les deux chromosomes X sont semblables en taille et en conformation (centromère subterminal) à celui de l'âne, tandis qu'aucun chromosome X de cheval (élément métacentrique plus médian) n'a pu être identifié. De plus, les chromosomes autosomes s'apparient facilement, alors que cette étape est plutôt difficile chez un hybride. La mule présumée fertile n'était donc en fait qu'une ânesse présentant des caractéristiques morphologiques inhabituelles.
Ainsi les auteurs en concluent-ils que les nombreux cas décrits de pseudo-fertilité des hybrides dans la littérature doivent être interprétés avec prudence, et ne peuvent être exploitables qu'au vu d'une analyse chromosomique confirmant la réelle identité du prétendu hybride.

La méfiance quant à la fertilité des mules doit être d'autant plus grande que les mules sont capables d'adopter et d'allaiter avec succès un foal orphelin ou délaissé par sa mère, ce phénomène étant relativement commun et bien connu des éleveurs de mules (Tegetmeier et Sutherland, 1895).

<u>Figure 53 :</u> Caryotype de la mule prétendue fertile en parfaite concordance avec un caryotype d'âne (Benirschke et al., 1964)**.**



<u>β) Preuves scientifiques</u>

Les mules sont réputées pour leur stérilité. En effet, les importants réarrangements chromosomiques qui différencient les caryotypes de *Equus caballus* et *Equus asinus* empêcheraient l'appariement des chromosomes homologues avant la première division de méïose, engendrant ainsi la dégénérescence des cellules germinales. Des analyses chromosomiques différentielles et études de la méïose chez des mulets corroborent effectivement cette hypothèse.

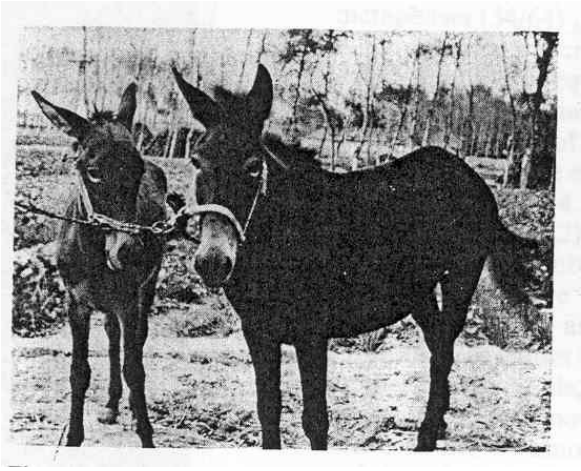
Toutefois, il existe dans la littérature de nombreux cas rapportés de mules fertiles, notamment en Chine où les mules sont élevées intensivement. Tandis que les mules femelles sont connues pour exprimer occasionnellement des œstrus et ovulation, jusque là aucun cas documenté de gestation de mule, avec confirmation de l'identité de la mère comme étant réellement une mule, n'a été présenté. Ainsi donc, comme les femelles mules sont reconnues être capables d'allaiter (Tegetmeier et Sutherland, 1895), la maternité de foals prétendus nés de femelles mules reste à être démontrée.

Rong et al. (1985) sont les premiers à avoir réalisé des investigations caryotypiques et biochimiques afin d'établir l'authenticité d'un cas de mule fertile qui aurait donné naissance en Chine à une pouliche engendrée par un âne (nommée « Dragon Foal », figure 54).

Phénotypiquement, le foal semble être un fascinant mélange des traits de cheval, d'âne et de mule.

En 1983, la mère meurt de coliques. Mais l'analyse chromosomique des lymphocytes sanguins avait déjà été réalisée, montrant que celle-ci était bien une mule : avec 63 chromosomes et les deux chromosomes X ont clairement été identifiés comme étant l'un d'origine équine, l'autre d'origine asine.

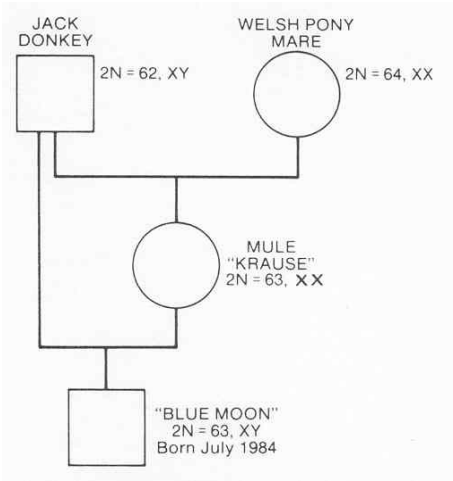
<u>Figure 54 :</u> « Dragon Foal », pouliche âgée de 1 an et ½ et sa mère mule (Rong et al., 1985).



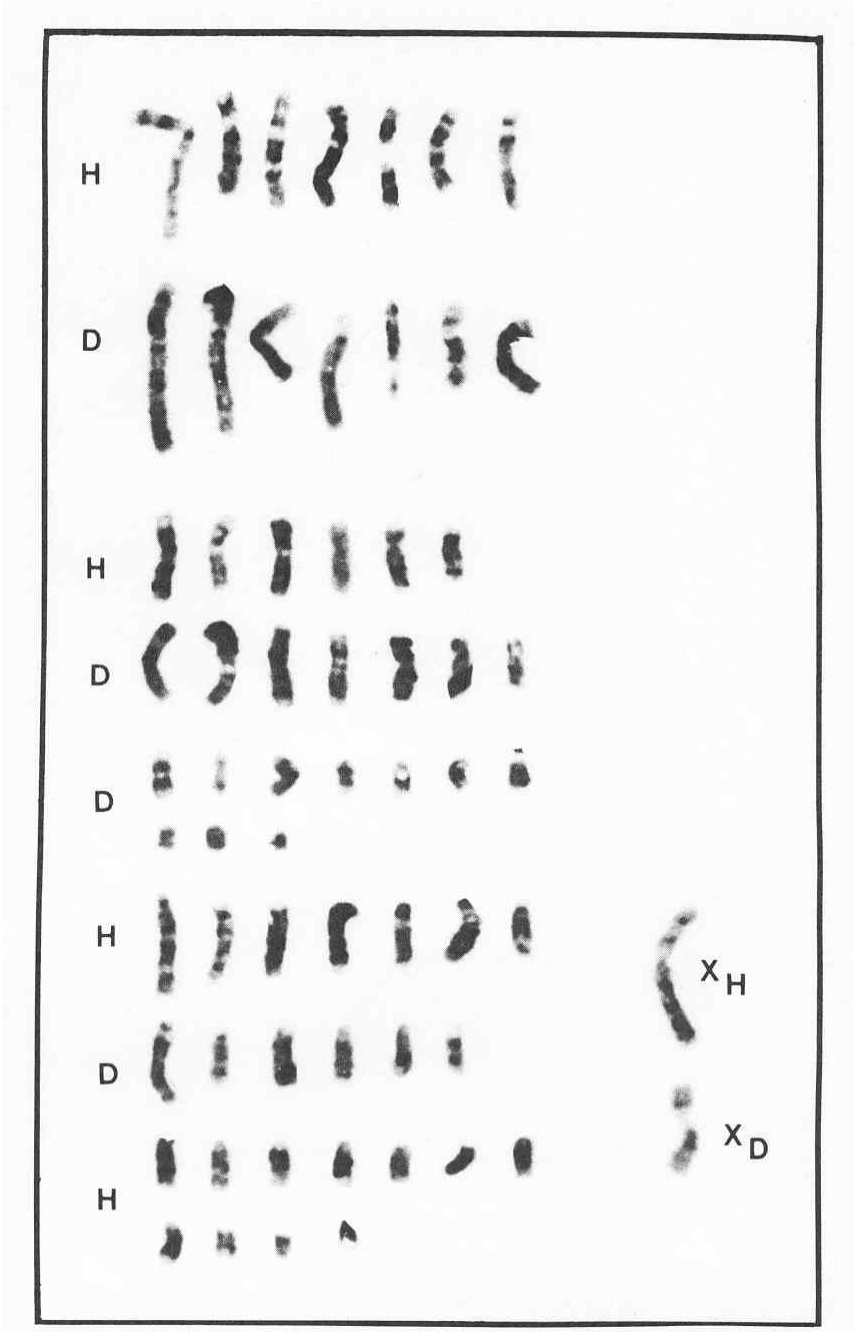
Le caryotype de « Dragon Foal» a révélé un nombre de chromosomes à 2n = 62, identique à celui de l'âne. Le caryotype en bandes C présente un nombre de chromosomes acrocentriques de 24 (ou 25), intermédiaire entre l'âne (22) et la mule (30). Les deux chromosomes X sont d'origne asine.

Ryder et al. (1985) au même moment, se sont également intéressés aux analyses chromosomiques d'un nouveau-né (nommé « Blue Moon ») allaité par une femelle mule (nommée « Krause ») aux USA, dont le pedigree est représenté dans la figure 55. L'analyse chromosomique indique que la prétendue mère de ce foal est bien une mule, possédant, comme tous ces hybrides, 63 chromosomes. L'analyse en bandes G (figure 56) permet l'identification des éléments avec des motifs caractéristiques de cheval et d'âne. Sur ce caryotype, les chromosomes d'âne et de cheval ont été séparés. L'identification absolue de petits éléments avec des ratios de bras similaires est problématique. Cependant, la différence de nombre de chromosomes acrocentriques et métacentriques constitue une caractéristique distinctive des caryotypes spécifiques de l'âne et du cheval, autorisant une identification sans équivoque d'un caryotype de mule.

<u>Figure 55 :</u> Pedigree du foal né d'une mère mule (Ryder et al., 1985).

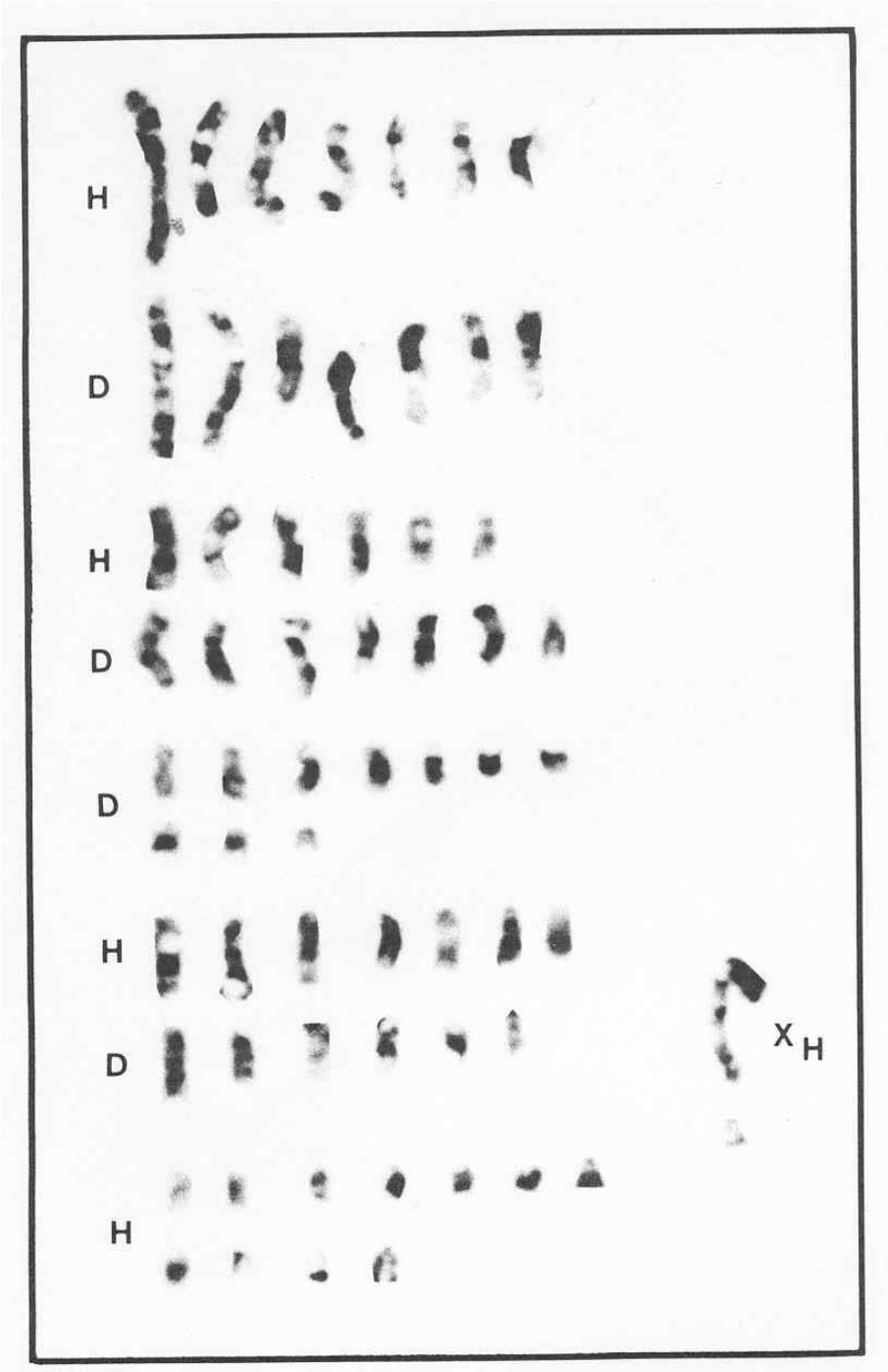


<u>Figure 56 :</u> Caryotype en bandes G de la mule « Krause » (Ryder et al., 1985).



Le foal « Blue Moon » présente également 2n = 63 chromosomes, avec des motifs de bandes caractéristiques d'un mulet (figure 57).

<u>Figure 57 :</u> Caryotype en bandes G du foal « Blue Moon » né de mère mule (Ryder et al., 1985).



Malgré des années de doute et de septicisme de la part des scientifiques concernant la possibilité que les mules et les femelles bardots puissent occasionnellement donner naissance à des foals semble maintenant certaine. Les publications de la naissance en Chine de « Dragon Foal » et aux USA de « Blue Moon », nés de mère mule, furent les premières dans la littérature mondiale à fournir des preuves cytogénétiques et biochimiques convainquantes de la fertilité des mules. Chacune de ces deux mules avait été saillie naturellement par un âne

avec lequel elles étaient en contact depuis longtemps. L'authenticité de ces deux déclarations, basée sur des preuves caryotypiques et biochimiques, démontre maintenant qu'il est fort probable qu'au moins une partie des rapports précédents de fertilité de mule et de femelle bardot puisse avoir été véritable (Rong et al., 1988). Il semblerait donc qu'il existe plus de mules fertiles que ce qu'on aurait pu supposer (Chandley, 1988).

Ainsi, Taylor (1973) en conclut-il que ce qui est remarquable, n'est pas le fait que les mules soient stériles, mais que les deux sexes puissent occasionnellement réussir à produire des gamètes, même si la manière avec laquelle ils y parviennent demeure méconnue !

b) Etude cytogénétique et mystère de la ségrégation chromosomique

α) Théorie de l'élimination du lot de chromosomes paternels

Dans le cas de « Blue Moon », l'analyse chromosomique couplée à l'étude des marqueurs sanguins révèle que la mule « Krause » aurait transmis à son rejeton l'ensemble complet de ses chromosomes maternels (cheval). Selon ce schéma, la mule et son foal disposeraient alors exactement des mêmes constituants génétiques maternels.

Le mécanisme permettant à une femelle mule de transmettre uniquement les chromosomes maternels à sa descendance pourrait s'expliquer par le fait que le génotype paternel puisse être isolé dans le globule polaire, comme le suppose Anderson et al., 1939. Pour appuyer cette notion de ségrégation des chromosomes d'âne et de cheval non effectuée au hasard chez les mules et les femelles bardots, Chandley et al., 1974 font allusion à un phénomène apparemment similaire, appelé « affinité » chez des hybrides interspécifiques de souris, selon lequel la ségrégation des marqueurs ne s'effectue pas selon les lois du hasard. De façon intéressante, les autres cas de fertilité présumée de mules décrits précédemment répondaient également dans l'ensemble à ce modèle : les descendants des mules dont le père est un étalon semblent cheval en apparence, tandis que ceux dont le père est un âne ressemblent plutôt à des mules (Ryder et al., 1985).

β) Théorie du mélange au hasard de chromosomes parentaux

Contrairement à la mule du Nebraska « Krause » décrite par Ryder et al., 1985 qui semble avoir transmis l'ensemble complet de chromosomes maternels de cheval à son ovule ; le foal chinois « Dragon Foal » décrit par Rong et al., 1985 a hérité d'un mélange des deux ensembles de chromosomes de cheval et d'âne de sa mère mule.

De la même façon, les auteurs ont étudié le foal d'une femelle bardot dont le père est un âne. Ce foal compte 2 n = 63, et présente également un chromosome X de cheval et un d'âne. Parmi les autosomes, on retrouve clairement un mélange de chromosomes d'âne et de cheval, bien que ce mélange soit différent de celui observé chez « Dragon Foal ».

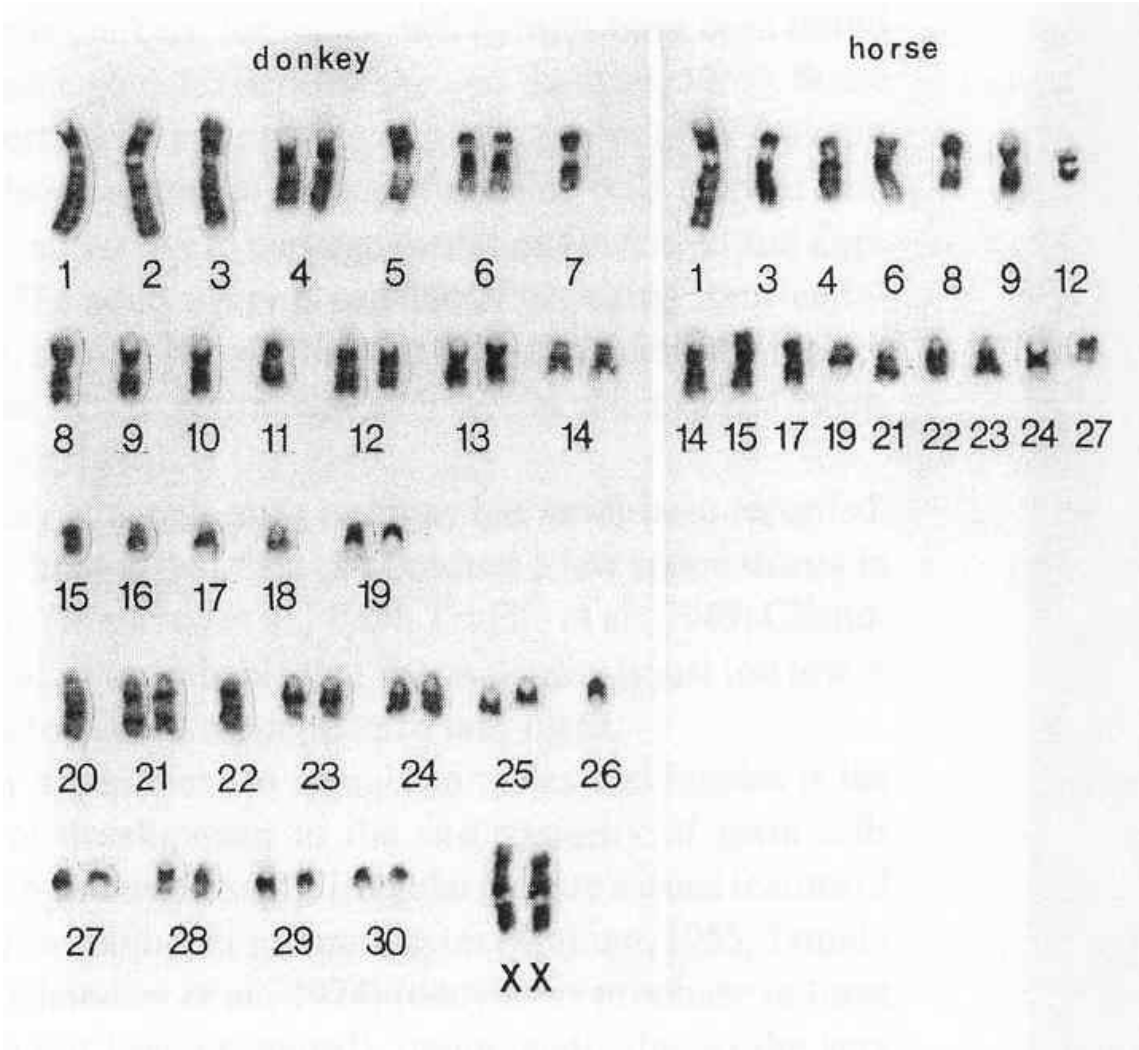
La viabilité des foals issus d'hybride avec une telle variabilité de combinaisons de chromosomes entre les deux espèces suggère que de considérables similarités génétiques existent encore entre *Equus caballus* et *Equus asinus*, malgré les différences structurales chromosomiques qui se sont développées au cours de l'évolution.

Chaque foal issu d'une mère hybride dispose d'un modèle caryotypique unique, qui diffère à la fois de celui de la mule ou femelle bardot, mais également différent les uns des autres.

Ainsi, le caryotype du foal de la femelle bardot présente un nombre de chromosomes métacentriques de 31, supérieur à celui du cheval (26) et inférieur à celui de l'âne (38), alors que le nombre de chromosomes acrocentriques de 30 est supérieur à celui de l'âne (22) et plus faible que celui du cheval (36).

De même, « Dragon Foal » a hérité de 31 chromosomes de sa mère mule, dont 16 sont d'origine équine maternelle, et les 15 restant d'origine asine paternelle (figure 58).

Figure 58 : Caryotype de « Dragon Foal » en bandes G avec séparation des chromosomes de cheval et d'âne (Rong et al., 1988).



A gauche : Chromosomes d'origine asine (31 hérités de son père âne et 15 de sa mère mule)
A droite : Chromosomes d'origine équine (15 hérités de sa mère mule).

Le principal obstacle à la fertilité chez les mules et les femelles bardots est l'échec de développement dans la grande majorité des cellules germinales durant la gamétogenèse. Les irrégularités synaptiques constituent une particularité habituelle des chromosomes en prophase dans les spermatocytes, indubitablement à cause des arrangements structuraux très différents entre les chromosomes d'âne et de cheval. Toutefois, des appariements presque normaux ont été observés par Chandley et al. (1974) à l'intérieur d'un spermatocyte de bardot ; ce pourrait être ce genre de cellules qui seraient alors capables d'accéder aux stades ultérieurs de la spermatogenèse.

L'appariement complet en prophase de méiose est considéré comme étant essentiel au développement normal des cellules germinales, en effet, de nombreux exemples dans la littérature décrivent une mort des cellules germinales associée à un échec synaptique.

Les mécanismes contrôlant l'initiation de l'appariement demeurent inconnus, bien que de nombreuses hypothèses aient été proposées. La complémentarité de séquences d'ADN nécessaire pour le crossing-over entre chromosomes homologues pourrait ne pas être à lui seul le principal élément gouvernant l'initiation de l'appariement. Chez des hybrides comme la mule ou la femelle bardot, où il existe d'énormes différences structurales entre les caryotypes des espèces parentales, il se pourrait bien que le problème de l'appariement méiotique ne repose pas autant sur le manque d'homologie entre les séquences génétiques, que sur la divergence de similarité structurale entre les chromosomes des deux espèces. Dans les rares cellules où l'appariement s'effectue et qu'un ovule ou un spermatozoïde est produit, il est possible que les recombinaisons génétiques puissent s'effectuer entre les chromosomes de cheval et d'âne. Les foals issus d'hybrides pourraient ainsi montrer des nouveaux chromosomes qui combineraient les caractéristiques de bandes des éléments individuels d'âne et de cheval.

L'observation des trois descendants d'hybrides décrits par Ryder et al. (1985) et Rong et al. (1985) mettent à l'épreuve l'hypothèse de Chandley (1981) qui suggère que les mouvements vers les pôles en anaphase I de méïose chez les mules et femelles bardots par lesquels les ensembles de chromosomes parentaux obéiraient aux lois de « l'affinité », avec l'élimination par le globule polaire de l'ensemble complet des chromosomes paternels en méïose. La mule du Nebraska de Ryder et al. (1985) semblerait effectivement obéir à cette règle ; mais pas la mule chinoise ni la femelle bardot de Rong et al. (1985 et 1988). L'élimination de l'ensemble des chromosomes paternels (d'âne) de l'ovocyte de mule pourrait ainsi être produit par croisement avec un âne. C'est certainement ce qui s'est passé dans le cas de la mule du Nebraska. Toutefois, chez « Dragon Foal » et le foal de la femelle bardot, un mélange des chromosomes de cheval et d'âne a eu lieu au hasard à l'intérieur de l'ovule. Les règles gouvernant la ségrégation méïotique chez les hybrides équins sont encore méconnues.

Des études chromosomiques complémentaires de cas de mules et de femelles bardots fertiles seraient nécessaires afin d'obtenir une réponse à la question du mécanisme aboutissant à des hybrides fertiles.

c) Progression graduelle vers la fertilité

Etant admis que la majorité des hybrides entre le cheval et l'âne sont stériles, conformément à l'hypothèse d'échec de la gamétogenèse, Zong et Fan (1989) se sont intéressés à évaluer la fertilité chez des hybrides (mules et bardots) par différents critères. Les

résultats de leur recherche, les a mené à conclure qu'il existe une variabilité dans le degré de stérilité et de fertilité à la fois des hybrides (F1) et de leurs descendants (B1).

α) Chez les femelles

Leurs observations ont porté sur le comportement d'œstrus, l'ovulation, l'accouplement, la gestation, la spermatogenèse, l'activité endocrinienne, les isoenzymes et les caryotypes. Elles montrent que la stérilité des mules et des femelles bardots n'est pas absolue. En effet, tandis que la plupart des hybrides (F1) sont stériles, un petit nombre de femelles hybrides peut occasionnellement donner naissance à un foal par accouplement avec un étalon ou un âne. La proportion de tels individus F1 est limitée, mais leur fertilité constitue pourtant un authentique phénomène.

Les auteurs considèrent que les études concernant la stérilité des mules et femelles bardots sont trop concentrées sur les principes cytologiques. L'hypothèse soulevée par Anderson (1939) et Chandley (1981) selon laquelle l'ovule des mules et femelles bardots fertiles contient uniquement un ensemble complet de chromosomes maternels, fournit une explication possible de la production d'une descendance génétiquement équilibrée par l'hybride fertile. Mais les auteurs estiment que l'explication de la stérilité des hybrides équins nécessitent une nouvelle approche.

Les résultats de leurs recherches montrent que le degré de stérilité des mules et femelles bardots est variable selon les individus hybrides F1 et que ceci est valable pour leurs descendants B1. En effet, parmis les mules et femelles bardots observées, certaines ne présentent jamais d'œstrus, tandis que d'autres sont occasionnellement en œstrus. Certaines femelles sont cyclées de manière irrégulière, alors que d'autres ont un cycle assez régulier. Certaines présentent des signes apparents d'œstrus alors que leurs follicules ne sont pas encore complètement développés, d'autres n'ovulent pas alors que leurs follicules sont bien développés. Ainsi, les règles générales de la biologie connaissent de grandes variations chez les mules.

β) Chez les mâles

Des degrés variés de fertilité existeraient également chez les hybrides mâles (mulets et bardots). Les tubes séminifères de plus de 20 mulets ont été observés, et la plupart de ces testicules ne contenaient que très peu de spermatocytes primaires. Mais quelques mulets et bardots ont présenté un petit nombre de spermatozoïdes dans leurs testicules. Jusqu'à maintenant, aucun rapport de mulet fertile n'a été publié, mais une telle possibilité pourrait exister. Ainsi, il est possible que cette progression vers la fertilité existe aussi chez les mâles.

γ) Chez les descendants des hybrides

L'étude des descendants B1 montre que la spermatogenèse des différents individus d'une même lignée n'est pas similaire. Ainsi, le degré de spermatogenèse chez les mâles B1 est supérieur à celui des mâles F1 apportant ainsi une preuve supplémentaire de la variabilité de la stérilité des hybrides et de l'avance progressive vers la fertilité.

δ) Chez d'autres espèces animales

Cette variabilité de la stérilité des hybrides et progression vers la fertilité n'intervient pas uniquement chez les hybrides de cheval et d'âne, mais est également retrouvée chez d'autres organismes tels que les oiseaux, les poissons et les insectes. Par exemple, en 1929 Lancetild a rapporté que la taille des testicules d'hybrides F1 de *Drosophila* était très variable. Dobzhansky en 1936 a montré que cette variabilité de la stérilité des hybrides et de l'avancée progressive vers la fertilité pouvaient être mises en relation avec les différentes combinaisons de chromosomes allodiploïdes. Il existe d'autres exemples comme celui-ci chez les mammifères : les mâles de la première génération du croisement *Bos gaurus x Bos taurus* sont stériles tandis que les femelles peuvent donner naissance à des descendants B1. Dans une observation (Zong et Fan, 1989), deux mâles B1 parmi 12 étaient fertiles avec seulement 30 % spermatozoïdes anormaux. Des croisements supplémentaires ont produit 9 descendants mâles B2 (individus appartenant à la descendance de B1). L'un de ces sujets B2disposait de tous ces spermatozoïdes normaux et donc d'une fertilité normale.

Ainsi Zong et Fan (1989) en concluent qu'il existe une variabilité dans le degré de stérilité et de fertilité à la fois chez les hybrides F1 mais également chez leurs descendants B1 avec une progression graduelle depuis la stérilité vers la fertilité.

Pour corroborer cette observation, Fan et al. (1992) ont analysé l'activité de l'isoenzyme estérase dans le sérum de mules et femelles bardots fertiles, ainsi que dans leur descendance. Il existe 4 bandes de l'isoenzyme estérase chez le sérum d'*Equus caballus*, dont 3 migrent rapidement dans le gel d'acrilamide (E3) et la 4ème migre lentement (E1). Chez *Equus asinus*, on retrouve seulement la bande E1. Les hybrides F1 issus de croisements interspécifiques réciproques, la mule et le bardot, présentent à la fois E1 et E3 dans leur sérum. La présence ou l'absence de cette isoenzyme estérase spécifique constitue une différence caractéristique d'espèce entre le cheval et l'âne, et constitue un marqueur génétique objectif pour l'étude des hybrides entre ces deux espèces.

Parmi les 3 descendants B1 issus d'un croisement d'une femelle bardot et d'un âne, 2 ne présentent pas la bande E3 dans leur sérum, alors que E3 est présent chez le 3ème. De même parmi les 4 descendants issus du croisement d'une mule et d'un âne, 2 présentent la bande E3 et les 2 autres ne l'ont pas. Ces résultats montrent que l'isoenzyme estérase de cheval peut ou non être transmise à un individu B1.

Il existe donc un modèle de transmission irrégulier à partir de la mule ou de la femelle bardot à sa descendance, qui ne suit pas nécessairement les règles précises établies dans de récentes hypothèses. Par exemple, pour expliquer la fertilité occasionnelle des mules, Anderson, 1939 suggérait que seulement les chromosomes maternels pouvaient être répartis dans l'ovule. Ce schéma a plus récemment été repris par Chandley, 1981 pour qui la ségrégation des chromosomes chez la mule et la femelle bardot pourrait être dirigée par les principes « d'affinité », un phénomène qui conduirait à une séparation complète ou presque complète de l'ensemble des génomes parentaux lors de la méiose chez les hybrides. Toutefois, les résultats de cette étude confortent l'idée qu'un mélange des chromosomes de cheval et d'âne puisse passer dans l'ovule de mule et de femelle bardot. De plus, le ratio et le mélange peuvent être variables d'un individu B1 à un autre.

Cette découverte est importante, non seulement parce qu'elle contribue à la compréhension de la spéciation, de l'évolution biologique mais également parce qu'elle peut nous aider à comprendre pourquoi il existe une progression graduelle chez les mules et les femelles bardots entre celles qui sont stériles et celles qui présentent une fertilité partielle ou complète.

Ainsi, même si la croyance légendaire s'attache à considérer stériles tous les hybrides d'équidés, il existe des hybrides interspécifiques parfaitement fertiles. Cette fertilité peut être occasionnelle comme c'est le cas pour les mules ou femelles bardots, ou systématique pour les deux sexes comme dans le croisement *Equus przewalskii x Equus caballus.* Même si, pour des espèces si différentes aussi bien phénotypiquement que caryotypiquement, le mécanisme sous-jacent n'est pas encore élucidé à ce jour, ces découvertes argumentées scientifiquement d'hybrides fertiles remettent en cause le concept général de la stérilité des hybrides.

CONCLUSION

La famille EQUIDAE se distingue par une extrême richesse en hybrides interspécifiques, liée à sa formidable capacité d'hybridation puisque les 8 espèces qui la constituent, aussi différentes soient-elles aussi bien phénotypiquement que caryotypiquement, sont toutes susceptibles de donner naissance à des hybrides par croisement interspécifique entre elles.

La question de la fertilité des hybrides a toujours suscité l'intérêt des scientifiques et motivé de nombreuses études bien que les hybrides interspécifiques des équidés ne constituent qu'un modèle biologique sans intérêt économique réelle, contrairement par exemple au croisement entre le canard de Pékin et la cane de Muscovy qui conduit à la production de mulards, hybrides intensément exploités dans la fabrication du foie gras.

Même si la fertilité de certains hybrides est maintenant reconnue, le mécanisme conduisant à la formation des gamètes reste méconnu, et il faudrait encore faire progresser les connaissances avant d'espérer pouvoir faire se reproduire naturellement avec succès les hybrides entre eux et non plus les espèces parentales. Mais aujourd'hui, l'heure est plutôt à la reproduction assistée et les recherches se concentrent surtout sur les techniques modernes de transfert embryonnaire extraspécifique ou de clonage. Ainsi en mai 2003 est né le premier mulet cloné et les scientifiques espèrent déjà que le clonage pourra à l'avenir compenser le défaut de fertilité des hybrides.

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN WR (1975) The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progestagen production in Equids. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **23**, 405-413.

- ALLEN WR, KYDD JH, BOYLE MS, ANTCZAK DF. (1985) Between-species transfer of horse and donkey embryos : a valuable research tool. *Equine Vet. J.. Suppl.* **3**, 53-62.

- ALLEN WR, KYDD JH, ANTCZAK DF. (1993) Interspecies and extraspecies equine pregnancies. *In :* McKINNON, VOSS, *Equine reproduction,* Ed. Philadelphia : Lea and Fediger, Chapt. **63**, 536-553, 1137 p.

- ALLEN WR, SHORT RV. (1997) Interspecific and extraspecific pregnancies in Equids : anything goes. *J. Hered., **88** (5),* 384-392.

- ANDERSON WS. (1939) Fertile mare mules. *J. Hered.* ,**30** ; 549-551.

- ANTCZAK DF, DAVIES CJ, KYDD JH, ALLEN WR. (1985) Immunological aspects of pregnancy in mules. *Equine Vet. J;. Suppl***.** **3**, 68-72.

- ASBURY AC, LEBLANC MM. (1993) The placenta. *In :* McKINNON, VOSS, *Equine reproduction,* Ed. Philadelphia : Lea and Fediger, Chapt. **60**, 509-516, 1137 p.

- BAILEY E. (1982) Prevalence of anti-red blood cell antibodies in the serum and colostrum of mares and its relationship to neonatal isoerythrolysis. *Am. J. Vet. Res.;* **43**, 1917-1921.

- BAILEY E, ALBRIGHT DG, HENNEY PJ. (1988) Equine neonatal isoerythrolysis : evidence for prevention by maternal antibodies to the Ca blood group antigen. *Am. J. Vet. Res.*, **49**, 1218-1222.

- BAKER JM, BAMFORT AI, ANTCZAK DF. (1999) Modulation of allospecific CTL responses during pregnancy in Equids : an immunological barrier to interspecies matings ? J. *Immunol.,* **162** , 4497-4501.

- BENNETT SD, FOSTER WR. (1985) Successful transfer of a zebra embryo to a domestic horse. *Equine Vet. J. Suppl.* **3**, 78-79.

- BENIRSCHKE K, LOW RJ, SULLIVAN MM, CARTER RM. (1964) Chromosome study of an alleged fertile mare mule. *J. Hered.,* **55** ; *31-38.*

- BENIRSCHKE K, RYDER OA. (1985) Genetic aspects of equids with particular reference to their hybrids. *Equine Vet. J., Suppl* **3**, 1-10.

- CAROLI J, BESSIS M. (1947) Recherches sur la cause de l'ictère grave familial des muletons (ses rapports avec la maladie hémolytique du nouveau-né) *Rev. Hemato. ,* **2**,207-228.

- CHANDLEY AC, SHORT RV, ALLEN WR. (1975) Cytogenetic studies of three equine hybrids. *J. Reprod. Fert., Suppl.* ***23****, 365-370.*

- CHANDLEY AC. (1988) Fertiles mules. *J. Roy. Soc. Med.*, **81**, 2.

- COUTURE L, LEMONIER JP, ROBERT P, BIDART JM. (1994) Etude immunochimique de l'hormone Chorionique Gonadotrope Equine (eCG) et de ses sous-unités. *Prat. Vet. Equine, Vol.* **26,** n°2, 121-127.

- CRUMP AL, DAVIES CJ, ANTCZAK DF. (1985) Genetic control of immune responses to major histocompatibility complex antigens during equine pregnancy. *Equine Vet. J., Suppl.* **3,** 76-77.

- DARRE R, DARRE A, BERLAND HM, PAGET S, BRUN-BARONAT C, PINTON A, SEGUELA A, DUCLOS A. (2000) Cytogénétique clinique des troubles de la reproduction chez le cheval. *Prat. Vet. Equine, Vol.* ***32****, n°****128****, 21-30.*

- DAVIES CJ, ANTCZAK DF, ALLEN WR. (1985) Reproduction in mules : Embryo transfer using sterile recipients. *Equine Vet. J., Supl.* **3**, 63-67.

- FAN G, ZONG E, ZHAO Z. (1992) A genetic study of esterase activity in mules, hinny and their backcross progeny. *Heredity*, **68**, 89-92.

- FIELDING D. (1988) Reproductive characteristics of the jenny donkey (*Equus asinus*) : a review. *Trop. Anim. Hlth Prod.,* **20**, 161-166.

- FLOOD PF. (1993) Fertility, early development and the establishment of the placenta. *In :* McKINNON, VOSS, *Equine reproduction,* Ed. Philadelphia : Lea and Fediger, Chapt. **56**, 473-483, 1137 p.

- GERSTENBERG C, ALLEN WR, STEWART F. (1999) Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. *J. Reprod. Fert.,* **117**, 143-152.

- GRAY AP. (1972) Familly Equidae. *In : Mammalian hybrids.* 2nd ed. Slough : Commonwealth Agricultual Bureaux, 94-113, 372 p.

- GUNTER NOBIS DR. (1992) Histoire du cheval : évolution et domestication. *In :* CHEESE P, FORTUNEL E, LHEMANNE JL, LAPEIRE C, MONTFORT AF, MONFORT M. *Nouvelle encyclopédie du cheval.* Ed. Paris : Maloine, 9-26, 785p.

- HALNAN CRE. (1989) Studies in the mule and Przewalski horse. *In : Cytogenetics of animals.* Ed. Sydney : Halnan, 200-202.

- HANAK I. (1985) La famille des Equidés. *In : Encyclopédie des animaux,* Ed. Paris : GRUND, 56-72, 124p.

- HENRY M, GASTAL EL, PINHEIRO LE, GUIMARME SE. (1995) Mating pattern and chromosome analysis of a mule and her offspring. *Equine Reprod. Suppl. 32,* 273-279.

- HENRY M. (2001) Quelques caractéristiques de la reproduction des ânes. *Prat. Vet. Equine,* **33** n°**129**, 11-20.

- HERNANDEZ-JAUREGUI P, MARQUEZ-MONTER H. (1977) Fine structure of mule testes : light and electron microscopy study. *Am. J. Vet. Res.,* **38**, n°**4**, 443-447.

- JONES CJ, WOODING FB, ABD-ELNAEM MM, LEISER R, DANTZER V, STODDART RV. (2000) Glycosylation in the near-term epitheliochorial placenta of the horse, donkey and camel : a comparative study of interbreeding and non-interbreeding species. *J. Reprod. Fert.,* **118**, 397-405.

- KOBOZIEFF J, POMRIASKINSKY-KOBOZIEFF M. (1943) Stérilité et génétique. *In : Précis de génétique appliquée à la médecine vétérinaire.* Ed. Vigot frères, Paris (VIe), 143p.

- KOULISCHER L, FRECHKOP S. (1966) Chromosome complement : a fertile hybrid between *Equus przewalskii* and *Equus caballus*. *Science*, **151**, 93-95.

- KYDD J, MILLER J, ANTCZAK DF, ALLEN WR. (1982) Maternal anti-fetal cytotoxic antibody responses of equids during pregnancy. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **32**, 361-369.

- KYDD J, BOYLE MS, ALLEN WR. (1985) Transfer of exotic equine embryos to domestic horse and donkey. *Equine Vet. J., Suppl.* **3**, 80-83.

- KYDD J, BUTCHER GW, ANTCZAK DF, ALLEN WR. (1991) Expression of major histocompatibility complex (MHC) class 1 molecules on early trophoblast. *J. Reprod. Fert.,*.Suppl. **44**, 463-477.

- LANDIM FC, BORTOLOZZI J. (1994) Ultrastructure of the hinny (*Equus asinus x Equus caballus*) seminiferous epithelium. *Anat. Histol. Embryol.* **23**, 343-351.

- MARCENAC LN, AUBLET H, D'AUTHEVILLE P. (1980) *Encyclopédie du cheval*. 4ème ed Paris : Maloine, 704-709, 1350p.

- MC CLURE JJ, KOCH C, TRAUB-DARGATZ J. (1994) Characterization of a red blood cell antigen in donkeys and mules associated with neonatal isoerythrolysis. *Animal genetics* **25**, 119-120.

- POWER MM. (1990) Chromosomes of the Horse. *In : Domestic animal cytogenetics. Vol.***34**, Ed. Pennsylvania : Mc FEELY RA., 131-167, 324p.

- QUINTERO F, ZARCO L, VALENCIA J. (1996) Transferencia de embriones hibridos (E. caballus X E. asinus) en mulas. *Vet. Mex.* **27 (2)**, 175-177.

- RONG R, CAI H, YANG X, WEI J. (1985) Fertile mule in China and her unusual foal. *J. Royal Soc. Med.*, **78**, 821-825.

- RONG R, CHANDLEY AC, SONG J, Mc BEATH S, TAN PP, BAI Q, SPEED RM. (1988) A fertile mule and hinny in China. *Cytogenet. Cell Genet.,* **47**, 134-139.

- RYDER OA, EPEL NC, BENIRSCHKE K. (1978) Chromosome banding studies of the Equidae. *Cytogenet. Cell Genet.,* **20**, 323-350.

- RYDER OA, CHEMNICK LG, BOWLING AT, BENIRSCHKE K. (1985) Male mule foal qualifies as the offspring of a female mule and jack donkey. *J. Hered.*, **76**, 379-381.

- SAINT-MARTIN A. (1952) Prophylaxie et traitement de l'ictère du muleton. *Rev. Med. Vet.,* **103**, 263-268.

- SAMUEL CA, ALLEN WR, STEVEN DH. (1975) Ultrastructural development of the equine placenta. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **23**, 575-578.

- SCOTT AM, JEFFCOTT LB. (1978) Haemolytic disease of the newborn foal. *Vet. Rec.,* **103**, 71-74.

- SHELDRICK EL, WRIGHT PJ, ALLEN WR, HEAP RB. (1977) Metabolic rate, production rate, and source of progesterone in donkey with fetus of different genotypes. *J. Reprod. Fert.*, **51**, 473-476.

- SHORT RV. (1975 a) The evolution of the horse. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **23**, 1-6.

- SHORT RV. (1975 b) The contribution of the mule to scientific thought. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **23**, 359-364.

- STEWART F, ALLEN WR, MOOR RM. (1977) Influence of fœtal genotype on the Follicle Stimulating Hormone : Luteinizing Hormone ratio of pregnant mare serum gonadotrophin. *J. Endocrino.,* **73**, 419-425.

- STEVEN DH, SAMUEL CA. (1975) Anatomy of the placental barrier in the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.***23**, 579-582.

- STEVEN DH. (1982) Placentation in the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **31**, 41-55.

- STEWART F., ALLEN WR. (1981) Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. *J. Reprod. Fert.,* **62**, 527-536.

- SUMMERS PM, SHEPARD AM,HODGES JK, KYDD J, BOYLE MS, ALLEN WR. (1987) Successful transfer of the embryos of Przewalski's horses (*Equus przewalskii*) and Grant's zebra (*E. burchelli*) to domestic mares *(E. caballus*). *J. Reprod. Fert.,* **80**, 13-20.

- TAYLOR MJ, SHORT RV. (1973) Development of the germ cells in the ovary of the mule and hinny. *J. Reprod. Fert.* **32**, 441-445.

- TEGETMEIER D, SUTHERLAND J. (1895) Horses, Asses, Zebras, Mules and Mule breeding. Ed. Horace Cox, London, 72p.

- TRAUB-DARGATZ J, Mc CLURE JJ, KOCH C, SCHLIPF JW. (1995) Neonatal isoerythrolysis in mule foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.,* **206**, 67-70.

- WHITFIELD LS (1993) Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene *SRY*. *Nature.* ***364***, 713-715.

- WILKERSON MJ, DAVIES E, SHUMAN W, HARKIN K, COX J, RUSH B. (2000) Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune mediated hemolytic anemia. *J. Vet. Intern. Med.,* **14**, 190-196.

- ZONG E, FAN G. (1988) The variety of sterility and gradual progression to fertility in hybrids of the horse and donkey. *Heredity,* **62**, 393-406.

LES HYBRIDES INTERSPECIFIQUES CHEZ LES EQUIDES

NOM et Prénom : PETRUS Isabelle

RESUME :

La Famille EQUIDAE englobe 8 espèces différentes, incluant à la fois les chevaux, les ânes et les zèbres. L'originalité de cette famille réside dans le fait que toutes ces espèces sont capables de se croiser entre elles pour donner naissance à des hybrides interspécifiques. Ainsi peut-on dénombrer presque autant de catégories d'hybrides qu'il existe de croisements potentiels ; même si seuls les mulets et bardots sont réellement connus et significativement représentés.

Les divergences phénotypiques et caryotypiques qui existent entre ces 8 espèces expliquent les particularités immunologiques et hormonales de la gestation interspécifique. Post-partum, les hybrides nouveau-nés sont très fréquemment affectés d'anémie hémolytique immunitaire.

Les hybrides interspécifiques, notamment la mule, sont réputés pour leur stérilité, en raison des difficultés rencontrées lors de l'appariement des chromosomes au cours de la méiose, les cellules germinales de ces animaux dégénérant au début du processus de méiose. Toutefois, certains hybrides, tels que les individus mâles et femelles issus du croisement *Equus przewalskii x Equus caballus,* sont systématiquement fertiles. De même, quelques mules et femelles bardots peuvent occasionnellement donner naissance à une descendance. Mais le mécanisme de formation des gamètes chez ces animaux n'est que partiellement élucidé.

MOTS-CLES :
Equidés – Hybrides interspécifiques – Immunologie – Gestation extraspécifique - Anémie hémolytique - Stérilité – Fertilité.

JURY :
Président : Pr
Directeur : Dr CHASTANT-MAILLARD
Assesseur : Pr BOSSE
Invité : M.

Adresse de l'auteur :
Melle PETRUS Isabelle
44 bis avenue Joliot Curie
41200 VILLEFRANCHE SUR CHER

INTERSPECIFIC HYBRIDS IN EQUIDS

SURNAME : PETRUS
Given name : Isabelle

SUMMARY :

EQUIDAE family comprises eight different species including horses, donkeys and zebra. This family's originality lies in the fact that all these species are able to interbreed for giving birth to interspecific hybrids. So there are nearly as many hybrids'categories as potential interbreedings; even if only mules and hinny are really known and significatively represented.

The phenotypical and karyotypical differences which exist between these eight species can explain that interspecific hybrid's production is characterised on the one hand by immunologic and hormonal features of gestation, and on the other hand by an immune pathology of post-partum, named neonatal isoerythrolysis of mule foals, that frequently affect hybrids foals.

Interspecific hybrids, and particularly the mule, are renowned for their sterility, because of chromosomal pairing's difficulties during meiosis. Germinal cells of those animals degenerate at the beginning of meiosis. Nevertheless, some hybrids, as male and female stemming from interbreeding of *Equus przewalskii* and *Equus caballus*, are systematically fertiles. At the same, some females mules and hinnies can occasionally give birth to descendant. But the mechanism of gametes'production is only partially cleared up.

KEY WORDS :
Equids – Interspecific hybrids – Immunology – Extraspecific gestation - Neonatal isoerythrolysis – Sterility – Fertility.

JURY :
President : Pr
Director : Pr CHASTANT-MAILLARD
Assessor : Pr BOSSE
Guest : M.

Author's Address :
Melle PETRUS Isabelle
44 bis avenue Joliot Curie
41200 VILLEFRANCHE SUR CHER