

# PARTENAIRE Repro

MAGAZINE D'INFORMATION  
EN REPRODUCTION BOVINE DE MSD SANTÉ ANIMALE

# MAG

Numéro 20

## Au sommaire :

- **Retour sur 40 ans de reproduction bovine**
- **Des applications nouvelles pour l'échographie Doppler en reproduction bovine ?**
- **Quelle valeur pour une nouvelle gestation ?**

DOSSIER

**RECHERCHES  
RÉCENTES VERS  
LES THÉRAPEUTIQUES  
DU FUTUR EN  
REPRODUCTION BOVINE**



# SOMMAIRE

## **03** ÉDITO

## **04** 40 ANS APRÈS...

UTILISATION DES HORMONES POUR OPTIMISER  
LA REPRODUCTION DES FEMELLES D'ÉLEVAGE

## **10** DOSSIER

RECHERCHES RÉCENTES  
VERS LES THÉRAPEUTIQUES  
DU FUTUR EN REPRODUCTION  
BOVINE

## **22** DIAGNOSTIC

DES APPLICATIONS NOUVELLES POUR L'ÉCHOGRAPHIE  
DOPPLER EN REPRODUCTION BOVINE ?

## **30** ÉCONOMIE DE LA REPRODUCTION

QUELLE VALEUR POUR UNE NOUVELLE GESTATION ?

Partenaire Repro Mag' Mars 2019 - MSD Santé Animale

Rédacteur en chef : René FOURNIER

Ont collaboré à ce numéro : Marc Antoine DRIANCOURT, Dr Gilles HOERNER

Relecture : Schirine AMIN

Réalisation : Christine BESSON



## SUIVI DE REPRODUCTION : LES VACHES ALLAITANTES AUSSI !

Avec la diminution programmée et inéluctable des actes de prophylaxie collective des maladies réglementées et l'érosion d'un certain nombre d'actes traditionnels, il nous a fallu chercher des voies de développement d'actes collectifs permettant de compenser la baisse de revenus. Il tombait sous le sens que l'acte gynécologique individuel devait s'enrichir d'une approche plus globale ; de fait, le suivi de reproduction de troupeau pouvait être un substitut intéressant aussi bien en élevage laitier qu'en allaitant.

L'élevage allaitant étant souvent bien plus « traditionnel » et mené de façon moins rationnelle, il a été nécessaire d'user d'arguments technico-économiques pour motiver des éleveurs pas toujours enclins à engager beaucoup de dépenses dans ce domaine.

Les éleveurs les plus motivés par la gestion de la reproduction dans notre clientèle sont les plus « organisés », qui souhaitent condenser la période de vêlages sur les trois derniers mois de l'année une fois achevés les travaux en grandes cultures. Ce qui a toutefois tendance à superposer la période d'obstétrique et la période de suivi de reproduction, générant un pic d'activité à gérer au sein de la clinique vétérinaire.

Notre objectif est de développer le concept sur un nombre de cheptels allaitants plus large et, en seconde cible, chez les éleveurs « rentabilistes » pour lesquels il faut user d'arguments « repro-économiques » : valeur d'une nouvelle gestation, productivité numérique.

Mais nos armes ne sont pas suffisamment affutées ou apprêtées, le recours à l'outil informatique avec BDIvet ou un autre logiciel de gestion troupeau devrait s'avérer intéressant pour cibler des élevages à fertilité défailante avec mise en avant d'arguments financiers ; mais ces collectes de données sont chronophages. Sans doute serait-il pertinent d'aborder ce sujet de la reproduction lors du BSE annuel pour faire prendre conscience du coût d'une vache vide et de déboucher sur l'importance d'une gestion rationnelle de la reproduction.

**Comme pour les troupeaux laitiers, les vétérinaires peuvent jouer sur tous les aspects de la reproduction en système allaitant.** Le suivi intègre notamment l'évaluation et l'éventuelle correction des rations (tous les cabinets disposent d'analyseurs biochimiques sanguins qui permettent une bonne approche de l'équilibre azote énergie) ainsi que le diagnostic de non-gestation. Ce dernier nous concerne davantage que le constat de gestation, et surtout permet une présence régulière dans les élevages, fondamentale pour conserver notre légitimité et notre dialogue avec nos clients très (sur-)informés.

**Dr Gilles HOERNER**  
Vétérinaire à Morhange (57)



# UTILISATION DES HORMONES POUR OPTIMISER LA REPRODUCTION DES FEMELLES D'ÉLEVAGE

## RETOUR SUR 40 ANS DE REPRODUCTION BOVINE



Marc Antoine DRIANCOURT  
Astek Consult,  
49330 Chateaufort sur Sarthe, France

*De nos jours, la gestion de la reproduction est optimisée sur une fraction conséquente des vaches laitières, soit pour traiter les troubles de femelles individuelles, soit pour gérer la reproduction de groupes de femelles afin de permettre un usage systématique de l'insémination, facilitant ainsi la diffusion du progrès génétique. De plus, pour maximiser la descendance des femelles d'élite, des traitements (super-ovulation puis transfert des embryons récoltés à des receveuses ou OPU/FIV) sont disponibles. Ces traitements ont commencé à être développés dans les années 1960-1970 puis ont été perfectionnés au fil du temps. L'objectif de cette revue est de retracer la chronologie de mise au point de ces approches et de détailler comment les scientifiques, les praticiens et les industriels ont interagi pour mettre au point les traitements d'aujourd'hui.*

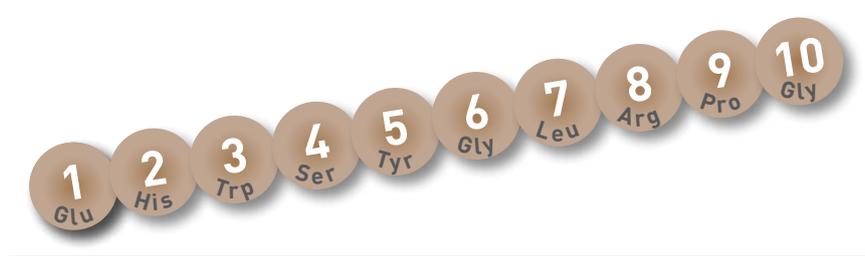
### 1. Les acquis des années 1970-1990

#### 1.1. Mise à disposition du monde vétérinaire de tous les outils de maîtrise de la reproduction

Si la capacité de l'eCG à induire une poly-ovulation et celle de la progestérone à bloquer l'ovulation sont connues depuis les années 1950, essentiellement suite aux recherches pour traiter l'infertilité humaine ou induire une contraception, c'est dans les années 1970 qu'a eu lieu la vague principale de développement de tous les outils actuels de maîtrise de la reproduction animale.

- L'identification de la structure et des effets du GnRH a été réalisée en 1972-1974 (schéma 1). Des analogues de GnRH (composés analogues au GnRH naturel à l'exception de quelques acides aminés modifiés pour réduire la dégradation donc augmenter la demi-vie), tels que la buséreline ont été mis au point (essentiellement par Hoechst) entre 1975 et 1980, avec les premiers tests démontrant l'induction d'une ovulation fertile chez la vache dès 1981 (Moller & Fielden 1981). Aujourd'hui GnRH naturels et analogues de GnRH sont à la disposition des vétérinaires avec des doses d'utilisation très différentes (globalement 10 à 100 fois plus faibles pour un analogue, compte tenu de la résistance augmentée à la protéolyse).

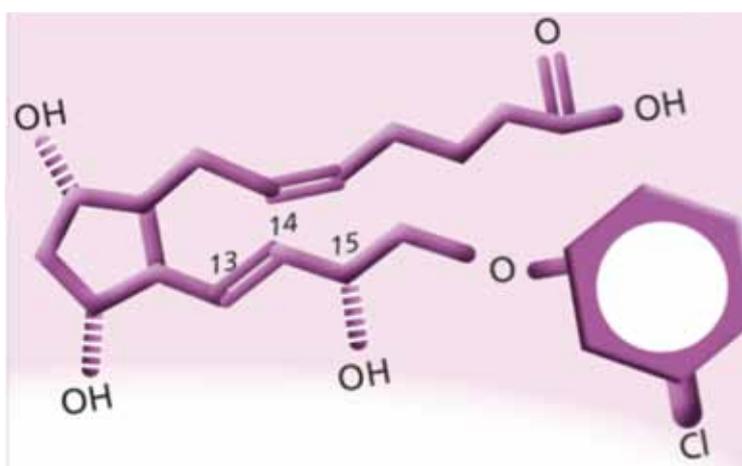
Schéma 1 : Structure décapeptidique du GnRH





- La démonstration du rôle clé de la prostaglandine F2 $\alpha$  dans la régression du corps jaune (Roberts *et al.* 1974) a aussi précédé de quelques années la mise au point d'analogues ayant une demi-vie prolongée (quelques heures au lieu de quelques minutes) tels que le cloprosténol (*schéma 2*). Prostaglandines naturelles et analogues se partagent aujourd'hui ce marché, avec des doses cliniques différentes (25mg vs 500 $\mu$ g). Immédiatement après leur découverte, les prostaglandines ont été utilisées en pratique clinique et les limites de leur efficacité (résistance des corps jaunes de moins de 5 jours d'âge à leur effet lutéolytique, finesse de la synchronisation de l'œstrus post traitement dépendant du stade du cycle où l'injection est réalisée) vite identifiées.

**Schéma 2 : Structure d'un analogue de la prostaglandine naturelle F2 $\alpha$  (cloprosténol)**



- Enfin, la démonstration de la solubilité de la progestérone dans certains plastiques comme le silicone et la capacité de celui-ci à libérer ce stéroïde au fil du temps sur une durée atteignant 21 jours a permis d'imaginer de créer un « cycle artificiel » chez la vache, en utilisant la voie vaginale, permettant d'élaborer la première génération de traitement synchronisant basé sur une spirale métallique recouverte d'une couche de silicone + progestérone, ou un dispositif en T en nylon recouvert d'une couche de silicone + progestérone (non commercialisé en France initialement). L'utilisation sur le terrain de ces procédés de synchronisation longs (Roche *et al.* 1976) ayant montré une relation négative entre la durée d'imprégnation et la fertilité au cycle synchronisé, de tels traitements ont été raccourcis à 12 jours pour cette première génération de dispositifs vaginaux.
- En parallèle de ces recherches, des progestagènes (analogues de progestérone légèrement modifiés pour en augmenter l'activité), tels que le norgestomet ont été développés par les chimistes qui synthétisaient les hormones utilisées en contraception humaine. Leur activité hormonale environ 100 fois plus élevée que celle de la progestérone naturelle a ensuite permis de développer des implants de petite taille, compatibles avec une insertion dans l'oreille et libérant leur contenu en norgestomet pendant plusieurs jours.



## 1.2. Mise au point et optimisation des traitements de synchronisation

La nécessité d'une diffusion optimisée du progrès génétique via l'utilisation de l'IA a coïncidé avec la mise au point de traitements de synchronisation permettant la mise à la reproduction simultanée de groupes de femelles, et ce, quel que soit leur stade du cycle lors de l'initiation du traitement.

En fonction des caractéristiques physiologiques des différentes femelles cibles, ces stratégies ont été progressivement raffinées.

Ainsi, chez les génisses laitières, qui sont généralement toutes cyclées lors de leur mise à la reproduction, c'est la combinaison de 2 injections de prostaglandines (séparées de 11-14 jours) qui s'est répandue car elle est économique et efficace. La limite de ce protocole est que la synchronisation générée n'est pas suffisamment précise pour permettre une seule insémination à un moment prédéterminé. Deux IA programmées ou une IA sur chaleur détectée sont alors nécessaires.

A l'inverse, chez les vaches en lactation dont une fraction peut être non cyclique, ce sont les dispositifs à base de progestérone/progestagènes qui ont été adoptés par le marché. Ces traitements (implants, dispositif vaginal) duraient 9 à 12 jours en général avec une administration d'œstradiol lors de la pose du dispositif libérant la progestérone ou le progestagène. L'œstradiol avait deux effets : d'une part, via ses effets de feedback négatif sur les hormones gonadotropes, il induisait l'atrésie du gros follicule présent sur les ovaires. D'autre part, par ses effets anti-lutéotrope ou lutéolytiques, il abrégait la durée de vie du corps jaune éventuellement présent lors de la pose. Le jour de la dépose du dispositif, une injection d'eCG (alors appelée PMSG ; 400 à 600IU) était réalisée afin d'induire une croissance folliculaire terminale chez les femelles non cyclées et de synchroniser plus finement l'ovulation des femelles cyclées. De tels traitements permettaient de programmer la mise à la reproduction de 100% des femelles avec une ou deux inséminations à des moments prédéterminés et d'obtenir des fertilités similaires à celles observées sans traitement.

Dans les troupeaux de vaches laitières où le taux de cyclicité à 60 jours post partum était élevé, une autre option était l'utilisation du traitement « double prostaglandine » avec les mêmes limites que les génisses (voir ci-dessus).

## 1.3. Mise au point et optimisation des traitements de stimulation ovarienne

Les premiers traitements de stimulation ovarienne reposaient sur l'utilisation de doses super-ovulantes d'eCG (2500 à 3000UI), injectées à un stade spécifique du cycle (J8-J10 post ovulation) déterminé empiriquement. Déjà à cette époque, la variabilité des réponses ovariennes générait des difficultés dans l'organisation des chantiers de transfert d'embryons et ce d'autant plus que la congélation d'embryons était loin d'être généralisée ! La limite de ces traitements avec l'eCG était qu'il y avait un décalage assez marqué entre les réponses ovariennes (généralement satisfaisantes) et le nombre d'embryons de bonne qualité (généralement décevant). C'est l'analyse des profils hormonaux (particulièrement d'œstradiol) pendant et après le traitement de super-ovulation qui a suggéré que la cause de ce décalage était la demi-vie prolongée d'eCG qui produisait une montée d'œstradiol post ovulatoire trop élevée et que celle-ci était embryotoxique. Les industriels ont alors proposé deux solutions (cf plus bas) : l'administration d'un anticorps monoclonal anti-eCG (Neutra PMSG) pour bloquer l'activité de la PMSG résiduelle après l'ovulation ou l'utilisation d'une nouvelle hormone à demi-vie réduite : la FSH, en fait un extrait d'hypophysés porcines enrichi en FSH et LH.

## 1.4 Limites actuelles des traitements développés dans les années 1970-1990

Si les doses cliniques de GnRH et de prostaglandines établies dans les années 1970-1980 sont toujours pertinentes et efficaces aujourd'hui, ce n'est plus le cas des dispositifs libérant de la progestérone. En effet, le métabolisme accru de la progestérone par le foie des vaches laitières hautes productrices se traduit par des niveaux circulants de progestérone libérée inférieurs à 1ng/ml (donc représentant 20% des concentrations physiologiques) lors des derniers jours du traitement (Cerri *et al.* 2009). De telles concentrations sont trop faibles pour bloquer la pulsativité de la LH. La croissance folliculaire terminale reprend alors en milieu de traitement et les follicules qui ovulent à l'œstrus synchronisé sont âgés, avec des ovocytes de qualité réduite. De même, l'origine animale de l'eCG comme la faible pureté des préparations de FSH posent des questions qui pourraient être résolues en développant des protéines recombinantes.



## 2. Les nouveautés apportées par les scientifiques entre 1990 et 2019

Alors que le développement des premiers traitements de synchronisation ou de stimulation ovarienne avait été relativement empirique et souvent avancé par une série de tests du type « essai-erreur », l'essor de la recherche en physiologie ovarienne et l'utilisation intensive de l'échographie pour le suivi ovarien ont produit un nouveau « boom » d'innovation !

C'est la connaissance des effets du GnRH sur les follicules (en fonction de leur taille) et celle des intervalles entre vagues folliculaires qui a permis la conception d'une nouvelle stratégie de synchronisation : l'Ovsynch (ou GPG). Cette synchronisation sans progestérone ou progestagène permet l'insémination de 100% des femelles à un moment prédéterminé avec une fertilité correcte (Pursley *et al.* 1995).

C'est ensuite la démonstration de l'existence de fenêtres de relative inefficacité de l'Ovsynch lorsqu'il est initié à des moments spécifiques du cycle (Moreira *et al.* 2000) qui a stimulé la mise au point, par plusieurs universités américaines, de traitements améliorant ses résultats en maximisant la proportion de femelles dont le traitement Ovsynch synchronisant est commencé à un stade optimal du cycle (Presynch-Ovsynch, Double Ovsynch, G6G, voir *Repromag 16* ; photo 1). En parallèle, la démonstration par plusieurs chercheurs du lien négatif entre la durée de dominance d'un follicule et la qualité de l'ovocyte qu'il contient leur a fait proposer un raccourcissement à 5 jours du traitement Ovsynch (5 day Ovsynch), avec parfois des améliorations significatives de la fertilité (5 à 10 points de plus ; revue : Bo *et al.* 2016).

**Photo 1 : Les résultats du protocole Ovsynch sont améliorés si une forte proportion de vaches présentent un follicule de grande taille à l'initiation du protocole**



Enfin, c'est la démonstration de l'innocuité de l'administration d'une injection de GnRH à des vaches en tout début de gestation qui a permis le développement des nombreuses stratégies de resynchronisation permettant de minimiser l'écart entre l'IA1 et l'IA suivante chez des vaches vides après l'IA1 (Chebel *et al.* 2003, Fricke *et al.* 2003). Deux stratégies, largement utilisées aux USA, sont proposées pour resynchroniser. La première, qui est la plus « agressive », combine une injection de GnRH vers J21 post IA et un diagnostic de gestation par échographie à J28. Si celui-ci est négatif, la femelle reçoit immédiatement une injection de prostaglandine suivie d'une injection de GnRH et d'une insémination à J30 et J31 respectivement. L'intervalle DG négatif-IA est alors théoriquement de 3 jours. La seconde débute par le diagnostic de gestation à J28. Toutes les femelles diagnostiquées vides débutent un traitement Ovsynch classique et sont inséminées à J38. L'intervalle DG négatif-IA est alors de 10 jours.



### 3. Les nouveautés imposées par les autorités entre 1990 et 2019

Pendant les 20 premières années de leur usage, aussi bien la spirale recouverte de silicone que le traitement à base d'implant de norgestomet incluait l'administration d'une dose d'œstradiol en début de traitement de synchronisation pour les raisons détaillées au paragraphe 1.2. Les autorités européennes étant devenues très critiques sur les possibles effets des résidus d'œstradiol et de ses métabolites dans les produits animaux, l'utilisation de l'œstradiol chez les animaux de production a été interdite en Europe en 2006. Il est donc devenu indispensable de réajuster les traitements existants. Deux stratégies ont alors été proposées :

- dans la première, une injection de GnRH, permettant de faire ovuler les follicules dominants présents à la pose, et donc d'initier une nouvelle vague folliculaire, a été ajoutée lors de la pose de l'implant de norgestomet, sans pour autant modifier la durée du traitement. La prostaglandine injectée en fin de traitement était alors indispensable pour assurer une lutéolyse synchrone chez toutes les femelles. Les études cliniques ont montré des performances de fertilité équivalentes après utilisation de ce nouveau traitement à base de norgestomet sans œstrogène (SO) par comparaison avec l'ancienne méthode.
- dans la seconde, la libération de progestérogène par la spirale en silicone a été optimisée en changeant la nature de la matrice utilisée pour stocker puis libérer la progestérogène (Éthylène-vinyl- acétate à la place du silicone ; Van Werven *et al.* 2013) afin que les niveaux plus élevés de progestérogène circulante libérés augmentent le freinage de la sécrétion de LH par l'hypophyse (par feedback négatif), induisant ainsi un renouvellement folliculaire. De plus, la durée du traitement a été limitée à 7 jours. Compte tenu de sa durée réduite, ce nouveau traitement nécessite également l'inclusion d'une prostaglandine lors du retrait du dispositif. Comme pour la méthode SO avec le norgestomet, les résultats de fertilité produits après utilisation du nouveau dispositif étaient équivalents à ceux générés par les dispositifs antérieurs.

### 4. Les nouveautés apportées par les industriels entre 1990 et 2019

L'innovation, et la propriété intellectuelle associée, représentent les bases du développement pharmaceutique, humain comme vétérinaire. La reproduction ne fait pas exception et nombreux sont les industriels qui ont tenté d'innover pour se démarquer de leurs concurrents. Classiquement, innovation de rupture et innovation incrémentale se succèdent et se complètent.

Trois beaux exemples d'innovation de rupture sont :

- L'utilisation d'un plastique innovant pour développer un dispositif vaginal de libération de progestérogène utilisant l'éthylène-vinyl-acétate (EVA) au lieu du silicone afin d'optimiser la libération de progestérogène et de minimiser le contenu résiduel en progestérogène après utilisation, tout en maximisant le bien-être animal. Cette nouvelle matrice a été associée au développement d'une forme innovante (triangle) optimisant le bien-être animal pendant le traitement.
- Le développement d'un anticorps monoclonal contre l'eCG (Neutra PMSG), permettant de limiter la demi-vie excessive de cette hormone *in vivo* pour la super-ovulation. En effet, son injection au moment de l'œstrus, en bloquant les effets sur l'ovaire des concentrations résiduelles d'eCG, permettait d'optimiser la production d'embryons (Gielen *et al.* 1990). Néanmoins, commercialement, le schéma de super-ovulation incluant la combinaison eCG-Neutra PMSG n'a pas été un succès !
- Le développement de dispositifs vaginaux biodégradables chargés en progestérogène, utilisant un polymère innovant : la polycaprolactone (Bunt *et al.* 1999, brevet WO 9926556). Cependant, compte tenu du coût du polymère, de tels dispositifs n'ont jamais été développés commercialement.

Parmi les exemples d'innovation incrémentale initiée par les industriels, deux méritent d'être évoqués :

- Vers la fin des années 1990, le dispositif vaginal en T à base de silicone a subi un recalibrage (optimisant sa surface, l'épaisseur du film de silicone...) pour maintenir son profil de libération au fil du temps tout en réduisant sa charge en progestérogène (de 1,9 à 1,38g ; Rathbone *et al.* 2002). Le dispositif encore utilisé aujourd'hui dérive de cette étape d'innovation.
- A la même époque, en Nouvelle-Zélande, un dispositif de synchronisation (Cue Mate) combinant un support inerte et réutilisable et des plots chargés en progestérogène (à renouveler à chaque synchronisation) a également été mis au point. Il est aujourd'hui disponible commercialement dans certains pays !



**Tableau 1 : Principales évolutions en reproduction bovine au cours des 70 dernières années**

Période	Principales avancées techniques et scientifiques	Nouveaux protocoles
Années 1950-1970	Induction par l'eCG de polyovulation	Stimulation ovarienne (superovulation)
Années 1970-1990	Structure de la GnRH et synthèse d'analogues Effet lutéolytique de la PGF2 $\alpha$ et synthèse d'analogues Mise au point de dispositifs libérant la progestérone Synthèse d'analogues de la progestérone	Stimulation ovarienne avec l'eCG (superovulation) Synchronisation avec une double prostaglandine Synchronisation avec un progestagène à libération prolongée
Années 1990	Anticorps monoclonaux anti-eCG (fin des années 80-début 90)	Utilisation de la 'FSH' en superovulation Méthode Ovsynch
Années 2000- 2010		Variantes du protocole Ovsynch (présynchronisation, ...) Resynchronisation précoce Synchronisation progestagène sans oestrogène

## CONCLUSION

Cette rétrospective illustre bien les progrès réalisés dans la maîtrise de la reproduction bovine au cours des 50 dernières années (tableau 1). Cette innovation a été bien acceptée par le marché car aujourd'hui un nombre conséquent de génisses et de vaches laitières reçoit des traitements de synchronisation lors de la mise à la reproduction. Les traitements utilisés en routine aujourd'hui sont le produit de 2 principales vagues d'innovation, séparées de vagues d'optimisation. La première a fait naître les traitements de synchronisation à base de prostaglandines et de progestérone et fait émerger le concept d'insémination à un moment prédéterminé sans nécessité de détection des chaleurs. La seconde a vu émerger les traitements Ovsynch et toutes leurs variantes et fait apparaître le concept de resynchronisation. Nous sommes clairement à la fin de cette seconde vague. Cette alternance de phases d'innovation de rupture et de périodes plus longues d'optimisation est classiquement observée lors de la diffusion de l'innovation dans beaucoup de domaines scientifiques et techniques. La spécificité du domaine de la maîtrise de la reproduction animale est cependant liée au grand nombre d'activateurs possible d'une nouvelle vague :

- Les consommateurs peuvent être inducteurs d'une nouvelle vague d'innovation s'ils décident que les traitements d'aujourd'hui sont inadaptés d'un point de vue santé du consommateur ou posent des questions éthiques.
- Les animaux eux-mêmes peuvent être vecteurs d'innovation car le progrès génétique impulsé a modifié leurs caractéristiques physiologiques. C'est typiquement le cas aujourd'hui où les dispositifs à base de progestérone sont devenus inadaptés (il en faut 2 pour obtenir une fertilité correcte chez certains types de vaches (Bisonotto *et al.* 2013))
- L'attitude des autorités d'enregistrement sur la question des perturbateurs endocriniens (car toutes les hormones utilisées en maîtrise de la reproduction appartiennent à ce groupe), est aussi potentiellement un activateur d'innovation si certaines classes d'hormones sont interdites.
- Enfin, les industriels proposant une gamme de produits de maîtrise de la reproduction ont des produits en développement dans leur pipeline. Tous ne verront pas le jour et certains ne seront pas des succès commerciaux. Celui qui paraît le plus proche du marché est une « FSH one shot » susceptible de remplacer les 8 injections de FSH dans les traitements de stimulation ovarienne. Des recherches visant à développer des tests d'identification précoce des femelles gestantes (détectant l'interféron ou des molécules induites par celui-ci) ou des femelles à fort potentiel reproductif (mesurant l'AMH) sont également en cours.

Finalement, pour terminer sur une note un peu provocatrice, on peut s'interroger pour savoir, si avec l'avènement des nouvelles technologies de la communication appliquées à la détection des chaleurs (monitoring) et aux retours, et leur sophistication croissante, il y aura encore besoin de méthodes hormonales d'optimisation de la reproduction à l'horizon 2030... Rendez-vous à ce stade pour faire un nouveau bilan ?



## RECHERCHES RÉCENTES VERS LES THÉRAPEUTIQUES DU FUTUR EN REPRODUCTION BOVINE



Marc Antoine DRIANCOURT  
Astek Consult,  
49330 Chateaufort sur Sarthe, France

*Il est généralement accepté que les vétérinaires disposent aujourd'hui de tout l'arsenal thérapeutique nécessaire pour traiter les principales affections de la reproduction chez la vache laitière et allaitante. En effet, dispositifs libérant de la progestérone, prostaglandines, GnRH, eCG, et hCG sont disponibles depuis longtemps auprès d'un ou plusieurs laboratoires et sont largement utilisés pour traiter l'anœstrus, induire et /ou synchroniser les chaleurs ou tenter de réduire la durée des périodes infertiles. Cependant, depuis quelques années, la demande sociétale a fait émerger de nouvelles contraintes telles que le bien-être animal (qui implique de s'interroger sur la nécessité de traitements parfois complexes), l'éthique (qui questionne le traitement systématique de groupes de femelles, le respect de l'animal lors de manipulations répétées /ou invasives ou l'origine de certaines matières actives) ou la sécurité de l'environnement et/ou du consommateur vis-à-vis de certaines hormones... Face à ces nouvelles exigences, les chercheurs ne sont pas restés inactifs ! La synthèse ci-dessous tente de présenter les principales pistes explorées, et propose dans sa conclusion une analyse prospective des performances et limites de chacune d'entre elles.*

### De la science à de possibles nouveaux produits. Quoi de neuf ?

Les chercheurs sont, par nature, curieux et essaient systématiquement d'être innovants. Au cours des 10 dernières années, ils ont bénéficié de découvertes de la recherche fondamentale et de l'avancée de certaines technologies de pointe pour explorer les différents étages de l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire à la recherche de nouvelles molécules mimant les composants et mécanismes naturels à l'œuvre à chacun de ces étages... Et leur recherche a été fructueuse !

#### • Kiss, un nouveau peptide pilotant la sécrétion de GnRH

Kiss est le peptide (comportant 10 acides aminés pour KP10 ou 54 acides aminés pour KP54) qui, à l'intérieur du cerveau, « pilote » la sécrétion de GnRH. Il est bien connu, chez les petits ruminants qui ont un anœstrus saisonnier, qu'un déficit de synthèse de kiss et/ou un déficit de réceptivité des cellules sensibles à kiss jouent un rôle clé dans le blocage de l'ovulation observé à cette période. Une revue récente dans le Repromag 13 (Driancourt 2014) décrit notre compréhension des différents impacts de kiss dans ces espèces.

Chez les bovins, il existe très peu de données permettant de documenter les effets biologiques de kiss sur la production de gonadotropines et sur l'induction de l'ovulation chez des vaches non cyclées. Cependant, compte tenu de la très grande généralité du rôle de kiss sur la production de GnRH dans toutes les espèces animales, du très haut degré de conservation de sa séquence peptidique à travers les espèces et de l'universalité des effets stimulants de GnRH sur la production de LH et, à un degré moindre, celle de FSH, il est hautement probable qu'un traitement avec kiss aurait des effets stimulants sur la croissance folliculaire et l'ovulation chez les bovins via une élévation des niveaux de LH et FSH.



A ce titre, kiss pourrait constituer une alternative à l'utilisation d'eCG. Cette substitution aurait de multiples avantages car kiss est un peptide assez simple à synthétiser et à purifier, deux facteurs garantissant une excellente sécurité pour les animaux traités, les vétérinaires, et sans risques pour l'environnement. Hélas, kiss, comme tous les petits peptides, présente une demi-vie très courte (quelques minutes). Chez les ovins, une injection unique de kiss induit une montée des gonadotropines trop brève pour avoir un effet stimulant sur la croissance folliculaire. Induire l'ovulation d'une brebis en anœstrus nécessite une infusion continue de kiss pendant au moins 24h (Caraty *et al.* 2007). Chez les bovins, compte tenu de la durée de la phase folliculaire (72-96h, donc deux fois plus longue que chez la brebis), il faudrait une infusion de kiss pendant cette durée pour produire le développement et la maturation d'un follicule pré-ovulatoire. C'est bien entendu complètement impossible en pratique.

Aussi quelques équipes de recherche ont cherché à modifier la structure de kiss pour créer des agonistes de kiss ayant une demi-vie augmentée. En substituant les acides aminés sensibles à la protéolyse par des acides aminés résistants, une équipe de l'INRA (Beltramo & Decourt 2017) a réussi à développer un agoniste qui paraît prometteur. Dans un brevet parallèle (Beltramo *et al.* 2014), la même équipe a également envisagé de « greffer » sur le peptide kiss des chaînes permettant à ce nouvel agoniste de se lier sur l'albumine plasmatique, qui sert alors de « réservoir » pour le peptide. Cependant, la demi-vie de cet agoniste de kiss innovant semble encore limitée. Si ce point était confirmé chez la vache, il pourrait ne pas constituer un stimulant robuste de la croissance folliculaire chez des vaches en anœstrus, car il serait incapable d'élever les concentrations de LH pendant les 72h d'une phase folliculaire.

En conclusion, il est clair que des agonistes de kiss constituent potentiellement des outils innovants de stimulation de la croissance folliculaire terminale et/ou de maîtrise de l'ovulation. Cependant les agonistes actuels ont des caractéristiques pharmacocinétiques qui pourraient limiter leur utilisation comme alternative à l'eCG aux seuls petits ruminants. Bien sûr, il pourrait être envisagé de faire deux injections chez la vache, mais une telle stratégie irait à l'encontre de la demande de simplification des traitements émise par les éleveurs et de la demande sociétale de bien-être animal. Le développement d'un agoniste de kiss dédié aux bovins et actif en injection unique reste donc un challenge technique complexe.



• **La mélatonine, une petite molécule active sur la reproduction ?**

La mélatonine est connue pour être le médiateur informant le système nerveux central des durées respectives du jour et de la nuit ; elle est donc impliquée dans le contrôle des variations saisonnières de l'activité ovarienne chez les espèces saisonnées. C'est à ce titre qu'un traitement à base de mélatonine a été développé pour modifier la durée de la saison sexuelle des petits ruminants.

Il est moins connu que des récepteurs à la mélatonine sont aussi présents dans l'ovaire (cellules de la granulosa et ovocyte). Afin d'analyser si un traitement à la mélatonine pouvait moduler la reproduction chez les bovins, une étude espagnole récente (Garcia-Ispierto *et al.* 2013) a administré 9-12 implants de mélatonine à des vaches tarées en début d'été et observé leur effet sur les performances de reproduction post partum. Le traitement avec la mélatonine a été associé à une réduction de 20 jours de l'intervalle vêlage-IA fécondante, induite par une réduction de la fréquence des vaches repeat- breeders. Ces résultats intéressants n'ont cependant pas été confirmés sur de plus grands effectifs et dans des conditions climatiques tempérées !

• **Les anti-aromatase : des outils pour agir sur les vagues folliculaires ?**

Les inhibiteurs de l'aromatase (qui empêchent ou réduisent la production d'œstradiol par les follicules en maturation terminale) sont des molécules qui sont utilisées depuis longtemps en santé humaine (traitement des cancers œstrogéno-dépendants et de l'endométriose), dépourvues de toxicité et qu'il est possible de produire à une échelle industrielle. Dans la famille des inhibiteurs de l'aromatase, deux composés (létrozole, anastrozole) sont particulièrement utilisés. Un groupe canadien (Yapura *et al.* 2017), persuadé que l'utilisation de tous les stéroïdes pouvait être interdite à moyen terme à cause de leur possible activité de perturbateur endocrinien, a eu l'idée de tester si ces composés pouvaient être une alternative aux stéroïdes pour toutes les indications de synchronisation des cycles. En effet, en théorie, la diminution des concentrations d'œstradiol suite à l'administration d'un traitement anti-aromatase devrait induire une montée de FSH (par réduction du feedback négatif de l'œstradiol sur la FSH). Comme une montée de FSH est le moteur de l'initiation d'une nouvelle vague folliculaire, l'administration d'un anti-aromatase pourrait agir comme synchronisateur des vagues folliculaires. En pratique, ces auteurs ont montré que le létrozole (inhibiteur de l'aromatase d'un poids moléculaire de 285) était bien actif chez les bovins dans un test in vitro (cellules de granulosa). Ils ont ensuite montré qu'une injection d'une grosse dose de létrozole, réalisée pendant la phase lutéale, rallongeait la durée de persistance des follicules dominants et augmentait la taille du corps jaune (Yapura *et al.* 2017). De plus, une étude plus ancienne (Yapura *et al.* 2013) avait également montré que l'administration de létrozole pendant la maturation terminale du follicule augmentait la taille du follicule pré-ovulatoire et la production de progestérone post-ovulatoire. L'ensemble des effets observés suggère que, contrairement à l'hypothèse avancée par les chercheurs, l'activité du létrozole est plus complexe. De plus, compte tenu de la demi-vie limitée du létrozole chez les bovins (30h environ), ceux-ci ont dû développer un dispositif vaginal contenant du létrozole (1 ou 3g selon les études) afin d'assurer des concentrations circulantes élevées de cette molécule pendant au moins 4 jours. Ils l'ont alors testé sur génisses dans un schéma de traitement incluant aussi une injection



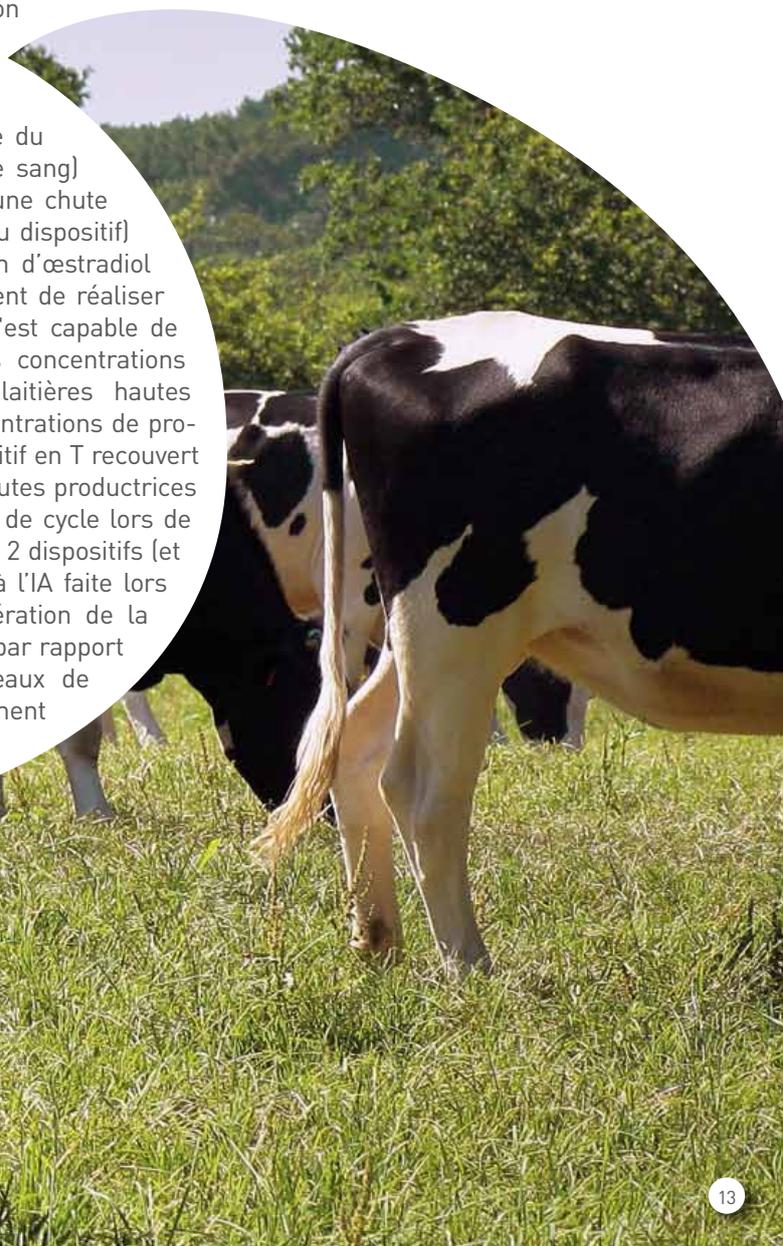


de prostaglandine (au retrait du dispositif vaginal contenant le létrozole) et une injection de GnRH (24h après la prostaglandine). Par rapport au lot contrôle ne recevant que prostaglandines et GnRH, le pourcentage de femelles synchronisées a été amélioré par l'addition du létrozole et la variabilité du moment de l'ovulation réduite. Il est néanmoins regrettable que cet essai ne présente pas de données de fertilité suite à cette synchronisation ! Ces résultats demandent donc à être confirmés par des données de fertilité obtenues sur des effectifs suffisants lors d'un essai clinique incluant un lot contrôle positif adapté. De même, l'efficacité de ce type de traitement chez des femelles en anœstrus devra aussi être établie, aussi bien pour son aptitude à les synchroniser que pour la fertilité obtenue. Finalement, l'industrialisation de la production du dispositif vaginal, la dose de létrozole à y inclure et le coût du dispositif final demandent à être validés avant qu'un tel dispositif puisse être mis à disposition du marché. Cela demandera encore de nombreuses années de développement !

#### • Les nouveaux plastiques : des outils plus performants de libération de la progestérone ?

Les dispositifs vaginaux libérant de la progestérone, présents sur le marché en France comme en Europe, utilisent comme matrice de stockage/libération soit du silicone, soit de l'EVA (Ethylène-vinyl-acetate). Ils sont utilisés assez largement, particulièrement chez les vaches (laitières et allaitantes) en anœstrus. Tous deux présentent cependant des limites, à la fois au niveau des fertilités obtenues après traitement, et également à cause de leur relative inefficacité à libérer la progestérone qu'ils contiennent (il reste 60% de la charge initiale après usage) et des risques associés pour l'environnement.

Les prérequis pour que de tels systèmes de synchronisation des chaleurs utilisant la progestérone soient efficaces sont au nombre de trois : d'abord, un pic de libération de progestérone à la pose (pour initier une nouvelle vague folliculaire), ensuite, le maintien pendant toute la durée du traitement de niveaux (sans doute autour de 2ng/ml de sang) suffisants pour freiner la pulsativité de la LH et enfin, une chute brutale des concentrations de progestérone (au retrait du dispositif) permettant la croissance pré-ovulatoire et la production d'œstradiol associée. Si la plupart des dispositifs existants permettent de réaliser facilement les premiers et derniers prérequis, aucun n'est capable de libérer, pendant la seconde partie du traitement, des concentrations adaptées de progestérone nécessaires aux vaches laitières hautes productrices. Dans certaines expérimentations, les concentrations de progestérone circulantes en fin de traitement avec un dispositif en T recouvert de silicone n'excèdent pas 0,5ng/ml ! Chez les vaches hautes productrices aux USA, particulièrement celles en anœstrus ou en fin de cycle lors de la pose du dispositif, il a été montré qu'il faut maintenant 2 dispositifs (et non plus un seul) pour obtenir une fertilité acceptable à l'IA faite lors de l'œstrus synchronisé !! Même si les profils de libération de la nouvelle spirale en silicone paraissent un peu améliorés par rapport au dispositif en T (Van Werven *et al.* 2013), les niveaux de progestérone libérés pendant la seconde partie du traitement restent aussi trop faibles pour les vaches laitières haute productrices.





Une recherche active est donc en cours pour améliorer les performances et la « durabilité » de ces dispositifs soit en explorant le potentiel de nouveaux polymères, soit en exploitant les potentialités de tous les composants de la grande famille des EVA. Elle explore 3 pistes

- Créer des dispositifs biodégradables afin de limiter les risques environnementaux liés à la gestion des dispositifs usagés. Ainsi, un groupe en Nouvelle-Zélande (Rathbone *et al.* 2002) a développé un dispositif vaginal utilisant le polycaprolactone (PCL) comme matrice, car ce polymère est biodégradable. Il a montré que ce dispositif générait des profils identiques au T recouvert de silicone. Cependant, le coût élevé du polymère n'a pas permis le développement commercial de ce dispositif.
- Utiliser de nouveaux plastiques comme matrice. Un groupe argentin (Heredia *et al.* 2009) a exploré le potentiel du latex (polyisoprène) à libérer de la progestérone et a montré que des dispositifs inertes couverts d'une feuille de latex imprégnée de progestérone génèrent in vivo des profils assez similaires à ceux produits avec du silicone. Cependant, depuis cette publication, aucun dispositif de ce type n'est apparu sur le marché !
- Valoriser la diversité des propriétés de l'EVA pour optimiser le taux de libération de la progestérone. En effet, la solubilité de la progestérone dans l'EVA (et sa libération hors de l'EVA) dépend du type d'EVA utilisé. Un autre groupe argentin (Cappadoro & Luna 2015) a publié récemment des résultats montrant une meilleure efficacité de relargage (moindre quantité résiduelle de progestérone après 7 jours d'usage) par un dispositif en EVA par rapport à un dispositif en silicone. Cependant, une revue récente sur ce sujet (De Graaff & Grimard 2017) souligne que l'innovation dans ce domaine est d'une grande complexité car la progestérone fond à 130° C et beaucoup d'EVA ont besoin de températures supérieures à ce seuil (autour de 170°C) pour être moulés. La recristallisation de la progestérone associée au décalage entre ces deux températures étant source d'instabilité des dispositifs pendant leur stockage avant usage, remettrait en cause leur développement commercial !

Si les nouveaux polymères constituent une voie délicate mais activement explorée, d'autres (Rathbone *et al.* 2012) ont essayé d'être encore plus innovants en créant un dispositif électronique de libération des hormones de synchronisation des cycles. Si des prototypes ont pu être produits et ont montré une certaine efficacité, leur fiabilité limitée ne leur a pas permis d'atteindre un développement commercial.

#### • Une/des nouvelles gonadotropines bovines recombinantes. Une possibilité ?

Depuis presque 20 ans, des gonadotropines humaines recombinantes (FSH, LH et hCG) sont disponibles pour traiter l'infertilité humaine et réaliser des stimulations ovariennes avant fécondation in vitro (FIV). Plus récemment, le développement d'une FSH humaine longue action (Elonva, Merck), qui après une injection unique stimule la croissance folliculaire pendant une semaine, a permis de simplifier les traitements de stimulation ovarienne en minimisant stress et risques d'erreurs et d'oublis ! Haute pureté et haute répétabilité de la qualité du produit fini sont également deux avantages de ces hormones recombinantes humaines. Il est hélas impossible néanmoins d'utiliser ces nouvelles hormones recombinantes humaines chez l'animal, d'une part en raison de leur coût et d'autre part à cause de leur possible immunogénicité.

En revanche, dans le monde de la reproduction animale, qui utilise très largement des gonadotropines extraites (de sang ou d'hypophyses), on pourrait être déçu du peu d'avancées car une recherche approfondie sur les bases de données scientifiques et de brevets n'a permis d'identifier que trois entreprises actives dans le domaine des hormones gonadotropes recombinantes :

- L'objectif de la première entreprise (Aspen Bio), basée aux USA est de développer une FSH bovine longue action en utilisant la même technologie que celle utilisée pour Elonva, la FSH longue action humaine. Celle-ci consiste à inclure dans la construction utilisée non seulement les 2 sous unités de la FSH bovine mais aussi la queue hyperglycosylée d'hCG, l'hormone placentaire humaine. Ce sont les 4 sites supplémentaires de O-glycosylation de la queue d'hCG qui sont responsables de l'extension de la demi-vie de cette molécule recombinante. Cependant, compte tenu de l'importance de la glycosylation pour son activité biologique, cette hormone doit être produite par des cellules CHO (Chinese hamster ovary) qui constituent un système complexe et peu productif. Un article récent (Carvalho *et al.* 2014) suggère qu'une telle hormone présente une activité biologique satisfaisante chez les bovins dans le cadre de la production d'embryons. Cependant, cette activité semble présenter une variabilité



importante entre lots. Il est également clair que, compte tenu de son activité FSH pure, cette nouvelle hormone ne pourra en rien constituer un substitut à l'eCG. Depuis 2014, aucune nouvelle information n'a filtré sur cette FSH bovine recombinante, suggérant que le projet a été arrêté ou bien qu'il est développé vers le marché avec une extrême confidentialité...

- La seconde entreprise (Trophogen), également basée aux USA, propose une technologie différente qui consiste à modifier des acides aminés spécifiques (5 au maximum) pour augmenter l'activité biologique de l'hormone produite. Le brevet (Szkudinski & Weintraub 2014) qui documente leurs recherches montre que cette hormone, dans les modèles *in vitro* présentés, se comporte en effet comme un super-agoniste de FSH. De plus, cette entreprise a aussi breveté une stratégie d'hyper N-glycosylation pour augmenter la demi-vie de leur super-agoniste. Très peu d'informations sont disponibles sur l'efficacité de ce/ces composé(s) *in vivo* chez la vache. Les raisons possibles pourraient être les mêmes que pour la FSH d'Aspen Bio !
- Une dernière entreprise (Ouro Fino, Brésil) a publié récemment une demande de brevet (Sogayar *et al.* 2017) concernant la production recombinante d'eCG par des cellules CHO. Ce brevet qui contient très peu d'informations sur l'activité biologique du produit obtenu chez la vache a néanmoins le mérite de montrer que certains industriels s'intéressent à la production d'eCG recombinante ! Il faut néanmoins garder en mémoire que, eCG étant la gonadotropine présentant la glycosylation la plus complexe (3 chaînes N-glycosylées et 12 chaînes O-glycosylées), sa production recombinante en cellules CHO représente un réel challenge technique et pourrait induire des coûts de production très élevés.

## De la science à de nouveaux schémas de traitement. Quoi de neuf ?

L'utilisation souvent systématique de l'échographie ovarienne lors des traitements d'induction et de synchronisation a permis de mettre en évidence des facteurs associés à une réduction de la fertilité. Cette compréhension a permis de proposer des modifications des traitements existants pour en améliorer les résultats. Dans cette synthèse, nous n'évoquerons pas les combinaisons de traitement de type Ovsynch (Presynch-Ovsynch, double Ovsynch, G6G visant à maximiser la réponse ovulatoire à la première injection de GnRH du traitement) déjà présentées dans le numéro 16 du Repromag et nous focaliserons sur deux nouvelles adaptations de l'Ovsynch classique.

En parallèle de ces travaux, des tests rapides de détection du pic de LH ont été développés. En théorie, ils permettent d'associer de façon très fine l'IA et l'ovulation et donc de maximiser la fertilité et/ou le taux de fertilisation et de développement chez les donneuses d'embryons.





• **L'Ovsynch court, un moyen d'augmenter la fertilité ?**

Un traitement Ovsynch (GnRH-Prostaglandine-GnRH) optimal (du point de vue de la fertilité à la chaleur synchronisée) démarre par une ovulation induite par la première injection de GnRH. Cette ovulation s'accompagne de l'initiation d'une nouvelle vague folliculaire, d'où émerge un follicule dominant quelques jours plus tard. L'âge du follicule dominant ayant un effet négatif sur la qualité de l'ovocyte qu'il contient, certains auteurs ont proposé de raccourcir à 5 jours (au lieu de 7) la durée de l'intervalle entre le premier GnRH et la prostaglandine pour faire ovuler un follicule aussi jeune que possible. En effet, il est généralement admis que plus un follicule est jeune, plus la qualité de l'ovocyte qu'il contient est élevée. Deux études réalisées aux USA (Bridges *et al.* 2008, Santos *et al.* 2010) ont montré des gains en taux de conception de 9 et 5 points en faveur des traitements courts. En revanche, de tels traitements courts nécessitent l'inclusion d'une injection supplémentaire de prostaglandine (voir ci-après).

• **Deux prostaglandines au lieu d'une dans l'Ovsynch. Un progrès ?**

Le succès du traitement Ovsynch repose sur deux prérequis : d'une part l'induction d'une ovulation par la 1<sup>ère</sup> injection de GnRH et d'autre part, l'induction de la régression de tous les corps jaunes présents (dont ceux induits par l'administration de GnRH) par l'injection de prostaglandine. Si dans le traitement Ovsynch classique, la régression du corps jaune induit n'est généralement pas problématique car 7 jours séparent le premier GnRH de l'injection de prostaglandine, ce n'est plus le cas dans le schéma « Ovsynch court » décrit ci-dessus où les corps jaunes induits ont 4-5 jours au moment de l'injection de prostaglandine. Pour éviter les problèmes liés à l'absence de lutéolyse de ces très jeunes corps jaunes ou à leur lutéolyse incomplète, Wiltbank *et al.* (2015) ont proposé d'effectuer 2 injections de prostaglandines à un jour d'intervalle au lieu d'une seule. Dans un essai clinique de terrain (2500 vaches de 12 fermes aux USA), ils ont montré que l'inclusion d'une seconde prostaglandine dans le traitement était associée à une élévation du taux de conception de 3 points (34.4% vs 37.6% dans les lots avec une ou deux prostaglandines respectivement).

• **Quels bénéfices d'un dosage rapide de LH pour la gestion de l'insémination ?**

Un bon synchronisme entre le moment de l'insémination et le moment de l'ovulation est nécessaire pour maximiser le taux de conception. Comme le moment de l'ovulation est difficile à déterminer, la pratique propose soit d'utiliser le moment de début des chaleurs pour « caler » l'insémination [règle « matin / après-midi »] soit de se reposer sur des traitements de synchronisation permettant une insémination à un moment prédéterminé. Cependant, chaleurs silencieuses et/ou ovulations retardées par rapport au début des chaleurs chez certaines hautes productrices compliquent souvent cette gestion et interfèrent négativement avec la fertilité. En effet, pour que celle-ci soit optimale, il faut que l'IA soit faite 12h avant l'ovulation donc 12h après le pic de LH induisant celle-ci. Une start-up française, ReproPharm, a récemment développé un kit de mise en évidence du pic de LH chez la vache (Predibov) qui pourrait être un outil utile permettant de faire coïncider finement insémination et ovulation. En effet, ce kit, qui peut être mis en œuvre à la ferme, détecte en 40 minutes le pic de LH à partir de quelques gouttes de





sang et donne une réponse binaire (oui/non). Si le pic de LH est détecté chez une vache (couleur bleue du test), il faut l'inséminer 12h plus tard. Si aucun pic n'est mis en évidence, un nouveau prélèvement est réalisé 6h plus tard et son résultat utilisé pour décider ou non d'une insémination. La pertinence de ce kit a été évaluée après utilisation de semence sexée et chez des génisses productrices d'embryons (Dupuy *et al.* 2012). Si des effets bénéfiques de cette approche sur la production d'embryons n'ont pas été détectés de façon significative, des résultats préliminaires montrent (sur un tout petit effectif !!) un gain de 14 points de fertilité chez des femelles inséminées en semence sexée 18-24h après la détection de leur pic de LH par rapport à des femelles inséminées de façon systématique après le retrait d'une spirale vaginale. Ces résultats demandent toutefois à être confirmés sur de grands effectifs ! De même, la pertinence économique de l'approche doit être évaluée en prenant en compte le coût du test individuel et la nécessité de le répéter toutes les 6h sur les vaches détectées négatives.

## De la science à de nouveaux diagnostics. Quoi de neuf ?

Il est impossible de réduire le contrôle de la fonction de reproduction aux seuls acteurs « classiques » (GnRH hypothalamique, FSH et LH hypophysaires et stéroïdes ovariens). En effet, la production de signaux endocrines ovariens ne se limite pas aux stéroïdes et la recherche a dévoilé récemment l'importance de nombreux signaux protéiques ovariens ou plus largement génitaux à activité locale (autocrine et paracrine). L'AMH et les protéines de type Bone morphogenic protein (BMP/GDF) en sont deux particulièrement importantes, évoquées récemment dans les Repromag 17 et 19. L'utérus interagit également avec l'ovaire via la libération de prostaglandines chez la femelle non gestante mais également par la production d'interféron tau et de Pregnancy associated glycoproteins (PAG) chez les femelles gestantes. La possibilité d'utiliser ces 2 derniers composés pour réaliser des diagnostics ultra-précoces de gestation a été explorée au cours des dernières années. Enfin, très récemment, une utilisation innovante de l'échographie couplée au Doppler a été proposée pour réaliser des diagnostics de gestation vers 20 jours post IA. Une telle approche constituerait à ce jour le test de gestation le plus précoce disponible, utilisable dans les conditions du terrain, permettant ainsi de minimiser l'intervalle entre 2 IA !

### • Dosage d'AMH et potentiel de reproduction. Quel dosage ? Quel potentiel ?

Chez la femme, la mesure des concentrations sanguines d'hormone anti-mullérienne (AMH) est utilisée comme marqueur de la taille de la réserve ovarienne. Pratiquement, chez la femme jeune dont l'ovaire est riche en follicules, les concentrations d'AMH sont élevées alors qu'elles deviennent faibles quand la ménopause s'approche. Cette information est également utilisée en clinique humaine pour ajuster les doses de FSH administrées lors des traitements de l'infertilité selon la taille de cette réserve : en effet, en présence d'une réserve ovarienne de grande taille, de faibles doses de FSH sont suffisantes pour obtenir un nombre d'ovulations raisonnable, alors qu'en présence d'une réserve ovarienne diminuée, de plus fortes doses de FSH sont nécessaires. Assez rapidement, les chercheurs s'intéressant à la stimulation ovarienne chez la vache ont cherché à valider si la même logique s'appliquait et ont confirmé le lien entre concentrations d'AMH et nombre d'ovulations induites après FSH chez la vache. Cependant, le test ELISA de mesure des concentrations d'AMH étant un test humain dont les réactions croisées avec l'AMH bovine sont limitées, il était assez difficile de réaliser une prédiction de la réponse ovarienne d'animaux individuels à partir de leur concentration d'AMH ainsi déterminée. Un réel progrès a été permis par la mise au point d'un test ELISA spécifique d'AMH bovine (Ayouche *et al.* 2015) avec lequel les concentrations lues sont beaucoup plus élevées et précises. Sur la base de ce test ELISA homologue, ces auteurs ont pu classer des vaches superovulées en 4 groupes de concentration et définir la réponse ovarienne obtenue pour chaque groupe (Ayouche *et al.* 2015). Reste maintenant à transformer ce test de laboratoire en test de routine utilisable en centres de production d'embryons ! Et ce dosage d'AMH pourrait aussi avoir d'autres applications en reproduction bovine .

En effet, une étude récente a mis en évidence un lien entre concentrations d'AMH et longévité (Jimenez-Krassel *et al.* 2015). Les femelles ayant des concentrations d'AMH faibles à l'âge de 11-15 mois, étaient plus susceptibles d'être réformées précocement car seules 24% réalisaient 3 lactations alors que leurs congénères à plus fortes concentrations d'AMH étaient entre 32 et 43% à le faire.... Les lecteurs intéressés par des détails supplémentaires sur les liens entre AMH et reproduction bovine pourront consulter avec profit un article récent du Repromag 17 !





### • Dosage de PAG précoces comme diagnostic de gestation. Une option réaliste aujourd'hui ?

Depuis quelques années déjà, des dosages de PAG sont disponibles commercialement (Idexx) pour détecter une gestation débutante. Ces dosages, réalisables sur du sang et parfois sur du lait, constituent donc une alternative à la visualisation d'une gestation débutante par échographie. Ils fournissent une information de qualité analogue à celle-ci (sensibilité/spécificité) à des stades post IA où l'échographie est un examen fiable (30-35 jours). En revanche, ils présentent trois limitations : premièrement, ce sont des tests de laboratoire qui ne peuvent être mis en œuvre à la ferme ; deuxièmement, à l'inverse de l'échographie pour laquelle le battement du cœur du fœtus renseigne sur sa viabilité, la mise en œuvre de concentrations élevées de PAG ne garantit pas la viabilité du fœtus car les concentrations de PAG chutent très lentement après un avortement ; troisièmement, ces tests sont relativement tardifs (28-35 jours post IA) et s'ils constituent le principal diagnostic de gestation, ils peuvent produire un accroissement significatif de l'écart entre l'IA1 et l'IA suivante des vaches vides. De nombreux travaux de recherche récents visent donc à développer des tests de diagnostic de gestation plus précoces et plus prédictifs de la survie embryonnaire en utilisant le monitoring de PAG spécifiques. Un pas en avant a été réalisé cette année par une équipe américaine (Reese *et al.* 2018) qui a utilisé un anticorps monoclonal contre une PAG produite précocement au cours de la gestation pour développer un test ELISA, l'appliquer sur des échantillons obtenus à J24 post ovulation et le cross-valider contre le résultat d'une échographie à J31 post ovulation. Les résultats de cette étude montrent des concentrations de PAG trois fois plus élevées chez les femelles gestantes par rapport à celles qui n'ont pas conçu. Les auteurs proposent aussi des seuils permettant d'identifier correctement les femelles gestantes avec 90 ou 95% d'exactitude. Un tel test, s'il devenait disponible commercialement, permettrait de réduire de 4 à 11 jours l'intervalle entre 2 IA consécutives.

Une autre option potentiellement utile, car permettant de prédire le risque de mortalité embryonnaire entre J30 et J60 post IA, utilise des anticorps spécifiques anti-PAG (fournis par Idexx ; Gatea *et al.* 2018). Dans cette étude impliquant plusieurs centaines de vaches fécondées par insémination ou transfert, et où la mortalité embryonnaire s'établissait entre 16 et 23%, les concentrations de PAG, mesurées par un dosage précis (3 anticorps monoclonaux en capture et un anticorps polyclonal en détection), étaient plus de deux fois plus élevées chez les vaches qui maintenaient leur gestation au-delà de 60 jours par rapport à celles qui stoppaient leur gestation entre 30 et 60 jours. Si la valeur prédictive de ce dosage pour une mortalité embryonnaire tardive était confirmée sur un plus grand nombre d'animaux, un tel test pourrait être mis en œuvre sur des groupes de femelles spécifiques (receveuses d'embryons de haute valeur génétique, vaches pleines après IA de semence sexée...) afin de détecter les femelles à risque et d'essayer de prévenir cette mortalité embryonnaire tardive !

Des chercheurs encore plus ambitieux (Yoshino *et al.* 2018) ont décrit une approche (basée sur la quantification par PCR de 4 gènes spécifiques induits par la production d'interféron tau par l'embryon) pour proposer une possibilité de détection d'une gestation débutante dès 20-22 jours post IA. Si les résultats techniques du test semblent acceptables, la complexité de la préparation des échantillons et celle de l'algorithme de lecture du résultat ne permettent pas d'imaginer l'arrivée d'un tel test sur le terrain avant un bon moment ! Cependant, détecter une gestation débutante avant ou en parallèle du retour en chaleur d'une femelle spécifique est une proposition qui a une vraie pertinence économique et qui mérite certainement d'être poursuivie !

### • La vascularisation du corps jaune permet-elle un diagnostic de gestation fiable ?

Lors de la régression du corps jaune associée à l'absence de gestation débutante, la vascularisation du corps jaune diminue. Une équipe brésilienne (Siquiera *et al.* 2013) a été la première à imaginer qu'il était possible d'effectuer un diagnostic de gestation très précoce (autour de J20 post IA) en utilisant un échographe Doppler et en mesurant la vascularisation du corps jaune. Dans cette étude, qui impliquait environ 500 vaches et génisses, la sensibilité d'un test échographique Doppler pour détecter une gestation s'est établie à 99% et la valeur prédictive négative atteignait 98,5%. Ce test écho-Doppler est donc un excellent test de non-gestation ! Une étude irlandaise plus récente (Scully *et al.* 2014) a confirmé la valeur du critère « vascularisation du corps jaune » et a proposé d'y adjoindre une mesure de sa taille et de la texture de l'utérus à J21. Quand ces 3 paramètres sont pris en compte, la sensibilité et la spécificité du diagnostic dépassent 97%. Cette technique, qui certes demande un équipement coûteux, présente clairement les avantages d'un diagnostic rapide, à la ferme et d'une précision très informative. C'est certainement un bon outil de gestion des femelles vides après une première insémination, particulièrement dans les grands troupeaux. Le coût d'achat de cet équipement peut néanmoins constituer un frein à sa diffusion à grande échelle.



## CONCLUSION

S'il fallait jouer à « Mme Irma », regarder dans une boule de cristal et essayer de prédire les prochains outils mis à la disposition des vétérinaires, quelles pourraient être les options les plus réalistes parmi celles évoquées dans ce texte ?

Dans le domaine du diagnostic, la diffusion de l'échographie Doppler pour le diagnostic de gestation précoce de gestation vers J19-J20 post IA ne nécessite aucun prérequis additionnel et devrait donc pouvoir avoir lieu rapidement, une fois le matériel validé pour un usage de terrain et le coût de réalisation de l'examen établi ! Certaines des autres approches diagnostiques décrites paraissent aussi prometteuses. Mais avant de les diffuser sur le terrain, il restera à faire évoluer le système de mesure utilisé dans les tests ELISA mentionnés ci-avant vers des tests sur bandelettes adaptés à un usage à la ferme, puis à en évaluer l'efficacité sur de grands nombres de femelles (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative) ainsi que la pertinence économique de leur mise en œuvre. La commercialisation de tels diagnostics (hors échographie Doppler) doit également être précédée par une documentation sérieuse de la qualité des réactifs utilisés ainsi que de la qualité et de la robustesse du processus de fabrication. A court/moyen terme, les vétérinaires et leurs éleveurs devraient donc se voir proposer certains nouveaux tests, particulièrement dans le domaine du diagnostic ultra-précoce de la gestation.

La création de nouveaux médicaments de maîtrise de la reproduction ne peut s'envisager qu'à moyen et long terme, car le temps de développement d'un médicament est généralement d'environ 10 ans, compte tenu de la complexité des études réglementaires nécessaires à leur enregistrement. Les candidats médicaments les plus avancés sont un kiss longue action, une FSH recombinante longue action et, à plus long terme, un inhibiteur de l'aromatase, au cas où l'usage de tous les stéroïdes serait interdit par une réglementation sur les perturbateurs endocriniens... Si les données techniques montrant l'efficacité de deux premières molécules sont partiellement disponibles, il reste aux entreprises développant ces médicaments à réaliser toutes les études de toxicité/sécurité ainsi qu'à valider la qualité et la robustesse de leur processus de fabrication !

Pour toutes ces nouvelles molécules, l'absence de temps d'attente et un coût de synthèse compatible avec une valorisation chez la vache sont aussi deux interrogations pouvant invalider le développement de nouveaux médicaments. Il est donc presque impossible de prédire quand ils seront mis à la disposition des vétérinaires et éleveurs.

En ce qui concerne les dispositifs vaginaux de synchronisation, même s'il existe un réel besoin pour de nouveaux dispositifs plus performants (du point de vue de l'efficacité et du respect de l'environnement), la recherche n'a pas, à ce jour, fourni de pistes permettant d'espérer, à court/moyen terme, l'incorporation d'une innovation industrialisable dans des systèmes disponibles sur le terrain !

En résumé, l'innovation dans le domaine de la reproduction animale est donc bien active. Si toutes les idées innovantes détaillées ci-dessus n'atteindront pas le terrain, certaines seront peut-être vos outils de demain... Merci aux équipes de chercheurs prêtes à innover puis à affronter les difficultés apparaissant parfois au fil de ce processus passionnant qu'est le développement de nouveaux traitements ou médicaments !



## Pour en savoir plus :

- Ayouche N., Picard J.Y., Monniaux D. et al (2015) The BOC ELISA a ruminant specific AMH assay that improves the determination of plasma AMH concentrations and its correlation with embryo production in cattle. *Theriogenology* 84: 1397-1404.
- Beltramo M. & Decourt C. (2017) Towards new strategies to manage livestock production using kisspeptin analogues. *Theriogenology* (in press).
- Beltramo M., Aucagne V., Caraty A. et al (2014) Kiss 1R receptor agonist compounds and use thereof for inducing ovulation in mammals. Brevet WO2014/118318A1.
- Bridges G.A., Carvalho P.D., Grum D.E. et al (2008) Decreasing the interval between GnRH and prostaglandin F2D from 7 to 5 days and lengthening proestrus increases timed AI pregnancy rates in beef cows. *Theriogenology* 69: 843-851.
- Carvalho P.D., Hackbart K.S., Bender R.W. et al (2014) Use of a single injection of a long acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: a preliminary study. *Theriogenology* 82: 481-489.
- Cappadoro A.J. & Luna J.A. (2015) Development of an injection molded ethylene vinyl acetate copolymer (EVA) intravaginal insert for the delivery of progesterone to cattle. *Animal Reproduction Science* 158: 104-108.
- Caraty A., Smith J.T., Lomet D. et al (2007) Kisspeptin synchronises preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148: 5258-5267.
- De Graaff W. & Grimard B. (2017) Progesterone releasing devices for cattle estrus induction and synchronization: device optimization to anticipate shorter treatment durations and new devices development. *Theriogenology* (in press)
- Driancourt M.A. (2014) Du nouveau dans le cerveau : les mécanismes contrôlant la sécrétion de GnRH enfin décryptés. *Repromag*
- Dupuy L., Joly C., Decourtye J., et al (2012) Utilisation de PrediBov, un test utilisable en ferme pour détecter le pic pré-ovulatoire de LH et optimiser la production d'embryons. *Renc Rech Ruminants* 19: 355.
- Garcia-Ispuerto I, Abdelfatah A., & Lopez-Gatius F. (2013) Melatonin treatment at dry off improves reproductive performance post-partum in high producing dairy cows under heat stress conditions. *Reproduction in domestic animals* 48:577-583.
- Gatea A.O., Smith M.F., Pohler K.G. et al (2018) The ability to predict pregnancy loss with ELISAs that detect pregnancy associated glycoproteins is antibody dependent. *Theriogenology* 108: 269-276.
- Heredia V., Bianco I.D., Tribulo H. et al (2009) Polyisoprene matrix for progesterone release. *International journal of Pharmaceutics* 382: 98-103.
- Jimenez-Krassel F., Scheetz D.M., Neuder L.M. et al (2015) Concentration of AMH in dairy heifers is positively associated with productive herd life. *Journal of Dairy Science* 98: 3036-3045.
- Rathbone M.J., Bunt C.R., Ogle C.R. et al (2002) Development of an injection molded polycaprolactone intravaginal insert for the delivery of progesterone to cattle? *Journal of controlled release* 85: 61-71.
- Rathbone M.J. & Burke C.R. (2012) Controlled release veterinary drug delivery. In Rathbone & McDowell (editeurs) *Long acting animal health drugs*. Londres. Springer. pp 247-270
- Reese S.T., Pereira M.H.C., Edwards J.L., et al (2018) Pregnancy diagnosis in cattle using pregnancy associated glycoprotein concentration in circulation at day 24 of gestation. *Theriogenology* 106: 178-185.
- Santos J.E.P., Narciso C.D., Rivera F. et al (2010) Effect of reducing the period of follicular dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93: 2976-2988.
- Scully S., Butler S.T., Kelly A.K., et al (2014) Early pregnancy diagnosis on days 18 to 21 post insemination using high resolution imaging in lactating dairy cows. *Journal of dairy Science* 97: 3542-3557.
- Siqueira L.G.B., Areas V.S., Ghetti A.M., et al (2013) Color Doppler flow imaging for the early detection of non -cattle at 20 days after timed artificial insemination *Journal of dairy Science* 96: 6461-6472
- Sogayar M.C., Oliveira Carreira A.C., Almeida Demasi M.A. et al (2017) Process of producing a recombinant equine chorionic gonadotropin, veterinary composition and use thereof. Brevet WO2017/112987A1.
- Szkudlinski M.W. & Weintraub B.D. (2014) Glycoprotein hormone long acting superagonists. Brevet US 2014/0371146A1
- Van Werven T. Waldeck F., Souza A.H., et al (2013) Comparison of two intravaginal progesterone releasing devices (PRID delta and CIDR) in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 138: 143-149.
- Wiltbank M.C., Baez G.M., Cochrane F., et al (2015) Effect of a second treatment with prostaglandin F2D during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 98: 8644-8654
- Yapura M.J., Zwiefelhofer E.M., Pierson R.A. & Adams G.P. (2017) Aromatase inhibitors: a new approach for controlling ovarian function in cattle. *Theriogenology* (in press)
- Yapura M.J., Mapletoft R.J., Pierson R.A. et al (2013) Aromatase inhibitor treatment with an intra vaginal device and its effects on pre-ovulatory ovarian follicles in a bovine model. *Reproductive Biology and endocrinology* 11: 97-104
- Yoshino H., Toji N., Sasaki K., et al (2018) A predictive threshold value for the diagnosis of early pregnancy in cows using interferon stimulated genes in granulocytes. *Theriogenology* 107/ 188-193





## DES APPLICATIONS NOUVELLES POUR L'ÉCHOGRAPHIE DOPPLER EN REPRODUCTION BOVINE ?

*L'échographie est utilisée en reproduction bovine depuis près de 40 ans. C'est une méthode d'imagerie non invasive, indolore, et non traumatique (tant pour l'animal que pour l'opérateur) ; elle peut donc être pratiquée sans protection et répétée autant que souhaité. La mise au point d'appareils portables a rendu son utilisation par les praticiens plus aisée au cours de la dernière décennie.*

*L'échographie est surtout employée pour le diagnostic de gestation par visualisation de la vésicule embryonnaire dans l'utérus. Mais elle est utile également pour évaluer le fonctionnement des ovaires grâce à la caractérisation des organites ovariens (structures folliculaires et lutéales).*

*Au cours des 20 dernières années, sont apparus en médecine vétérinaire des échographes dotés d'une sonde Doppler ; ces appareils, en plus de l'examen échographique habituel, sont capables de mesurer la vitesse du sang dans les vaisseaux et organes. Ils sont essentiellement utilisés pour l'examen cardiaque et l'exploration des organes abdominaux des animaux de compagnie. Chez les bovins, l'échographie Doppler est surtout utilisée à titre expérimental pour l'étude de la reproduction. Mais des applications intéressantes existent aussi pour le praticien dans ce domaine.*

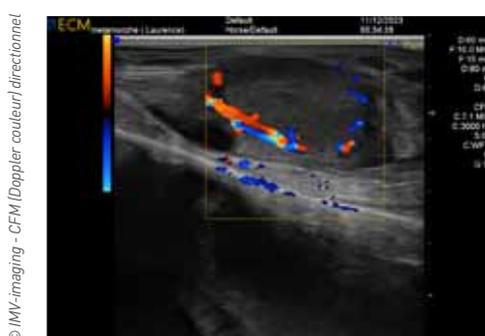
### L'effet Doppler pour mesurer la vitesse du sang

L'effet Doppler, mis en évidence en 1842, est le décalage de fréquence d'une onde (mécanique, acoustique, électromagnétique ou autre) observé entre les mesures à l'émission et à la réception, lorsque la distance entre l'émetteur et le récepteur varie au cours du temps. Cet effet peut donc être utilisé pour mesurer une vitesse.

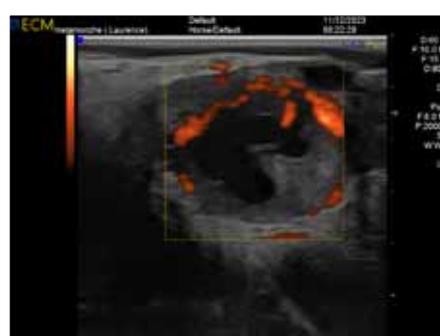
La première application en médecine humaine date de 1958 avec l'utilisation d'un capteur comprenant deux cristaux, l'un émettant et l'autre recevant en continu des ultrasons (**Doppler continu**) pour étudier la circulation sanguine dans les vaisseaux. Lorsque le faisceau d'ultrasons traverse des vaisseaux sanguins, l'écho est renvoyé par les éléments figurés du sang qui deviennent des émetteurs. La sonde Doppler recueille alors un écho dont la fréquence (longueur d'onde) est différente de la fréquence d'émission. Cette différence des fréquences d'émission et de réception permet de calculer la vitesse et la direction des globules rouges. L'inconvénient du Doppler continu réside dans l'absence de discrimination des vaisseaux selon leur profondeur : il n'y a pas de repérage en profondeur, deux structures voisines ne pourront être distinguées.

Apparu ultérieurement, le **Doppler couleur** (aussi appelé Doppler bidimensionnel) a constitué une grande évolution technologique. Il intègre dans le même appareil une imagerie échographique rapide et une détection Doppler pulsée en tous points de l'image. Un encodage couleur du signal Doppler (par convention rouge pour les flux s'approchant de la sonde, bleu pour les flux s'éloignant) permet de distinguer celui-ci du signal échographique. Le Doppler couleur est complété par une analyse spectrale pour le calcul de la vitesse sanguine.

**Photos 1 et 2 : Exemples d'images obtenues en échographie Doppler couleur et en power Doppler**



© IMV-imaging - CFM (Doppler couleur) directionnel.



© IMV-imaging - Power Doppler sur un ovaire



Une autre évolution de la technique est le **Doppler puissance (power mode)**, ou Doppler énergie. Le codage du signal Doppler ne dépend plus des fréquences qui le constituent mais de son amplitude. Il en résulte un signal d'intensité plus élevée, proportionnelle à la puissance de l'écho, qui aboutit à une meilleure visualisation des images de vaisseaux. Par contre, les informations concernant le sens d'écoulement du sang sont perdues.

## Des applications en reproduction bovine

L'échographie Doppler (ou écho-Doppler) est une technique accessible pour les praticiens même si elle nécessite davantage de temps qu'un simple examen échographique et exige une expérience minimale pour l'interprétation des images.



© Dr Pierre-Luc CHARBONNEAU

### a) Suivi du cycle (vaches non gravides)

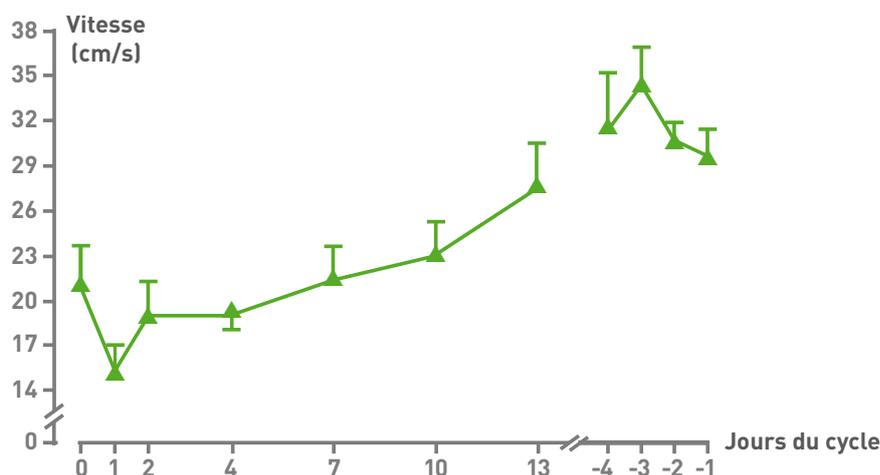
Pour repérer l'artère utérine, BOLLWEIN & al. (2016) conseillent de suivre l'aorte dans sa partie caudale jusqu'à la jonction avec l'artère iliaque interne, puis de suivre cette dernière jusqu'à l'artère utérine qui est un gros vaisseau (diamètre atteignant 5mm chez la vache non gravide).

Pendant le diœstrus, le flux sanguin dans l'artère utérine est stable en début de cycle, mais augmente au cours de la phase folliculaire (ou pro-œstrus, de J17-18 à J21-22) et des chaleurs (figure 1). Ces fluctuations sont cependant trop limitées pour avoir une utilité diagnostique.



Photos 3 et 4 : Utilisation de l'échographe Doppler EXAGO (ECM) par un praticien Vétérinaire

Figure 1 : Variations du flux sanguin utérin au cours du cycle sexuel de la vache (BOLLWEIN & al. 2016)

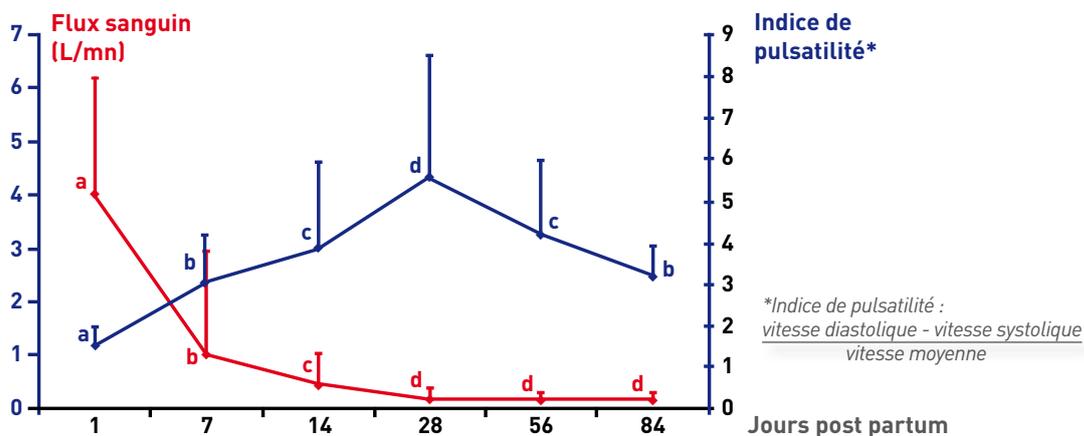




## b) Infections utérines

La perfusion sanguine utérine diminue fortement dans les premiers jours qui suivent le vêlage, parallèlement à la réduction rapide du poids et de la taille de l'utérus. Le flux vasculaire continue ensuite à baisser pour atteindre une valeur basse environ 1 mois postpartum (figure 2).

Figure 2 : Variations du flux sanguin utérin au cours du cycle sexuel de la vache (BOLLWEIN & al. 2016)



(les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes,  $p > 0,05$ )

Chez la vache à postpartum pathologique (rétention placentaire, métrite), le flux sanguin utérin diminue moins vite dans les jours après vêlage en comparaison à des vaches saines. Etant donné l'évidence des signes cliniques associés à ces troubles, le recours à l'écho-Doppler ne présente cependant pas d'intérêt majeur en pratique vétérinaire.

## c) Croissance folliculaire

### Distinction entre follicules sains et follicules atrétiques – Repérage du follicule dominant

Les follicules sains se caractérisent par une vascularisation dynamique alors que les follicules atrétiques ont peu ou pas de vaisseaux fonctionnels. De ce fait, l'échographie Doppler peut permettre de distinguer les deux types de follicules, ce que ne permet pas l'échographie classique.

Les petits follicules visibles à l'échographie (diamètre  $> 2,5\text{mm}$ ) qui présentent un flux sanguin détectable au Doppler avant leur sélection (vers 9-10mm) présentent un plus grand diamètre ultérieur que ceux où aucune circulation n'est visible. De plus, le futur follicule dominant se distingue par une augmentation de circulation 1 à 2 jours avant sa « déviation » (moment où son diamètre devient supérieur à celui des autres follicules de la cohorte). De ce fait, la mesure du flux sanguin folliculaire permettrait, d'après BOLLWEIN & al. (2016), de déterminer précocement le futur follicule dominant. Selon les mêmes auteurs, le nombre de follicules avec une circulation détectable pourrait être utilisé pour prévoir la réponse en superovulation. Dans ces conditions, le dénombrement des follicules antraux (ou la mesure de l'hormone anti-Müllérienne, voir Repromag N° 17) couplé à l'évaluation de leur vascularisation pourrait constituer un examen utile pour identifier le potentiel des vaches à répondre à la stimulation ovarienne.

### Prévision du moment de l'ovulation

Dans les heures précédant l'ovulation, le flux sanguin augmente rapidement et atteint un maximum au moment de l'ovulation (MATSUI & MIYAMOTO, 2009) ; le flux s'accroît à la base du follicule pré-ovulatoire, alors qu'il diminue en zone apicale. Le suivi du flux sanguin folliculaire grâce à l'échographie Doppler peut donc permettre de prévoir la proximité du moment de l'ovulation. SIDDIQUI & al. (2009) indiquent une relation entre l'augmentation de la vascularisation du follicule pré-ovulatoire au moment de l'IA et la réussite à celle-ci.



## d) Fonction lutéale

### Les limites de l'échographie classique pour apprécier la fonction lutéale

Chez la vache, la surface du corps jaune observé à l'échographie classique est un bon indicateur de sa production de progestérone. Mais les variations individuelles importantes empêchent de déduire la progestéronémie et l'âge d'un corps jaune uniquement sur la base de ses dimensions (hormis en début de cycle, entre J4 et J7, période sur laquelle la corrélation est forte). En particulier, en fin de cycle, la taille du corps jaune diminue moins vite que la production de progestérone. L'aspect du corps jaune (son échogénicité) est un meilleur indicateur de la production de progestérone en milieu de cycle : sur cette période, le corps jaune est granuleux, bien défini, avec une ligne de séparation nette avec le stroma ovarien. Mais l'aspect échographique du corps jaune est semblable en début de cycle et en phase de régression lutéale, avec une ligne de contour qui s'estompe et une moindre différence d'échogénicité entre le corps jaune et le reste de l'ovaire.

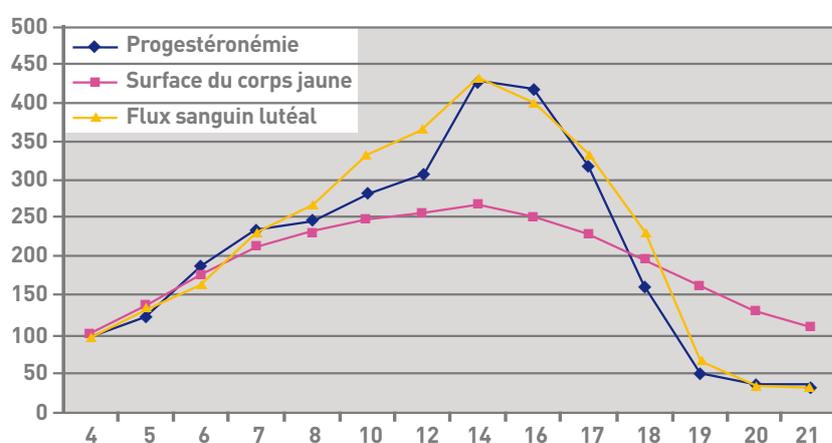
### L'échographie Doppler pour apprécier l'âge des corps jaunes et leur production de progestérone

Le flux sanguin lutéal est étroitement corrélé à la progestéronémie tout au long du cycle sexuel (HERZOG & al. 2010 ; figure 3). De ce fait, l'échographie Doppler peut apporter en temps réel une information plus fiable que l'échographie classique sur l'âge du corps jaune (même si le flux sanguin mesuré vers J7-J8 est voisin de celui à J17-J18 pour un corps jaune cyclique), sans recours au dosage de la progestérone.

En particulier, elle permet de distinguer les corps jaunes fonctionnels en début de cycle (donc présentant un flux sanguin plus important) des corps jaunes qui régressent en fin de cycle. De même, un flux sanguin lutéal faible est incompatible avec une gestation.

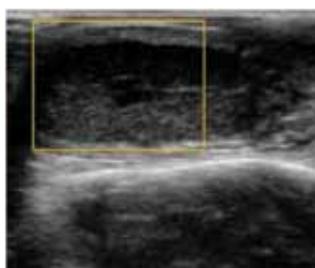
En début de gestation, les faibles progestéronémies sont associées à une moindre fertilité ; de ce fait, MATSUI & MIYAMOTO indiquent dans leur revue bibliographique (2009) que l'estimation de la production de progestérone par échographie Doppler permettrait de sélectionner les vaches receveuses les plus fertiles en transfert d'embryons.

**Figure 3 : Evolution relative (base 100 à J4 pour les 3 paramètres) de la progestéronémie, de la surface du corps jaune et du flux sanguin lutéal chez 10 vaches Holstein cyclées (HERZOG et al. 2010)**

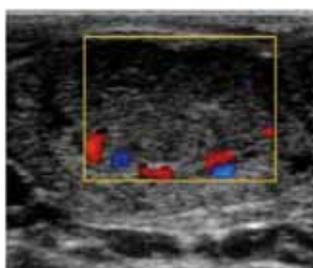


### **Photos 5 à 8 : Catégorisation des corps jaunes grâce à l'échographie Doppler**

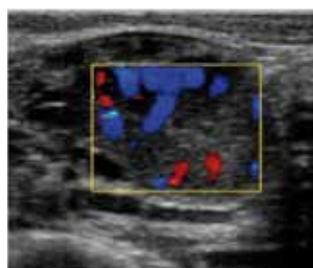
Échographie Doppler d'un corps jaune ayant un score D0 (aucune couleur)



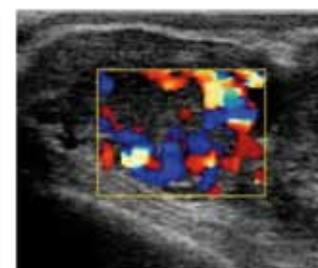
Échographie Doppler d'un corps jaune ayant un score D1 (10 à 39% de la surface est colorée)



Échographie Doppler d'un corps jaune ayant un score D2 (40 à 69% de la surface est colorée)



Échographie Doppler d'un corps jaune ayant un score D3 (>70% de la surface est colorée)





## Vers un diagnostic de gestation très précoce grâce à l'échographie Doppler ?

HERZOG & al. (2011a) ont montré que le flux sanguin lutéal ne chute pas chez la vache gestante au cours de la troisième semaine post AI, à l'inverse de ce qui est observé chez la vache « vide ». Il est significativement plus élevé 15 jours après l'insémination chez les vaches gravides en comparaison aux vaches (déjà) « vides ». Du fait de la diminution de la vascularisation lutéale pendant la régression du corps jaune, le diagnostic (très) précoce de non gestation est donc une autre application envisageable de l'échographie Doppler en reproduction bovine.

### • Diagnostic entre 19 et 21 jours post-insémination

Chez les vaches non gravides, la régression fonctionnelle du corps jaune se manifeste par une réduction significative du flux sanguin à J18 – J19 après ovulation ou insémination. Cette baisse de vascularisation n'est pas observée sur les vaches gravides entre J16 et J23 après l'ovulation. MATSUI & MIYAMOTO (2009) ont indiqué que l'échographie Doppler, en avérant l'absence de diminution du flux sanguin lutéal, améliore le diagnostic précoce de gestation entre J19 et J21 par rapport à l'échographie simple (car la régression morphologique du corps jaune est postérieure à sa régression fonctionnelle). Mais la méthode est considérée comme insuffisamment fiable par manque de spécificité (SIQUEIRA & al. 2013, UTT & al. 2009 ; *tableau 1*) pour déterminer seule entre J17 et J21 les vaches effectivement gestantes.

**Tableau 1 : Performances de l'échographie DOPPLER pour le diagnostic précoce de gestation (par évaluation du flux sanguin du corps jaune de gestation)**

Auteurs	Période d'examen*	Sensibilité	Spécificité	Valeur Prédictive Positive VPP	Valeur Prédictive Négative VPN
UTT & al. 2009	J17	79,7%	43,2%	54,4%	73,3%
UTT & al. 2009	J19	85,5%	54,3%	61,4%	82,9%
UTT & al. 2009	J21	83,3%	61,1%	64,8%	81,5%
SIQUEIRA & al. 2013	J20	99,0%	53,7%	65,1%	98,5%

(\*après la chaleur ou l'insémination)

UTT & al. (2009) précisent que les valeurs médiocres de spécificité obtenues sont liées en partie non pas directement à la technique mais au fait que certaines femelles, encore gravides au moment de l'examen précoce (entre J17 et J21 après la chaleur), vont subir une mortalité embryonnaire tardive (mortalité embryonnaire tardive, entre J26 et J40, pour 12 des 50 femelles suivies dans leur observation).

Dans leur étude, SIQUEIRA & al (2013) ont obtenu moins de 1% de faux négatifs (vaches annoncées « vides » à tort) sur l'ensemble des examens pratiqués aboutissant à d'excellents résultats de détection précoce des femelles non gravides avec une valeur prédictive négative (VPN : probabilité pour une vache donnée « vide » à l'échographie Doppler d'être effectivement non gestante) proche de 100%. Finalement, pour les 2 groupes d'auteurs (UTT & al. 2009, SIQUEIRA & al. 2013), les VPN obtenues à J20-J21, entre 81,5% et 98,5%, sont bien meilleures que les VPP (Valeur Prédictive Positive : probabilité pour que le résultat positif de l'examen Doppler corresponde à une vache effectivement gestante), aux alentours de 65%. Ils en concluent que l'échographie Doppler pratiquée 20-21 jours après l'insémination constitue **une méthode fiable et rapide permettant la détection précoce des vaches non gestantes. L'échographie Doppler à cette période constitue donc une bonne alternative au dosage de progestérone pour le diagnostic des non gestations.**

Au contraire, la valeur prédictive positive de l'échographie Doppler semble insuffisante (65,1% à J21 pour SIQUEIRA & al. 2013, 64,8% à J21 pour UTT & al. 2009) pour que la méthode puisse aujourd'hui être considérée comme un outil fiable de détection précoce des vaches gestantes.

**Ainsi, même si rétrospectivement les différences précoces de vascularisation sont significatives entre les lots de femelles gravides ou non (HERZOG & al. (2011a), au moment de l'examen individuel, il n'est pas possible en pratique d'affirmer qu'une femelle est gestante avec suffisamment de fiabilité.**



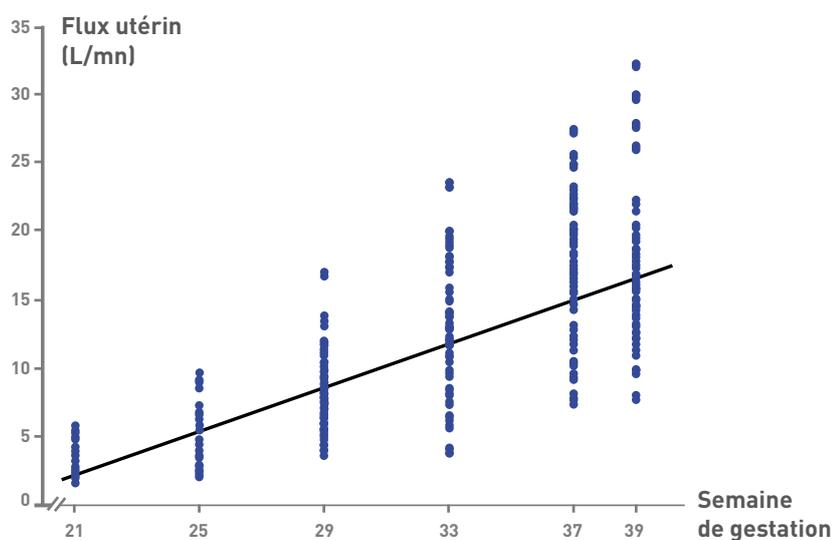
Au Brésil, BARUSELLI & al. (2017) ont proposé la remise à la reproduction précoce des femelles détectées vides à l'échographie DOPPLER afin de réduire l'intervalle entre IA chez celles-ci : resynchronisation dès 14 jours après l'IA à l'aide d'un dispositif progestagène (sans connaître le statut de gestation des animaux), échographie Doppler à J22 et ré-insémination à J24 des vaches détectées vides à l'échographie Doppler (NDR : cette gestion très 'agressive' de la reproduction est liée à la faible fertilité des femelles locales ; des stratégies visant à réduire au maximum les intervalles entre IA sont mises en œuvre pour conserver un IVV acceptable).

#### • Evolution du flux sanguin utérin du milieu de la gestation jusqu'au vêlage

HERZOG & al. (2011b) ont montré que le flux sanguin dans l'artère utérine augmente régulièrement entre les 21<sup>ème</sup> et 39<sup>ème</sup> semaines de gestation, avec une valeur moyenne 5,5 fois plus élevée sur la fin de la période d'observation (figure 4). Mais les variations individuelles sont importantes. De ce fait, l'examen ne peut être utilisé pour 'dater' individuellement une gestation.

Les vaches les plus lourdes présentent les valeurs moyennes de flux sanguin utérin les plus élevées. En semaine 39, une très bonne corrélation a été notée entre le flux utérin et le poids du veau à la naissance ( $r = 0,60$  :  $P < 0,0001$ ).

Figure 4 : Relation entre le stade de gestation et le flux utérin chez 44 vaches Holstein (HERZOG & al. 2011b)



 **CONCLUSION**

En conclusion, même si le développement de l'échographie Doppler sera freiné par le surcoût de l'équipement (environ 2000-2500€) et la technicité d'utilisation nécessitant une période d'apprentissage, il est probable que le recours à cette technique va se répandre en Europe, comme c'est le cas aujourd'hui aux Etats-Unis et au Canada. Dans ces pays, l'échographie Doppler est principalement utilisée pour le diagnostic très précoce de (non) gestation.

**Remerciements**

Merci à Cyril GONZALEZ (IMV-imaging) et au Dr Pierre-Luc CHARBONNEAU (vétérinaire praticien à Richmond, Québec) pour la fourniture des images échographiques Doppler.

Merci au Pr Sylvie CHASTANT-MAILLARD (ENVT) et à Marc-Antoine DRIANCOURT (Astek Consult) pour leurs relectures, suggestions et corrections.





## Références bibliographiques

- BOLLWEIN & al. *Vet Clin Food Anim* 2016, 32 : 149-164  
RUEL. *Le Point Vétérinaire* 2013, 340 : 18-23  
HERZOG & al. *Theriogenology* 2010, 73 : 691-697  
HERZOG & al. *Theriogenology* 2011a, 75 : 549-554  
HERZOG & al. *Theriogenology* 2011b, 75 : 1688-1694  
MATSUI & MIYAMOTO. *Vet J* 2009, 181 : 232-240  
UTT & al. *Theriogenology* 2009, 71 : 707-715  
SIQUEIRA & al. *JDS* 2013, 96 : 6461-6472  
BARUSELLI & al. 31st Annual Meeting of the Brazilian Embry Technology Society (SBTE). *Proceedings* : 558-571  
GRATALOUP-ORIEZ & CHARPENTIER. *Encyclopédie médico-chirurgicale 35-003-C-10* (Elsevier, Paris) 1999 : 1-10  
GRENIER & CLAUDON : [http://naxos.biomedicale.univ-paris5.fr/diue/wp-content/uploads/2013/05/polyBasesPhysiques\\_07.pdf](http://naxos.biomedicale.univ-paris5.fr/diue/wp-content/uploads/2013/05/polyBasesPhysiques_07.pdf) (13 p.)  
HANZEN : <https://orbi.uliege.be/handle/2268/220204> (publié le 10 février 2018)  
Wikipédia : [https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89chographie\\_Doppler](https://fr.wikipedia.org/wiki/%C3%89chographie_Doppler)  
SIDDIQUI & al. *Anim Reprod Sci* 2009, 113 : 287-292





## QUELLE VALEUR POUR UNE NOUVELLE GESTATION ? QUEL COÛT POUR UN AVORTEMENT ?

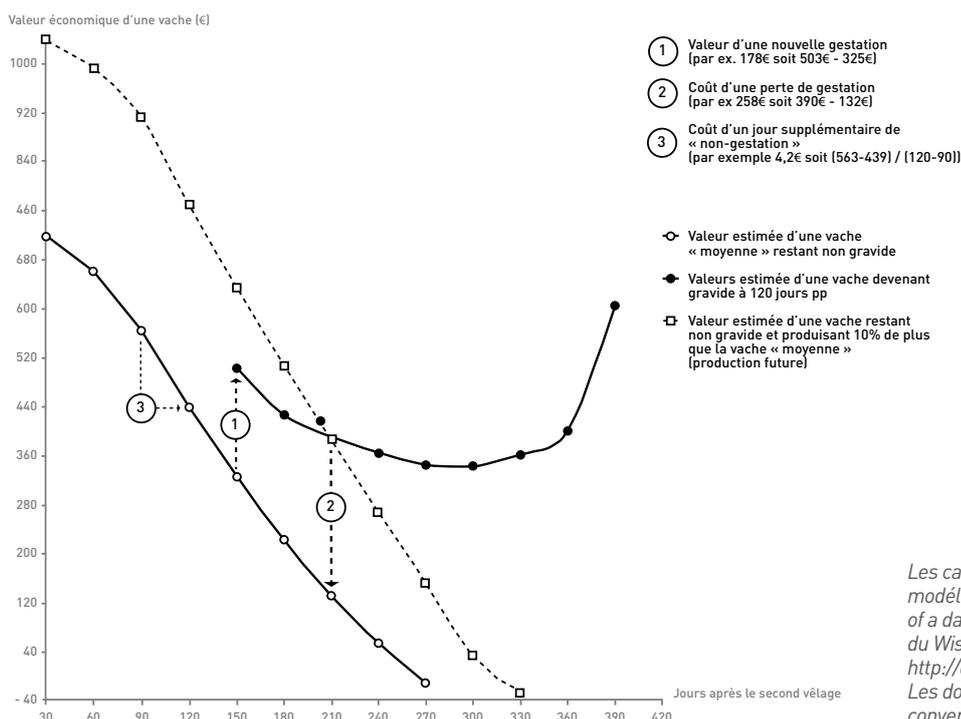
La rentabilité des fermes laitières dépend pour une part importante de leurs performances de reproduction. Plusieurs études ont montré que les jours additionnels nécessaires pour obtenir un début de gestation, par rapport à un délai optimum postpartum, font perdre de l'argent à l'éleveur. Ces pertes sont d'autant plus élevées que le retard pour obtenir une fécondation est important. La valeur d'une nouvelle gestation dépend donc d'abord du stade de lactation. Mais d'autres paramètres peuvent aussi l'influencer, tels que le numéro de lactation, la production de lait, la persistance laitière, le prix du lait, la stratégie de renouvellement du troupeau laitier, ...

### Comment calculer la valeur d'une nouvelle gestation ou d'une perte de gestation ?

Pour calculer le prix d'une nouvelle gestation ou le coût d'une perte de gestation, 2 approches ont été utilisées dans les études américaines publiées. La première consiste à calculer la différence entre les bénéfices financiers (revenus - coûts) générés par la vache selon son statut de gestation (DE VRIES 2006). Les revenus sont issus de la vente du lait produit et des veaux ; les coûts correspondent à l'aliment, les frais de mise à la reproduction, le coût de remplacement des vaches par une génisse, ...

Une autre méthode consiste à comparer la valeur de la vache, gravide ou non, à une date donnée (CABRERA 2014 ; *graphe 1*). Pour calculer cette valeur, l'auteur a utilisé l'outil de modélisation économique « The economic Value of a Dairy Cow » de l'Université du Wisconsin Madison, disponible en ligne : <http://dairymgt.uwex.edu/tools.php>. La valeur d'une nouvelle gestation était calculée à 150 jours postpartum sur une vache « moyenne » fécondée 30 jours auparavant.

**Grappe 1 : Valeur estimée d'une vache laitière selon son statut de gestation et sa production (d'après CABRERA 2014)**



Les calculs sont réalisés à l'aide de l'outil de modélisation économique "Economic value of a dairy cow" développé par l'Université du Wisconsin (disponible à l'adresse <http://dairymgt.info/tools.php>). Les dollars ont été convertis en euros avec la conversion 1 USD = 0,8€



Les résultats des différentes études sont voisins, avec **une valeur moyenne d'environ 200€ pour une nouvelle gestation**.

**Tableau 1 : Valeur moyenne d'une nouvelle gestation (aux Etats-Unis)**

Auteurs	Année	Valeur*(€)
EICKER & FETROW	2003	160
STEVENSON	2001	202 - 219
DE VRIES	2006	222
CABRERA	2014	178

*\*données en USD converties en € (en prenant 1 USD = 0,8 €)*

Dans la modélisation de CABRERA (2014), la valeur d'une nouvelle gestation augmente significativement avec la productivité de la vache : elle passe de 178€ pour une vache « moyenne » à 365€ pour une vache produisant 10% de plus. Chez une vache non gestante entre 90 et 120 jours pp, la baisse de valeur de l'animal fait apparaître une perte moyenne de 4,2€ par jour supplémentaire pour obtenir la fécondation (4,8€ si la vache produit 10% de plus que la moyenne).

Selon le même modèle, chez une vache fécondée à 120 jours postpartum, l'avortement précoce au bout de 90 jours (donc à 210 jours pp) coûte 258€ pour une vache « moyenne » (393€ chez une vache avec un niveau de production 10% supérieur).

### Variations de la valeur d'une nouvelle gestation et du coût d'une perte de gestation

En utilisant une modélisation bio-économique, De VRIES (2006) a testé l'influence de plusieurs paramètres sur la valeur d'une nouvelle gestation : délai entre vêlage et fécondation, rendement laitier et parité. Le tableau 2 présente quelques valeurs utilisées dans le cadre de cette modélisation.





**Tableau 2 : Quelques critères utilisés dans le modèle développé par De VRIES (2006)**

<b>Rendement laitier</b>	
- en 1 <sup>ère</sup> lactation	83,3% de la production 3 <sup>ème</sup> lactation et +
- en 2 <sup>ème</sup> lactation	90,9% de la production 3 <sup>ème</sup> lactation et +
<b>Reproduction</b>	
Taux de soumission à l'IA*	40%
Réussite à l'IA**	40%
Taux de gestation***	16%
Baisse du taux de réussite à l'IA après 61 jours pp	2,6% par mois
Probabilité d'avortement	3,5% au 2 <sup>ème</sup> mois de gestation 2,5% au 3 <sup>ème</sup> mois de gestation 1,5% au 4 <sup>ème</sup> mois de gestation 0,5 % au 5 <sup>ème</sup> mois de gestation 0,25 % au 6 <sup>ème</sup> mois de gestation 0,1 % au 7 <sup>ème</sup> et 8 <sup>ème</sup> mois de gestation
<b>Prix****</b>	
Lait	248€ / 1000kg
Génisse de remplacement	1 280 €
Veau	160 €

\* Probabilité pour une vache cyclée d'être inséminée sur un cycle de 21 jours

\*\* Calculée à 61 jours pp

\*\*\* Taux de gestation calculé 61 jours pp (Taux de soumission X Réussite à l'IA)

\*\*\*\* (sur la base 1 dollar = 0,8 euro)

Les paramètres utilisés dans le modèle bio-économique (tableau 2) permettent de définir les caractéristiques technico-économiques d'un troupeau « moyen » (tableau 3). Dans celui-ci, les ventes de lait représentent 91% des produits (le reste correspondant aux ventes de veaux et réformes). Les frais d'alimentation représentent 45% des coûts totaux.

**Tableau 3 : Caractéristiques du troupeau défini sur la base du modèle bio-économique par DE VRIES (2006)**

<b>Revenus totaux / vache par an (€*)</b>	<b>3105</b>
Vente de lait	2835
Vente de vache	103
Vente de veau	167
<b>Coûts totaux / vache par an (€)</b>	<b>2822</b>
Coûts d'alimentation	1258
Coût d'achat de génisses	482
Coûts de mise à la reproduction	26
Autres coûts	1056
<b>Profit / vache par an (€)</b>	<b>283</b>
Production / vache par an	11431 litres
Stade de lactation moyen	223 jours
Intervalle vêlage-IA fécondante	137 jours
Taux de gestation**	15%
Réforme	36%
Valeur d'une nouvelle gestation (€)	222
Coût d'une perte de gestation (€)	444

\*Sur la base 1 dollar = 0,8 euro,

\*\*Taux de soumission x Réussite à l'IA



### • Valeur d'une nouvelle gestation

Sur la base du modèle développé, il apparait que (voir tableau 4 et graphe 2) :

- la valeur de la gestation **augmente avec le rendement laitier** (à l'exception des primipares « remplissant » précocement à 61 jours pp)
- la valeur d'une nouvelle gestation est minimale en début et en fin de lactation
- la valeur maximale d'une nouvelle gestation est obtenue plus tardivement en lactation chez les fortes productrices.
- La valeur d'une nouvelle gestation est nulle pour certaines femelles, ce qui signifie qu'il est préférable de les réformer. Ceci concerne les primipares faibles productrices vides au-delà de 300 jours ; pour les vaches en 2<sup>ème</sup> lactation, il s'agit des faibles productrices au-delà de 210 jours pp ainsi que les moyennes productrices au-delà de 330 jours pp.

A noter que chez les primipares fortes productrices, la valeur d'une nouvelle gestation est négative lorsque celle-ci est obtenue précocement, dès 61 jours postpartum ; cela signifie que sur ce type de femelles, l'optimum économique est observé en différant la mise à la reproduction.

**Tableau 4 : Valeur de conservation d'une vache selon son statut de gestation et valeur d'une nouvelle gestation selon le numéro de lactation, le délai de fécondation et la production laitière (DE VRIES 2006)**

N° de lactation	Intervalle (j.) Vêlage - fécondation	Production laitière (%) <sup>1</sup>	Valeur (€) de conservation <sup>2</sup> Vache gestante	Valeur (€) de conservation <sup>2</sup> Vache 'vide'	Valeur (€) d'une nouvelle gestation
1	61	80	315	219	<b>96</b>
1	61	100	812	747	<b>65</b>
1	61	120	1322	1333	<b>-11</b>
1	243	80	117	(-6)	<b>117</b>
1	243	100	570	239	<b>331</b>
1	243	120	1054	654	<b>400</b>
2	61	80	343	206	<b>137</b>
2	61	100	828	649	<b>179</b>
2	61	120	1327	1161	<b>166</b>
2	243	80	-34	-34	<b>0</b>
2	243	100	243	18	<b>225</b>
2	243	120	639	198	<b>441</b>

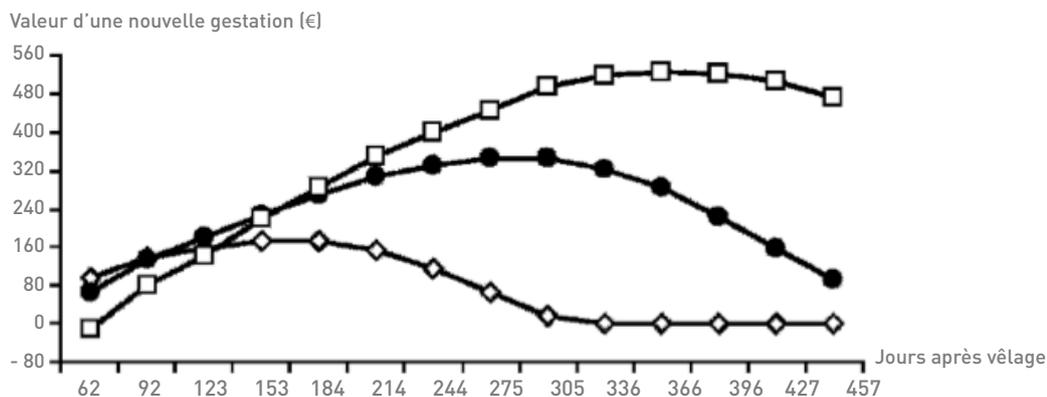
<sup>1</sup> En comparaison à une production moyenne (100%)

<sup>2</sup> Calculée en comparant les revenus générés par sa conservation ou sa réforme  
Conversion utilisée : 1 dollar = 0,8€

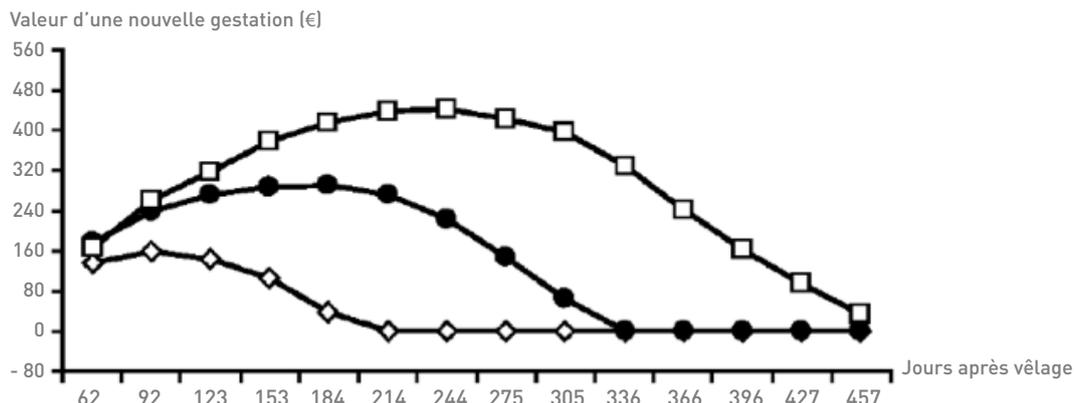


**Graph 2 : Valeur estimée d'une nouvelle gestation selon le niveau de production (◇ : 80%, ● : 100%, □ : 120% du rendement laitier de référence) en 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> lactation (DE VRIES 2006)**

### Primipares



### 2<sup>ème</sup> lactation



#### • Coût d'une perte de gestation

Le coût d'une perte de gestation est toujours plus élevé que la valeur d'une nouvelle gestation, sauf dans les rares cas où la vache gestante mériterait d'un point de vue économique d'être réformée (cas des multipares peu productives débutant une nouvelle gestation tardivement après le vêlage précédent, pour lesquelles la valeur d'une nouvelle gestation est négative). Il est en moyenne double (444 €) de celui de la valeur d'une nouvelle gestation (222€).

De façon générale, **le coût d'une perte de gestation augmente avec l'avancement de la gestation** (tableau 5). A l'exception des vaches les plus faibles productrices, **le coût de perte de la gestation augmente aussi avec le délai postpartum d'acquisition de la gestation concernée par la perte** (la perte d'une gestation amorcée 243 jours après le vêlage précédent est plus coûteuse que celle d'une gestation débutée dès 61 jours après le vêlage).

Chez les plus fortes productrices, le coût de la perte de gestation est plus élevé lorsque le délai d'acquisition de la gestation est important. Lorsque la conception est obtenue précocement après vêlage, le niveau de production joue peu sur le coût de la perte de gestation, sauf dans les cas où cette perte a lieu à un stade avancé (7 mois) de la gestation.



**Tableau 5 : Coût d'une perte de gestation selon l'avancement de la gestation, le numéro de lactation, la production laitière et le délai entre vêlage et fécondation (DE VRIES 2006)**

Production laitière <sup>1</sup> (%)	N° de lactation	Intervalle Vêlage - fécondation 61 jours			Intervalle Vêlage - fécondation 243 jours		
		Mois de gestation			Mois de gestation		
		1	4	7	1	4	7
80	1	122	225	334	128	236	461
80	2	166	226	331	0 <sup>2</sup>	95	452
80	3	184	222	323	0 <sup>2</sup>	0 <sup>2</sup>	313
100	1	88	223	462	391	591	770
100	2	228	420	605	248	414	746
100	3	269	450	581	97	238	569
120	1	-2	109	392	479	794	1098
120	2	218	463	787	519	750	1059
120	3	289	555	818	390	535	844

<sup>1</sup> En comparaison à une production moyenne (100%) - Conversion utilisée : 1 dollar = 0,8€

<sup>2</sup> Lorsque la vache gestante devrait être réformée d'un point de vue économique, le coût de la perte de gestation est pris égal à 0

## Conséquences pratiques et conclusion

Ces résultats sont issus de modélisations réalisées en intégrant des valeurs représentatives d'un troupeau Holstein américain (tableau 2). Il serait intéressant de reproduire le même type d'étude sur la base de données françaises ou européennes (et avec des prix variables payés pour le lait).

L'évaluation de la valeur d'une nouvelle gestation et du coût d'une perte de gestation est importante pour la prise de décision concernant la mise à la reproduction. En particulier, elle permet d'affiner les stratégies d'insémination et de mise en place de programmes de prévention de la mortalité embryonnaire ou fœtale :

- Le coût d'un jour supplémentaire pour obtenir un début de gestation est élevé (4 à 5€), notamment chez les vaches les plus fortes productrices. De ce fait, il est intéressant économiquement d'augmenter les opportunités d'inséminer, particulièrement chez les femelles à plus forte productivité (optimisation de la détection des chaleurs, protocole de synchronisation de l'œstrus).
- Le coût d'une perte de gestation étant élevé, d'autant plus que la gestation est avancée, les stratégies permettant de réduire les risques de mortalité embryonnaire ou d'avortement sont le plus souvent rentables.
- Contrairement aux pratiques qui se développent sur le terrain, la mise à la reproduction (très) précoce ne constituerait pas nécessairement la stratégie la plus intéressante d'un point de vue économique chez les plus fortes productrices.

Au-delà de la seule valeur d'une gestation ou de sa perte, des logiciels d'aide à la décision de réforme sont déjà en développement avancé et seront proposés aux éleveurs. Ils intègrent non seulement la fertilité et la fécondité antérieure des animaux mais également le nombre d'épisodes de maladies (mammite, boiterie, ...), le niveau de production, le numéro de lactation.

DE VRIES. *JDS* 2006, 89 : 3876-3885

CABRERA. *Animal* 2014, 8 (suppl. 1) : 211-221

EICKER & FETROW. *Proceedings of the Kentucky Dairy Conference, Cave City* 2003 : 33-46

STEVENSON. *JDS* 2001, 84 (E supplement) : 128-143



ENSEMBLE,  
**CRÉONS**  
DE LA FERTILITÉ

