

**EVALUATION DE L'INFLUENCE DE LA RACE
ET DU CYCLE ŒSTRAL SUR LA DENSITÉ
DES GLANDES ENDOMETRIALES ÉQUINES**

**EVALUATION OF THE INFLUENCES OF BREED
AND OESTROUS CYCLE UPON ENDOMETRIAL
GLAND DENSITY IN THE MARE**

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2001
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Anne-Cécile, Sylvie LEFRANC
Née, le 2 mai 1978 à SOUSSE (Tunisie)

Directeur de thèse : M. le Docteur Dominique BERGONIER

JURY

PRESIDENT :
M. Jean PARINAUD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Dominique BERGONIER
M. Xavier BERTHELOT

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

MEMBRE INVITE :
M. W.R. ALLEN

Professeur à l'Université de CAMBRIDGE (GB)

A la mémoire du Dr Francesca STEWART,

In memory of Dr Francesca STEWART,

Sincères remerciements,

A mon jury de thèse,

Au Pr Jean PARINAUD,

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier,
Biologie du Développement et de la Reproduction, CHU La Grave, Toulouse.

Pour m'avoir fait l'honneur de présider ma thèse,

Au Dr Dominique BERGONIER,

Maître de Conférences,
Pathologie de la Reproduction, Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse.

Pour m'avoir encadrée dans mon travail et encouragée dans mes démarches,

Au Pr Xavier BERTHELOT,

Professeur,
Pathologie de la Reproduction, Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse.

Pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail,

Au Pr W.R. (Twink) ALLEN, BVSc, PhD, ScD, DESM, MRCVS

Professeur en Reproduction Equine, Université de Cambridge, Angleterre.
Directeur Scientifique de l'Unité de Fertilité Equine, Newmarket, Angleterre.

*Pour m'avoir transmis la passion pour la recherche en reproduction équine,
Pour m'avoir soutenue et fait confiance durant mes études vétérinaires,
Pour la disponibilité continue et les précieux conseils,*

A l'ensemble de l'équipe de l'Unité de Fertilité Equine,

Pour m'avoir encadrée et aidée dans mes manipulations pendant toute l'année,

A ma famille et à mes amis,

Pour être une source continue de soutien et d'encouragement.

Sincere gratitude,

To the members of my examination jury,

To Pr Jean PARINAUD,

Professor – Hospital doctor,
Biology of Development and of Reproduction, La Grave Hospital, Toulouse.

For according me the privilege of presiding my thesis,

To Dr M. Dominique BERGONIER,

Lecturer,
Pathology of Reproduction, National Veterinary School, Toulouse.

For having supervised my work and helped me in all my inquiries,

To Pr Xavier BERTHELOT,

Professor,
Pathology of Reproduction, National Veterinary School, Toulouse.

For according me the privilege of judging my work,

To Pr W.R. (Twink) ALLEN, BVSc, PhD, ScD, DESM, MRCVS

Professor of Equine Reproduction, Cambridge University, England.
Scientific Director of the Equine Fertility Unit, Newmarket, England.

*For sharing his passion of equine reproduction,
For his support and his trust during my veterinary studies,
For his continuous availability and his precious advice,*

To the Equine Fertility Unit team,

For the help and advice throughout the year,

To my family and to my friends,

For the constant support and encouragement in all my projects.

Chapitre 1

INTRODUCTION GENERALE

1.1. GENERALITES EN REPRODUCTION EQUINE

1.1.1. L'activité sexuelle

- 1.1.1.1. La saison de reproduction p 16
- 1.1.1.2. Le cycle œstral p 16

1.1.2. Endocrinologie du cycle œstral p 18

1.1.3. L'influence des facteurs externes

- 1.1.3.1. Lumière p 24
- 1.1.3.2. Autres facteurs externes p 24

1.2. LE TRACTUS GENITAL DE LA JUMENT

1.2.1. Les organes génitaux internes

- 1.2.1.1. Ovaires p 28
- 1.2.1.2. Oviductes p 30
- 1.2.1.3. Utérus p 30
- 1.2.1.4. Vagin et col utérin p 32

1.2.2. L'endomètre

- 1.2.2.1. La paroi utérine p 38
- 1.2.2.2. Structure histologique p 42
- 1.2.2.3. Changements annuels p 44
- 1.2.2.4. Influence du cycle œstral p 44

1.3. LA STEREOLOGIE

1.3.1. But de la stéréologie p 52

1.3.2. Orientation de la section plane p 52

1.3.3. Estimateur non biaisé : densité de surface (Sv) p 54

Chapter 1

GENERAL INTRODUCTION

1.1. REPRODUCTION IN THE MARE

1.1.1. Sexual activity

- 1.1.1.1. The annual ovarian cycle p 17
- 1.1.1.2. The oestrous cycle p 17

1.1.2. Endocrinology of the oestrous cycle p 19

1.1.3. The influence of external factors

- 1.1.3.1. Light p 25
- 1.1.3.2. Other external factors p 25

1.2. THE REPRODUCTIVE TRACT OF THE MARE

1.2.1. The internal reproductive organs

- 1.2.1.1. Ovaries p 29
- 1.2.1.2. Oviducts p 31
- 1.2.1.3. Uterus p 31
- 1.2.1.4. Vagina and cervix p 33

1.2.2. The endometrium

- 1.2.2.1. Structure of the uterine wall p 39
- 1.2.2.2. Histological structure p 43
- 1.2.2.3. Annual changes p 45
- 1.2.2.4. Influence of the oestrous cycle p 45

1.3. THE TECHNIQUE OF STEREOLOGY

1.3.1. Aim of stereology p 53

1.3.2. Plane section orientation p 53

1.3.3. Unbiased estimator : surface density (Sv) p 55

Chapitre 2

ETUDE DE L'INFLUENCE DE LA RACE ET DU CYCLE OESTRAL SUR LA DENSITE DES GLANDES ENDOMETRIALES

2.1. INTRODUCTION p 60

2.2. MATERIELS ET METHODES

2.2.1. Animaux p 72

2.2.2. Suivi du cycle oestral p 76

2.2.3. Biopsies endométriales

2.2.3.1. Préparation de la jument p 78

2.2.3.2. Biopsie sous contrôle visuel vidéoendoscopique p 78

2.2.4. Préparation des tissus

2.2.4.1. Fixation p 82

2.2.4.2. Traitement p 82

2.2.4.3. Section et coloration des tissus p 82

2.2.5. Mesure de la densité des glandes endométriales p 84

2.3. RESULTATS EXPERIMENTAUX

2.3.1. Expérience 1 : Evaluation stéréologique de la densité des glandes endométriales dans l'utérus de la jument p 88

2.3.2. Expérience 2 : Evaluation de l'influence de la race et du cycle oestral sur la densité des glandes endométriales équinnes p 92

2.4. DISCUSSION p 104

Chapter 2

EVALUATION OF THE INFLUENCES OF BREED AND OESTROUS CYCLE UPON ENDOMETRIAL GLAND DENSITY

2.1. INTRODUCTION	p 61
2.2. MATERIALS AND METHODS	
2.2.1. Experimental animals	p 73
2.2.2. Monitoring the oestrous cycle	p 77
2.2.3. Recovery of endometrial biopsies	
2.2.3.1. Preparation of the mare	p 79
2.2.3.2. Biopsy technique under videoendoscopic visual control	p 79
2.2.4. Preparation of tissues	
2.2.4.1. Fixation	p 83
2.2.4.2. Processing	p 83
2.2.4.3. Cutting and staining sections	p 83
2.2.5. Measurement of endometrial gland surface density	p 85
2.3. EXPERIMENTAL RESULTS	
Experiment 1 : Stereological evaluation of endometrial gland surface density throughout the mare's uterus	p 89
Experiment 2 : The influences of breed and oestrous cycle upon endometrial gland surface density in the mare	p 93
2.4. DISCUSSION	p 105

REFERENCES p 111

Annexe 1 :

Fixation et traitement des tissus utérins p 117

Annexe 2 :

Coloration à l'Hæmatoxyline et Eosine (H&E) p 119

Annexe 3 :

Valeurs individuelles de densités de surface en glandes endométriales p 121

Annexe 4 :

Données statistiques p 123

Annexe 5 :

Abstract soumis au congrès de l'ESDAR (European Society for Domestic
Animal Reproduction) de Viennes (Septembre 2001) p 125

LEFRANC, A.C. and ALLEN, W. R. Stereological comparison of endometrial gland density in Welsh pony and Thoroughbred mares during the oestrous cycle.

REFERENCES p 111

Appendix 1 :

Tissue fixation and processing protocol p 117

Appendix 2 :

Haematoxylin and Eosin (H&E) staining protocol p 119

Appendix 3 :

Endometrial gland surface density measurements in individual mares p 121

Appendix 4 :

Statistical analyses p 123

Annexe 5 :

**Abstract submitted to the ESDAR (European Society for Domestic
Animal Reproduction) conference in Vienna (September 2001)** p 125

LEFRANC, A.C. and ALLEN, W. R. Stereological comparison of endometrial gland density in Welsh pony and Thoroughbred mares during the oestrous cycle.

Table des illustrations

Figures :

- Figure 1 :** Représentation des profils hormonaux dans la circulation générale de la jument pendant le cycle œstral. D'après Allen (1987) p 23
- Figure 2 :** Influence des facteurs extéroceptifs et des hormones endogènes sur les fonctions de reproduction de la jument. Schéma amélioré de Allen (1987) p 27
- Figure 3 :** Topographie des organes génitaux de la jument *in situ* p 35
- Figure 4 :** Représentation schématique du tractus génital de la jument p 35
- Figure 5 :** Le tractus génital de la jument (photo) p 37
- Figure 6 :** Ovaire - vue externe (photo) p 37
- Figure 7 :** Ovaire - coupe longitudinale (photo) p 37
- Figure 8 :** Structure de la paroi utérine. Schéma amélioré de McKinnon and Voss (1993) p 39
- Figure 9 :** Section histologique de la paroi utérine de la jument (photo) p 41
- Figure 10 :** Structure histologique d'une glande endométriale (photo) p 41
- Figure 11 :** Structure histologique de l'endomètre de la jument.
D'après Kenney and Doig (1986) p 43
- Figure 12 :** Section histologique de l'endomètre pendant l'œstrus (photo, x 50) p 49
- Figure 13 :** Stroma œdémateux pendant l'œstrus (photo, x 150) p 49
- Figure 14 :** Epithélium haut cylindrique pendant l'œstrus (photo, x 300) p 49
- Figure 15 :** Section histologique de l'endomètre pendant le diœstrus (photo, x 50) p 51
- Figure 16 :** Glandes disposées en "collier de perles" pendant le diœstrus (photo, x 150) p 51
- Figure 17 :** Epithélium cuboïdal bas pendant le diœstrus (photo, x 300) p 51
- Figure 18 :** Le concept des plans verticaux. D'après Baddeley *et al.* (1986) p 55
- Figure 19 :** Obtention de lignes isotropiques réparties de façon uniformément aléatoire dans l'espace tridimensionnel. D'après Baddeley *et al.* (1986) p 57
- Figure 20 :** Le placenta épitheliochorial de la jument. D'après Bracher *et al.* (1997) p 65

Illustration table

Figures :

Figure 1 : Hormone profiles in the peripheral serum of the mare during the oestrous cycle. From Allen (1987)	p 23
Figure 2 : Exteroceptive factors and endogenous hormones controlling reproductive function in the mare. Arranged from Allen (1987)	p 27
Figure 3 : Topography of the mare's genital organs <i>in situ</i>	p 35
Figure 4 : Diagrammatic representation of the reproductive tract of the mare	p 35
Figure 5 : The reproductive tract of the mare (picture)	p 37
Figure 6 : Ovary – external view (picture)	p 37
Figure 7 : Ovary – open-section (picture)	p 37
Figure 8 : The uterine wall structure. Arranged from McKinnon and Voss (1993)	p 39
Figure 9 : Histological section of the equine uterine wall (picture)	p 41
Figure 10 : Histological structure of an endometrial gland (picture)	p 41
Figure 11 : Histological structure of the endometrium of the mare. From Kenney and Doig (1986)	p 43
Figure 12 : Histological section of the endometrium during oestrus (picture, x 50)	p 49
Figure 13 : Stromal oedema during oestrus (picture, x 150)	p 49
Figure 14 : Tall columnar epithelium during oestrus (picture, x 300)	p 49
Figure 15 : Histological section of the endometrium during dioestrus (picture, x 50)	p 51
Figure 16 : Glands arranged in a 'string of pearls' during dioestrus (picture, x 150)	p 51
Figure 17 : Cuboidal epithelium during dioestrus (picture, x 300)	p 51
Figure 18 : The concept of vertical planes. From Baddeley <i>et al.</i> (1986)	p 55
Figure 19 : Isotropic uniformly random lines in three dimensions. From Baddeley <i>et al.</i> (1986)	p 57
Figure 20 : The epitheliochorial microcotyledonary placenta of the horse. From Bracher <i>et al.</i> (1997)	p 65

Figure 21 : Représentation schématique d'un endomètre sain et de l'endomètre d'une jument âgée avec un kyste	p 65
Figure 22 : Localisations des prélèvements endométriaux en <i>post-mortem</i>	p 73
Figure 23 : Suivi échographique de la croissance folliculaire et de l'ovulation	p 77
Figure 24 : Examen vidéoendoscopique du tractus génital (photo)	p 81
Figure 25 : Visualisation de la bifurcation des cornes utérines par endoscopie (photo)	p 81
Figure 26 : Ecartement des mâchoires de la pince à biopsie pour emprisonner un pli endométrial (photo)	p 81
Figure 27 : Pli endométrial emprisonné entre les mâchoires de la pince à biopsie.(photo) ...	p 81
Figure 28 : Grille de 36 "points test" superposés à une section histologique verticale	p 87
Figure 29 : 36 segments tests superposés à la section, avec 35 intersections comptabilisées ..	p 87
Figure 30 : Section histologique de l'endomètre d'une ponne Galloise pendant l'œstrus (photo, x 30)	p 101
Figure 31 : Section histologique de l'endomètre d'une jument Thoroughbred pendant l'œstrus (photo, x 30)	p 101
Figure 32 : Section histologique de l'endomètre d'une ponne Galloise à mi-diœstrus (photo, x 30)	p 103
Figure 33 : Section histologique de l'endomètre d'une jument Thoroughbred à mi-diœstrus (photo, x 50)	p 103

Tableaux :

Tableau 1 : Densités de surfaces moyennes des glandes endométriales de ponnettes Galloises en œstrus	p 89
Tableau 2 : Densités de surface moyennes des glandes endométriales de ponnettes Galloises et de juments Thoroughbred pendant le cycle œstral	p 93

Graphiques :

Graphique 1 : Densités de surface moyennes des glandes endométriales de ponnettes Galloises en œstrus	p 91
Graphique 2 : Densités de surface moyennes des glandes endométriales de ponnettes Galloises et de juments Thoroughbred pendant le cycle œstral	p 97

Figure 21 : Diagrammatic representation of the endometrium in a healthy young mare and in an aged mare suffering from endometrosis	p 65
Figure 22 : Locations of the endometrial samples recovered <i>post-mortem</i>	p 73
Figure 23 : Ultrasonographic visualisation of follicular development and ovulation	p 77
Figure 24 : Videoendoscopic examination of the uterus (picture)	p 81
Figure 25 : Endoscopic visualisation of the bifurcation of the uterine horns (picture)	p 81
Figure 26 : Biospy forceps jaws opened and apposed to the uterine wall (picture)	p 81
Figure 27 : A fold of endometrium trapped in the jaws of the biopsy forceps after evacuation of the air from the uterine horn (picture)	p 81
Figure 28 : Test sytem grid of 36 test points overlaid on a vertical histological section	p 87
Figure 29 : Total of 36 linear probes ('needles') overlaid on the section, with 35 intersections counted	p 87
Figure 30 : Histological section of a Welsh Pony mare's endometrium during oestrus (picture, x 30)	p 101
Figure 31 : Histological section of a Thoroughbred mare's endometrium during oestrus (picture, x 30)	p 101
Figure 32 : Histological section of a Welsh Pony mare's endometrium at mid-dioestrus (picture, x 30)	p 103
Figure 33 : Histological section of a Thoroughbred mare's endometrium at mid-dioestrus (picture, x 50)	p 103

Tables :

Table 1 : Mean endometrial gland surface density values throughout the uterus of Welsh Pony mares in oestrus	p 89
Table 2 : Mean endometrial gland surface density values in Welsh Pony and Thoroughbred mares throughout the oestrous cycle	p 93

Graphs :

Graph 1 : Mean endometrial gland surface density in Welsh Pony mares in oestrus	p 91
Graph 2 : Mean endometrial gland surface density in Welsh Pony and Thoroughbred mares throughout the oestrous cycle	p 97

Chapitre 1

INTRODUCTION GENERALE

1.1. GENERALITES EN REPRODUCTION EQUINE

1.1.1. L'activité sexuelle

1.1.1.1. La saison de reproduction

1.1.1.2. Le cycle œstral

1.1.2. Endocrinologie du cycle œstral

1.1.3. L'influence des facteurs externes

1.1.3.1. Lumière

1.1.3.2. Autres facteurs externes

1.2. LE TRACTUS GENITAL DE LA JUMENT

1.2.1. Les organes génitaux internes

1.2.1.1. Ovaires

1.2.1.2. Oviductes

1.2.1.3. Utérus

1.2.1.4. Col utérin et vagin

1.2.2. L'endomètre

1.2.2.1. La paroi utérine

1.2.2.2. Structure histologique

1.2.2.3. Changements annuels

1.2.2.4. Influence du cycle œstral

1.3. LA STEREOLOGIE

1.3.1. But de la stéréologie

1.3.2. Orientation de la section plane

1.3.3. Estimateur non biaisé : densité de surface (Sv)

Chapter 1

GENERAL INTRODUCTION

1.1. REPRODUCTION IN THE MARE

1.1.1. Sexual activity

- 1.1.1.1. The annual ovarian cycle
- 1.1.1.2. The oestrous cycle

1.1.2. Endocrinology of the oestrous cycle

1.1.3. The influence of external factors

- 1.1.3.1. Light
- 1.1.3.2. Other external factors

1.2. THE REPRODUCTIVE TRACT OF THE MARE

1.2.1. The internal reproductive organs

- 1.2.1.1. Ovaries
- 1.2.1.2. Oviducts
- 1.2.1.3. Uterus
- 1.2.1.4. Vagina and cervix

1.2.2. The endometrium

- 1.2.2.1. Structure of the uterine wall
- 1.2.2.2. Histological structure
- 1.2.2.3. Annual changes
- 1.2.2.4. Influence of the oestrous cycle

1.3. THE TECHNIQUE OF STEREOLOGY

1.3.1. Aim of stereology

1.3.2. Plane section orientation

1.3.3. Unbiased estimator : surface density (Sv)

1.1. GENERALITES EN REPRODUCTION EQUINE

1.1.1. L'activité sexuelle

1.1.1.1. La saison de reproduction

La jument est une espèce à **activité sexuelle saisonnière**, dite à "jours longs". Ainsi, dans les régions tempérées de l'hémisphère nord, elle exhibe des cycles œstraux de façon régulière depuis le printemps jusqu'au début de l'automne (Ginther, 1974).

1.1.1.2. Le cycle œstral

Le cycle œstral de la jument comprend une phase folliculaire, ou œstrus, de 5-7 jours, qui précède une phase lutéale, ou diœstrus, de 14-16 jours (Geschwind *et al.*, 1975 ; Hughes *et al.*, 1972 ; Hughes *et al.*, 1975 ; Noden *et al.*, 1975). Si le cycle œstral dure ainsi 20-21 jours en moyenne, il se trouve rallongé lors de la reprise annuelle de l'activité sexuelle et lors de la transition automnale inverse (Evans *et al.*, 1971 ; Ginther, 1974).

La jument en chaleurs se positionne les membres postérieurs écartés et la queue relevée devant l'étalon. Les lèvres vulvaires sont alors écartées de façon rythmique pour exposer le clitoris (Ginther, 1974, 1979). Durant cette phase œstrale, une première vague de croissance folliculaire se produit et aboutit à une ovulation. Elle précède de 10 à 12 jours une seconde vague qui conduit à une atresie folliculaire au milieu du diœstrus (Stabenfeldt *et al.*, 1972 ; Sirois *et al.*, 1989; Ginther and Bergfelt, 1993). L'oocyte est expulsé du follicule mûr 18 à 24 heures avant la fin de l'œstrus (Geschwind *et al.*, 1975 ; Hughes *et al.*, 1975). Le follicule mesure alors 35 à 55 mm de diamètre, mais reste difficilement palpable de par sa position centrale dans l'ovaire.

1.1. REPRODUCTION IN THE MARE

1.1.1. Sexual activity

1.1.1.1. The annual ovarian cycle

The mare exhibits regular oestrous cycles during the long natural photoperiod, that lasts from Spring to early Autumn in northern temperate regions, and hence she is regarded as a "**long-day seasonally polyoestrous**" animal (Ginther, 1974).

1.1.1.2. The oestrous cycle

The mare's oestrous cycle lasts 20-21 days, with respective periods of oestrus and dioestrus of 5-7 days and 14-16 days (Geschwind *et al.*, 1975 ; Hughes *et al.*, 1972 ; Hughes *et al.*, 1975 ; Noden *et al.*, 1975). It is shortest in the mid-summer and lengthens both at the beginning and the end of the breeding season (Evans *et al.*, 1971 ; Ginther, 1974).

During oestrus, the mare adopts a receptive posture towards the stallion, with arching of her tail, abduction and spreading of her rear legs, and clitoral winking, *i.e.* repeated eversion of the *vulva labia* to expose the clitoris (Ginther, 1974, 1979). Follicular dynamics are not limited to the oestrous phase of the cycle as two major waves of follicular growth with similar patterns of development occur every 10 to 12 days. Each results in either follicular atresia or ovulation (Stabenfeldt *et al.*, 1972 ; Sirois *et al.*, 1989 ; Ginther and Bergfelt, 1993). The oocyte is generally expelled 18-24 h before the end of oestrus (Geschwind *et al.*, 1975 ; Hughes *et al.*, 1975) from a follicle that usually ranges in diameter from 35 to 55 mm. The mature follicle bulges only slightly from the ovarian surface due to its central position within the organ.

1.1.2. Endocrinologie du cycle œstral

L'hormone **GnRH** (Gonadotrophin Releasing Hormone), libérée de manière pulsative par l'hypothalamus, est responsable de la sécrétion des gonadotrophines **FSH** (Follicle Stimulating Hormone) et **LH** (Luteinising Hormone) par l'hypophyse (Geschwind, 1972).

Luteinising Hormone (LH) :

Contrairement aux autres mammifères, qui présentent un bref pic pré-ovulatoire de **LH**, la jument présente la caractéristique de libérer cette hormone de façon progressive et prolongée. Ainsi, la sécrétion de LH est amorcée au début d'œstrus, atteint son niveau maximal 1 ou 2 jours après l'ovulation, et diminue ensuite progressivement sur une période de 4 jours pour atteindre son niveau basal de diœstrus (Evans and Irvine, 1975 ; Geschwind *et al.*, 1975 ; Noden *et al.* , 1975 ; Figure 1). Un tel profil de sécrétion suggère l'implication de LH dans la maturation folliculaire. La persistance de LH dans la circulation sanguine jusqu'à 4 jours après l'ovulation est par ailleurs responsable d'ovulations multiples.

Follicle Stimulating Hormone (FSH) :

Pendant le cycle œstral, la **FSH** est libérée selon deux vagues de sécrétion qui ont le même profil (Evans and Irvine, 1975). Alors que la première vague est conjointe à l'augmentation de la concentration plasmatique en LH à la fin de l'œstrus-début de diœstrus, la seconde vague de sécrétion a lieu au milieu du diœstrus pour préparer les follicules à la période œstrale suivante (Figure 1).

1.1.2. Endocrinology of the oestrous cycle

Gonadotrophin Releasing Hormone (**GnRH**), secreted in pulsatile bursts from the hypothalamus, induces the secretion of the two gonadotrophins, Follicle Stimulating Hormone (**FSH**) and Luteinising Hormone (**LH**) by the pituitary gland (Geschwind, 1972).

Luteinising hormone (LH) :

While most species show a short oestrous period with a brief and well-defined pre-ovulatory peak of **LH**, the mare exhibits a long slow LH rise throughout her prolonged oestrous period. Hence, peripheral LH serum concentrations begin to rise at the onset of oestrus to reach a maximum concentration 1-2 days after rather than before ovulation. They then decline again over the next 4 days and remain basal for the whole of the dioestrous period (Evans and Irvine, 1975 ; Geschwind *et al.*, 1975 ; Noden *et al.* , 1975 ; Figure 1). Such a profile suggests a role for LH in the maturation of the primary pre-ovulatory follicle. The pattern also underlies the occurrence of twin ovulations in some mares due to the persistence of appreciable quantities of LH in the circulation for as long as 4 days after ovulation.

Follicle Stimulating Hormone (FSH) :

FSH secretion undergoes two major surges during the mare's oestrous cycle (Evans and Irvine, 1975). While the first of these occurs coincidentally with the rise of plasma LH concentrations during late oestrus and early dioestrus, the second surge takes place in mid-dioestrus and clearly stimulates a new wave of follicular development for the following period of oestrus (Figure 1).

Œstrogènes :

La croissance folliculaire débute au début de l'œstrus sous l'effet des hormones FSH et LH. Les **œstrogènes**, sécrétés par la thèque interne des follicules, sont de ce fait détectables dans la circulation sanguine dès le 6^{ème} à 10^{ème} jour précédant l'ovulation et atteignent leur concentration maximale 12 à 36 h avant celle-ci (Patisson *et al.*, 1974 ; Garcia *et al.*, 1979; Allen *et al.*, 1995 ; Figure 1). Les signes d'œstrus, qui accompagnent cette sécrétion œstrogénique, persistent quant à eux jusqu'à 2 jours après l'ovulation, ce qui est caractéristique de l'espèce équine (Hansen and Echterkamp, 1972).

Il a par ailleurs été montré que l'administration exogène d'œstrogènes à des juments ovariectomisées pendant l'hiver, donc à une période où l'axe hypothalamo-hypophysaire est inactif, entraîne une diminution de la concentration en LH. Celle-ci augmente par contre l'été avec le rallongement de la durée d'éclairement journalière. La photopériode et les œstrogènes semblent ainsi tous deux influencer sur la sécrétion de LH chez la jument (Garcia *et al.*, 1979).

Progestérone :

Après l'ovulation, le corps jaune se met à sécréter de la **progestérone** dont la concentration maximale est atteinte en 5 jours. Elle exerce alors un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion hypophysaire de LH pendant la totalité du diœstrus (Palmer and Jousset, 1975 ; Figure 2). Pendant l'œstrus, la concentration en progestérone devient par contre inférieure à 1 ng/mL, ce qui lève le rétrocontrôle négatif et permet à l'hypophyse de reprendre son activité sécrétoire (Stabenfeldt *et al.*, 1975).

Prostaglandine :

La **prostaglandine** est une hormone lutéolytique sécrétée par l'endomètre à la fin du diœstrus (Ginther and First, 1971) et qui est donc responsable de la baisse de la concentration en progestérone. Sa mesure sérique se fait par l'intermédiaire de son métabolite, la 15-keto-13,14-dihydro-PGE₂ (Kindahl *et al.*, 1976).

Oestrogens :

Under the influence of both FSH and LH, ovarian follicles grow progressively and, as they do so, their *theca interna* cells start to secrete **oestrogens** from as early as 6-10 days before ovulation. Maximum concentrations are reached 12-36 h before ovulation (Patisson *et al.*, 1974 ; Garcia *et al.*, 1979 ; Allen *et al.*, 1995 ; Figure 1). Nevertheless, oestrous signs persist for up to 2 days after ovulation, which is unusual compared to other mammalian species (Hansen and Echtenkamp, 1972).

When oestrogens are administrated exogenously to ovariectomised mares during Winter, that is while the pituitary-ovarian axis is temporally inactive, serum LH concentrations rise. Similarly, serum LH levels rise after the increase of daylength during Summer. Hence, both photoperiod and the positive feedback effects of oestrogens can influence LH secretion in the mare (Garcia *et al.*, 1979).

Progesterone :

After ovulation, **progesterone** is secreted by the developing *corpus luteum* (CL). Serum concentrations quickly reach a peak within 5 days and remain at high for the rest of dioestrus, exerting a negative feedback effect on the release of LH (Palmer and Jousset, 1975 ; Figure 1). During oestrus, progesterone concentrations are below 1 ng/mL : the inhibition is therefore removed from the pituitary gland, which, once again, begins to secrete (Stabenfeldt *et al.*, 1975).

Prostaglandin :

Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) is a luteolytic hormone that is secreted by the endometrium at the end of dioestrus (Ginther and First, 1971) and causes the decline in serum progesterone concentrations. It is measured in serum in the stable metabolite 15-keto-13,14-dihydro-PGE₂ (PGFM) (Kindahl *et al.*, 1976).

Figure 1 (ci-contre) : Représentation des profils hormonaux dans la circulation générale de la jument pendant le cycle œstral. D'après Allen (1987).

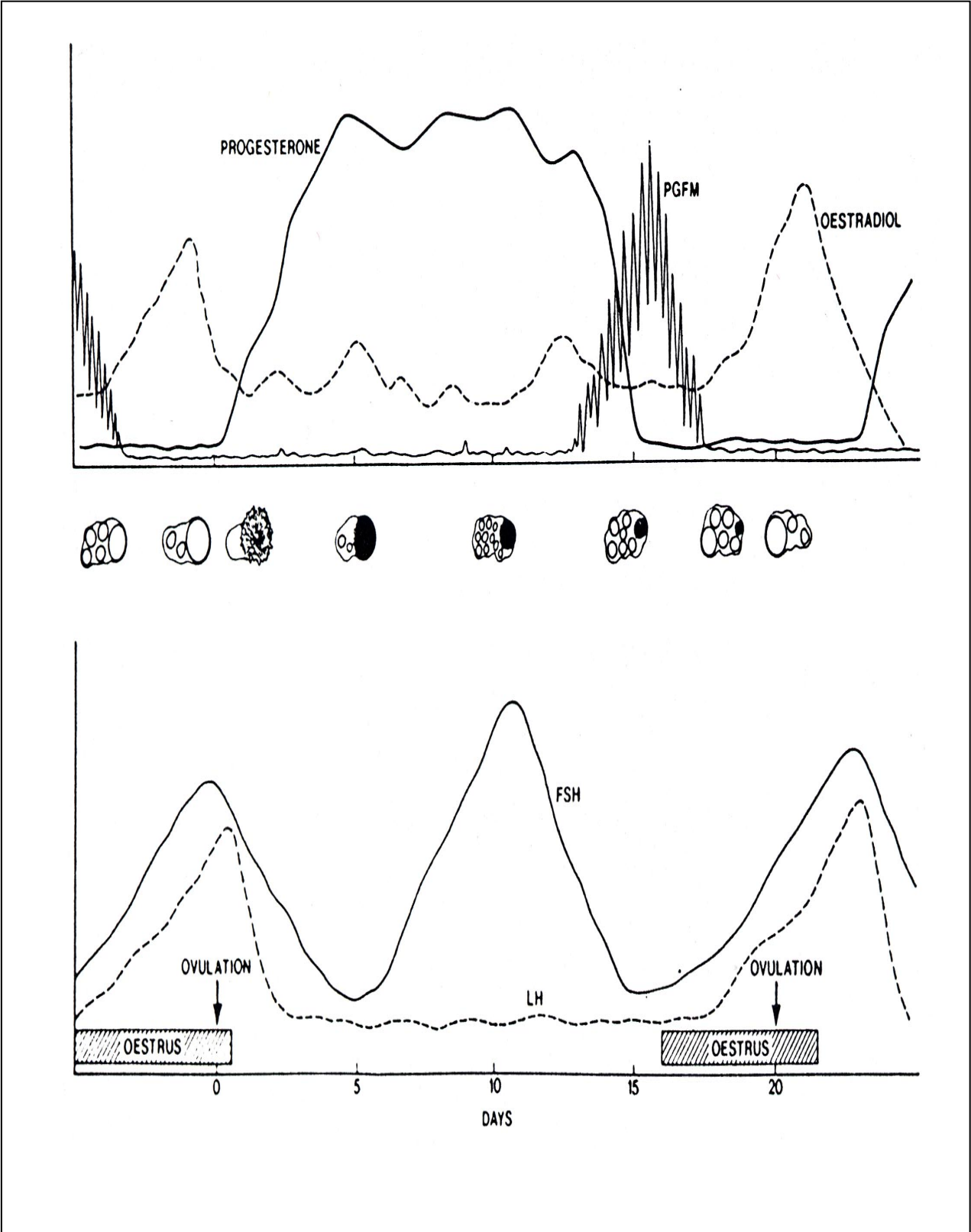


Figure 1 : Hormone profiles in the peripheral serum of the mare during the oestrous cycle. From Allen (1987).

1.1.3. L'influence des facteurs externes

1.1.3.1. Lumière

L'activité sexuelle de la jument étant saisonnière, une durée d'éclairement suffisante est nécessaire pour stimuler l'axe hypothalamo-hypophysaire et induire ainsi l'activité ovarienne (Kooistra and Ginther, 1975 ; Allen, 1987). La **mélatonine**, sécrétée par l'hypophyse pendant les périodes d'obscurité, exerce un rétrocontrôle négatif sur la production de GnRH par l'hypothalamus. Ainsi, lorsque la sécrétion de mélatonine est prolongée pendant les longues nuits hivernales, la libération de GnRH se trouve bloquée, ce qui empêche toute activité ovarienne : la jument est alors en anœstrus saisonnier avec un utérus atrophié et des ovaires non fonctionnels. Par contre, avec le rallongement de la durée d'éclairement quotidienne au printemps, la mélatonine n'est sécrétée que pendant de très courtes durées : l'hypothalamus reprend de ce fait son activité sécrétoire et les ovaires redeviennent actifs.

1.1.3.2. Autres facteurs externes

La reprise de l'activité sexuelle peut se trouver retardée par un printemps trop froid ou un problème de malnutrition. Belonje and Van Nierkerk (1975) ont notamment montré qu'un apport nutritionnel supplémentaire avant le début de la saison de reproduction stimule efficacement les fonctions ovariennes.

Par ailleurs, les phéromones semblent aussi influencer sur les rythmes biologiques internes mais ce rôle reste secondaire par rapport à celui majeur qu'est la durée d'éclairement.

1.1.3. The influences of external factors

1.1.3.1. Light

As the mare is a long-day seasonal breeder, the increase in daylength during Spring constitutes the most important exteroceptive stimulus for the induction of renewed ovarian activity at the onset of the breeding season (Kooistra and Ginther, 1975 ; Allen, 1987). **Melatonin**, secreted by the pineal gland during the hours of darkness, exerts a negative feedback effect on the release of GnRH by the hypothalamus. Hence, in Winter, when daylength is short, the periods of melatonin secretion are prolonged. Consequently, pulsatile GnRH releases are suppressed, and the pituitary-ovarian axis remains quiescent. The mare is said to be in anoestrus and she exhibits small inactive ovaries and an atrophied uterus. When daylength starts to increase again in Spring, the period of elevated melatonin secretion become shorter thereby permitting the pulsatile release of GnRH to increase and stimulate the onset of ovarian activity.

1.1.3.2. Other external factors

A prolonged cold Spring, or malnutrition, have both been shown to delay the onset of the breeding season. Belonje and Van Nierkerk (1975) demonstrated a noticeable stimulatory effect of supplementary feeding on the ovarian activity early in the year.

Other external factors, such as pheromones, seem to be able to exert a direct influence on endogenous biological rhythms, but they are all secondary to the major stimulus of daylength.

Figure 2 (ci-contre) : Influence des facteurs extéroceptifs et des hormones endogènes sur les fonctions de reproduction de la jument. Schéma amélioré de Allen (1987).

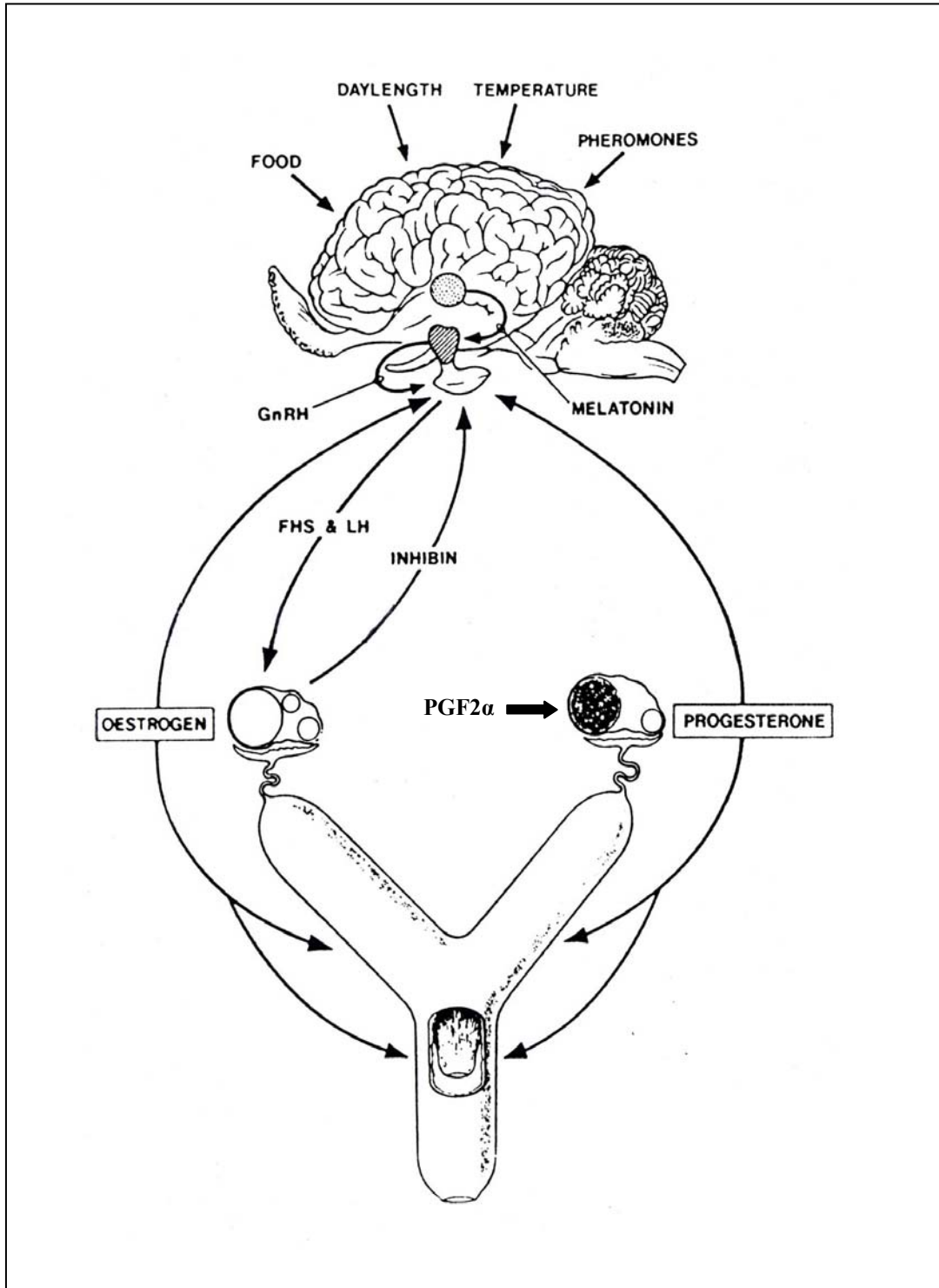


Figure 2 : Exteroreceptive factors and endogenous hormones controlling reproductive function in the mare. Arranged from Allen (1987).

1.2. LE TRACTUS GENITAL DE LA JUMENT

1.2.1. Les organes génitaux internes

Les organes génitaux internes de la jument sont localisés autant dans la cavité abdominale que dans la cavité pelvique, où ils sont suspendus à la région sublombaire par le **ligament large** (Figure 3). Ce dernier est formé de trois régions, le mesovarium, le mesosalpinx et le mesometrium, qui interviennent respectivement dans la suspension, l'innervation et l'irrigation des ovaires, des oviductes et de l'utérus.

1.2.1.1. Ovaires

Les ovaires de la jument sont localisés ventralement aux quatrième et/ou cinquième vertèbres lombaires. Ils sont suspendus à la région sublombaire par le long **mesovarium** dont le bord cranial forme le ligament suspenseur de l'ovaire.

L'ovaire de la jument mesure environ 5 à 8 cm de long et 4 à 5 cm de large et possède une forme caractéristique de rein due à la présence de la **fosse ovulatoire** sur son bord libre (Sisson and Grossman, 1953 ; Figures 6 et 7).

Contrairement aux autres mammifères, où l'ovaire est formé d'une région corticale périphérique pour la croissance folliculaire et d'une zone médullaire centrale pour l'innervation et l'irrigation de l'organe, la jument présente une organisation structurale inverse. Ainsi, les follicules évoluent au sein d'une zone parenchymateuse centrale alors que la zone vasculaire est périphérique. Le tissu cortical confiné au centre de l'organe n'a de contact avec la surface ovarienne qu'au niveau d'une zone spécifique, la fosse ovulatoire, qui se trouve ainsi être le site exclusif de l'ovulation (Witherspoon and Talbot, 1970).

1.2. THE REPRODUCTIVE TRACT OF THE MARE

1.2.1. The internal reproductive organs

The internal reproductive organs of the mare, located half in the pelvic cavity and half in the abdominal cavity, are attached to the sublumbar region by the **broad ligament** (Figure 3). This is divisible into three areas : i) the mesovarium, ii) the mesosalpinx and iii) the mesometrium. They provide both the physical support for the ovaries, oviducts and uterus, and supply the nerves and vessels to these organs.

1.2.1.1. Ovaries

Generally located ventral to the 4th or 5th lumbar vertebrae, each ovary is attached to the extremity of the uterus by the ovarian ligament, while being suspended to the sublumbar region by the long **mesovarium**, the cranial border of which forms the suspensory ligament of the ovary.

The equine ovary, approximately 5-8 cm long and 4-5 cm wide, has a characteristic "kidney-bean" shape due to a distinguishable depression on its free border, known as the **ovulation fossa** (Sisson and Grossman, 1953 ; Figures 6 and 7). This configuration is unique amongst the mammals, in which the ovary usually consists of a superficial cortex containing the oocytes in primordial follicles and a deeper medullary zone in which the blood vessels and nerves run. In the mare's ovary, the oocytes in their follicles are located in a central parenchymatous zone while the vascular zone is superficial. This centrally confined cortical tissue only has direct contact with the ovarian surface in one specific area, the ovulation fossa, which therefore represents the exclusive site for ovulation (Witherspoon and Talbot, 1970).

1.2.1.2. Oviductes

Les oviductes relient les ovaires à l'extrémité des cornes utérines et sont suspendus par le mesosalpinx qui émerge de la région latérale du mesovarium. Ils mesurant 20 à 30 cm de long et présentent un trajet très flexueux *in situ*. Chaque oviducte peut être divisé en trois régions : i) l'infundibulum, ii) l'ampulle et iii) l'isthme. Sa principale fonction est le transport des oocytes et des zygotes depuis le site de fécondation jusqu'à l'utérus. Au moment de l'ovulation, l'infundibulum recouvre la fosse ovulatoire pour faciliter le passage de l'oocyte de l'ovaire à l'oviducte. L'oocyte est ensuite dirigé par la ciliature infundibulaire vers l'ampoule pour y être fécondé. Seuls les œufs fécondés circulent dans l'isthme pour atteindre la corne utérine environ 144 à 168 heures après l'ovulation (Battut *et al.*, 1997). En effet, l'oviducte équin présente la particularité de pouvoir retenir les oocytes non fécondés pendant une durée pouvant atteindre 7 mois (Van Niekerk and Gerneke, 1966 ; Steffenhagen *et al.*, 1972). Par ailleurs, la libération de prostaglandine E2 par l'embryon est responsable de la relaxation des muscles circulaires lisses situés autour de l'oviducte et, par conséquent, du passage de l'embryon dans l'utérus (Weber *et al.*, 1995).

1.2.1.3. Utérus

L'utérus de la jument présente une forme anatomique en Y, avec un unique corps utérin de 18 à 20 cm de long relié à deux cornes utérines de 25 cm de long (Figures 3, 4 et 5). Il est suspendu dorsalement à la région sublombaire par le feuillet viscéral du ligament large alors que son bord ventral reste libre. L'utérus est principalement composé de plis endométriaux longitudinaux qui obstruent de manière physiologique la lumière utérine (Budras *et al.*, 1994).

1.2.1.2. Oviducts

The oviducts join the ovaries to the extremities of the uterine horns, and are suspended in the mesosalpinx that arises from the lateral surface of the mesovarium. They measure 20-30 cm in length when extended, but are very convoluted *in situ*. They can be divided into three areas, when passing from the ovary to the uterus : i) the infundibulum, ii) the ampulla and iii) the isthmus. Their principal role is the transport of oocytes and zygotes from the site of fertilisation to the uterus. During ovulation, the infundibulum covers the ovulation fossa of the ovary so as to facilitate the entry of the oocyte into the ovary. Its ciliated epithelium assists the passage of the oocyte to the ampulla, where fertilisation occurs. Finally, the fertilised egg passes through the isthmus to enter the tip of the uterine horn between 144 and 168 hours after ovulation (Battut *et al.*, 1997). Uniquely amongst other mammals, the equine oviduct has the capacity to retain non-fertilised oocytes for as long 7 months (Van Niekerk and Gerneke, 1966 ; Steffenhagen *et al.*, 1972) and it is the secretion of prostaglandin E2 by the embryo on days 4 and 5 after ovulation which relaxes the circular smooth muscle that surrounds the oviduct and so enables the onward passage of the embryo into the uterus (Weber *et al.*, 1995).

1.2.1.3. Uterus

The mare's uterus is Y-shaped, with a single body of 18-20 cm in length and two horns, each of approximately 25 cm (Figures 3, 4 and 5). It is attached dorsally to the sublumbar region by the visceral layer of the broad ligament (*i.e.* the perimetrium), while its ventral border remains free. Its lumen is lined by prominent, longitudinally arranged folds of endometrium (Budras *et al.*, 1994).

1.2.1.4. Col utérin et vagin

Le vagin de la jument mesure environ 15 à 20 cm de long et se trouve relié à l'utérus par le col utérin. Celui-ci, dépourvu d'anneaux cervicaux, a un diamètre de 3.5 à 4 cm et mesure 5 à 7.5 cm de long. Le col utérin permet la production de mucus dont le rôle est soit d'obstruer la lumière utérine pendant le dioestrus pour éviter toute contamination bactérienne ascendante, soit de lubrifier la région pendant la mise-bas pour faciliter le passage du poulain.

1.2.1.4. Cervix and vagina

The vagina of the mare measures around 15-20 cm in length and is connected to the uterus by the cervix. This measures 5-7.5 cm in length and 3.5-4 cm in diameter and does not have cervical rings. Mucus production by the cervix causes either the occlusion of its lumen during dioestrus to avoid any bacterial infection, or it lubricates the area during the foaling process.

Figure 3 (ci-contre) : Topographie des organes génitaux de la jument *in situ*.

Figure 4 (ci-contre) : Représentation schématique du tractus génital de la jument.

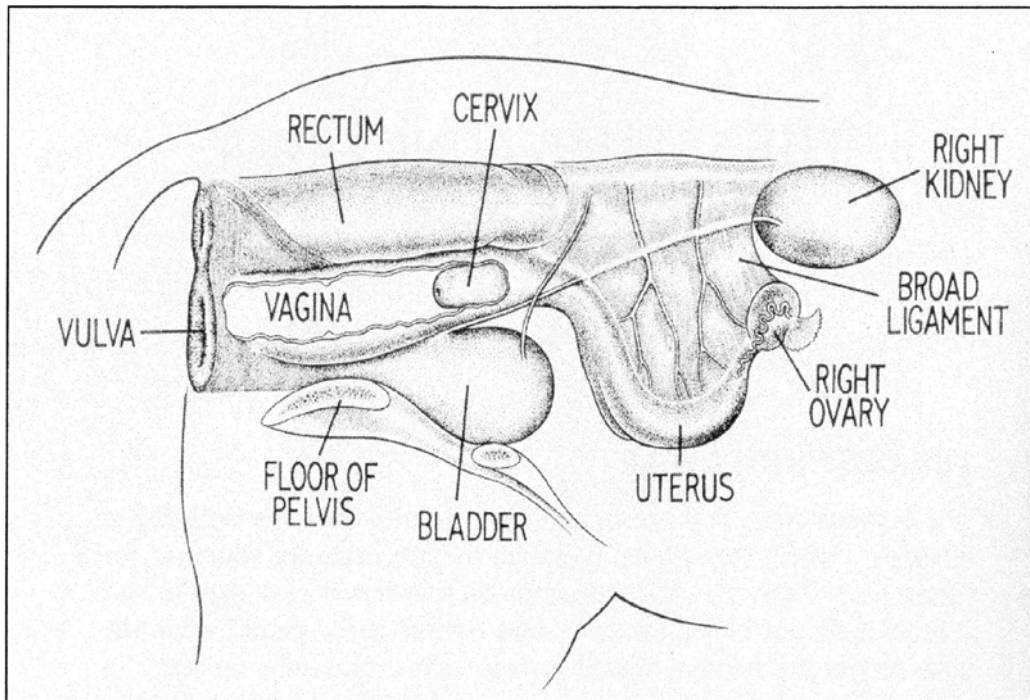


Figure 3 : Topography of the mare's genital organs *in situ*.

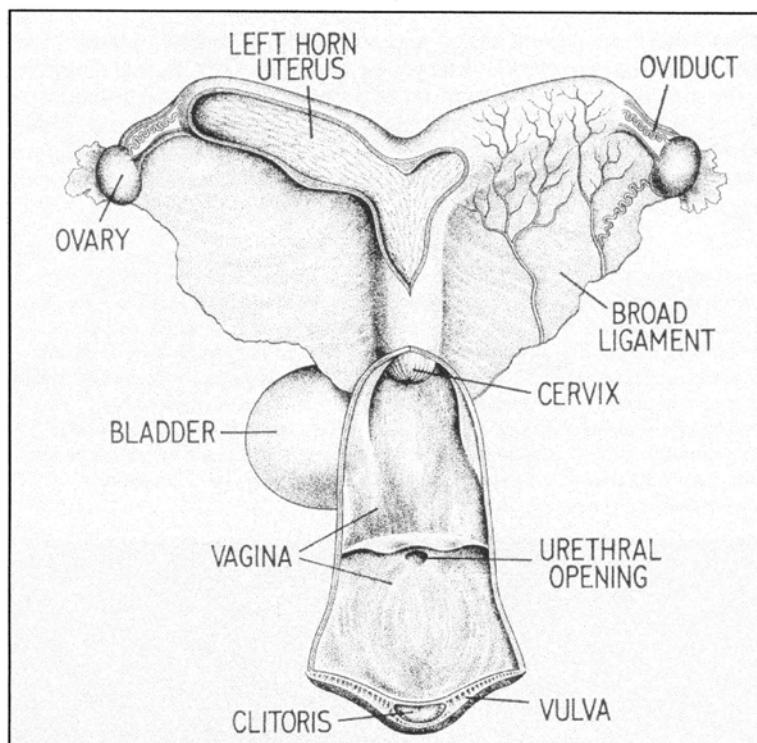
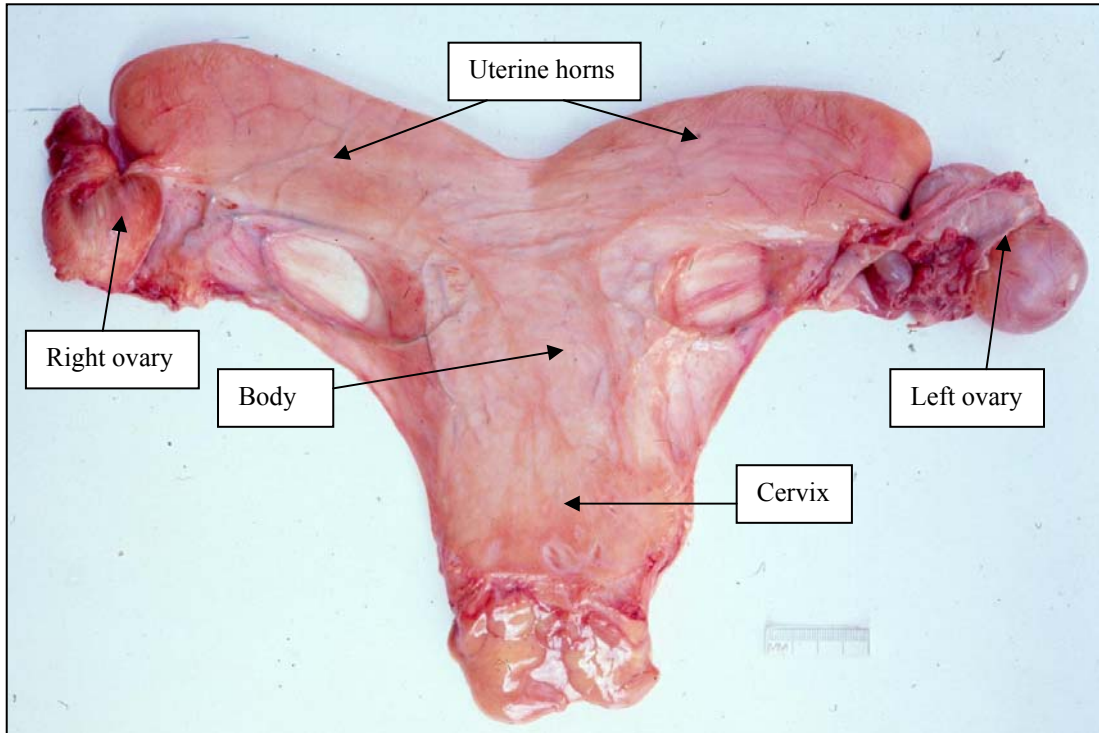


Figure 4 : Diagrammatic representation of the reproductive tract of the mare.

Figure 5 (ci-contre, en haut) : **Le tractus génital de la jument.**

Figure 6 (ci-contre, au centre à gauche) : **Ovaire - vue externe.**

Figure 7 (ci-contre, en bas à gauche) : **Ovaire - section longitudinale.**



1.2.2. L'endomètre

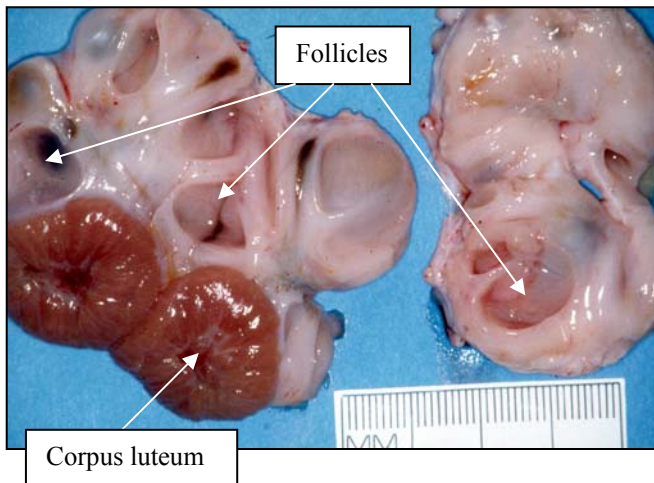
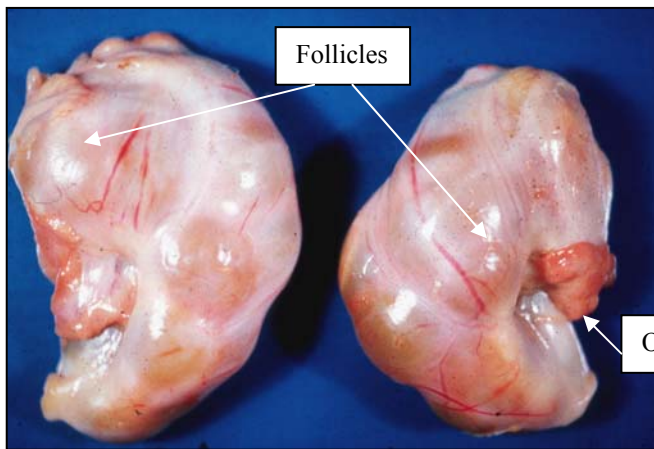


Figure 5 (above) : The reproductive tract of the mare.

Figure 6 (top left) : Ovary (external view).

Figure 7 (bottom left) : Ovary (open-section).

1.2.2. L'endomètre

1.2.2.1. La paroi utérine

La paroi utérine est composée de trois couches : la couche interne non déciduée, ou **endomètre** (*Tunica mucosa*), vitale pour l'implantation et la nutrition de l'embryon, la couche intermédiaire, ou **myomètre** (*Tunica muscularis*), formée de deux couches de cellules musculaires lisses séparées par une couche vasculaire qui irrigue l'endomètre, et la couche externe, ou **perimètre** (*Tunica serosa*), essentiellement composée de tissu conjonctif lâche contenant des cellules musculaires lisses, des vaisseaux lymphatiques et sanguins, et des fibres nerveuses (Dellmann, 1993 ; Figures 8 et 9).

Figure 8 (ci-contre) : Structure de la paroi utérine. Schéma amélioré de McKinnon and Voss (1993).

1.2.2. The endometrium

1.2.2.1. Structure of the uterine wall

The uterus of the mare is composed of three layers : the inner non-deciduate **endometrium** (*Tunica mucosa*), vital for the implantation and nutrition of the embryo, the intermediate **myometrium** (*Tunica muscularis*), consisting of two layers of smooth muscle cells separated by a vascular layer that supplies the endometrium, and the outer **perimetrium** (*Tunica serosa*), composed mainly of loose connective tissue containing smooth muscle cells, lymph and blood vessels, and nerve fibres (Dellmann, 1993 ; Figures 8 and 9).

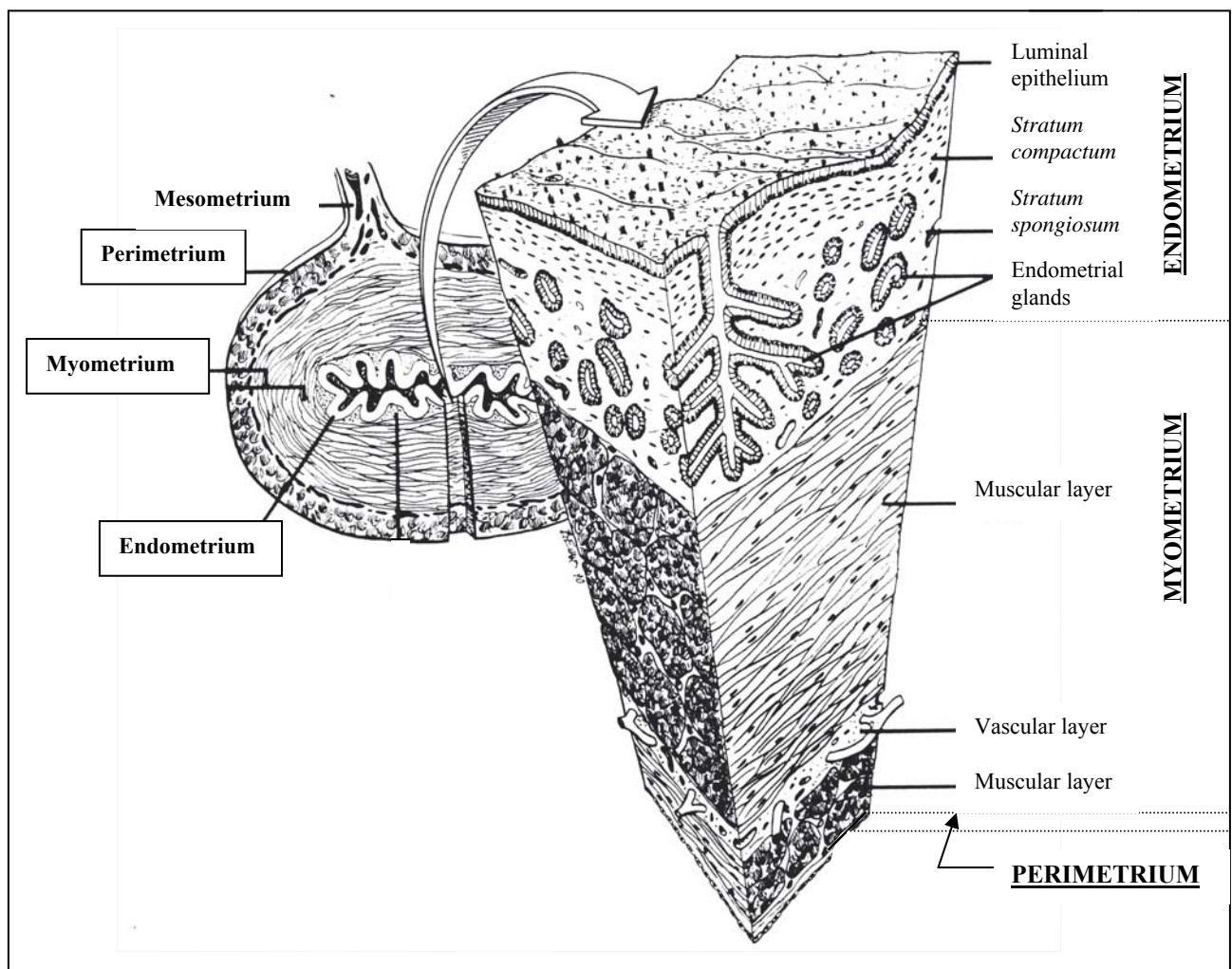


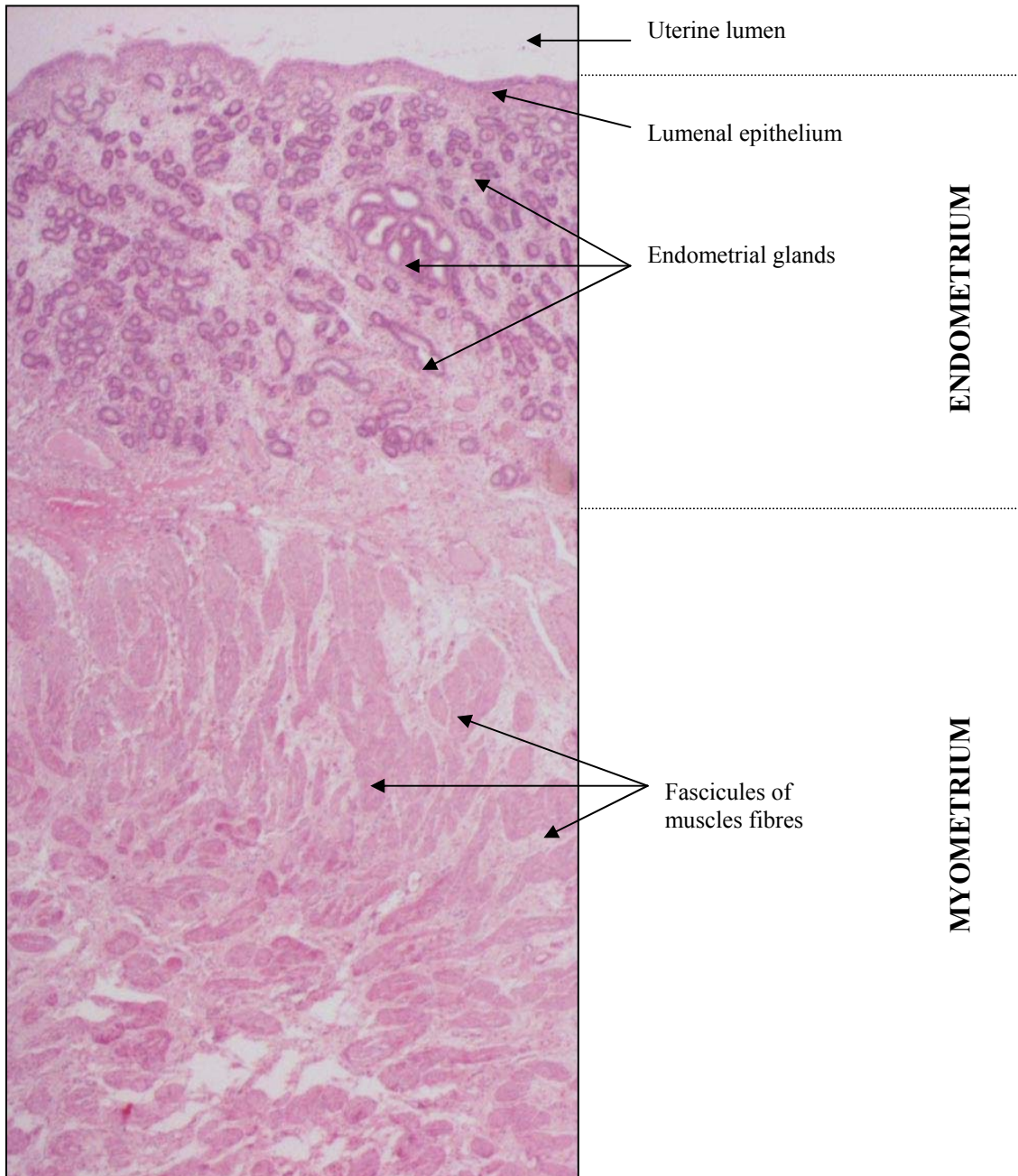
Figure 8 : The uterine wall structure. Arranged from McKinnon and Voss (1993).

Figure 9 (ci-contre, à gauche) : **Section histologique de la paroi utérine de la jument.**

Figure 10 (ci-contre, en haut à droite) : **Structure histologique d'une glande endométriale.**

Figure 9 (below) : Histological section of the equine uterine wall.

Figure 10 (top right) : Histological structure of an endometrial gland.



1.2.2.2. Structure histologique

L'endomètre de la jument est composé de deux couches majeures : l'épithélium luminal et la *Lamina propria*. Sa structure histologique a été décrite par Hammond and Wodzicki (1941), Brandt (1970), Ricketts (1975a), Kenney (1978) et Leishman *et al.* (1982). L'**épithélium luminal** est formé de cellules épithéliales cubiques, pour moitié ciliées. La ***Lamina propria*** est formée de deux régions : la *Stratum compactum*, riche en vaisseaux sanguins et en cellules stromales, et la *Stratum spongiosum*, plus large mais nettement moins vascularisée (Figures 9 et 11). Les glandes endométriales exocrines et multicellulaires sont disposées au sein de la *Lamina propria* et résultent de l'invagination de l'épithélium (Figures 10 et 11). Leurs canaux simples sont localisés dans la *Str. compactum*, alors que leurs portions sécrétoires sont exclusivement présentes dans la *Str. spongiosum*.

**Figure 11 (ci-contre) : Structure histologique de l'endomètre de la jument.
D'après Kenney and Doig (1986).**

1.2.2.2. Histological structure

The endometrium of the mare consists in two main layers : the luminal epithelium and the *Lamina propria*. Its histological structure has been described by Hammond and Wodzicki (1941), Brandt (1970), Ricketts (1975a), Kenney (1978) and Leishman *et al.* (1982). The simple **luminal epithelium** consists in cuboidal to columnar epithelial cells, half of which are ciliated. The *Lamina propria* beneath is subdivided into two regions : the subepithelial *Stratum compactum*, which is richly vascularised and contains high density of stromal cells, and the deeper, much wider, but far less cellular *Stratum spongiosum* (Figures 9 and 11). The multicellular exocrine endometrial glands are the major components within the *Lamina propria* and they consist of tubular invaginations of the luminal epithelium (Figures 10 and 11). Their unbranched ducts and openings are located in the *Str. compactum*, while their tubular secretory portions are found exclusively in the *Str. spongiosum*.

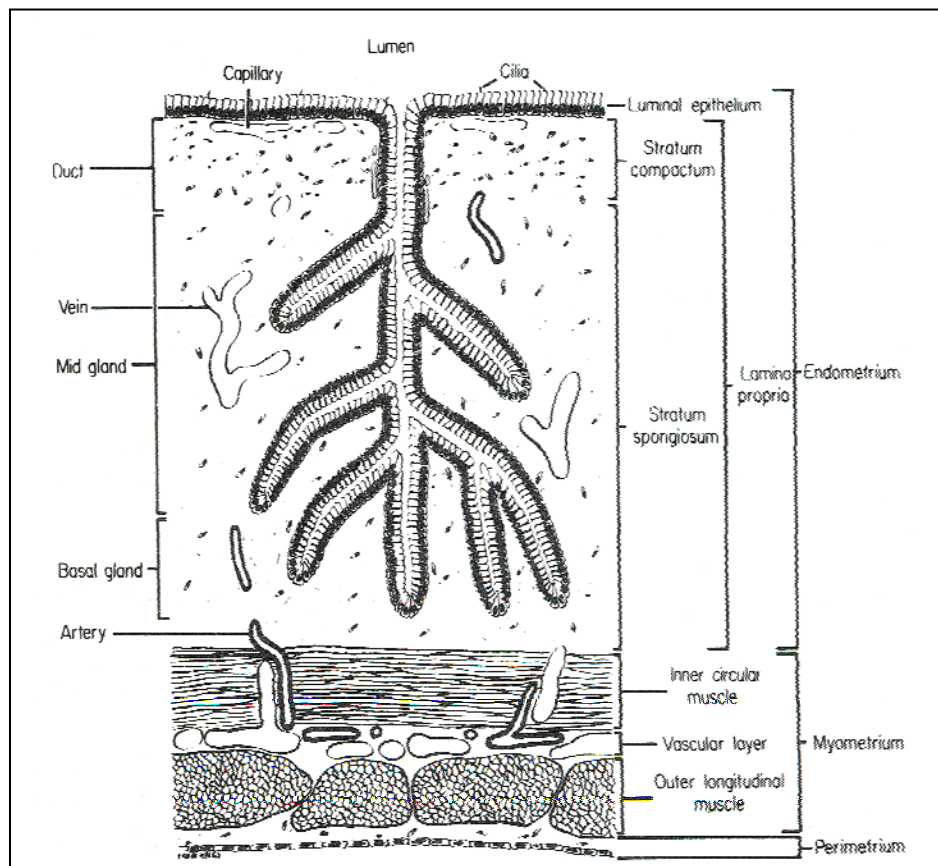


Figure 11 : Histological structure of the endometrium of the mare. From Kenney and Doig (1986).

1.2.2.3. Changements annuels

L'endomètre de la jument subit des changements annuels physiologiques. Pendant l'hiver, la jument est en anœstrus saisonnier : son utérus atrophié présente un endomètre inactif au sein duquel les glandes endométriales apparaissent moins nombreuses et plus éparpillées que lors de la saison de reproduction (Britton, 1982 ; Gross and Leblanc, 1984 ; Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986). L'épithélium luminal est cuboïdal bas et des sécrétions sont souvent observées dans la lumière des portions apicales des glandes.

Au moment de la reprise de l'activité sexuelle, l'épaisseur de la *Lamina propria* reste identique, mais l'endomètre passe d'un état de quiescence à un état d'activité intense (Britton, 1982). Les cellules de l'épithélium luminal et de la région apicale des glandes sont les premières à devenir actives. Durant cette période de transition, les glandes apparaissent souvent distendues et regroupées en amas.

1.2.2.4. Influence du cycle œstral

La structure endométriale varie pendant le cycle œstral sous l'effet de l'œstrogène et de la progestérone (Brandt, 1970 ; Ricketts, 1975a ; Gordon and Sartin, 1978 ; Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986). Alors que l'œstradiol stimule les processus régénératifs, la progestérone permet de les maintenir ensuite. Ainsi, le développement des glandes est permis par l'œstradiol, mais un niveau suffisant de progestérone est nécessaire pour permettre leur activité sécrétoire (Banks, 1986).

1.2.2.3. Annual changes

Being a seasonal breeder, the mare exhibits changes in her endometrium throughout the year. During the **anoestrous** winter period, while the uterus is atrophied and the endometrium is quiescent, endometrial glands are less numerous and appear more sparsely distributed (Britton, 1982 ; Gross and Leblanc, 1984). They are also less coiled than during the sexual activity period (Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986). The luminal epithelium is low cuboidal and inspissated secretions are often found in the lumen of the apical portions of glands.

As the breeding season commences, the *Lamina propria* remains the same thickness (Britton, 1982), while the endometrium goes through a transition from complete atrophy to full activity. The luminal epithelial cells and those of the apical portions of the glands are the first to become columnar and active. Clustering of gland branches and distension of the gland luminae are also observed frequently during the transitional period between anoestrus and renewed ovarian cyclicality.

1.2.2.4. Influence of the oestrous cycle

Under the direct influence of the steroid hormones, oestrogen and progesterone, the endometrium undergoes several changes throughout the oestrous cycle (Brandt, 1970 ; Ricketts, 1975a ; Gordon and Sartin, 1978 ; Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986). Regenerative processes are first induced by oestradiol and then maintained by progesterone. While oestradiol stimulates growth and branching of the endometrial glands, an acceptable level of progesterone is required for coiling of the glands and for their copious production of exocrine secretions (Banks, 1986).

Pendant l'**œstrus**, les cellules des épithéliums luminal et glandulaire s'hypertrophient sous l'effet de l'œstradiol et atteignent leur hauteur maximale (Figure 14). Les glandes endométriales apparaissent alors allongées au sein d'un tissu conjonctif plus vascularisé et congestionné (Brandt, 1970 ; Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986 ; Figures 12, 13 et 14). Des amas, ou "nids", de glandes peuvent être observés suite au développement excessif d'œdème en périphérie des glandes. Ces formations physiologiques doivent être différenciées des "nids" pathologiques de fibrose rencontrés dans des cas d'endométrite chronique (Ricketts, 1975a, 1975b ; Kenney, 1975, 1978 ; Gordon and Smith, 1978 ; Doig *et al.*, 1981 ; Kenney and Doig, 1986).

Après l'ovulation, la concentration en œstrogènes diminue parallèlement à l'augmentation de la concentration en progestérone. Durant le **diœstrus**, la progestérone est responsable de l'hyperplasie et de l'activité sécrétoire importante des cellules épithéliales glandulaires. Les glandes apparaissent plus tortueuses et arborescentes (Figure 15) dans un tissu conjonctif beaucoup moins œdémateux (Figure 16) et les épithéliums luminal et glandulaire sont cuboïdaux bas (Figure 17). Après une période de 16 jours, si aucune fécondation n'a eu lieu, la vascularisation s'atténue, les glandes involuent et l'activité sécrétoire rétrocede, parallèlement à la chute de la concentration en progestérone lors de la lutéolyse.

Hence, at the onset of **oestrus**, the rise in oestradiol levels induces the proliferation of luminal and glandular epithelia that reach their peak height (Figure 14). The connective tissue becomes increasingly oedematous and vascularised, which makes the glands appear straighter and less dense than during dioestrus or anoestrus (Brandt, 1970 ; Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986 ; Figures 12, 13 and 14).

Physiological gland “nesting”, the consequence of stromal oedema developing faster between individual glands than between the branches of a gland, can be observed during that period and needs to be differentiated from the pathological “gland nesting” induced by fibrosis in mares with endometrosis (Ricketts, 1975a, 1975b ; Kenney, 1975, 1978 ; Gordon and Smith, 1978 ; Doig *et al.*, 1981 ; Kenney and Doig, 1986).

After ovulation, oestrogen levels decline, while progesterone concentrations start to rise. Thus, during **dioestrus**, gland hyperplasia continues, the secretory activity of the cells is high and the glands appear extensively branched and coiled. The level of oedema in the connective tissue declines and even tends to disappear (Figures 15 and 16) and both the luminal and the glandular epithelia become low columnar to cuboidal (Figure 17). Around day 16, if fertilisation has not occurred, vascularity decreases, the glands involute and secrete less, and progesterone levels decline as luteolysis occurs.

Figure 12 (ci-contre) : Section histologique de l'endomètre pendant l'œstrus (x 50).

Figure 13 (ci-contre) : Stroma œdémateux pendant l'œstrus (x 150).

Figure 14 (ci-contre) : Epithélium haut cylindrique pendant l'œstrus (x 300).

OESTRUS

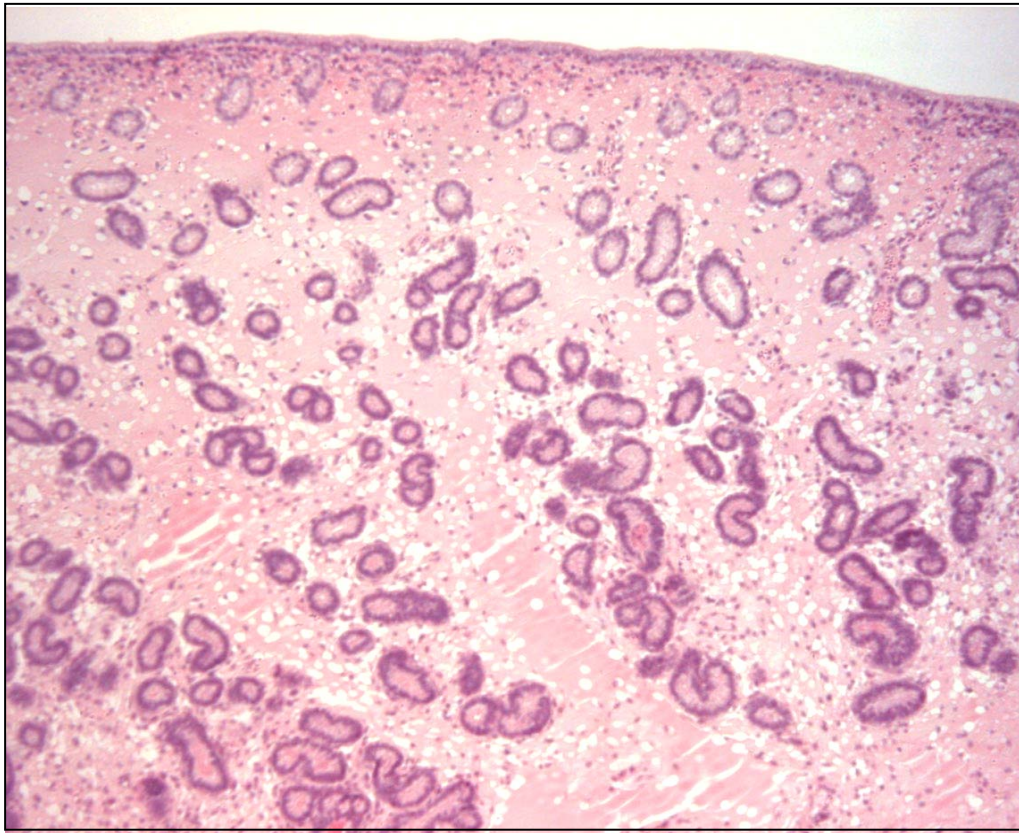


Figure 12 : Histological section of the endometrium during oestrus (x 50).

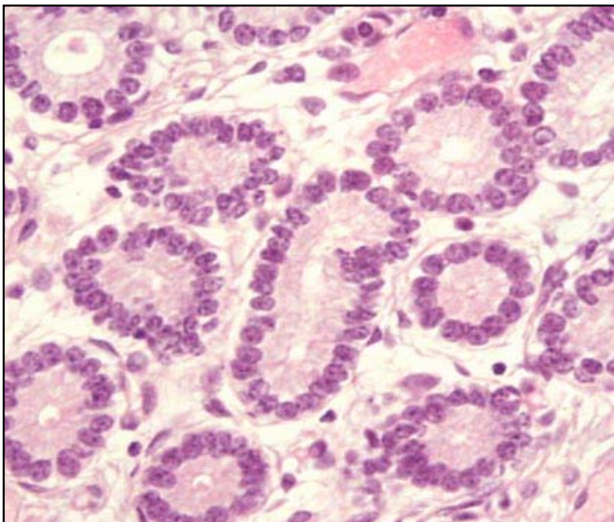


Figure 13 : Stromal oedema during oestrus (x 150).

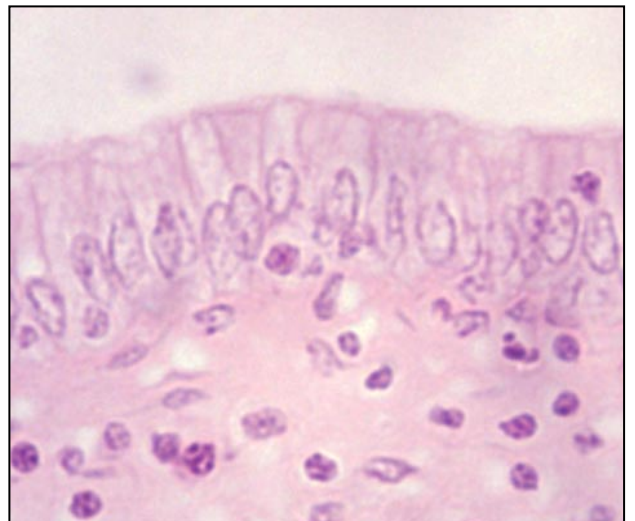


Figure 14 : Tall columnar epithelium during oestrus (x 300).

Figure 15 (ci-contre) : Section histologique de l'endomètre pendant le dioestrus (x 50).

Figure 16 (ci-contre) : Glandes disposées en "collier de perles" pendant le dioestrus (x 150).

Figure 17 (ci-contre) : Epithélium cuboïdal bas pendant le dioestrus (x 300).

DIOESTRUS

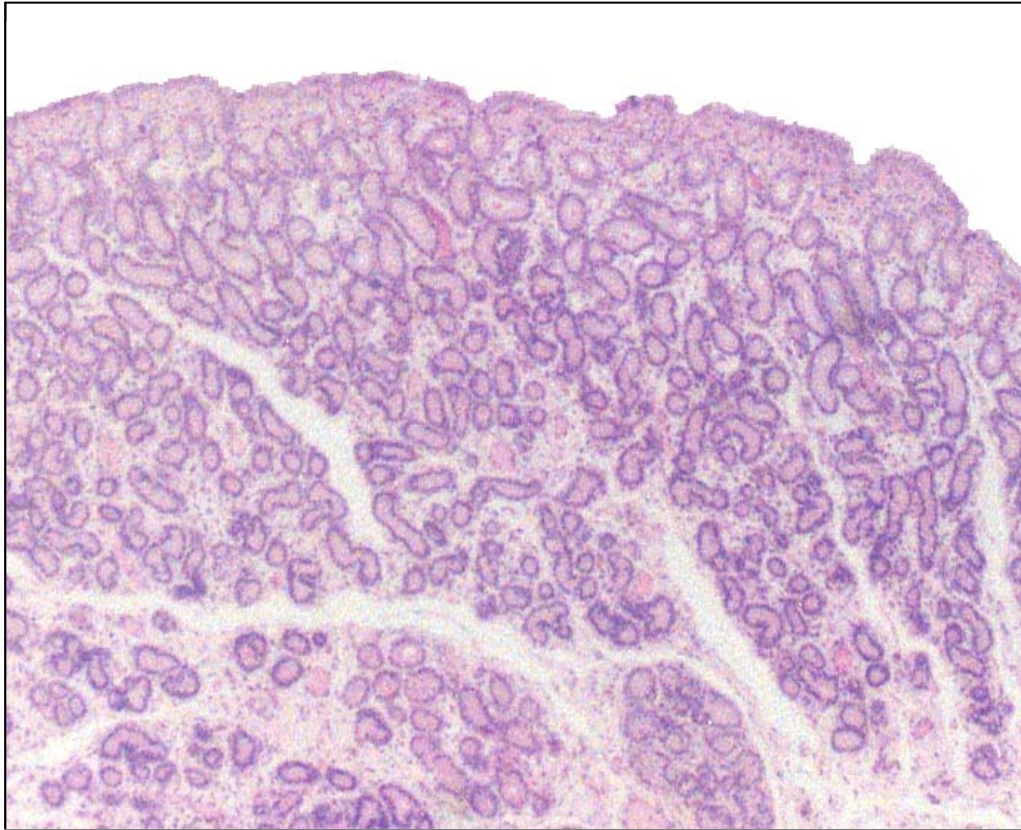


Figure 15 : Histological section of the endometrium during dioestrus (x 50).

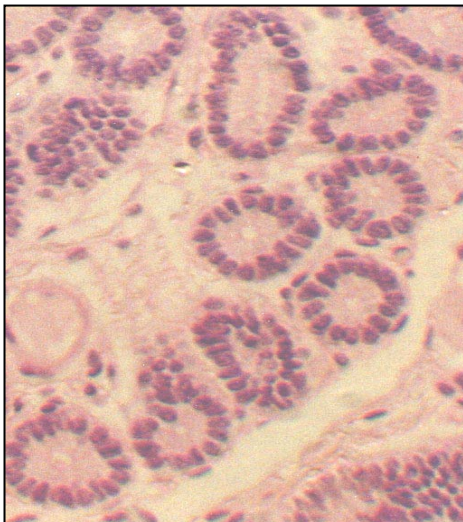


Figure 16 : Glands arranged in a 'string of pearls' during dioestrus (x 150).

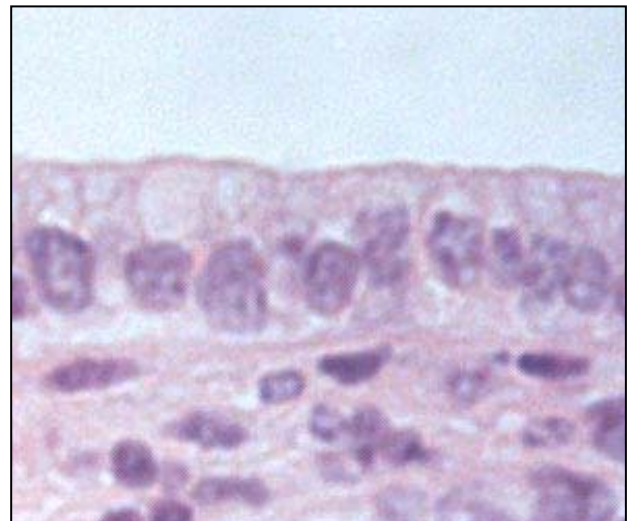


Figure 17 : Cuboidal epithelium during dioestrus (x 300).

1.3. LA STEREOLOGIE

1.3.1. But de la stéréologie

La stéréologie est une méthode statistique qui permet à partir d'une image microscopique plane d'obtenir des mesures de la structure tridimensionnelle (Weibel, 1979). Contrairement aux méthodes morphométriques traditionnelles qui peuvent amener à des résultats biaisés, la stéréologie permet de conclure de manière précise et non biaisée quant aux paramètres de hauteur, nombre, surface et volume de particules, sans aucune présomption sur leur forme, distribution ou orientation (Gundersen, 1986). Les mesures obtenues sont ainsi standardisées avec une estimation précise des valeurs et une réduction de la variabilité due à l'observateur.

1.3.2. Orientation de la section plane

En stéréologie, les sections planes doivent avoir des orientations isotropiques, uniformément aléatoires. De telles sections sont en fait difficilement réalisables et une orientation fixe et définie est parfois même exigée dans certains protocoles. De ce fait, une méthode a été proposée pour permettre l'estimation des taille, surface et volume de particules, à partir de sections verticales isotropiques, réparties de façon uniformément aléatoire (Baddeley *et al.*, 1986 ; Gokhale, 1990). Ainsi, un plan horizontal de référence (HP) pour l'orientation des sections peut être arbitrairement choisi dans l'espace tridimensionnel : les sections doivent alors être coupées parallèles les unes aux autres et selon la même épaisseur afin de retrouver la "direction verticale" dans chacune d'entre elles, à savoir l'axe perpendiculaire au plan horizontal (Figure 18). Les sections peuvent pivoter autour de leur axe vertical mais conservent constamment un angle de 90° avec le plan horizontal. Les mesures stéréologiques peuvent ensuite être effectuées sur l'image de la structure microscopique projetée perpendiculairement aux sections.

1.3. THE TECHNIQUE OF STEREOLOGY

1.3.1. Aim of stereology

Stereology is a geometrical method that enables three-dimensional measurements of a structure to be obtained from a two-dimensional microscopic image of a histological section (Weibel, 1979). Whereas conventional two-dimensional morphometric analysis methods tend to give biased results regarding the shape and size of the objects of interest, the stereology technique provides **unbiased** and **precise** conclusions regarding the number, height, surface area and volume of particles, without any assumptions on their shape, distribution or orientation (Gundersen, 1986). Measurements can therefore be standardised, true values accurately estimated and bias from individual observers reduced.

1.3.2. Plane section orientation

General principles of stereology suggest that plane sections of a three-dimensional structure have an isotropic uniformly random (IUR) orientation relative to the structure. Such sections are, in fact, difficult to obtain in practice and a defined, fixed orientation is often required for the purpose of biological studies. Therefore, a procedure preferring the use of **vertical uniformly random (VUR)** sections was established to enable the estimation of the mean size, surface area and volume of particles (Baddeley *et al.*, 1986 ; Gokhale, 1990). Any “horizontal reference plane” (HP) for the orientation of sections can therefore be chosen arbitrary in three-dimensional space, provided the slices are then cut with a constant thickness and in parallel planes so as to have all of them containing the “vertical direction”, *i.e.* the perpendicular axis to the horizontal plane (Figure 18). Sections are thus free to rotate around the vertical axis, as long as the 90° angle with the horizontal plane is maintained. Measurements are then performed on the projected image of the microstructure contained in the slice, with the projection direction perpendicular to the parallel planes of the slice.

**Figure 18 (ci-contre) : Le concept des plans verticaux (VERTICAL : dimension arbitraire dans l'espace tridimensionnel, VP ; plan vertical parallèle à cet axe, HP : plan horizontal perpendiculaire à VP).
D'après Baddeley *et al.* (1986).**

1.3.3. Estimateur non biaisé : densité de surface (S_v)

Afin d'estimer l'aire occupée par des particules par unité de volume, l'estimateur "densité de surface" est le plus indiqué. Ainsi, la superposition d'un ensemble de segments tests isotropiques, répartis de façon uniformément aléatoire dans l'espace, permet d'estimer statistiquement la densité de surface d'un quelconque objet. Le nombre d'intersections entre ces segments et les bordures de l'objet amène à la relation suivante (Baddeley *et al.*, 1986) :

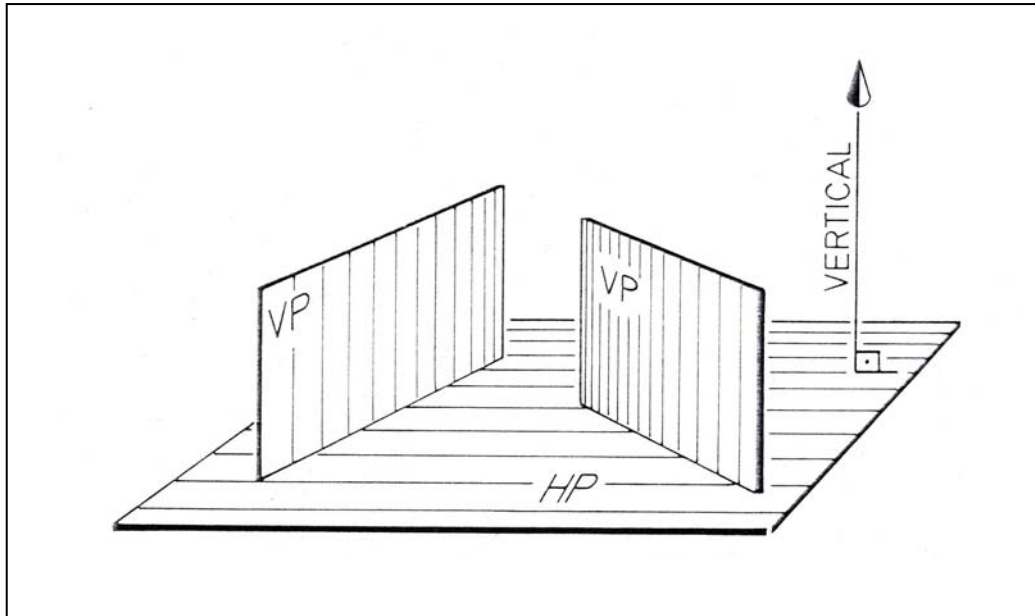
$$S_v = (2 \cdot \Sigma I) / L$$

avec S : aire étudiée

V : volume de la région étudiée au sein de l'objet

ΣI : nombre d'intersections

L : longueur totale des segments présents dans la région étudiée.



**Figure 18 : The concept of vertical planes (VERTICAL : arbitrary dimension in three-dimensional space, VP : vertical plane parallel to this last axis, HP : horizontal plane perpendicular to VP).
From Baddeley *et al.* (1986).**

1.3.3. Unbiased estimator : surface density (S_v)

To estimate the surface area of particles per unit volume, the **surface density (S_v)** estimator can be employed. Thus, the surface density of a curved object is statistically estimable by overlaying a test system of isotropic uniformly random (IUR) linear probes over a vertical section, and by counting thereafter the number of intersection points between these probes and the boundaries of the object of interest, so to apply the following equation (Baddeley *et al.*, 1986) :

$$S_v = (2 \cdot \Sigma I) / L$$

- where
- S : surface area of interest
 - V : volume of the phase of interest within the object
 - ΣI : number of intersections
 - L : total length of line falling within the phase of interest

Afin d'obtenir des segments tests isotropiques, répartis de façon uniformément aléatoire dans l'espace tridimensionnel, il est impératif que le plan vertical et les lignes tests de ce plan soient disposés de manière aléatoire. Pour cela, il convient de dessiner, régulièrement espacés, les méridiens d'une sphère autour d'un axe vertical qui a été choisi arbitrairement dans l'espace. Chacun des plans verticaux contenant ces méridiens doit systématiquement passer par cet axe vertical. L'obtention de segments test, à un angle θ de l'axe vertical et avec une longueur proportionnelle à $\sin \theta$, est alors permise en traçant des droites régulièrement espacées qui passent toutes par le point O (Baddeley *et al.*, 1986). Les lignes ainsi décrites sont isotropiques dans l'espace tridimensionnel : en observant celles-ci depuis le point O depuis lequel elles émanent toutes, elles apparaissent dirigées de façon uniforme dans l'espace (Figure 19).

Figure 19 (ci-contre) : Obtention de lignes isotropiques réparties de façon uniformément aléatoire dans l'espace tridimensionnel (VERT : axe vertical arbitraire, HP : plan horizontal, VP : plan vertical, line : ligne test, ϕ : angle autour de cet axe, θ : angle entre la direction verticale et la ligne test). D'après Baddeley *et al.* (1986).

Moreover, IUR linear probes in three-dimensional space can only be obtained if both the vertical plane and the test lines within that plane are randomly generated. For this purpose, equally spaced meridians of a sphere can be imagined around the arbitrary vertical axis chosen in three-dimensional space, to have all vertical planes that contain the meridians passing through the vertical axis. Evenly spaced test lines drawn so that they pass through the central point O, consequently allow $\sin \theta$ -weighted orientated linear probes to be obtained, *i.e.* the length of each line at an angle θ to the vertical axis is proportional to $\sin \theta$ (Baddeley *et al.*, 1986). The set of test lines so-described is therefore isotropic in three-dimension space, that is, from a common point O from which they all emanate, they are seen uniformly spread over all directions (Figure 19).

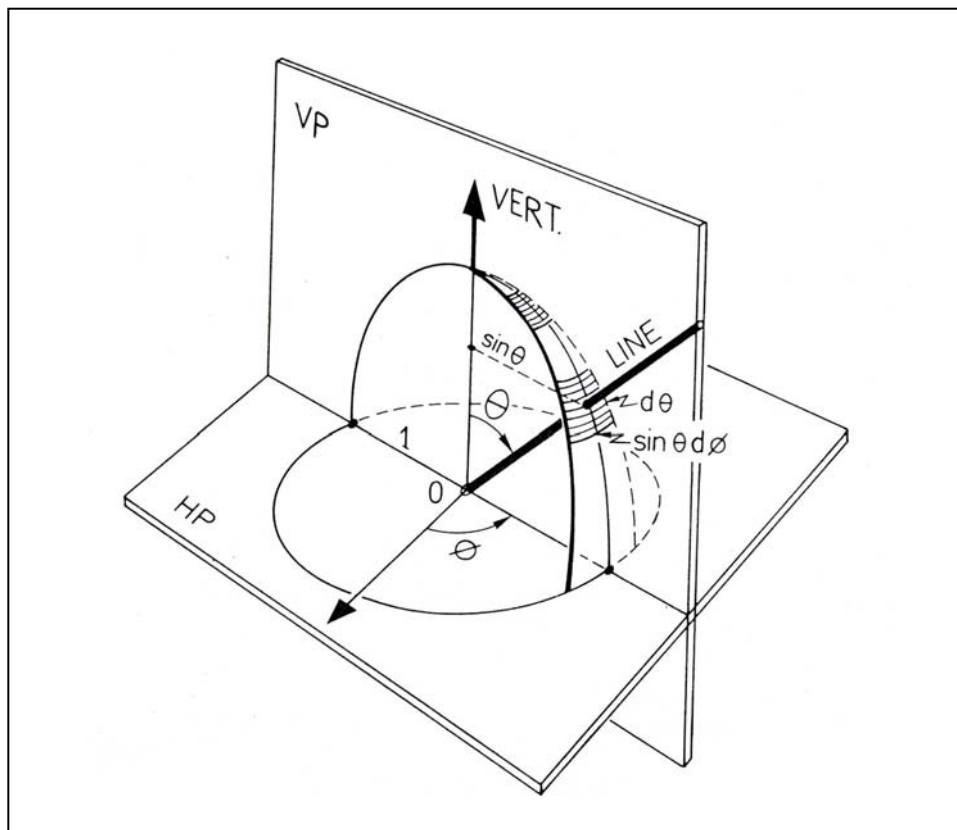


Figure 19 : Isotropic uniformly random lines in three dimensions.
(VERT : arbitrary vertical axis, HP : horizontal plane, VP : vertical plane,
line : line probe, ϕ : angle around the axis, θ : angle between the vertical
direction and the test line). From Baddeley *et al.* (1986).

Chapitre 2

EVALUATION DE L'INFLUENCE DE LA RACE ET DU CYCLE OESTRAL SUR LA DENSITE DES GLANDES ENDOMETRIALES

2.1. INTRODUCTION

2.2. MATERIELS ET METHODES

2.2.1. Animaux

2.2.2. Suivi du cycle œstral

2.2.3. Biopsies endométriales

2.2.3.1. Préparation de la jument

2.2.3.2. Biopsie sous contrôle visuel vidéoendoscopique

2.2.4. Préparation des tissus

2.2.4.1. Fixation

2.2.4.2. Traitement

2.2.4.3. Section et coloration des tissus

2.2.5. Mesure de la densité des glandes endométriales

2.3. RESULTATS EXPERIMENTAUX

2.3.1. Expérience 1 : Evaluation stéréologique de la densité des glandes endométriales dans l'utérus de la jument

2.3.2. Expérience 2 : Evaluation de l'influence de la race et du cycle oestral sur la densité des glandes endométriales

2.4. DISCUSSION

Chapter 2

EVALUATION OF THE INFLUENCES OF BREED AND OESTROUS CYCLE UPON ENDOMETRIAL GLAND DENSITY

2.1. INTRODUCTION

2.2. MATERIALS AND METHODS

2.2.1. Experimental animals

2.2.2. Monitoring the oestrous cycle

2.2.3. Recovery of endometrial biopsies

2.2.3.1. Preparation of the mare

2.2.3.2. Biopsy technique under videoendoscopic visual control

2.2.4. Preparation of tissues

2.2.4.1. Fixation

2.2.4.2. Processing

2.2.4.3. Cutting and staining sections

2.2.5. Measurements of endometrial gland surface density

2.3. EXPERIMENTAL RESULTS

2.3.1. Experiment 1 : Stereological evaluation of endometrial gland density throughout the mare's uterus

2.3.2. Experiment 2 : The influences of breed and oestrous cycle upon endometrial gland density in the mare

2.4. DISCUSSION

2.1. INTRODUCTION

La jument gravide exige la présence d'un endomètre intact et fonctionnel, essentiellement pendant la phase précédant l'implantation lorsque le conceptus se nourrit exclusivement des produits de sécrétion des glandes endométriales. Entre les 6^{ème} et 16^{ème} jours suivant l'ovulation, le conceptus, libre dans la lumière utérine, effectue des mouvements continus de va-et-vient entre les deux cornes utérines et libère son facteur de reconnaissance au niveau de la totalité de l'endomètre maternel pour l'informer de sa présence. Vers le 16-17^{ème} jour, le conceptus se positionne à la base d'une des cornes utérines (Ginther, 1983a, 1983b) toujours enveloppé de sa capsule glycoprotéique et acellulaire. Cette dernière, présente du 6^{ème} au 23^{ème} jour de gestation (Betteridge, 1989), permet d'éviter tout contact direct entre le trophoblaste et la surface épithéliale de l'endomètre. Entre les 25^{ème} et 35^{ème} jours, les cellules trophoblastiques à la jonction vitello-allantoïdienne s'hyperplasient de façon massive pour former une pâle bande circulaire épaissie, la ceinture chorionique (Allen and Moor, 1972). Celle-ci permet l'invasion localisée de l'endomètre maternel par les cellules fœtales sous-jacentes et la formation des cupules endométriales vers les 34-36^{ème} jours (Allen *et al.*, 1973). Après le 40^{ème} jour, un système d'interdigitations se met en place entre les villosités de l'allantochorion et les cryptes de l'endomètre pour former les microcotylédons, impliqués dans les échanges hémotrophiques fœto-maternels. La nutrition histotrophique, quant à elle, prend place entre les structures microcotylédonaires, dans les zones dites "en arcade", où les glandes endométriales sécrètent leurs productions exocrines pour être absorbés localement par le trophoblaste (Figure 20). De par sa placentation de type épithéliochorial, la jument gravide nécessite ainsi la présence d'un endomètre sain et fonctionnel pendant toute la durée de la gestation pour permettre les échanges hémotrophiques et histotrophiques fœto-maternels (Amoroso, 1952 ; Short, 1969 ; Steven, 1982).

2.1. 2.1. INTRODUCTION

The presence of a healthy and functional endometrium is vital throughout gestation in the mare, especially during the implantation process and during the long period preceding it when the non-attached conceptus takes its sustenance entirely from the exocrine secretions of the endometrial glands. After migrating continually throughout the entire uterine lumen between days 6 and 16 after ovulation in order to liberate its maternal recognition signal onto the whole surface of the endometrium, the conceptus becomes fixed at the base of one of the uterine horns on day 16 or 17 (Ginther, 1983a, 1983b). A unique acellular glycoprotein capsule surrounds the embryo between days 6 and 23 (Betteridge, 1989) which prevents the trophoblast and the endometrial epithelium from coming into direct contact one with each other. Between days 25 and 35, a band-like region of the chorion, at the point of abutment of the regressing yolk sac and enlarging allantois, becomes pale and thickened due to massive hyperplasia of the trophoblast cells in that region (Allen and Moor, 1972). Between days 34 and 36, the whole of this thickened chorionic girdle peels off the fetal membranes and the cells invade the overlying endometrium to form the unique equine endometrial cups (Allen *et al.*, 1973). Beyond day 40, blunt villi of allantochorion begin to interdigitate with accommodating crypts in the surface of the endometrium to begin the development of what will eventually become the mature microcotyledon that covers the entire surface of the placenta. These structures are involved in haemotrophic exchanges of small molecules and gases between the dam and the conceptus, while histotrophic nutrition continues only in the “arcade areas”. These latter, located between the microcotyledons, are characterised by the mouth of groups of endometrial glands that secrete their exocrine products towards the opposing absorptive tall columnar trophoblast epithelial cells (Figure 20). Hence, the definitive diffuse non-invasive epitheliochorial placenta (Amoroso, 1952 ; Short, 1969 ; Steven, 1982) requires a healthy endometrium throughout gestation to permit adequate foetomaternal histotrophic and haemotrophic exchanges.

La période encadrant le moment de l'implantation est une période sensible aux pertes embryonnaires puisque la majorité des avortements équin y est observée sur des animaux âgés et peu fertiles (Allen, 1993). De telles juments présentent des changements dégénératifs au sein de leur endomètre : un amincissement et une destruction partielle de l'épithélium luminal, une accumulation de cellules mononucléaires dans le stroma, une fibrose périglandulaire qui aboutit à la formation d'amas glandulaires non fonctionnels, et une dilatation des vaisseaux lymphatiques formant des lacunes lymphatiques dans le stroma et des kystes endométriaux intra-luminaux (Kenney, 1975, 1978 ; Ricketts, 1975a, 1975b ; Gordon and Sartin, 1978 ; Kenney and Doig, 1986 ; Figure 21). Lors de la gestation, ces changements dégénératifs nuisent aux échanges histotrophiques, ce qui aboutit à des avortements précoces (Kenney and Doig, 1986) et à la naissance de poulains de taille réduite (Bracher *et al.*, 1996). Les produits de sécrétion des glandes endométriales apparaissent ainsi être vitaux au maintien de la gestation équine. L'étude de leur composition et de leur distribution, ainsi que des facteurs exerçant une quelconque influence sur leur production, pourrait de ce fait permettre de mieux comprendre les causes d'avortement chez la jument.

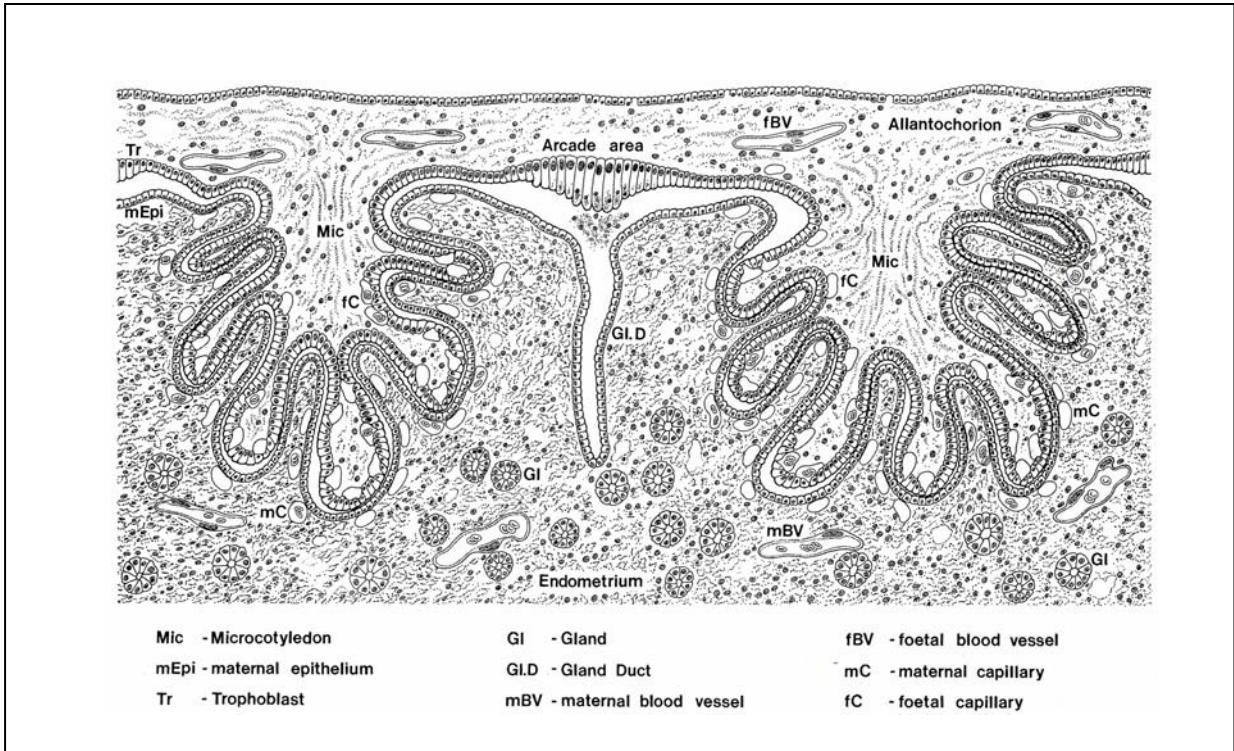
La technique de biopsie utérine est apparue être un moyen très simple et approprié de diagnostiquer ces changements dégénératifs (Ricketts, 1975a, 1975b ; Kenney, 1975, 1978 ; Kenney and Doig, 1986 ; Gordon and Sartin, 1978). L'endomètre de la jument est composé de deux couches principales : l'épithélium luminal et la *Lamina propria*, formée d'une couche compacte, la *Stratum compactum*, et d'une couche spongieuse, la *Stratum spongiosum*. Les glandes endométriales sont présentes au sein de la *Lamina propria* avec leurs portions sécrétrices exclusivement présentes dans *Stratum spongiosum* (Hammond and Wodzicki, 1941 ; Brandt, 1970 ; Ricketts, 1975a ; Kenney, 1978 ; Leishman *et al.*, 1982). L'endomètre subit également des variations saisonnières et passe d'un état de quiescence hivernal à une période d'activité durant la saison de reproduction (Britton, 1982).

The highest rates of pregnancy loss have been observed to occur during the peri-implantation period in ageing subfertile mares suffering from age-related degenerative changes in the endometrium, collectively termed endometrosis (Allen, 1993). The condition includes thinning and erosions of the luminal epithelium, accumulations of mononuclear cells in the stroma, deposition of fibrous tissue around the deeper fundic portions of the endometrial glands creating functionless "gland nests", and dilatation of lymph vessels leading to the formation of lymphatic lacunae within the stroma and endometrial cysts in the uterine lumen (Kenney, 1975, 1978 ; Ricketts, 1975a, 1975b ; Gordon and Sartin, 1978 ; Kenney and Doig, 1986 ; Figure 21). These degenerative changes, which result in suboptimal placentation and restrict the supply of the histotrophic components of fetal nutrition, consequently increase the rates of early pregnancy failures (Kenney and Doig, 1986) and the birth of undersized foals (Bracher *et al.*, 1996). Thus, a study of the nature and production of endometrial gland secretions, which are fundamental in the maintenance of equine pregnancy, as well as the factors that regulate their secretion, seems to be logical steps in understanding the causes of abortion in mares.

To diagnose these degenerative changes in the endometrium of the mare, the technique of uterine biopsy has proved to be very simple, practical and appropriate (Ricketts, 1975a, 1975b ; Kenney, 1975, 1978 ; Kenney and Doig, 1986 ; Gordon and Sartin, 1978). The mare's endometrium is composed of two layers : the superficial luminal epithelium and the deeper *Lamina propria*, which is divided into the *Stratum compactum* and the *Stratum spongiosum*. The endometrial glands are the major components of the *Lamina propria* and their secretory portions are located exclusively in the *Stratum spongiosum* (Hammond and Wodzicki, 1941 ; Brandt, 1970 ; Ricketts, 1975a ; Kenney, 1978 ; Leishman *et al.*, 1982). As the mare is a seasonally polyoestrous animal, the endometrium is subject to annual changes and goes from complete atrophy during the Winter anoestrous period to full secretory activity period in the breeding season (Britton, 1982).

Figure 20 (ci-contre) : Le placenta épithéliochorial de la jument montrant les interdigitations entre l'allantochorion et les cryptes endométriales. D'après Bracher *et al.* (1997).

Figure 21 (ci-contre) : Représentation schématique d'un endomètre sain (gauche) et de l'endomètre d'une jument âgée avec un kyste (droite).



**Figure 20 : The epitheliochorial microcotyledonary placenta of the horse showing the finger-like extrusions of the allantochorion interdigitating with accommodating endometrial crypts.
From Bracher *et al.* (1997).**

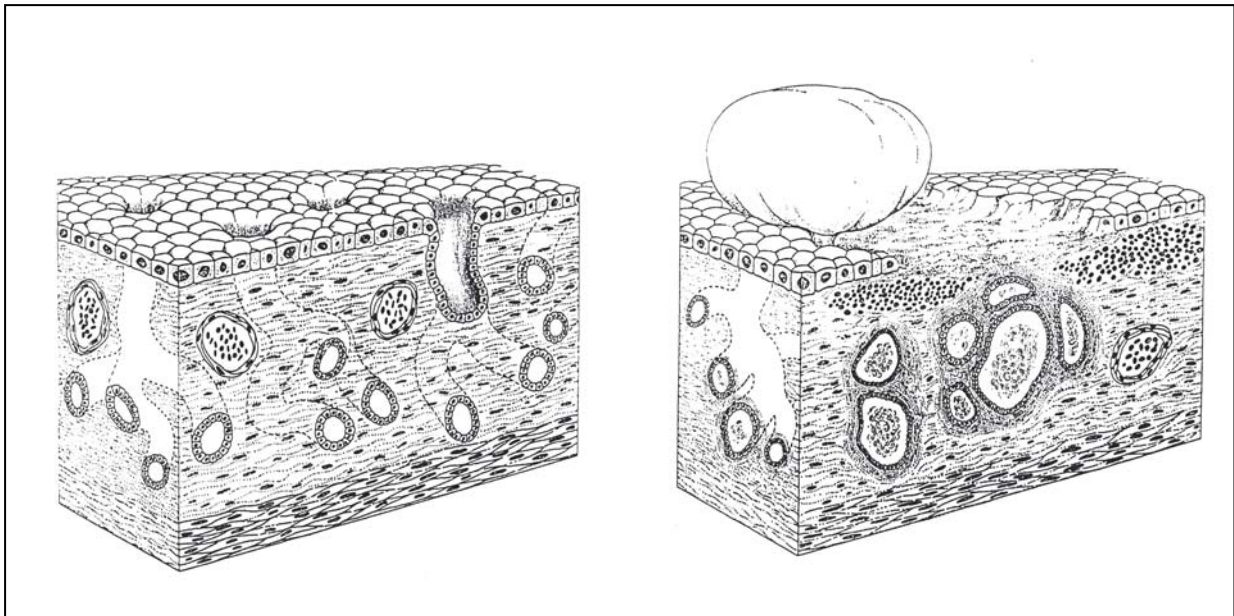


Figure 21 : Diagrammatic representation of the endometrium in a healthy young mare (left) and in an aged mare suffering from endometrosis (right).

L'endomètre de la jument subit des variations physiologiques pendant le cycle œstral, sous l'influence des hormones stéroïdiennes (Brandt, 1970 ; Ricketts, 1975a ; Gordon and Sartin, 1978 ; Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986). Pendant l'œstrus, alors que le stroma est œdémateux et que les glandes sont hyperplasiées, la densité glandulaire apparaît moins élevée que pendant le diœstrus (Brandt, 1970 ; Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986).

Des mesures morphométriques ont été conduites afin de quantifier la densité des glandes endométriales équine. En se servant d'un objectif microscopique calibré, Keenan *et al.* (1987) ont mesuré le nombre et le diamètre des glandes à travers le cycle œstral : alors que le diamètre des glandes superficielles est apparu plus important que celui des glandes basales, une diminution commune de celui-ci a été observée après le 12^{ième} jour de diœstrus. Aussi, le nombre de glandes a été augmenté de façon progressive pendant le diœstrus avec une profondeur des glandes accrue uniquement chez les juments gravides.

Récemment, Gerstenberg (1994) s'est servie d'une méthode morphométrique assistée par ordinateur pour étudier plus précisément l'endomètre équin. Les paramètres de densité, de fibrose, d'arborescence et d'activité sécrétoire des glandes endométriales ont été quantifiés à partir de 9 biopsies prélevées équitablement pendant l'œstrus, le diœstrus et l'anœstrus, sur 5 juments classées "normales" sur l'échelle de Kenney and Doig (1986). Les résultats ont montré une augmentation significative de la densité glandulaire entre les périodes d'œstrus et de diœstrus, avec des surfaces respectives de 18.3 et 36.5 mm² couvertes par les glandes pour 100 mm² de *Str. spongiosum*. Par ailleurs, les glandes sont apparues plus allongées pendant l'œstrus avec un nombre diminué de sections transversales de glandes par cm² de *Str. Spongiosum*.

Les essais de quantification de densité en glandes endométriales faits jusqu'à présent ont amené le plus souvent à des résultats biaisés ne permettant pas d'avoir des valeurs reproductibles et comparables. L'objet des deux expériences décrites ci-après était ainsi d'utiliser une méthode stéréologique assistée par ordinateur (Weibel, 1979) pour quantifier de façon précise et non biaisée la densité de surface des glandes endométriales (Sv), à savoir l'aire occupée par les glandes par unité de volume de *Stratum spongiosum*.

During the breeding season, physiological hormone-dependent variations occur in the endometrium throughout the oestrous cycle (Brandt, 1970 ; Ricketts, 1975a ; Gordon and Sartin, 1978 ; Kenney, 1978 ; Gross and Leblanc, 1984 ; Kenney and Doig, 1986). A diffuse glandular hyperplasia is observed during oestrus together with an increase in stromal oedema, while an apparent increase in density of endometrial gland is described during dioestrus (Brandt, 1970 ; Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986).

Morphometric analyses have been carried out previously to quantify the density of endometrial glands. Keenan *et al.* (1987) used a micrometer-calibrated eyepiece graticule to measure both the number and the diameter of glands at different stages of the cycle. They found that superficial glands have a significantly greater diameter than the basal glands and the diameters of both types of glands were decreased after day 12 of dioestrus. An increase in gland number as dioestrus progressed was noted but the depth of glands only seemed to rise in pregnant mares. More recently, Gerstenberg (1994) carried out a computerised morphometric study of the equine endometrium in order to give more reliable measurements. The density, and the degree of nesting, branching and secretory activity of endometrial glands were measured in 9 biopsies taken from 5 mares classified as “normal” on the Kenney and Doig (1986) scale, 3 of the biopsies were taken during oestrus, 3 during dioestrus and 3 in anoestrus. Mean surfaces areas of 18.3 and 36.5 mm² per 100 mm² surface area of *Str. spongiosum* were covered by glands in the oestrous and dioestrous groups. Moreover, although the degree of branching in the glands increased during oestrus, the number of cross-sections per cm² surface area of *Str. spongiosum* decreased.

Although visual observations and two-dimensional morphometric analyses have already been employed to evaluate endometrial gland density in the mare, the use of an unbiased and precise method still appears to be necessary to achieve accurate and reproducible measurements (Weibel, 1979). Hence, in the present study, a stereological computer-assisted analysis method was used in two experiments to quantify precisely the area covered by endometrial glands per unit volume of *Stratum spongiosum*, *i.e.* the surface density (Sv).

Expérience 1 : Evaluation stéréologique de la densité des glandes endométriales dans l'utérus de la jument.

Bergman and Kenney (1975) et Ricketts (1975b) ont montré l'uniformité structurale de l'endomètre de la jument : ainsi une unique biopsie utérine est apparue suffisante et représentative de la totalité de l'endomètre équin. Blanchard *et al.* (1987) ont prélevé 12 biopsies endométriales au niveau de sites utérins bien définis : la hauteur des cellules épithéliales luminales ainsi que les degrés de fibrose et de dilatation des vaisseaux lymphatiques sont apparus homogènes pour les différentes localisations. Au niveau de la région péri-cervicale, les glandes endométriales sont cependant apparues moins profondes et plus éparpillées qu'au niveau du reste de la *Lamina propria*.

La première expérience a été menée pour attribuer un degré de confiance aux mesures stéréologiques de densité en glandes endométriales réalisées à partir d'une unique biopsie utérine. Les prélèvements endométriaux ont été réalisés au niveau de 5 sites définis de l'utérus de ponettes Galloises abattues pendant l'œstrus. La variabilité inter-individuelle au niveau de chacun des sites utérins devrait ainsi permettre d'attribuer un degré de confiance à la technique stéréologique. La comparaison des valeurs au niveau des divers sites utérins pour un même individu devrait quant à elle renseigner sur l'uniformité de répartition des glandes endométriales au sein de l'utérus de la jument.

Experiment 1 : Stereological evaluation of endometrial gland density throughout the mare's uterus.

In the absence of any uterine pathology, several biopsies taken from different areas of the endometrium throughout the uterus have revealed the great uniformity of the endometrium. Thus, it could be concluded that a single endometrial biopsy was likely to be representative of the entire uterus (Bergman and Kenney, 1975 ; Ricketts, 1975b). More recently, Blanchard *et al.* (1987) collected a total of 12 endometrial biopsies from specific sites. Although the uniformity in the height of the luminal epithelial cells, the degree of fibrosis and the dilatation of the lymph vessels was firmly established, the endometrial glands appeared shallower and more sparsely separated in the *Lamina propria* of biopsies taken close to the cervix.

An initial experiment was carried out to judge the reliability of the stereological measurement of endometrial gland density in a single endometrial biopsy. Measurements were conducted on biopsies taken from 5 defined locations in the uteri of Welsh Pony mares killed at the same stage of the oestrous cycle. Comparison of the mean values between animals for each site in the uterus would give some information as to the variability between individuals, and thus on the reliability of the stereological counting procedure as a whole. In addition, the method would give some idea of the repartition of endometrial glands within the uterus.

Expérience 2 : Evaluation de l'influence de la race et du cycle œstral sur la densité des glandes endométriales.

Allen *et al.* (2000) ont transféré des embryons de juments Thoroughbred dans des juments Thoroughbred ou des ponettes Galloises, ainsi que des embryons de ponettes Galloises dans des juments des deux races. L'analyse morphométrique des placentas a montré qu'il existait une relation proportionnelle entre le poids du poulain à la naissance, la densité de surface des microcotylédons placentaires et la surface totale de contact fœto-maternelle. Plus récemment, Wilsher *et al.* (2000) ont quantifié la réduction importante en densité microcotylédonaire de placentas de ponettes Galloises ($S_v = 0.0297 \mu\text{m}^{-1}$) par rapport à celle de juments Thoroughbred ($S_v = 0.0371 \mu\text{m}^{-1}$). De telles variations ont conduit à s'interroger sur l'éventuelle différence de densité en glandes endométriales qu'il pourrait exister entre ces deux races. La seconde expérience a ainsi été réalisée pour étudier cette hypothèse et analyser l'influence exercée par le cycle œstral sur la densité et le développement des glandes endométriales.

Experiment 2 : The influences of breed and oestrous cycle upon endometrial gland density in the mare.

Allen *et al.* (2000) transferred embryos from Thoroughbred mares into Thoroughbred or Welsh Pony mares, and embryos from Welsh Pony into Thoroughbred or Welsh Pony mares. Detailed morphometric analysis of the placenta of each foal showed a remarkably strong correlation between foal birth weight and both the surface density of microcotyledons on the placenta and the total area of feto-maternal contact at the placental interface. In a further paper, Wilsher *et al.* (2000) demonstrated a significant reduction in the surface density of microcotyledons on the placentae of Welsh Pony mares ($S_v = 0.0297 \mu\text{m}^{-1}$) versus Thoroughbred mares ($S_v = 0.0371 \mu\text{m}^{-1}$), regardless of the fetus being carried. This suggested the possibility of differences in endometrial gland density between these two breeds as underlying the observed differences in microcotyledon density on the placentae. The second experiment was therefore undertaken to examine this hypothesis and to determine the influence of the oestrous cycle upon endometrial gland development and density.

2.2. MATERIELS ET METHODES

2.2.1. Animaux

Les expériences ont été réalisées en fin de saison de reproduction (août-octobre 2000) à partir du troupeau expérimental de l'Unité de Fertilité Equine, à Newmarket, Angleterre.

Expérience 1 : Evaluation stéréologique de la densité des glandes endométriales dans l'utérus de la jument.

Quatre ponettes Galloises de 250 à 450 kg, normalement cyclées et âgées de 4 à 8 ans, ont été sacrifiées alors qu'elles étaient en œstrus. Des biopsies utérines ont été prélevées à 5 localisations définies de l'utérus : le corps utérin, la base et l'extrémité des deux cornes utérines (Figure 22).

Figure 22 (ci-contre) : Localisations des prélèvements endométriaux en *post-mortem*.

2.2. MATERIALS AND METHODS

2.2.1. Experimental animals

Experiments were carried out towards the end of the breeding season (August-October) in 2000. The horses used were drawn from the experimental herd maintained by the Equine Fertility Unit, at Mertoun Paddocks, in Newmarket, England.

Experiment 1 : Stereological evaluation of endometrial gland density throughout the mare's uterus.

Four normal cycling Welsh Pony mares, weighing 250-450 kg and aged 4 to 8 years, were killed while in oestrus. Endometrial biopsies were taken at 5 precise locations in the uterus : i) the body of the uterus, ii) the base and the tip of both uterine horns (Figure 22).

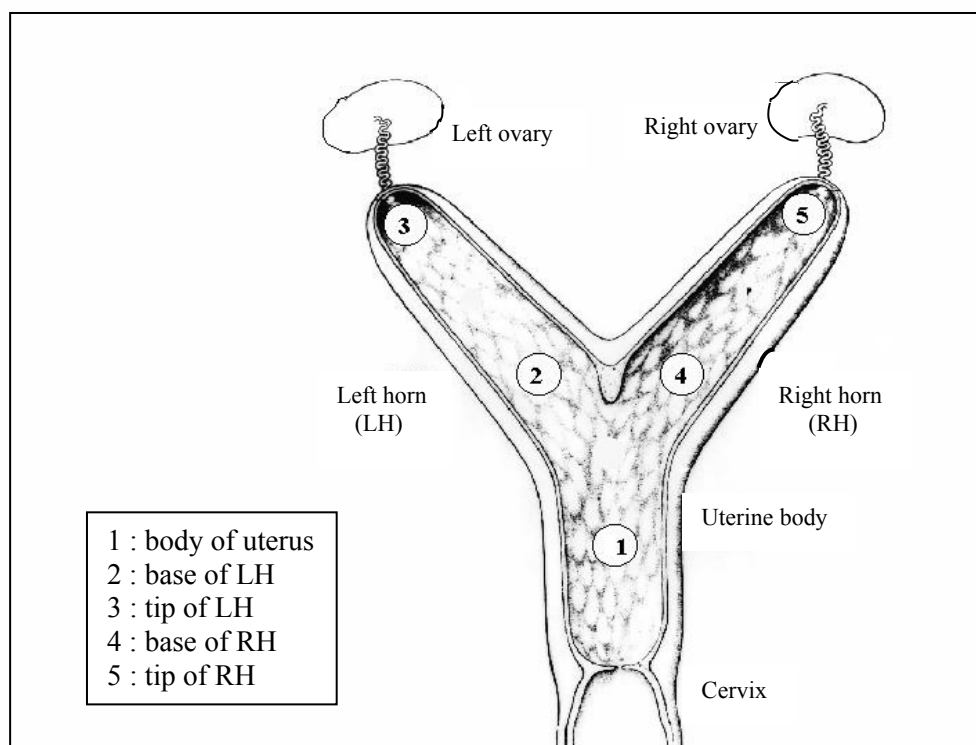


Figure 22 : Locations of the endometrial samples recovered *post mortem*.

Expérience 2 : Evaluation de l'influence de la race et du cycle œstral sur la densité des glandes endométriales.

Un ensemble de 18 biopsies utérines a été prélevé sur des juments Thoroughbred, de 500 à 650 kg, normalement cyclées et âgées de 5 à 22 ans. Quatre juments étaient en œstrus, quatre entre les jours 3 et 5 de diœstrus, quatre à jour 7 ou 8 de diœstrus, quatre à jour 12 ou 13 de diœstrus et enfin trois à jour 16 ou 17 de diœstrus.

De la même façon, des biopsies utérines ont été prélevées sur des ponettes Galloises âgées de 4 à 14 ans. Quatre d'entre elles se trouvaient en œstrus, quatre à jour 8 de diœstrus et trois à jour 12 de diœstrus.

Toutes les biopsies ont été réalisées sous contrôle visuel endoscopique, précisément à la base d'une des cornes utérines (Chapitre 2.2.3.).

Experiment 2 : The influences of breed and oestrous cycle upon endometrial gland density in the mare.

A total of 18 endometrial biopsies were recovered from normal cycling Thoroughbred mares weighing 500-650 kg and aged 5 to 22 years. Three of the mares were in oestrus, 4 were between days 3 and 5 of dioestrus, 4 mares were at day 7 or 8 of dioestrus, 4 mares were at day 12 or 13 of dioestrus and 3 mares were at day 16 or 17 of dioestrus.

Another set of endometrial biopsies were taken from normal cycling Welsh Pony mares aged 4-14 years old. Four of these mares were in oestrus, 4 mares on day 8 of dioestrus and 3 on day 12 of dioestrus.

Each biopsy was taken at a defined place at the base of one of the uterine horns, under videoendoscopic visual control (see Chapter 2.2.3.).

2.2.2. Suivi du cycle œstral

La croissance folliculaire et le moment de l'ovulation ont été suivis par échographie, et le premier jour de visualisation du corps jaune a été désigné comme le jour 0 du cycle (Figure 23). Des prélèvements sanguins quotidiens (10 mL) au niveau de la veine jugulaire ont été effectués durant les jours encadrant le moment de l'ovulation. Après centrifugation, le sérum décanté a été conservé à -20°C jusqu'à la réalisation du test AELIA (Amplified Enzyme-Linked Immuno-Assay), décrit par Allen et Sanderson (1987), pour la détermination de la concentration en progestérone. Quand le seuil de 1 ng/mL a été dépassé, cela a indiqué que l'ovulation avait eu lieu le jour précédent.

Figure 23 (ci-contre) : Suivi échographique de la croissance folliculaire et de l'ovulation.

2.2.2. Monitoring the oestrous cycle

Follicular development and ovulation were monitored ultrasonographically, and the day when a corpus luteum was first visualised was taken as being day 0 of the cycle (Figure 23). Daily jugular vein blood samples (10 mL) taken during the days before and after ovulation were collected into plastic blood tubes and centrifuged at room temperature. The serum was then decanted and stored at -20°C until assayed for progesterone, using the Amplified Enzyme-Linked Immuno-Assay (AELIA) described by Allen and Sanderson (1987). A rise in progesterone concentration to over 1 ng/mL confirmed the occurrence of ovulation the previous day.

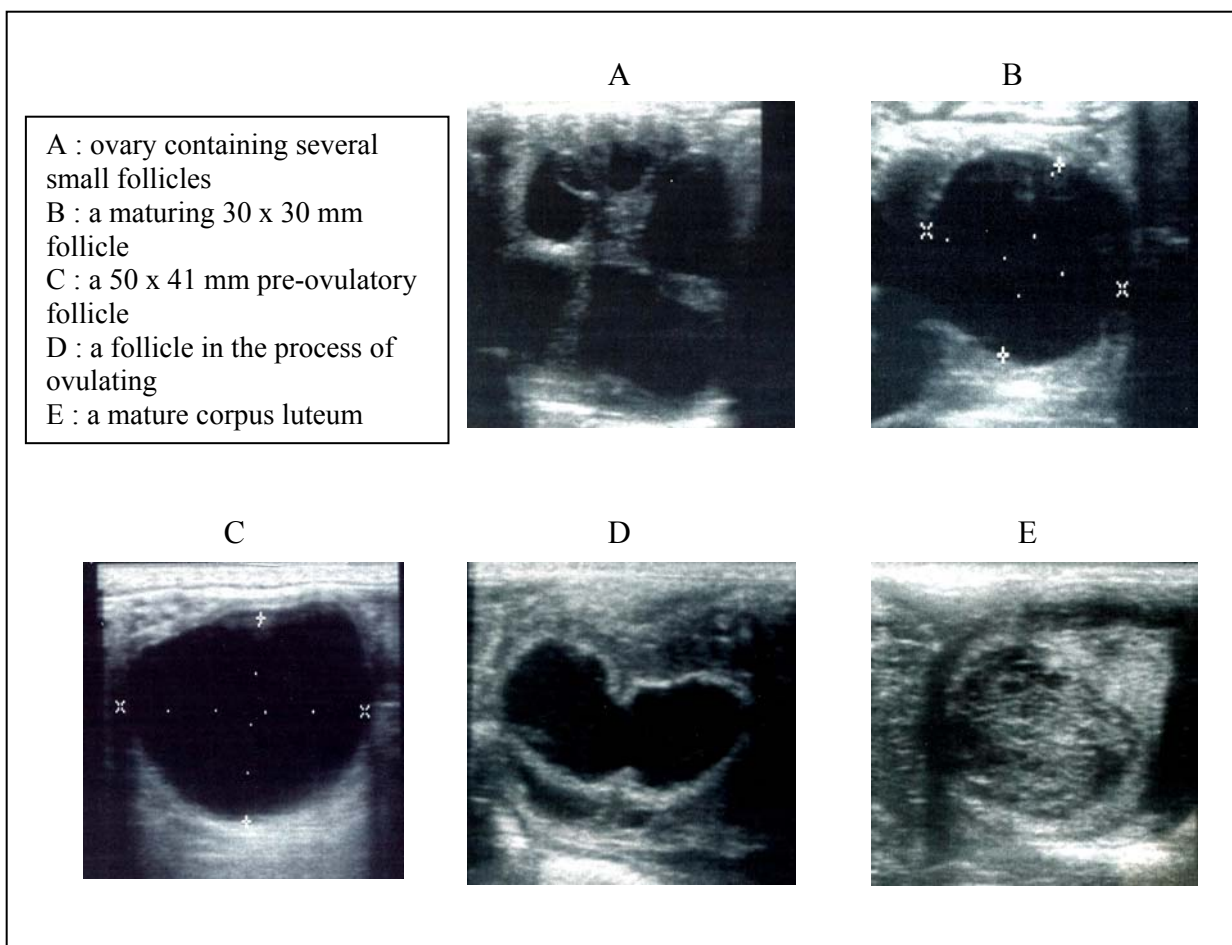


Figure 23 : Ultrasonographic visualisation of follicular development and ovulation.

2.2.3. Biopsies endométriales

2.2.3.1. Préparation de la jument

Après avoir vidé le rectum de la jument de son contenu, un examen rectal du tractus génital a été réalisé. La région péri-vulvaire a été vigoureusement nettoyée à l'aide d'une solution antiseptique, puis rincée à l'eau courante avant d'être séchée avec du papier absorbant. Chaque jument a été tranquilisée par une combinaison intraveineuse de 6 mg/kg d'hydrochloride de détomidine (*Domosedan : Pfizer Ltd., Kent, UK*) et de 1.15 µg/kg de butorphenol (*Torbugesic : Fort Dodge, Southampton, UK*).

2.2.3.2. Biopsie sous contrôle visuel endoscopique

Le vidéoendoscope (*Model EC-3400F : Pentax, Slough, UK*), tenu au creux d'une main gantée et lubrifiée (*X-Y : Johnson & Johnson Ltd., Maidenhead, UK*), a été introduit dans le vagin puis dans l'utérus en se servant de l'index pour le passage cervical (Bracher and Allen , 1992 ; Figure 24). De l'air filtré a été insufflé pour distendre la lumière utérine. Quand la zone de bifurcation des deux cornes utérines a été visualisée sur le moniteur (Figure 25), l'endoscope a été fermement maintenu en place pendant qu'une pince à biopsie de type Yeoman a été introduite dans l'utérus et amenée visuellement au niveau de la base d'une des cornes utérines (Figure 26). La pince à biopsie, apposée à la paroi endométriale, a ensuite été ouverte tout en pompant l'air précédemment insufflé. Le pli endométrial ainsi emprisonné entre les mâchoires de la pince à biopsie a alors été sectionné en retirant la pince d'un coup sec (Figure 27). Une injection intramusculaire de 250 à 375 µg de cloprosténol, analogue à la prostaglandine F (*Estrumate : Coopers Animal Health Ltd., Cheshire, UK*) a ensuite été administrée à chacune des juments possédant un corps jaune de plus de 5 jours pour induire l'œstrus et faciliter ainsi l'évacuation de sang ou de tout autre contaminant présent dans l'utérus.

2.2.3. Recovery of endometrial biopsies

2.2.3.1. Preparation of the mare

After emptying the rectum of the mare with a lubricated glove, a rectal examination of the genital tract was performed. The tail was bandaged and tied up out of the way before the vulva and perineum were washed thoroughly with an antiseptic solution, rinsed with running water and dried with disposable paper. The mare was then sedated by giving an intravenous injection of a combination of 6 mg/kg detomidine hydrochloride (*Domosedan* : Pfizer Ltd., Kent, UK) and 1.15 µg/kg butorphenol (*Torbugesic* : Fort Dodge, Southampton, UK).

2.2.3.2. Biopsy technique under videoendoscopic visual control

The videoendoscope (*Model EC-3400F* : Pentax, Slough, UK), held in the palm of a sterile gloved hand lubricated lightly with surgical jelly (*X-Y* : Johnson & Johnson Ltd., Maidenhead, UK), was passed into the vagina, and then into the uterus through the cervix, using the index finger as an insertion guide (Figure 24). The uterus was distended by filtered air insufflated through the air/water channel of the endoscope, as described by Bracher and Allen (1992). Once the bifurcation of the uterine horn was visible on the screen (Figure 25), the endoscope was held in position while a rigid Yeoman biopsy forceps with basket-jaws was passed through the cervix alongside the endoscope and progressed visually to the base of one horn (Figure 26). After bringing the jaws into contact with the endometrium, the jaws were opened and the air in the uterine lumen was evacuated using a medical suction pump. This sucked a fold of endometrium into the jaws, which were then closed to punch off the biopsy of endometrium by the operator giving a sharp backwards tug on the forceps (Figure 27). An intramuscular injection of 250-375 µg of the prostaglandin F analogue, cloprostenol (*Estrumate* : Coopers Animal Health Ltd., Cheshire, UK) was then given to each mare with a corpus luteum over 5 days old to induce oestrus and thereby help to evacuate any blood or other contamination from the uterus.

Figure 24 (ci-contre) : Examen vidéoendoscopique du tractus génital.

Figure 25 (ci-contre) : Visualisation de la bifurcation des cornes utérines par endoscopie.

Figure 26 (ci-contre) : Ecartement des mâchoires de la pince à biopsie.

Figure 27 (ci-contre) : Pli endométrial emprisonné entre les mâchoires de la pince à biopsie.



Figure 24 : Videoendoscopic examination of the uterus.

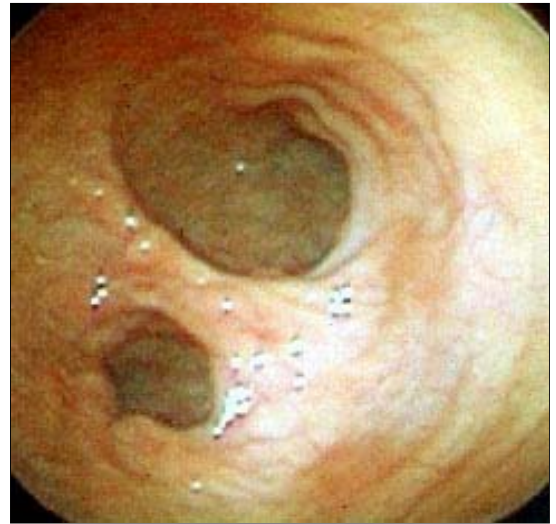


Figure 25 : Endoscopic visualisation of the bifurcation of the uterine horns.

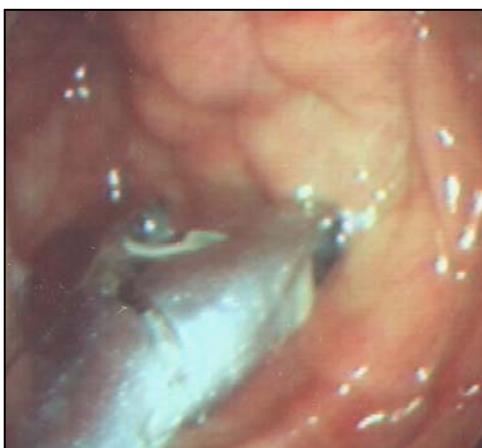


Figure 26 : Biopsy forceps jaws opened and apposed to the uterine wall.



Figure 27 : A fold of endometrium trapped in the jaws of the biopsy forceps after evacuation of the air from the uterine horn.

2.2.4. Préparation des tissus

2.2.4.1. Fixation

Les biopsies utérines ont été fixées dans du liquide de Bouin (Annexe 1) selon un ration de 1 volume de tissu pour 10 volumes de fixateur. Après 24-48 h, les échantillons ont été transférés dans de l'alcool à 70 % pour éviter une détérioration excessive des tissus.

2.2.4.2. Traitement

Les tissus ainsi fixés ont été traité selon un procédé automatique de 24 heures (*Hendrey Relays, Berks, UK*) consistant en une déshydratation initiale des échantillons à travers un gradient croissant d'alcool. L'excédent d'alcool a ensuite été retiré des tissus par un agent nettoyant (*Citroclear : HD Supplies, Bucks, UK*) avant de les imprégner de cire de paraffine fondue à 56°C (*Raymond A Lamb, London, UK*). Pour finir, les tissus ont été disposés dans des moules avant d'être recouverts de paraffine (*BDH, Poole, UK*).

2.2.4.3. Section et coloration des tissus

Les blocks de cire ont été placés sur un microtome, Microm HM 335E (*MICRON Laborgeräte GmbH, Walldorf, Germany*), et six sections de 5 µm suffisamment espacées ont été effectuées par biopsie. Les sections ont ensuite été disposées sur un bain d'eau distillée à 54-56°C, avant d'être recueillies sur une lame de microscope imprégnée d'alcool à 70 %. Les lames ont alors été placées à 40 °C pendant au moins 24 heures, puis colorées à l'Hæmatoxyline et Eosine (Annexe 2) avant de les recouvrir d'une lamelle de protection.

2.2.4. Preparation of tissues

2.2.4.1. Fixation

The biopsies were fixed in Bouin's fluid (Appendix 1) with a ratio of 1 part tissue to 10 parts fixative and after 24-48 hours, they were transferred into 70% alcohol to avoid excessive tissue hardening.

2.2.4.2. Processing

Fixed tissues were processed in the Histokinette tissue processor (*Hendrey Relays, Berks, UK*). This 24 hour automatic process consisted of an initial dehydration through a gradient of increasing alcohol concentrations. The alcohol was then removed using a clearing agent (*Citroclear : HD Supplies, Bucks, UK*) before the tissue sample was impregnated with molten pure paraffin wax at 56°C (*Raymond A Lamb, London, UK*). Finally, each sample was placed in a mould and covered with melted embedding wax (*BDH, Poole, UK*).

2.2.4.3. Cutting and staining sections

Paraffin blocks were affixed to the chuck of the microtome (*Microm HM 335E : Laborgeräte GmbH, Walldorf, Germany*), and 6 widely spaced sections of 5 µm thickness, were cut through each sample. The sections were floated out in a waterbath of warm distilled water (54-56°C), before being picked up on a glass microscope slide previously that had been soaked previously in 70% alcohol. After air drying for at least 24 h at 40°C, the sections were stained with Haematoxylin and Eosin (H&E : Appendix 2) and covered with a glass coverslip.

2.2.5. Mesure de la densité de surface (Sv) des glandes endométriales

Pour estimer de façon non biaisée la densité de surface (Sv), il convient de superposer un ensemble de segments tests isotropiques sur une structure tridimensionnelle et d'évaluer ensuite le nombre d'intersections entre ces segments tests et les limites de la structure. Un logiciel informatique permet de disposer une grille de segments tests sur des sections verticales d'endomètre. En prenant garde de constamment aligner l'axe vertical de la section avec un axe extérieur fixe de référence, ici la lumière utérine, le nombre d'intersections entre ces segments tests et l'épithélium des glandes endométriales présentes dans la *Stratum spongiosum* a été comptabilisé (Baddeley *et al.*, 1986).

La grille de segments tests a été produite par le logiciel de stéréologie digitale Fenestra, Version 2.3 (*Confocal Technologies, Liverpool, 1993*). Le moniteur informatique a été relié à un microscope à transmission Leitz Laborlux K (*Ernst Leitz GMBH, Wetzlar, Germany*), lui-même connecté à un dispositif vidéo (*JVC, TK-1085E, Leica UK Ltd*). Les sections verticales de *Stratum spongiosum* ont été observées à l'aide d'un objectif x10 et projetées sur un moniteur informatique. Gundersen and Jensen (1987) ont démontré qu'un nombre total de 100 à 200 "points test" et d'intersections comptés par animal était suffisant pour estimer de façon précise Sv. Une grille test formée de 6 rangées et de 6 colonnes est ainsi apparue adéquate pour l'estimation de la densité des glandes endométriales (Figure 28). Un ensemble de 36 segments tests a été positionné de façon aléatoire sur chaque section (Figure 29) et seul le nombre de points tests superposés à la *Stratum spongiosum* a été intégré dans le logiciel. Chaque biopsie endométriale ayant été sectionnée en moyenne 6 fois, un total de 1080 segments tests a été compté par échantillon (180 segments tests par section). Le nombre d'intersections (I) entre les segments tests et l'épithélium glandulaire a été pris en compte. Le logiciel informatique a alors calculé la densité de surface selon l'équation $Sv = (2 \cdot \Sigma I) / L$ donnée par Baddeley *et al.* (1986), ainsi que le coefficient de variation (CV) pour chaque valeur Sv, dont la limite de confiance a été fixée à 2.5 %.

2.2.5. Measurement of endometrial gland surface density (Sv)

An unbiased estimation of the surface density (Sv) involves probing the three-dimensional structure with isotropic linear probes and evaluating the intersection count per unit length of the probes. Using a digital computerised method, a test system of $\sin \theta$ -weighted linear probes, commonly called 'needles', was overlaid on the microscopic image of the vertical sections of endometrium. After rotating each section, so as to align it with a fixed exterior reference, *i.e.* the uterine lumen, the number of times the 'needles' intersected the epithelium of endometrial glands within the *Stratum spongiosum* was counted, keeping the vertical axis of the test system constantly aligned with the vertical direction of the sections (Baddeley *et al.*, 1986).

To produce such a test system grid, the Fenestra Digital Stereology programme, Version 2.3 (*Confocal Technologies, Liverpool, 1993*) was employed jointly with a Leitz Laborlux K transmitted-light microscope (*Ernst Leitz GMBH, Wetzlar, Germany*), itself connected to a colour video camera (*JVC, TK-1085E, Leica UK Ltd*). Vertical sections of *Stratum spongiosum* were digitised under a 10x objective and projected onto the computer screen. Gundersen and Jensen (1987) demonstrated that a total of 100-200 test points and intersections counted per animal is enough to give an accurate evaluation of Sv. Therefore, a grid of 6 rows and 6 columns of test points appeared to be sufficient to estimate the endometrial gland surface density (Figure 28). Only the number of test points that overlaid the *Stratum spongiosum* were entered in the computer programme, before a total of 36 isotropic uniformly random 'needles' were positioned on the screen (Figure 29). Since an average of 6 sections were cut from each endometrial biopsy, 1080 'needles' were counted per sample (*i.e.* 180 'needles' per section). The number of intersections (I) between the 'needles' and the glandular epithelial cells was counted. The computer then automatically calculated the surface density, using the equation $S_v = (2 \cdot \Sigma I) / L$ given by Baddeley *et al.* (1986), as well as the coefficient of variation (CV) for each individual value of Sv. The estimation of Sv was considered to be sufficiently precise when the coefficient of variation was below 2.5 %.

Figure 28 (ci-contre) : Grille de 36 “points tests” superposés à une section histologique verticale.

Figure 29 (ci-contre) : 36 segments tests superposés à la section, avec 35 intersections comptabilisées.

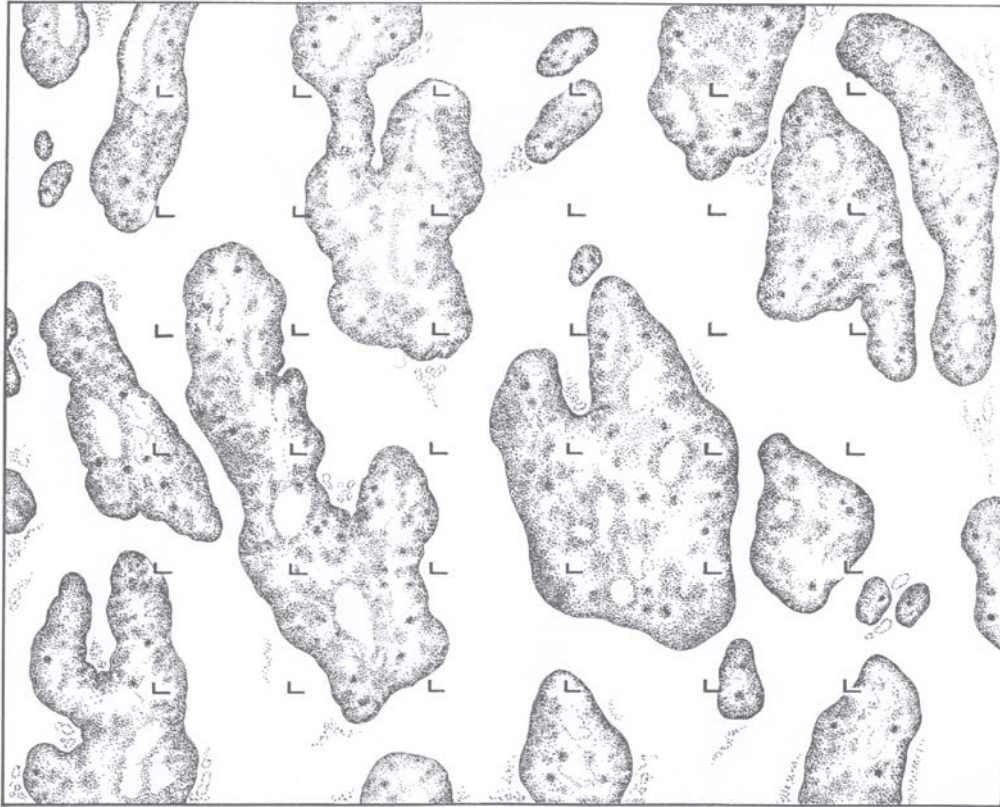


Figure 28 : Test system grid of 36 test points overlaid on a vertical histological section.

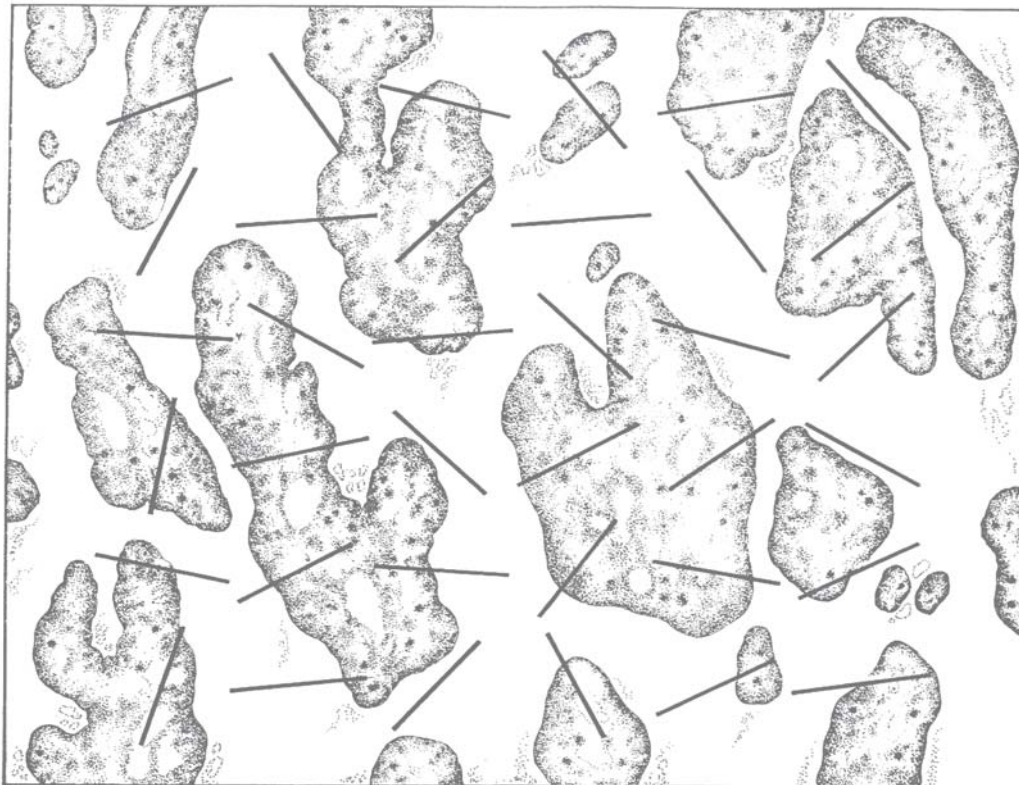


Figure 29 : Total of 36 linear probes ('needles') overlaid on the section, with 35 intersections counted.

2.3. RESULTATS

Les mesures de densité de surface ont été analysées de manière statistique par le logiciel SIGMASTAT Version 2.0 (*SPSS Inc., Chicago*).

2.3.1. Expérience 1 : Evaluation stéréologique de la densité des glandes endométriales dans l'utérus de la jument.

Les résultats de densité de surface pour chacune des localisations de l'utérus sont regroupés dans le Tableau 1.

Tableau 1 (ci-contre) : **Densités de surface moyennes des glandes endométriales de ponettes Galloises en œstrus.**

2.3. EXPERIMENTAL RESULTS

Surface density measurements were analysed statistically using the SIGMASTAT software package Version 2.0 (*SPSS Inc., Chicago*).

2.3.1. Experiment 1 : Stereological evaluation of endometrial gland density throughout the mare's uterus.

Surface density values for each localisation within the uterus are summarised in Table 1.

Table 1 : Mean endometrial gland surface density values throughout the uterus of Welsh Pony mares in oestrus.

Localisation of biopsy	Mean endometrial gland Sv ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^{-1}$)	
Body of uterus	1.535 (n = 4)	SD = 0.1900 SEM = 0.0952
Base of left horn	1.409 (n = 4)	SD = 0.0985 SEM = 0.0493
Tip of left horn	1.529 (n = 4)	SD = 0.1880 SEM = 0.0939
Base of right horn	1.414 (n = 4)	SD = 0.1170 SEM = 0.0585
Tip of left horn	1.466 (n = 4)	SD = 0.0810 SEM = 0.0405

n : number of animals
SD : standard deviation
SEM : standard error to the mean

Analyse statistique :

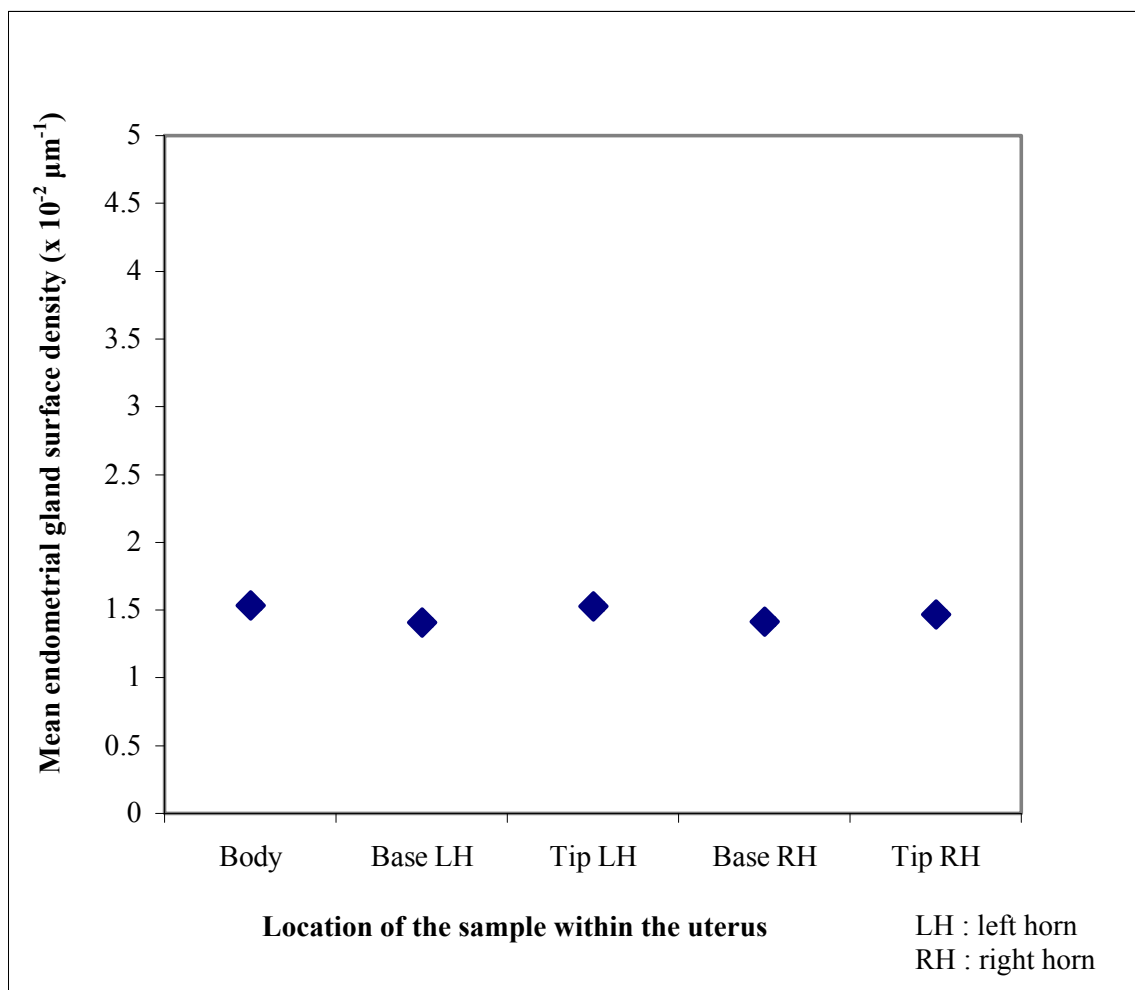
L'analyse de variance n'a pas montré de différence significative entre les moyennes de densité de surface pour les diverses localisations de l'utérus. Pour cette étude, le test de normalité ($P > 0.200$) ainsi que le test de variance égale ($P > 0.200$) ont été préalablement vérifiés. Annexe 4.

Graphique 1 (ci-contre) : Densités de surface moyennes des glandes endométriales de ponettes Galloises en œstrus.

Statistical analysis :

A one way analysis of variance was carried out. The normality test ($P > 0.200$) and the equal variance test ($P = 0.091$) both passed. **No significant difference was found between the mean endometrial gland surface density at the different locations of the uterus ($P = 0.593$).** Appendix 4.

Graph 1 : Mean endometrial gland surface density in Welsh Pony mares in oestrus.



2.3.2. Expérience 2 : Etude de l'influence de la race et du cycle œstral sur la densité des glandes endométriales

Les valeurs de densité de surface pour les juments Thoroughbred et les ponettes Galloises durant la totalité du cycle œstral sont résumées dans le Tableau 2.

Tableau 2 (ci-contre) : Densités de surface moyennes des glandes endométriales de ponettes Galloises et de juments Thoroughbred pendant le cycle œstral.

2.3.2. Experiment 2 : The influences of breed and oestrous cycle upon endometrial gland density in the mare

Endometrial gland densities measured in Welsh Pony and Thoroughbred mares throughout the oestrous cycle are summarised in Table 2.

Table 2 : Mean endometrial gland surface density values in Welsh Pony and Thoroughbred mares throughout the oestrous cycle.

	<u>WELSH PONY MARES</u>	<u>THOROUGHBRED MARES</u>
	Mean Sv ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^{-1}$)	Mean Sv ($\times 10^{-2} \mu\text{m}^{-1}$)
Oestrus	1.409 (n = 4) SD = 0.0985 SEM = 0.0493	2.408 (n = 5) SD = 0.0723 SEM = 0.0324
D4 of dioestrus	No data	2.479 (n = 4) SD = 0.2730 SEM = 0.1360
D8 of dioestrus	2.204 (n = 4) SD = 0.1890 SEM = 0.0945	2.964 (n = 4) SD = 0.1790 SEM = 0.0897
D12 of dioestrus	2.690 (n = 3) SD = 0.1080 SEM = 0.0622	3.101 (n = 3) SD = 0.2100 SEM = 0.1210
D16 of dioestrus	No data	3.369 (n = 3) SD = 0.2000 SEM = 0.1150

n : number of animals

SD : standard deviation

SEM : standard error to the mean

Analyses statistiques :

Une interaction significative a été révélée par l'analyse de variance entre le 'moment du cycle œstral' et la 'race' ($P = 0.005$). Le test de Tukey pour le facteur 'race' a permis de comparer les moyennes des valeurs de densité de surface pour chacune des deux races pour certains stades du cycle. Ainsi, pour l'œstrus, J8 et J12 de diœstrus, une différence significative a été observée entre les ponettes Galloises et les juments Thoroughbred ($P < 0.005$).

Ponettes Galloises :

Le test de normalité ($P > 0.200$) et de variance égale ($P = 0.520$) ont tous deux été vérifiés. Le test de Tukey a montré des différences significatives entre les valeurs de l'œstrus et du milieu du diœstrus ($P < 0.001$), ainsi qu'entre les jours 8 et 12 de diœstrus ($P < 0.005$).

Juments Thoroughbred :

Le test de normalité ($P = 0.026$) et de variance égale ($P = 0.744$) ont tous deux été vérifiés. Le test de Tukey a montré des différences significatives entre les valeurs pour l'œstrus et le milieu du diœstrus ($P < 0.001$), ainsi qu'entre les jours 4 et 8 de diœstrus ($p = 0.021$), de même qu'entre J16 de diœstrus et l'œstrus ($P < 0.001$). Aucune conclusion n'a pu être donnée pour la comparaison de J12 de diœstrus et J8, ou J12 et J16 de diœstrus à cause du nombre restreint d'animaux utilisés.

Statistical analysis :

A two way analysis of variance showed a **statistically significant interaction between the stage of the oestrous cycle and the breed (P = 0.005).**

A Tukey test for the 'breed' factor permitted a comparison of the mean values for each breed at different stages of the cycle. **They showed a statistically significant difference between Welsh Pony and Thoroughbred mares for the stages of oestrus, D8 of dioestrus and D12 of dioestrus (P < 0.05).**

A one way analysis of variance was then undertaken within each breed group :

Welsh Pony mares :

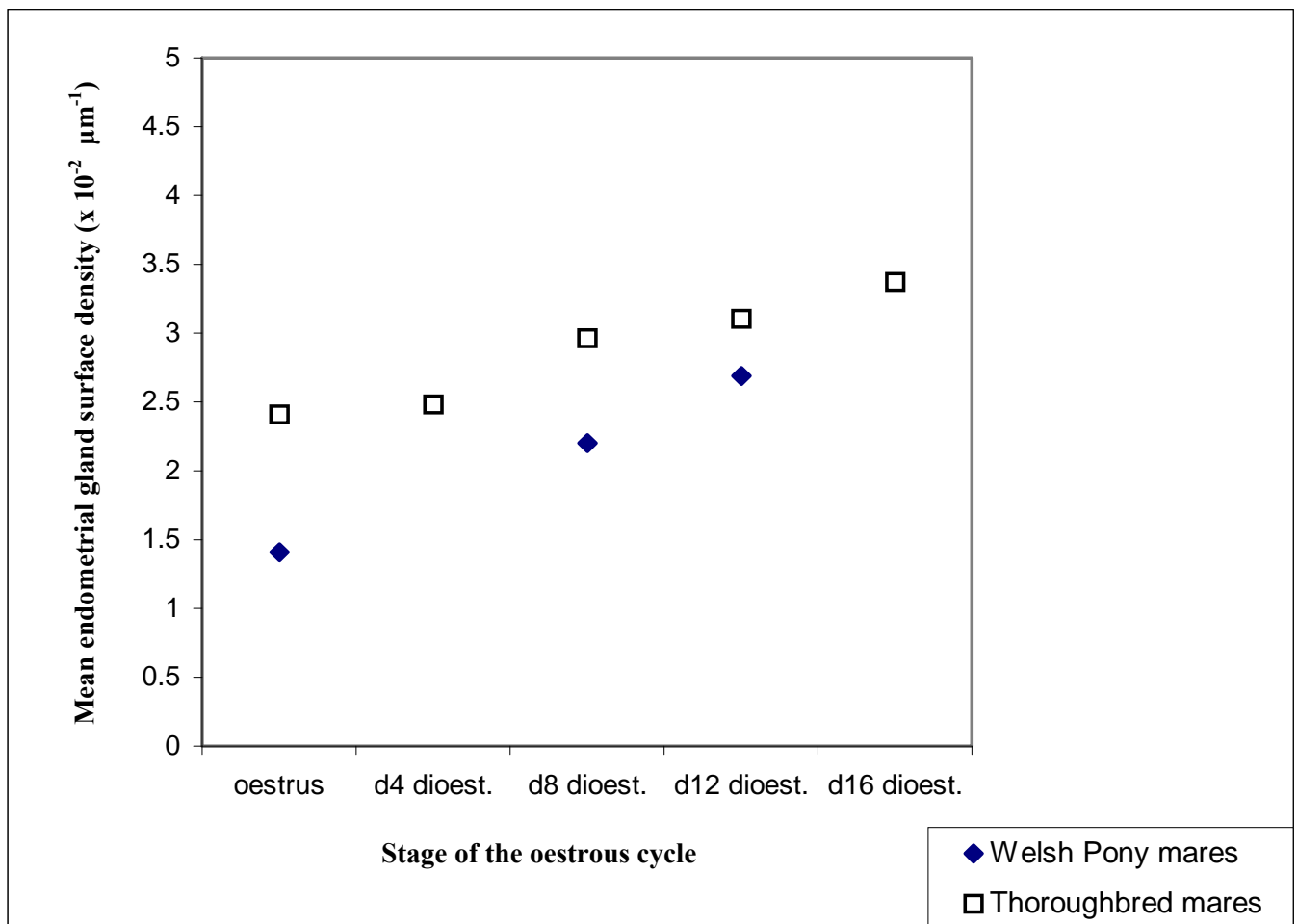
The normality test ($P > 0.200$) as well as the equal variance test ($P = 0.520$) both passed. A Tukey test for each 'stage of the cycle' group showed **significant differences between oestrus and mid-dioestrus (P < 0.001) and between D8 and D12 of dioestrus (P < 0.005).**

Thoroughbred mares :

The normality test ($P = 0.026$) as well as the equal variance test ($P = 0.744$) both passed. A Tukey test for each 'stage of the cycle' group showed **significant differences between oestrus and mid-dioestrus (P < 0.001), between D4 and D8 of dioestrus ($p = 0.021$) and between D16 of dioestrus and oestrus (P < 0.001).** No conclusion was possible for the comparison between D12 of dioestrus and either D8 or D16 of dioestrus as the group sizes were too small.

Graphique 2 (ci-contre) : Densités de surface moyennes des glandes endométriales de ponettes Galloises et de juments Thoroughbred pendant le cycle œstral.

Graph 2 : Mean endometrial gland surface density in Welsh Pony and Thoroughbred mares throughout the oestrous cycle.



Changements dans la structure histologique des deux races :

Les sections endométriales de ponettes Galloises et de juments Thoroughbred sont apparues similaires au niveau structural.

Pendant l'**œstrus**, les glandes sont apparues plus allongées et moins nombreuses chez les deux races par rapport aux observations faites pendant le diœstrus. L'œdème stromal, visualisable dans les deux cas, n'a pas pu être quantifié de manière précise par la seule observation microscopique. Les cellules épithéliales des épithéliums luminal et glandulaire ont été observées cylindriques et hautes.

Pendant le **diœstrus**, la densité en glandes endométriales a été accrue chez les deux espèces. Alors que la différence de densité était frappante pendant l'œstrus entre les ponettes Galloises et les juments Thoroughbred, la distinction n'a pas toujours été possible pendant le diœstrus. Les cellules épithéliales sont apparues ici cuboïdales avec des sécrétions souvent présentes dans la lumière utérine.

Ainsi, malgré une différence dans la densité des glandes endométriales entre les ponettes Galloises et les juments Thoroughbred, l'endomètre a conservé une structure similaire et a suivi les mêmes changements physiologiques durant le cycle œstral.

Histological comparisons between the two breeds :

No major difference in the histological structure of the sections of endometrium from Welsh Pony and Thoroughbred mares was underlined in this experiment.

During **oestrus**, endometrial glands were straighter and less numerous than during dioestrus. Stromal oedema was distinguishable in both breeds but no gradation could be precisely undertaken by a simple microscopic examination. Both luminal and glandular epithelium were observed high columnar.

During **dioestrus**, a visual increase in endometrial gland density was seen in both breeds. Although the number of endometrial glands during oestrus was significantly lower in Welsh pony mares compared to Thoroughbred mares, the distinction between the two breeds was far less obvious while in dioestrus. Epithelial cells appeared cuboidal and secretions were often seen in the uterine lumen.

Thus, the structure of the endometrium was very similar between Welsh Pony and Thoroughbred mares, with physiological changes observed in both breeds throughout the oestrous cycle.

Figure 30 (ci-contre) : **Section histologique de l'endomètre d'une ponette Galloise pendant l'œstrus (x 30).**

Figure 31 (ci-contre) : **Section histologique de l'endomètre d'une jument Thoroughbred pendant l'œstrus (x30).**

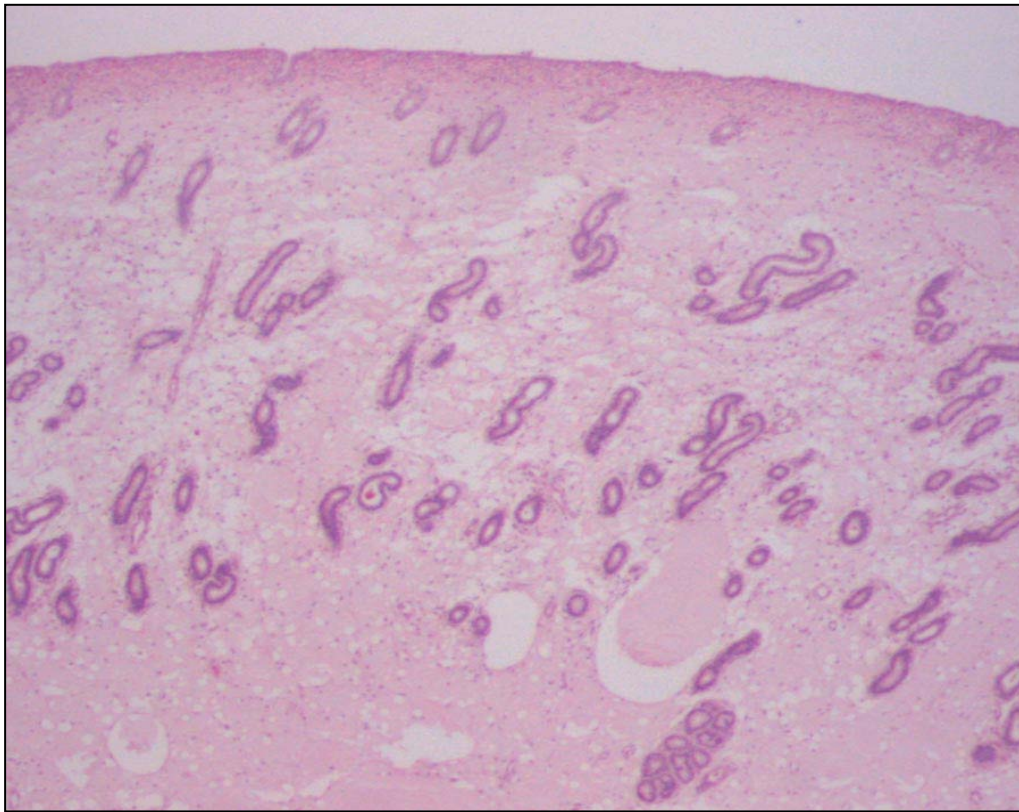


Figure 30 : Histological section of a Welsh Pony mare's endometrium during oestrus (x 30).

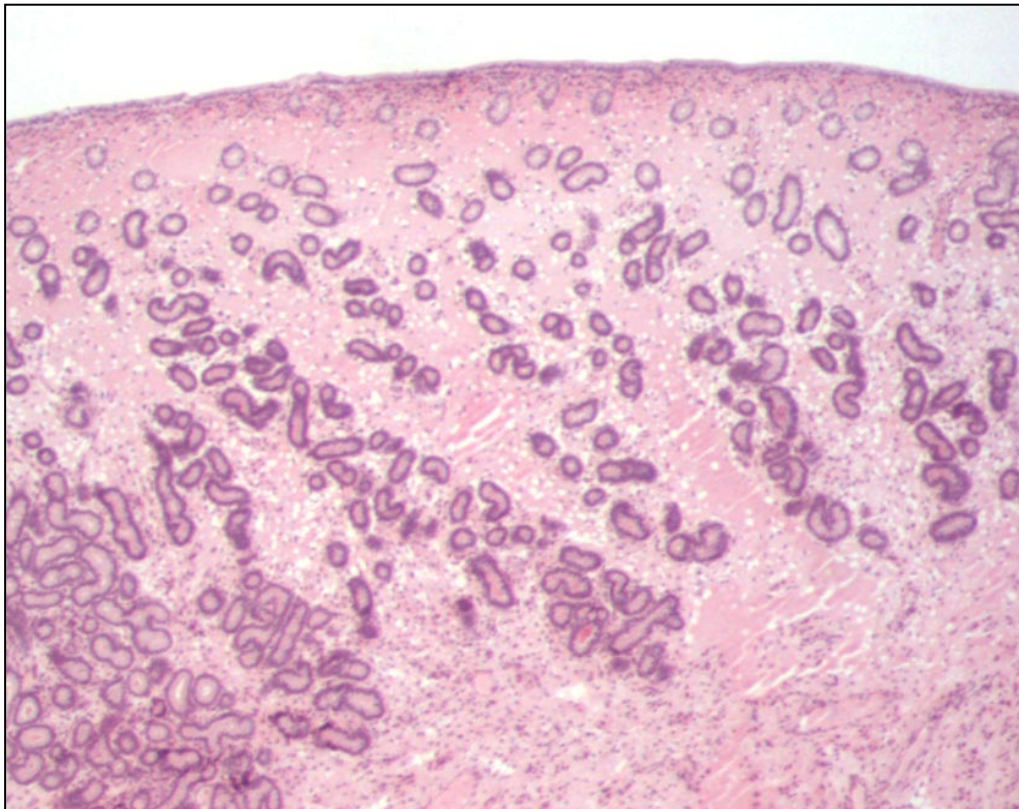


Figure 31: Histological section of a Thoroughbred mare's endometrium during oestrus (x 30).

Figure 32 (ci-contre) : Section histologique de l'endomètre d'une ponette Galloise à mi-diaestrus (x 30).

Figure 33 (ci-contre) : Section histologique de l'endomètre d'une jument Thoroughbred à mi-diaestrus (x 50).

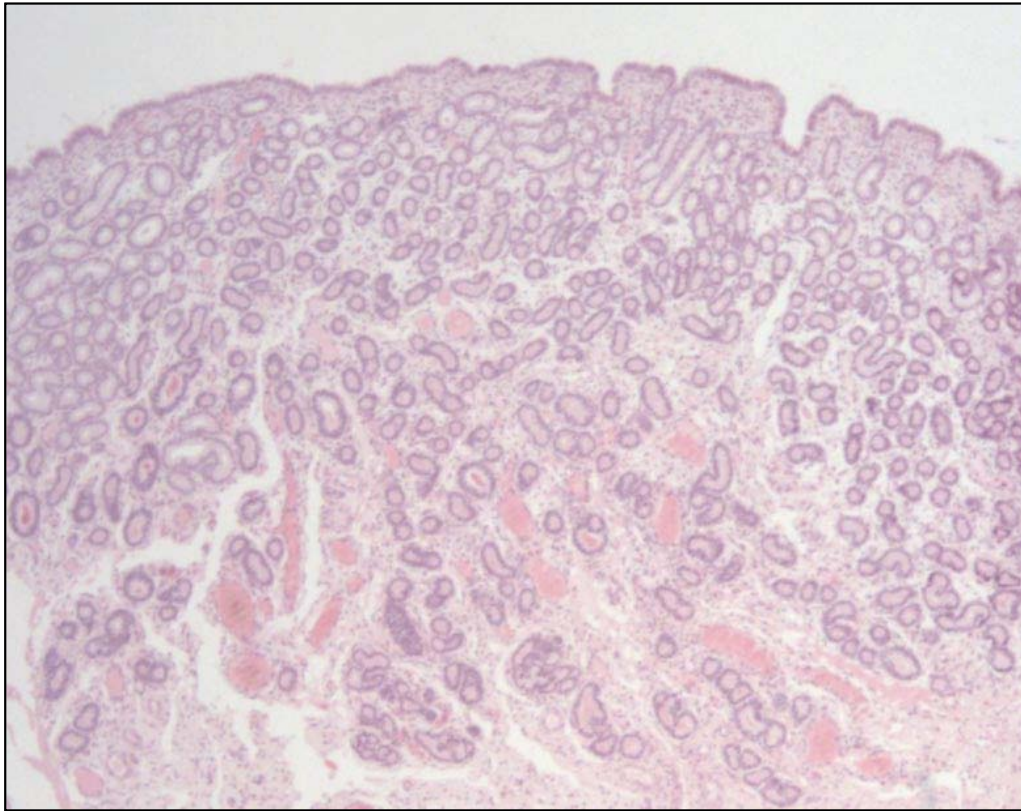


Figure 32 : Histological section of a Welsh Pony mare's endometrium at mid-dioestrus (x 30).

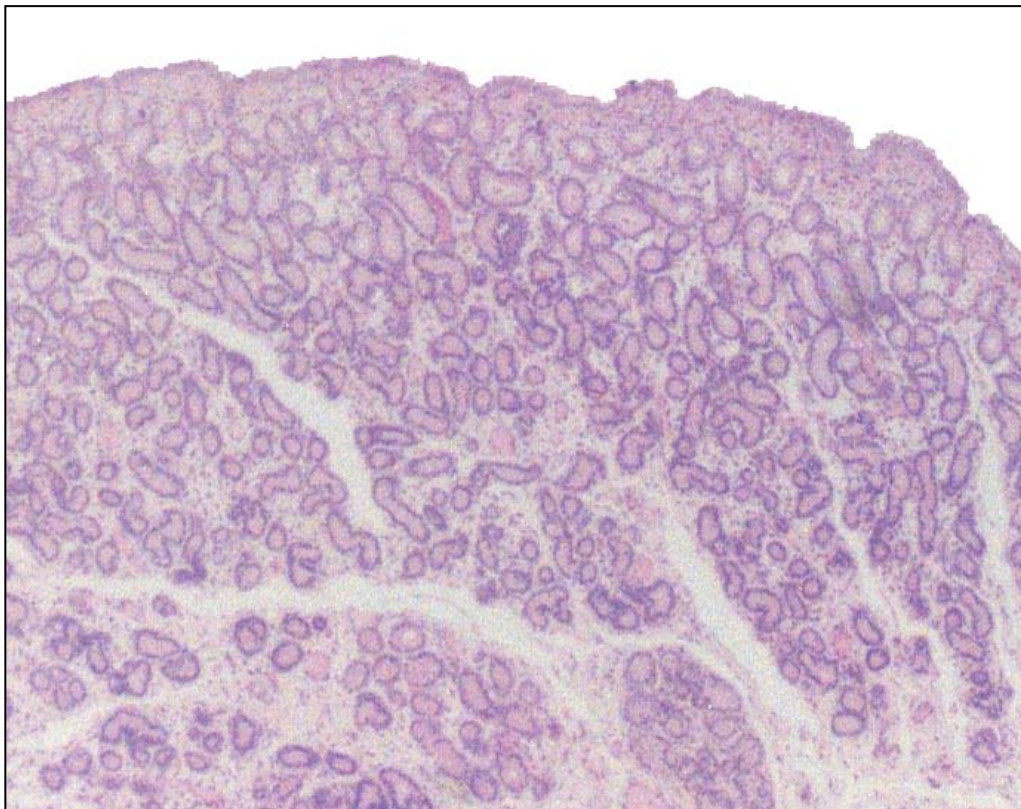


Figure 33 : Histological section of a Thoroughbred mare's endometrium at mid-dioestrus (x 50).

2.4. DISCUSSION

Les résultats obtenus dans ces deux expériences ont permis d'avoir des valeurs de référence non biaisées sur la densité en glandes endométriales pour les ponettes Galloises et les juments Thoroughbred durant la totalité du cycle œstral. Dans la première expérience, la densité glandulaire a été mesurée au niveau de 5 sites précis de l'utérus (le corps utérin, ainsi que la base et l'extrémité des deux cornes utérines) sur des ponettes Galloises en œstrus. Les résultats n'ont révélé aucune différence significative entre les différentes localisations utérines, ce qui suggère une répartition uniforme des glandes endométriales équine au sein de l'utérus. Par ailleurs, les valeurs intra et inter-individuelles sont apparues homogènes : la méthode stéréologique est de ce fait apparue suffisamment efficace et précise pour estimer la densité des glandes endométriales équine. Cependant, le volume utérin étant très variable d'un individu à l'autre, aucune donnée *in vivo* n'a pu être fournie concernant l'aire totale occupée par les glandes endométriales dans la totalité de l'utérus. Les résultats de densité obtenus ici ont donc été exprimés par unité de volume, en μm^{-1} et convertible en mm^2/mm^3 . Pour éviter tout biais, le même fixateur a été utilisé pour toutes les biopsies, qui elles-mêmes ont ensuite toutes été récoltées au niveau d'une seule et même localisation utérine (à la base d'une des cornes utérines), sous contrôle visuel endoscopique.

Dans l'expérience 2, une augmentation significative de la densité en glandes endométriales a été notée chez les ponettes Galloises et chez les juments Thoroughbred au fur et à mesure de l'avancement dans le diœstrus. Les ponettes Galloises ont présenté des valeurs significativement plus faibles que celles des Thoroughbred pendant la totalité du cycle (par exemple 0.01409 contre $0.02408 \mu\text{m}^{-1}$ pendant l'œstrus et 0.02204 contre $0.02964 \mu\text{m}^{-1}$ à mi-diœstrus), avec une variation des valeurs moins importante après le 12^{ième} jour de diœstrus. Cette dernière observation pourrait être expliquée soit par une augmentation rapide de la densité glandulaire chez les ponettes Galloises ou, plus vraisemblablement, par une perte de précision dans la comptabilisation du nombre d'intersections par champs observé.

2.4. DISCUSSION

The two experiments that were carried out produced some valuable reference values for endometrial gland density in Welsh Pony and Thoroughbred mares throughout the oestrous cycle. In Experiment 1, the mean values obtained at the five distinct sites in the uterus (*i.e.* the body of the uterus and the base and tip of both uterine horns) in Welsh Pony mares in oestrus, were not significantly different, thereby suggesting a great uniformity in endometrial gland distribution throughout the uterus. This then enabled the assumption that stereological measurements could be performed on a single biopsy taken from any site in the uterus. However, since the volume of the uterus varies greatly between individuals, it is not possible to give an estimate of the total area covered by endometrial glands throughout the whole uterus. Density results could therefore only be given per unit volume of tissue (*i.e.* in μm^{-1} convertible in mm^2/mm^3). To ensure comparability between individuals, biopsies were taken from the same defined site, at the base of a uterine horn, under videoendoscopic visual control. Furthermore, the same fixative was used to avoid any variation in the shrinkage of the tissue.

In Experiment 2, a statistically significant increase in endometrial gland density was observed in both Welsh Pony and Thoroughbred mares while advancing in dioestrus. Lower values were found in the Welsh Pony mares versus the Thoroughbred mares and this significant difference in density between the two breeds remained throughout the whole cycle (*e.g.* 0.01409 versus 0.02408 μm^{-1} in oestrus compared to 0.02204 vs 0.02964 μm^{-1} in mid-dioestrus), although values tended to get closer one to another after day 12 of dioestrus. This consequence could be explained by a more rapid increase in endometrial gland density in the Pony mares, or more likely, a loss of accuracy in the counting method due to a higher density of glands within each field.

Les ponettes Galloises ont montré une densité en glandes endométriales nettement inférieure à celle des juments Thoroughbred, avec un phénomène plus marqué pendant l'œstrus. Le diamètre glandulaire a été diminué chez les deux races après le 16^{ième} jour de diœstrus, comme l'avait constaté Keenan *et al.* (1987). La différence en densité glandulaire visualisée entre l'œstrus et le début du diœstrus (D4) est nettement moins marquée que celle présente entre le 16^{ième} jour de diœstrus et l'œstrus : si la diminution de densité glandulaire pendant la période œstrale est essentiellement expliquée par le développement de l'œdème stromal (Brandt, 1970 ; Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986), l'hypothèse d'une formation parallèle d'arborescences glandulaires durant le diœstrus ne devrait ainsi pas être exclue.

En supposant que les ponettes Galloises et les juments Thoroughbred possèdent une densité glandulaire quasi-similaire, cela signifierait que le développement œdémal est plus important chez les ponettes Galloises. Cependant, la visualisation échographique des sections transversales utérines contredit aisément cette supposition : en effet, alors que l'œdème est facilement visualisable chez les juments Thoroughbred et croît jusqu'à atteindre un seuil maximal 24 heures avant l'ovulation, il n'est pas rare d'observer des ponettes Galloises ovuler sans aucun signe d'œdème utérin préalable. De ce fait, il semblerait que la densité des glandes endométriales des ponettes Galloises soit physiologiquement inférieure à celle des juments Thoroughbred.

Enfin, comme la mise en place de l'œdème est un processus progressif, il serait souhaitable d'accompagner toute mesure de densité de surface réalisée pendant l'œstrus du degré d'œdème visualisé par échographie afin de permettre des comparaisons entre individus. De la même façon, il devrait être conseillé d'effectuer les mesures stéréologiques de densité préférentiellement pendant le diœstrus, une fois que le plateau de concentration maximale en progestérone a été atteint, ceci même si la comptabilisation des intersections est alors rendue plus difficile par la forte densité glandulaire.

Endometrial gland density has appeared to be significantly lower in Welsh Pony mares, especially during oestrus. In both breeds, mean endometrial gland diameter declined after day 16 of dioestrus, as described previously by Keenan *et al.* (1987). If a significant difference was not found systematically between oestrus and the beginning of dioestrus (D4), a sharp decline in the density could be observed between day 16 of dioestrus and the onset of the following oestrus. This observation indicates that the lower gland density in oestrus is due mainly to the development of oedema in the stroma (Brandt, 1970 ; Kenney, 1978 ; Kenney and Doig, 1986). A more extensive branching of the glands probably occurs under the influence of progesterone during dioestrus, so that more coiled glands are consequently observed at that stage.

When comparing the two breeds, if Welsh Pony and Thoroughbred mares did, in fact, start with a similar initial number, Pony mares would have to develop a higher level of oedema within the *Stratum spongiosum* during oestrus to explain the lower gland density that results in these animals. However, ultrasonographic monitoring of cross-sections of the uterus during oestrus clearly invalidates this hypothesis, as follicular development and ovulation often occur in Pony mares with no evidence of endometrial oedema at all, yet it is invariably present in Thoroughbred mares in oestrus and reaches a peak about 24 h before ovulation. Therefore, it may be concluded that endometrial gland density is physiologically lower in Welsh Pony mares than in Thoroughbred mares.

Moreover, as the development of endometrial oedema is progressive during oestrus and since it is very variable amongst individuals, the actual level of oedema should accompany any stereological measurement of endometrial gland density so as to allow a reliable comparison of values between animals at that stage of the cycle. In view of this variability, it could be recommended, if possible, to measure endometrial gland surface density during dioestrus, when serum concentration of progesterone have plateaued, even if counting is more difficult due to a higher number of boundaries crossed within the field of view.

Les protéines sécrétées par les glandes endométriales au début de la gestation sont indispensables à la croissance et au développement harmonieux de l'embryon. Parmi elles, la protéine P19, de 19 kDa, est sécrétée physiologiquement durant la fin de la phase lutéale, et persiste jusqu'au 25^{ième} jour de gestation chez les juments gravides (Stewart *et al.*, 1995). Uniquement exprimée chez les équidés, cette protéine appartient à la famille des lipocalines et est sécrétée par les cellules épithéliales de la région haute des glandes endométriales (Crossett *et al.*, 1996). Elle pourrait intervenir dans le transport de vitamines, minéraux et autres composants nutritionnels, tous nécessaires au développement embryonnaire (Stewart *et al.*, 2000). Stewart *et al.* (1994) a également montré l'expression brutale et massive d'ARNm de l'EGF (Endometrial Growth Factor) par les cellules épithéliales de la région apicale des glandes endométriales. L'EGF est exprimé entre les 35^{ième} et 40^{ième} jour suivant l'ovulation, et son action mitogénique semblerait jouer un rôle primordial dans la croissance, la différenciation et le développement du placenta et du fœtus (Efstratiadis, 1998). Chez la jument, l'EGF pourrait ainsi intervenir dans la mise en place des interdigitations fœto-maternelles ainsi que dans le développement des structures cotylédonaires arborescentes du placenta mature. De ce fait, l'augmentation de la densité des glandes endométriales dans l'utérus de juments Thoroughbred pourrait bien expliquer celle des microcotylédons placentaires chez cette race.

L'utilisation des techniques d'immunohistochimie pour suivre le niveau d'expression des protéines sécrétées par les glandes endométriales pendant le dioestrus et le début de la gestation (P19, EGF, utéroglobine and utéroferrine), pourrait être l'étape préliminaire dans la meilleure compréhension des phénomènes abortifs précoces chez la jument (Zavy *et al.*, 1982). La sécrétion de la protéine P19 et de l'EGF est progestérone-dépendante (Stewart *et al.*, 1995). Ainsi, il pourrait être intéressant d'étudier la distribution et la densité de ces protéines au sein de l'endomètre parallèlement au suivi de la concentration en progestérone dans le sang maternel. Un traitement des avortements précoces chez les juments âgées subfertiles pourrait ensuite être envisagé par l'administration de progestérone ou l'utilisation de protéines recombinantes dérivées des produits de sécrétion des glandes endométriales.

The proteins secreted by the endometrial glands during early pregnancy are vital for the growth and development of the non-attached conceptus. Secretions of one 19 kDa protein, P19, during the late luteal phase of the cycle is maintained until day 25 of gestation in pregnant animals (Stewart *et al.*, 1995). P19 is a novel member of the lipocalin family that is expressed exclusively in equids. It is secreted by the epithelial cells lining the neck regions of the endometrial glands (Crossett *et al.*, 1996) and it may act as a transport protein for vitamins, minerals or other nutritional components that are vital for the embryo (Stewart *et al.*, 2000).

Stewart *et al.* (1994) also showed a dramatic upregulation of endometrial growth factor (EGF) mRNA in the same epithelial cells lining the apical portions of the endometrial glands in pregnant mares between days 35 and 40 after ovulation. This potent mitogen has been shown to play a vital role in the growth, differentiation and development of the placenta and fetus in other species (Efstratiadis, 1998) and its sudden upregulation in the mare's endometrium suggests a relationship between the two events. Thus, if the mitogenic actions of EGF do indeed play a pivotal role in driving the fetomaternal interdigitation which results eventually in the complex branching microcotyledons of the mature placenta, the increased density of endometrial glands in the uteri of Thoroughbred mares might well account for the greater surface density of placental microcotyledons measured in this breed by Wilsher *et al.* (2000).

Therefore, immunohistochemical monitoring of the levels of proteins, such as P19, EGF, uteroglobin and uteroferrin, secreted by the endometrium during dioestrus and early pregnancy, may be an initial step in gaining a better understanding of early abortion in the mare (Zavy *et al.*, 1982). Both P19 and EGF have been shown to be progesterone dependent (Stewart *et al.*, 1995), so relating their densities and distribution within the endometrium to the concentration of progesterone in maternal blood may be worth of investigation in the future. In ageing mares with endometrosis, it may be possible to prevent early pregnancy losses by treatment with either progesterone or recombinant endometrial derived gland proteins.

REFERENCES

- ALLEN, W.R. and MOOR, R.M.** (1972) The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells. *J. Reprod. Fert.* **29**, 313-316.
- ALLEN, W.R., HAMILTON, D.W. and MOOR, R.M.** (1973) Origin of the equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. *Anat. Rec.* **177**, 485-502.
- ALLEN, W.R.** (1987) Endogenous hormonal control of the mare's oestrus cycle. *Proc. 9th Bain-Fallon Memorial Lectures*, pp. 1-13, AEVA, Sydney.
- ALLEN, W.R. and SANDERSON, M.W.** (1987) The value of a rapid progesterone assay (AELIA) in equine stud veterinary medicine and management. *Proc. 9th Bain-Fallon Memorial Lectures*, pp. 75-82, AEVA, Sydney.
- ALLEN, W.R.** (1993) Proceedings of the John P. Hughes International Workshop on equine Endometritis. *Equine Vet. J.* **27**, 73-75.
- ALLEN, W.R., MATHIAS, S., LENNARD, S.N. and GREENWOOD, R.E.S.** (1995) Serial measurement of serum oestrogen concentrations to determine optimum mating time in cycling mares. *Equine Vet. J.* **27**, 460-464.
- ALLEN, W.R., WILSHER, S., BARRETT, K., STEWART, F., FOWDEN, A., OUSEY, J. and ROSSDALE, P.D.** (2000) Effects of maternal size on pre- and post-natal development in the horse. *Havemeyer Foundation Monograph Series* **2**, 49-50 (Abst.).
- AMOROSO, E.C.** (1952) Placentation. In *Marshall's Physiology of Reproduction*. Ed. A.S. Parkes. 3rd edn., 2, 127-297. Longmans Green, London.
- BADDELEY, A.J., GUNDERSEN, H.J.G. and CRUZ-ORIVE, L.M.** (1986) Estimation of surface area from vertical sections. *J. Microsc.* **142**, 259-276.
- BANKS, W.J.** (1986) Applied veterinary histology. 3rd Edn. Missouri : Mosby-Year book Inc.
- BATTUT, I., COLCHEN, S., FIENI, F., TAINTURIER, D. and BRUYAS, J-F.** (1997) Success rates when attempting to non surgically collect equine embryos at 144, 156 and 168 hours after ovulation. *Equine Vet. J. Suppl.* **25**, 60-62.
- BELONGE, P.C. and VAN NIERKERK, C.H.** (1975) A review of the influence of nutrition upon the oestrous cycle and early pregnancy of the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **23**, 167-169.
- BERGMAN, R.V. and KENNEY, R.M.** (1975) Representativeness of a uterine biopsy of the mare. In : *Proceedings. 21st Ann Meeting. Am. Assoc. Equine Pract.*, 335-362.

BETTERIDGE, K.J. (1989) The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. *Equine Vet. J. Suppl.* **8**, 92-100.

BLANCHARD, T.L., GARCIA, M.C., KINTNER, L.D. and KENNEY, R.M. (1987) Investigation of the representativeness of a single endometrial sample and the use of trichrome staining to aid in the detection of endometrial fibrosis in the mare. *Theriogenology.* **28**, 445-450.

BRACHER, V. and ALLEN, W.R. (1992) Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus : I. Findings in normal fertile mares. *Equine Vet. J.* **24** (4), 274-278.

BRACHER, V., MATHIAS, S. and ALLEN, W.R. (1996) Influence of chronic degenerative endometritis (endometrosis) on placental development in the mare. *Equine Vet. J.* **28** (3), 180-188.

BRACHER, V., GERSTENBERG, C. and ALLEN, W.R. (1997) Der Einfluss von Endometrose (degenerativer Endometriuserkrankungen) auf Fruchtbarkeit, Plazentation und fötale Entwicklung beim Pferd. *Pferdeheilkunde.* **13**, 465-473.

BRANDT, G.W. (1970) The significance and interpretation of uterine biopsy in the mare. In : *Proceedings.* 16th Ann. Meeting. *Am. Assoc. Equine Pract.* 279-294.

BRITTON, B.A. (1982) Endometrial change in the annual reproductive cycle of the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **32**, 175-180.

BUDRAS, K.D., SACK, W.O., and ROCKS, S. (1994) Anatomy of the horse. An illustrated text. 2nd Edn. Hannover : Mosby-Wolfe.

CROSSETT, B., ALLEN, W.R. and STEWART, F. (1996) A 19kDa protein secreted by the endometrium of the mare is a novel member of the lipocalin family. *Biochem. J.* **320**, 137-143.

CROSSETT, B., SUIRE, S., HERRLER, A., ALLEN, W.R. and STEWART, F. (1998) Transfer of uterine lipocalin from the endometrium of the mare to the developing equine conceptus. *Biol. Reprod.* **59**, 483-490.

DAVID, I. (1985) La biopsie de l'endomètre chez la jument. *Pratique Vétérinaire Equine.* **XVII** (4), 181-190.

DELLMANN, H. D. (1993) Text book of Veterinary Histology- 1993- H-Dieler Dellmann-4th edition

DOIG, P.A., McKNIGHT, J.D. and MILLER, R.B. (1981) The use of endometrial biopsy in the infertile mare. *Can. Vet. J.* **22**, 72-76.

EFSTRATIADIS, A. (1998) Genetics of mouse growth. *International Journal of Developmental Biology.* **32**, 955-976.

EVANS, J.W., HUGHES, J.P. and STABENFELDT, G.H. (1971) The effect of season on the equine oestrous cycle. *J. Anim. Sci.* **33**, 253 (Abst.).

EVANS, J.W. and IRVINE, C.H.G. (1975) Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **23**, 193-200.

GARCIA, M.C., FREEDMAN, L.J. and GINTHER, O.J. (1979) Interaction of seasonal and ovarian factors in the regulation of LH and FSH secretion in the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **27**, 103-111.

GERSTENBERG, C. (1994) Computerized interactive morphometry of the equine endometrium. MMedVet (Gyn) thesis, University of Pretoria.

GERSTENBERG, C., ALLEN, W.R. and STEWART, F. (1999) Factors controlling epidermal growth factor (EFG) gene expression in the endometrium of the mare. *Molecular Reproduction and Development.* **53**, 255-265.

GESCHWIND, I.I. (1972) Dynamics of pituitary gonadotrophin secretion. *J. Anim. Sci.* **34**, 19-36.

GESCHWIND, I. I., DEWEY, R., HUGHES, J.P., EVANS, J.W. and STABENFELDT, G.H. (1975) Plasma LH levels in the mare during oestrous cycle. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **23**, 207-212.

GINTHER, O.J. and FIRST, N.L. (1971) Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. *Amer. J. Vet. Res.* **32**, 1687-1691.

GINTHER, O.J. (1974) Occurrence of anoestrus, oestrus, dioestrus and ovulation over a twelve month period in mares. *Amer. J. Vet. Res.* **35**, 1173-1179.

GINTHER, O.J. (1979) Reproductive Biology of the Mare : Basic and applied aspects. Michigan : McNaughton and Gunn, Inc.

GINTHER, O.J. (1983) Mobility of the early equine conceptus. *Theriogenology*, **19**, 608-611.

GINTHER, O.J. (1983) Fixation and orientation of the early equine conceptus. *Theriogenology.* **19**, 613-623.

GINTHER, O.J. and BERGFELT, D.R. (1993) Growth of small follicles and concentrations of FSH during the equine oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* **99**, 105-111.

GOKHALE, A.M. (1990) Unbiased estimation of curve length in 3-D using vertical slices. *J. Microsc.* **159**, 133-141.

GORDON, L.R. and SARTIN, E.M. (1978) Endometrial biopsy as an aid to diagnosis and prognosis in equine infertility. *J. Equine Med. Surg.* **2**, 328-336.

GROSS, T.L. and LEBLANC, M.M. (1984) Seasonal variation of histomorphological features of equine endometrium. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **184**, 1379-1382.

GUNDERSEN, H.J.G. (1986) Stereology of arbitrary particles. *J. Microsc.* **143**, 3-45.

- GUNDERSEN, H.J.G. and JENSEN, E.B.** (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microsc.* **147**, 229-263.
- HAMMOND, J. and WODZICKI, K.** (1941) Anatomical and histological changes during the oestrous cycle in the mare. *Proc. R. Soc. London.* **130**, 1-23.
- HANSEN, W. and ECHTERNKAMP, S.E.** (1972) Control of ovarian function in domestic animals. *Am. Zoologist*, **12**, 225-243.
- HUGHES, J.P., STABENFELDT, G.H. and EVANS, J.W.** (1972) Clinical and endocrine aspects of the oestrous cycle of the mare. *Proc. A. Am. Ass. Equine Pract.* 119-148.
- HUGHES, J.P., STABENFELDT, G.H. and EVANS, J.W.** (1975) The oestrous cycle of the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **23**, 161-166.
- KEENAN, L.R., FORDE, D., McGEADY, T., WADE, J. and ROCHE, J.F.** (1987) Endometrial histology of early pregnant and non-pregnant mares. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **35**, 499-504.
- KENNEY, R.M.** (1975) Pronostic value of endometrial biopsy of the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **23**, 347-348.
- KENNEY, R.M.** (1978) Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *J. Amer. Vet. Medical Assoc.* **172** (3), 241-262.
- KENNEY, R.M. and DOIG, P.A.** (1986) Equine endometrial biopsy. In : *Current Therapy in Theriogenology*. 2nd edition, Ed. D.A. Morrow, W.B. Saunders, Philadelphia, 723-729.
- KINDAHL, H., GRANSTROM, E., EDQVIST, L.E., NEELY, D. HUGHES, J. and STABENFELDT** (1976) The advantages of measuring a prostaglandin F_{2α} metabolite in peripheral blood in studies of the physiological role of prostaglandin release during luteolysis in domestic animals. In : *Proc. 8th Int. Congr. Anim. Reprod. & A.I.* Kracow, p 145-148.
- KOOISTRA, L. H. and GINTHER, O.J.** (1975) Effect of photoperiod on reproductive activity and hair in mares. *Am. J. Vet. Res.* **36**, 1413-1419.
- LEISHMAN, D. , MILLER, R.B. and DOIG, P.A.** (1982) A quantitative study of the histological morphology of the endometrium of normal and barren mares. *Can. J. Comp. Med.*, **46**, 17-20.
- McKINNON, A.O., and VOSS, J.L.** (1993) Reproductive organs of the mare. In : *Equine reproduction*. Eds. Lea & Febiger, Philadelphia, London, p 13.
- NODEN, P.A., OXENDER, W.D. and HAFS, H.D.** (1975) The cycle of oestrous, ovulation and plasma levels of hormones in the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **23**, 189-192.
- PALMER, E and JOUSSET, B.** (1975) Urinary oestrogen and plasma progesterone levels in non-pregnant mares. . *J. Reprod. Fert., Suppl.* **23**, 213-221.

- PATTISSON, M.L., CHEN, C.L., KELLEY, S.T. and BRANDT, G.W.** (1974) Luteinizing hormone and estradiol in peripheral blood of mares during the estrous cycle. *Biol. Reprod.* **11**, 245-250.
- RICKETTS, S.W.** (1975a) The technique and clinical application of endometrial biopsy in the mare. *Equine Vet. J.* **7**, 102-108.
- RICKETTS, S.W.** (1975b) Endometrial biopsy as a guide to diagnosis of endometrial pathology in the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **23**, 341-345.
- SHORT, R.V.** (1969) Implantation and the maternal recognition of pregnancy. In : *Ciba Foundn. Symposium on Foetal Autonomy*. Eds. G.E.W. Wolstenholme and M. O'Connor J. and A. Churchill, London, pp 2-26.
- SIROIS, J., BALL, B.A. and FORTUNE, J.E.** (1989) Patterns of growth and regression of ovarian follicles during the oestrous cycle and after hemiovariectomy in mares. *Equine Vet. J.* **8**, 43-48.
- SISSON, S. and GROSSMAN, J.D.** (1953) *Anatomy of the domestic animals*. 4th Edition. Philadelphia and London : W.B. Saunders Company.
- STABENFELDT, G.H., HUGHES, J.P. and EVANS, J.W.** (1972) Ovarian activity during the oestrous cycle of the mare. *Endocrinology.* **90**, 1379 – 1384.
- STABENFELDT, G.H., HUGHES, J.P., EVANS, J.W. and GESCHWIND, I.I.** (1975) Unique aspects of the reproductive cycle of the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **23**, 155-160.
- STEFFENHAGEN, W.P., PINEDA, M.H. and GINTHER, O.J.** (1972) Retention of unfertilized ova in uterine tubes of mares. *Am. J. vet. Res.* **33**, 2391-2398.
- STEVEN, D.H.** (1982) Placentation in the mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **31**, 41-55.
- STEWART, F., POWER, C.A., LENNARD, S.N., ALLEN, W.R., AMET, L. and EDWARDS, R.M.** (1994) Identification of the horse epidermal growth factor (EGF) coding sequence and its use in monitoring EGF expression in the endometrium of the pregnant mare. *Journal of Molecular Endocrinology.* **12**, 341-350.
- STEWART, F., CHARLESTON, B., CROSSETT, B., BARKER, P.J. and ALLEN, W.R.** (1995) A novel uterine protein that associates with the blastocyst capsule in equids. *J. Reprod. Fert.* **105**, 65-70.
- STEWART, F., GERSTENBERG, C., SUIRE, S. and ALLEN, W.R.** (2000) Immunodetection of a novel endometrial protein (P19) in the pregnant mare. *J. Reprod. Fert. Suppl.* **56**, 593-599.
- VAN NIEKERK, C.H. and GERNEKE, W.H.** (1966) Persistence and parthenogenetic cleavage of tubal ova in the mare. *J. Vet. Res.* **33**, 195-232.

WEBER, J.A., WOODS, G.L. and LICHTENWALNER, A.B. (1995) Relaxory effect of prostaglandin E2 on circular smooth muscle isolated from equine oviductal isthmus. *Biol. Reprod. Mono.* **1**, 125-130.

WEIBEL, E. R. (1979) *Stereological Methods*. Volume 1. London : Academic Press.

WILSHER, S., BALL, M. and ALLEN, W.R. (2000) The influence of maternal size, parity and age on morphometric placental development and function in the mare. In : *Fetomaternal Control of Pregnancy*. Eds TAE Stout and JF Wade. *Havemeyer Foundation Monograph Series No. 2*, pp 49-50 (Abstr.).

WITHERSPOON, D.M. and TALBOT, R.B. (1970) Ovulation site in the mare. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **157**, 1452-1458.

ZAVY, M.T., SHARP, D.C., BAZER, F.W., FAZLEABAS, A., SESSIONS, F. and ROBERTS, R.M. (1982) Identification of stage-specific and hormonally induced polypeptides in the uterine protein secretions of the mare during the oestrous cycle and pregnancy. *J. Reprod. Fert.* **64**, 199-207.

Appendix 1

Tissue fixation and processing protocol

Formula of Bouin's fluid :

Pitric acid (super saturated)	300 mL
Glacial acetic acid	20 mL
Formaldehyde solution (10% v : v)	100 mL

Tissue processing protocol :

<u>Solution</u>	<u>Time (hours)</u>	
70% alcohol (methanol)	2	} <u>Dehydration</u> <u>through a graded</u> <u>series of alcohol</u>
95% alcohol	1	
95% alcohol	1.5	
Abs. alcohol	2.5	
Abs. alcohol	2	
Citroclear I	2	} <u>Removal of</u> <u>alcohol with</u> <u>clearing agents</u>
Citroclear II	2	
Citroclear III	2	
Wax I	3	} <u>Paraffin wax</u> <u>melted at 56 °C</u>
Wax II	3	
Wax III	0.5-1	

Citroclear® (*HD Supplies, Bucks, UK*)

Pure paraffin wax, melting point 56°C (*Raymond A Lamb Ltd., London, UK*)

Appendix 2

Haematoxylin and Eosin (H&E) staining protocol

- | | |
|---|-----------------|
| 1) De-wax sections in CitrocLEAR® | 10 min |
| 2) Take through absolute alcohol, 95% alcohol,
70% alcohol and tap water | 2 dips each |
| 3) Leave in Haematoxylin solution | 7 min |
| 4) Wash in running tap water | at least 12 min |
| 5) Differentiate in 1% Acid Alcohol | 2 dips |
| 6) Wash in running tap water | at least 12 min |
| 7) Stain in 1% Aqueous Eosin | 10 min |
| 8) Wash in running tap water | at least 5 min |
| 9) Dehydrate through 70% alcohol, 95% alcohol
and absolute alcohol | 2 dips each |
| 10) Clear in CitrocLEAR® | 10 min |
| 11) Mount in DPX and cover with slide | |

CitrocLEAR® (*HD Supplies, Bucks, UK*)
Harris's Haematoxylin (*Raymond A Lamb, Eastbourne, UK*)
Aqueous Eosin 1 % (*Raymond A Lamb*)
DPX mountant (*Raymond A Lamb*)

1 % acid alcohol :

Conc. HCl (hydrochloric acid)	10 mL
70 % alcohol	344 mL

Appendix 3

Endometrial gland density measurements in individual mares

Experiment 1 :

Mare identity	Localisation of biopsy	Sv (x 10⁻² μm⁻¹)	CV (x 10⁻²)	Number of 'needles' counted
1	Body of uterus	1.710	1.806	1080
1	Base LH	1.498	2.339	1080
1	Tip LH	1.756	2.323	1080
1	Base RH	1.503	1.537	828
1	Tip RH	1.551	2.023	1080
2	Body of uterus	1.408	2.470	1260
2	Base LH	1.480	2.355	1260
2	Tip LH	1.426	1.547	1260
2	Base RH	1.480	2.263	1080
2	Tip RH	1.473	2.685	1260
3	Body of uterus	1.685	2.235	1080
3	Base LH	1.370	2.030	1080
3	Tip LH	1.601	1.785	1080
3	Base RH	1.428	2.069	1080
3	Tip RH	1.483	2.561	1080
4	Body of uterus	1.336	3.043	1080
4	Base LH	1.288	1.983	1080
4	Tip LH	1.333	2.609	1080
4	Base RH	1.245	2.727	1080
4	Tip RH	1.356	2.851	1080

LH : left uterine horn

RH : right uterine horn

Sv : surface density

CV : coefficient of variation

Experiment 2 :

Breed	Stage of the cycle	Sv (x 10⁻² μm⁻¹)	CV (x 10⁻²)	Number of 'needles' counted
P	Oestrus	1.498	2.339	1080
P	"	1.480	2.355	1260
P	"	1.370	2.030	1080
P	"	1.288	1.983	1080
P	D8 dioestrus	1.958	1.162	1080
P	"	2.154	1.562	1080
P	"	2.349	2.967	1080
P	"	2.356	1.842	1080
P	D12 dioestrus	2.631	2.496	432
P	"	2.624	2.158	972
P	"	2.814	1.407	828
Tb	Oestrus	2.522	1.424	1080
Tb	"	2.438	2.246	360
Tb	"	2.362	1.861	1080
Tb	"	2.349	2.468	1080
Tb	"	2.370	1.576	1080
Tb	D4 dioestrus	2.496	2.242	1080
Tb	"	2.174	2.788	360
Tb	"	2.414	1.789	756
Tb	"	2.834	1.595	1080
Tb	D8 dioestrus	3.227	1.807	1080
Tb	"	2.831	1.332	1080
Tb	"	2.876	1.831	1080
Tb	"	2.921	1.915	1080
Tb	D12 dioestrus	2.989	1.595	1080
Tb	"	2.970	1.946	1080
Tb	"	3.343	1.454	1080
Tb	D16 dioestrus	3.597	1.458	1080
Tb	"	3.222	2.657	1080
Tb	"	3.289	2.004	1080

P : Welsh Pony mare

Tb : Thoroughbred mare

Appendix 4

Statistical analyses

Experiment 1 :

One way analysis of variance ;

Source of variation	DF	SS	MS	F	P
Location of biopsy	4	0.0582	0.0145	0.717	0.593
Residual	15	0.3040	0.0203		
Total	19	0.3630			

Experiment 2 :

1) Analysis of the interaction between the stage of the cycle and the breed

Two way analysis of variance :

Source of variation	DF	SS	MS	F	P
Stage of cycle	2	3.888	1.9440	90.512	< 0.001
Breed group	1	2.912	2.9120	135.572	< 0.001
Stage x breed	2	0.310	0.1550	7.213	0.005
Residual	17	0.365	0.0215		
Total	22	7.431	0.3380		

Tukey test to compare Welsh Pony and Thoroughbred mares within each comparable stage of the oestrous cycle :

Stage of the cycle	Difference of means	p	q	P
Oestrus	0.999	2	14.373	< 0.001
D8 of dioestrus	0.759	2	10.365	< 0.001
d12 of dioestrus	0.411	2	4.857	0.003

2) Analysis of values per ‘stage of cycle’ within the PONY MARES group

One way analysis of variance ;

Source of variation	DF	SS	MS	F	P
Stage of cycle	2	2.966	1.4830	74.395	< 0.001
Residual	8	0.159	0.0199		
Total	10	3.126			

Tukey test :

Stage of the cycle	Difference of means	p	q	P
Oestrus vs. D8 dioestrus	0.795	3	11.265	< 0.001
D8 dioestrus vs. D12 dioestrus	0.485	3	6.366	0.005
D12 dioestrus vs. Oestrus	1.281	3	16.795	< 0.001

3) Analysis of values per ‘stage of cycle’ within the THOROUGHBRED MARES group

One way analysis of variance ;

Source of variation	DF	SS	MS	F	P
Stage of cycle	4	2.529	0.6320	17.385	< 0.001
Residual	14	0.509	0.0364		
Total	18	3.038			

Tukey test :

Stage of the cycle	Difference of means	p	q	P
Oestrus vs. D4 dioestrus	0.0713	5	0.788	0.979
D4 dioestrus vs. D8 dioestrus	0.484	5	5.078	0.021
D8 dioestrus vs. D12 dioestrus	0.137	5	1.329	0.877 (NT)
D12 dioestrus vs. D16 dioestrus	0.269	5	2.440	0.451 (NT)
D16 dioestrus vs. Oestrus	0.961	5	9.759	< 0.001

Appendix 5

Abstract submitted to the ESDAR conference in Vienna (September 2001)

STEREOLOGICAL COMPARISON OF ENDOMETRIAL GLAND DENSITY IN WELSH PONY AND THOROUGHBRED MARES DURING THE OESTROUS CYCLE

A-C. LEFRANC and W.R. ALLEN

Thoroughbred Breeders' Association Equine Fertility Unit, Mertoun Paddocks, Woodditton Rd, Newmarket, Suffolk CB8 9BH, U.K.

ABSTRACT

The diffuse, non-invasive epitheliochorial equine placenta develops an intimate and complex interdigitation with the maternal endometrium throughout gestation to maximise surface contact and, consequently, permit sufficient nutritional and gaseous maternofetal exchanges. Wilsher *et al.* (2000) demonstrated a significant reduction in the surface density of microcotyledons on the placentae of Welsh pony versus Thoroughbred mares, which suggested the possibility of differences in endometrial gland surface density between these two breeds. The present study was therefore undertaken to examine this question and to determine the influence of the oestrous cycle upon endometrial gland development and density. Biopsies were taken from a defined site at the base of a uterine horn, under videoendoscopic visual control, from 8 Welsh Pony mares and 9 Thoroughbred mares either in oestrus or on day 8 after ovulation. The biopsies were fixed in Bouin's fluid, processed and paraffin-embedded before 6 widely spaced sections were cut from each block. Each section was then evaluated by computer-assisted stereological morphometric analysis of 5 random selected areas of *Stratum spongiosum* to determine the surface density of endometrial glands.

A striking reduction in endometrial gland surface density was measured in the Pony mares compared to the Thoroughbreds during both oestrus and dioestrus. For example, mean \pm sem value of $14.09 \pm 0.49 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ (n=4) during oestrus in the ponies compared to $24.08 \pm 0.32 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ (n=5) in the Thoroughbreds at the same stage of the cycle. In dioestrus, values rose to $22.04 \pm 0.94 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ (n=4) in the ponies compared to $29.64 \pm 0.90 \text{ mm}^2/\text{mm}^3$ (n=4) in the Thoroughbreds. Stewart *et al.* (1994) showed a dramatic upregulation of endometrial growth factor (EGF) production by the epithelial cells of the endometrial glands in pregnant mares between days 35 and 40 after ovulation, and hence coincident with the onset of interdigitation between the allantochorion and endometrium to form the diffuse placenta. If, as suspected, the mitogenic actions of EGF play a pivotal role in driving this fetomaternal interdigitation and the resulting development of the complex branching microcotyledons on the mature placenta, the increased surface density of endometrial glands in the uteri of Thoroughbred mares may well account for the greater surface density of placental microcotyledons in this breed.

REFERENCES

Stewart, F., Power, C.A., Lennard, S.N., Allen, W.R., Amet, L. and Edwards, R.M. (1994) Identification of the horse epidermal growth factor (EGF) coding sequence and its use in monitoring EGF gene expression in the endometrium of the pregnant mare. *J. Mol. Endoc.* **12**, 341-350.

Wilsher, S., Ball, M. and Allen, W.R. (2000) The influence of maternal size, parity and age on morphometric placental development and function in the mare. In : *Fetomaternal Control of Pregnancy*. Eds TAE Stout and JF Wade. *Havemeyer Foundation Monograph Series No. 2*, pp 49-50 (Abstr.).

NOM : LEFRANC

PRENOM : Anne-Cécile

TITRE :

Evaluation de l'influence de la race et du cycle œstral sur la densité des glandes endométriales équines.

RESUME :

L'espèce équine possède un placenta diffus et non-invasif de type épithéliochorial qui établit des interdigitations complexes avec l'endomètre maternel afin d'optimiser la surface de contact fœtomaternelle et permettre ainsi des échanges nutritionnels et gazeux durant la totalité de la gestation. La densité de surface en microcotylédons placentaires est significativement réduite chez les ponettes Galloises par rapport à celle observée chez les juments Thoroughbred (Wilsher *et al.*, 2000), ce qui suggère l'existence d'une éventuelle différence de densité des glandes endométriales entre ces deux races. L'objet de cette étude était d'analyser cette hypothèse et de déterminer l'influence du cycle œstral sur le développement et la densité des glandes endométriales équines.

Des biopsies endométriales ont été réalisées à la base des cornes utérines de juments fertiles sous contrôle visuel endoscopique. Les sections histologiques ont ensuite été analysées par une méthode stéréologique assistée par ordinateur. Une diminution significative de la densité de surface des glandes endométriales présentes dans la *Stratum spongiosum* a ainsi été observée chez les ponettes Galloises par rapport aux juments Thoroughbred durant la totalité du cycle œstral. Stewart *et al.* (1994) ont montré la brutale production d'EGF (Endometrial Growth Factor) par les cellules épithéliales des glandes endométriales vers les 35^{ième}-40^{ième} jours de gestation, au moment de la mise en place des interdigitations entre l'allantochorion et l'endomètre lors de la formation du placenta épithéliochorial diffus. L'EGF semblerait exercer un rôle primordial dans la formation des interdigitations fœtomaternelles ainsi que dans le développement des structures cotylédonaire arborescentes du placenta. De ce fait, l'augmentation de la densité des glandes endométriales dans l'utérus de juments Thoroughbred pourrait bien expliquer celle des microcotylédons placentaires chez cette race.

MOTS-CLES :

Reproduction équine, jument, biopsie utérine, endomètre, glandes endométriales, cycle œstral, stéréologie.

ENGLISH TITLE :

Evaluation of the influences of breed and oestrous cycle upon endometrial gland density in the mare.

ABSTRACT :

The diffuse, non-invasive epitheliochorial equine placenta develops an intimate and complex interdigitation with the maternal endometrium throughout gestation to maximise surface contact and, consequently, optimise nutritional and gaseous maternofetal exchanges. Wilsher *et al.* (2000) demonstrated a significant reduction in the surface density of microcotyledons on the placentae of Welsh Pony versus Thoroughbred mares, which suggested that this may relate to a difference in the density of endometrial gland between these two breeds. The present study was undertaken to examine this hypothesis and to determine the influence of the oestrous cycle upon the development and density of endometrial glands.

Endometrial biopsies were taken under videoendoscopic visual control from a defined site at the base of a uterine horn in young fertile Welsh Pony and Thoroughbred mares at defined stages from the oestrous cycle. Computer-assisted stereological morphometric analysis permitted the surface density of endometrial glands within the *Stratum spongiosum* to be calculated and the results showed a statistically significant reduction in endometrial gland surface density in Welsh Pony compared to Thoroughbred mares during both oestrus and dioestrus. Stewart *et al.* (1994) showed a dramatic upregulation of endometrial growth factor (EGF) mRNA in the epithelial cells lining the apical portions of endometrial glands in pregnant mares between days 35 and 40 after ovulation, and hence coincident with the onset of interdigitation between the allantochorion and endometrium to form the microcotyledonary placenta. If, as suspected, the mitogenic actions of EGF play a pivotal role in driving this fetomaternal interdigitation and the resulting development of the complex branching microcotyledons of the mature placenta, the increased density of endometrial glands noted in the uteri of Thoroughbred mares may well account for the greater density of placental microcotyledons in this breed.

KEY WORDS :

Equine reproduction, mare, uterine biopsy, endometrium, endometrial glands, oestrous cycle, stereology.