Critères de choix d'une receveuse pour un transfert d'embryon



Professeur honoraire Christian Hanzen Université de Liège Consultant RumeXperts

https://www.facebook.com/Theriogenologie/

https://www.facebook.com/RumeXperts

Pierre de Bresse et Bourg en Bresse 27 /28 avril 2022 Organisée par la société Elexinn (Agathe Decherf) 2 x 15 techniciens inséminateurs/trices et responsables de transfert d'embryons

De quoi allons-nous parler?

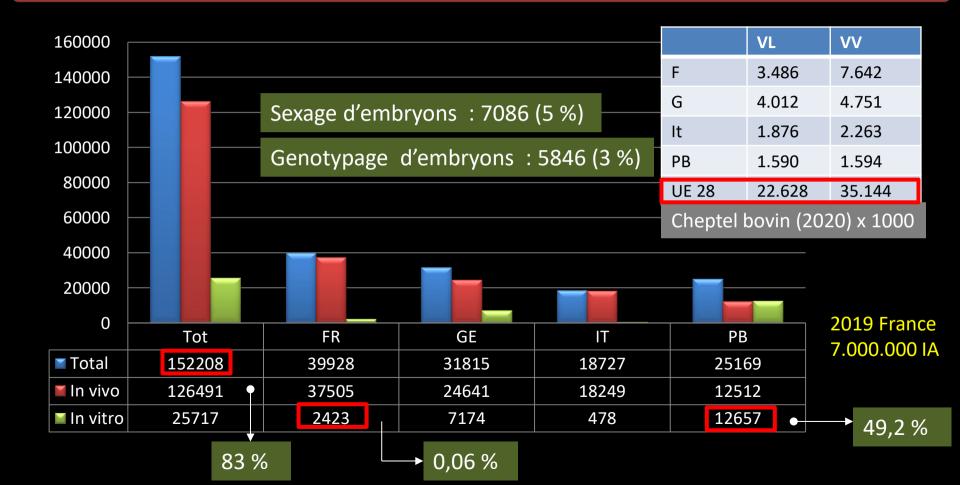
- 1. Un état des lieux sur l'utilisation des biotechnologies de l'embryon
- 2. Le corps jaune, d'où vient-il?, à quoi sert-il?
- 3. Comment identifier les corps jaunes manuellement ?
- 4. L'embryon et la période embryonnaire, de quoi parle-t-on?
- 5. Quels dialogues entre l'utérus et l'embryon pour une implantation réussie?
- 6. Quels sont les facteurs de réussite d'un transfert d'embryon?
- 7. Quels traitements possibles pour réussir un transfert d'embryon?
- 8. Comment identifier par échographie un corps jaune de qualité?
- 9. L'écho-Doppler : principes de base et applications possibles en reproduction bovine.

Ce que vous devriez connaître et comprendre à la fin de l'exposé

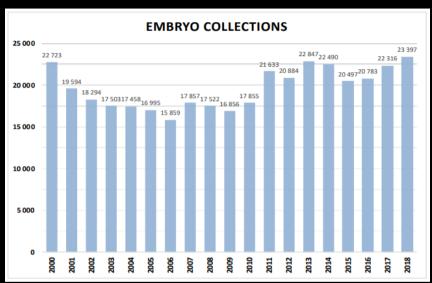
- 1. 94 % des embryons sont produits in vivo
- 2. 84 % des embryons produits concernent les races laitières
- 3. 6 embryons sont en moyenne récoltés
- 4. 66 % des embryons récoltés sont transférables
- 5. Il ne peut y avoir de bon corps jaune sans un bon follicule
- 6. Un transfert correspond à la présence d'un follicule dominant
- 7. Un « bon » CJ a un diamètre > 20 mm
- 8. Le corps jaune cavitaire n'est pas pathologique
- 9. Le kyste folliculaire ou lutéinisé a un diamètre > 25 mm
- 10. Il ne faut pas confondre embryon et fœtus
- 11. Il ne faut pas confondre mortalité embryonnaire et avortement
- 12. En 20 jours, la longueur de « l'embryon » est multipliée par 1.300 (0,15 mm à 20 cm)
- 13. Progestérone, trophoblastine et PAG sont les acteurs essentiels du dialogue entre l'embryon et l'utérus
- 14. On se trompe une fois sur 4 quand il s'agit de confirmer manuellement la présence ou l'absence de corps jaune
- 15. L'échographe est un outil indispensable pour sélectionner une receveuse
- 16. L'écho-Doppler est un outil de mesure de la vascularisation d'un follicule corps jaune ou utérus
- 17. La synthèse de progestérone est proportionnelle au degré de vascularisation du corps jaune.
- 18. Au moment du transfert (J7) l'analyse du flux sanguin du CJ permet de pronostiquer une gestation.
- 19. Au 21^{ème} jour de gestation, l'écho-Doppler permet plus d'identifier les animaux non-gestants que gestants.
- 20. Le recours à l'écho-Doppler requiert une réelle expertise

Un état des lieux sur l'utilisation des biotechnologies de l'embryon

Production in vivo et in vitro d'embryons transférables en Europe (Data AETE 2020)

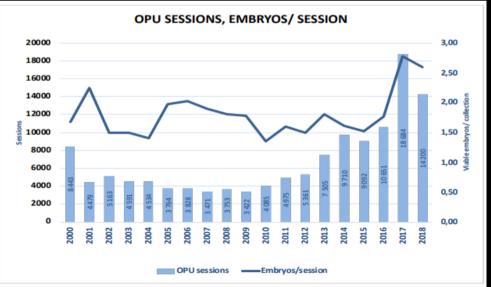


Evolution du nombre de récoltes et d'OPU en Europe (Data AETE 2018)

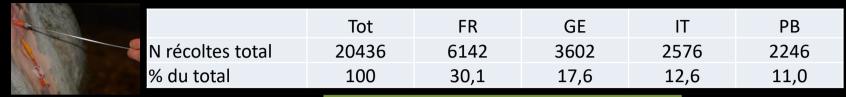


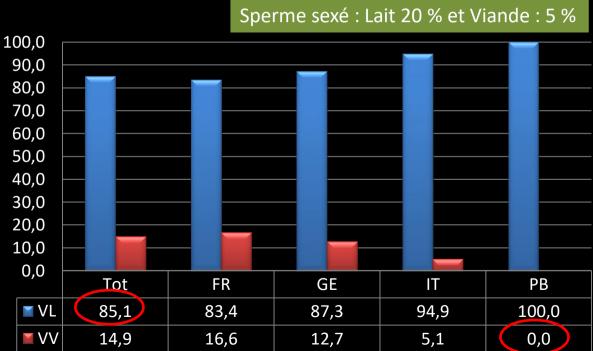






Distribution (%) des récoltes d'embryons en Europe par spéculation (Data AETE 2020)

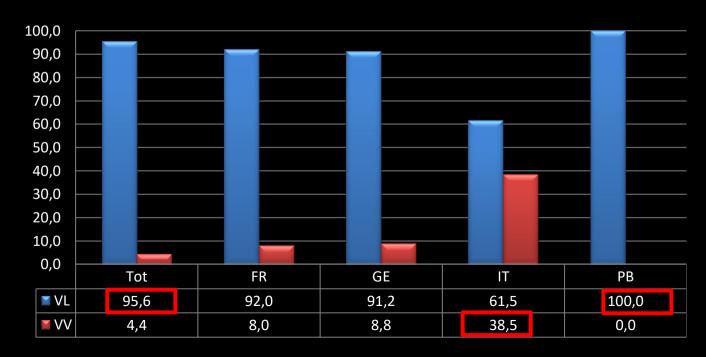




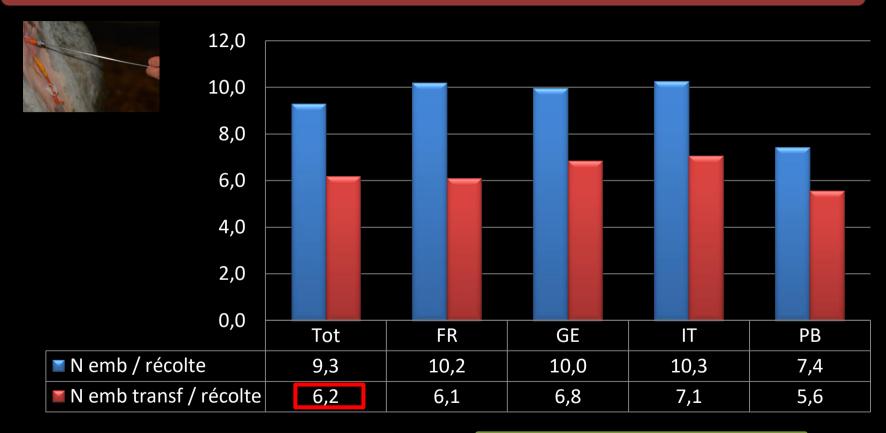
Distribution (%) des sessions d'OPU en Europe par spéculation (Data AETE 2020)



	Tot	FR	GE	IT	PB
N total OPU	9990	788	2495	182	5495
%	100	7,9	25,0	1,8	55,0



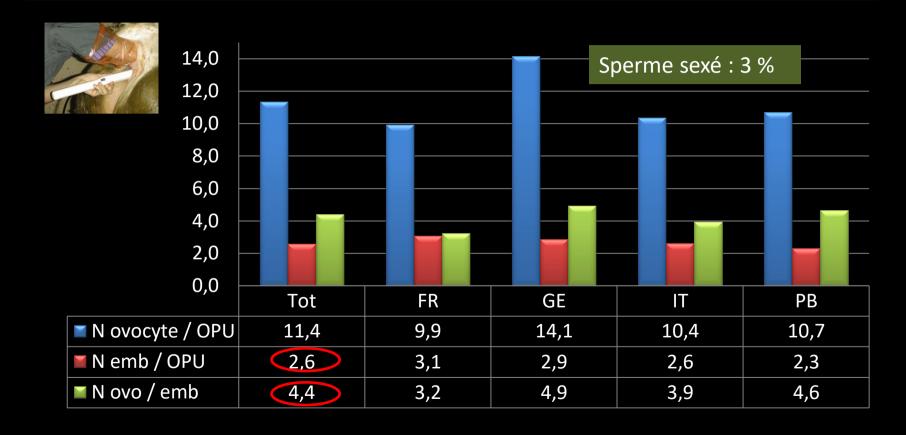
Production moyenne d'embryons par récolte en Europe (Data AETE 2020)



66 % d'emb transférables

Lait : 6,1 et Viande : 6,6

Production moyenne d'ovocytes et d'embryons par OPU en Europe (Data AETE 2020)



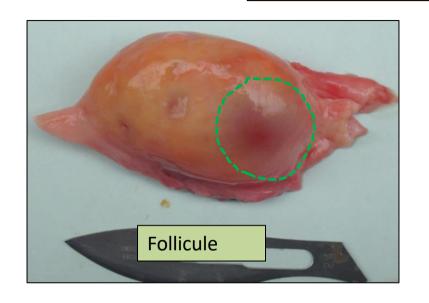
Que devriez-vous retenir?

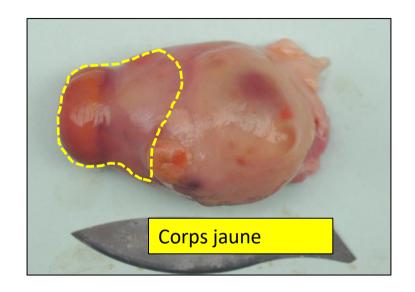
En France

- 1. 94 % des embryons sont produits in vivo
- 2. 84 % des embryons produits concernent les races laitières
- 3. 6 embryons sont en moyenne récoltés
- 4. 66 % des embryons récoltés sont transférables

Le corps jaune, d'où vient-il ?, à quoi sert-il ? comment l'identifier manuellement ?

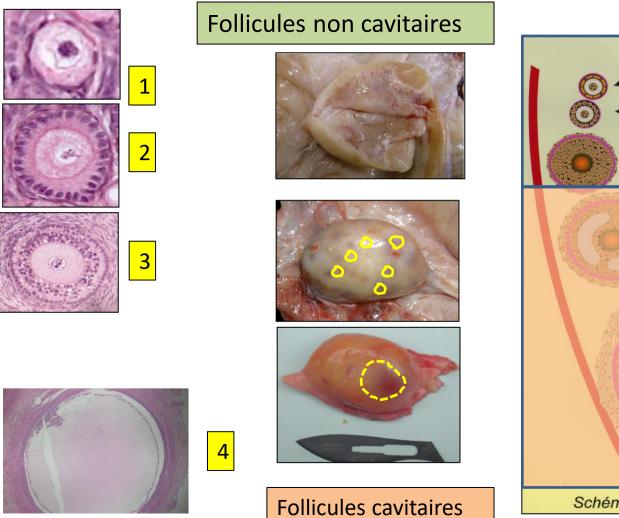
L'ovaire : deux types de structures

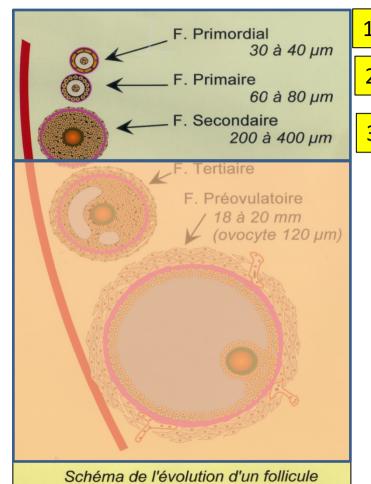




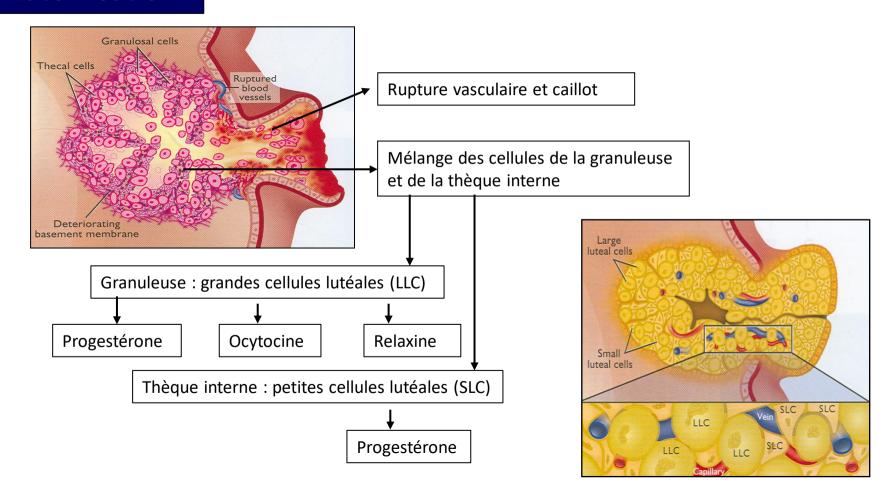
- Non cavitaires : < 2 mm
- Cavitaires : 2 to 25 mm
- Contient l'ovocyte
- Hormone : oestradiol

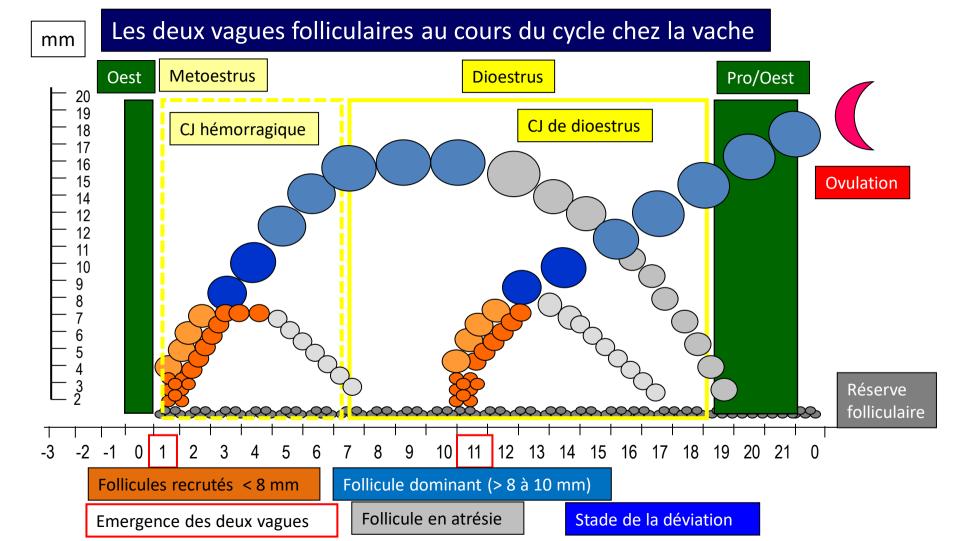
- Hémorragique
- De dioestrus
- Atrétique
- Cavitaire
- Hormone: progesterone





Lutéinisation





Que devriez-vous retenir?

- 1. Il ne peut y avoir de bon corps jaune sans un bon follicule
- 2. Un transfert correspond à la présence d'un follicule dominant

Comment identifier les corps jaunes manuellement ?

Il ne saurait y avoir de bonne palpation sans bonne préhension





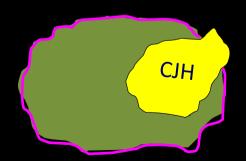
Le corps jaune hémorragique

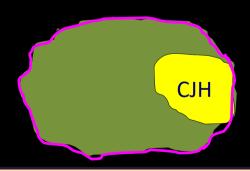


= structure de consistance molle de diamètre inférieur à 2 cm (palpable si > 5 mm) présentant ou non une papille



- Intra et extraovarien ou intraovarien
- Metoestrus (6J)
- Non réceptif à la PGF2a

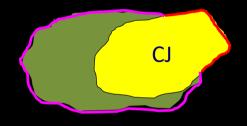




Le corps jaune de dioestrus

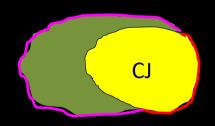
- CJ de dioestrus (>=2 cm)
- Sensible à la PGF2a
- Extraovarien ou intraovarien
- Zone lisse et ferme
- Bouchon de champagne ou pas















Les corps jaunes de dioestrus

= signe d'ovulations multiples et donc de gémellité possible

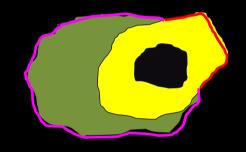




Le corps jaune cavitaire

= structure à surface lisse et de consistance ferme (hépatique), de diamètre compris entre 2 et 3 cm, présentant dans 60 % des cas une cavité de diamètre variable. La présence de cette cavité donne au CJ une consistance plus molle.

Cette structure appelée à tort corps jaune kystique n'a pas de signification pathologique.





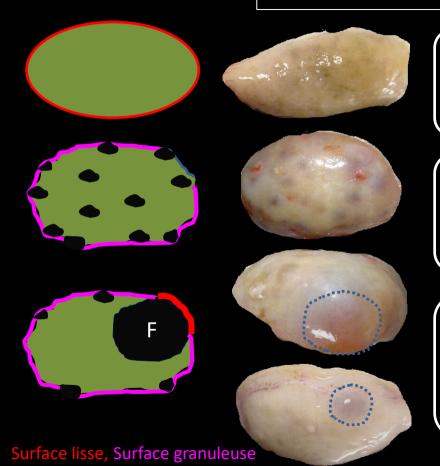




- CJ cavitaire intra ou intraovarien
- Vache cyclée ou gestante
- Cavité moins régulière que celle du kyste folliculaire lutéinisé
- Présence de bandes de fibrine (plus échogènes)
- Cavité de 2 à 22 mm de diamètre (35 % > 10 mm, 52 % : 6 à 10 mm et 13 % : 2 à 5 mm)
- Constat échographique

Les follicules

Structure lisse et dépressible de diamètre compris entre 1 et 2,5 cm. Les follicules de diamètre < 1 cm sont peu palpables

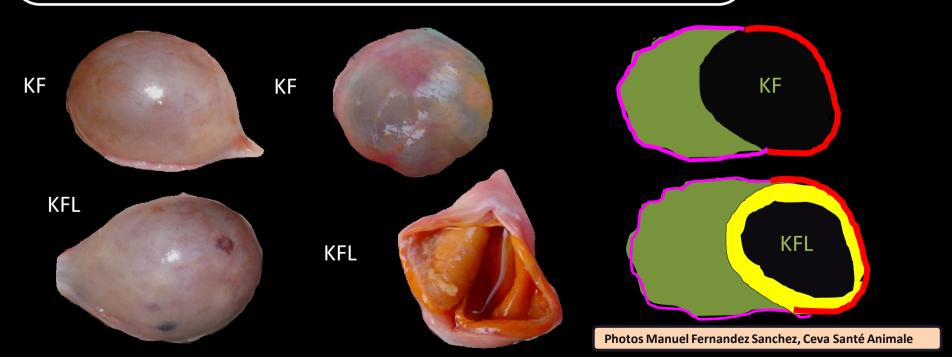


- Ovaires petits et lisses
- Absence de recrutement/croissance folliculaire
- Etat d'anoestrus de type 1 si bilatéral
- Ovaires granuleux
- Absence de croissance folliculaire jusqu'au stade de dominance
- Etat d'anoestrus de type 1 si bilatéral
- Croissance jusqu'au stade de dominance mais pas d'ovulation
- Follicule palpable (> 1 cm)
- Etat d'anoestrus de type 2 si ovaire contralatéral granuleux ou lisse

= Structures ovariennes lisses, de diamètre ≥ 25 mm plus (kyste folliculaire : KF) ou moins (kyste folliculaire lutéinisé : KFL) dépressible.

- Ces structures traduisent une absence d'ovulation.
- KF: diamètre de 31 à 33 mm et paroi < 3 mm (Hanzen et Bascon 2007)
- KFL: diamètre 35 à 39 mm et cavité de 24 à 49 mm et paroi de 3 à 9 mm
- Diagnostic différentiel par échographie

Les kystes ovariens



Que devriez-vous retenir?

- 1. Un « bon » CJ a un diamètre > 20 mm
- 2. Le corps jaune cavitaire n'est pas pathologique
- 3. Le kyste folliculaire ou lutéinisé a un diamètre > 25 mm

L'embryon et la période embryonnaire de quoi parle-t-on ?

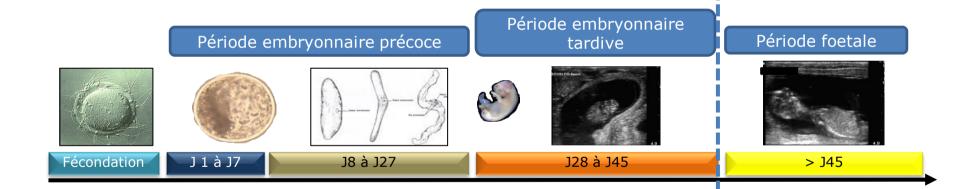
Définir l'embryon

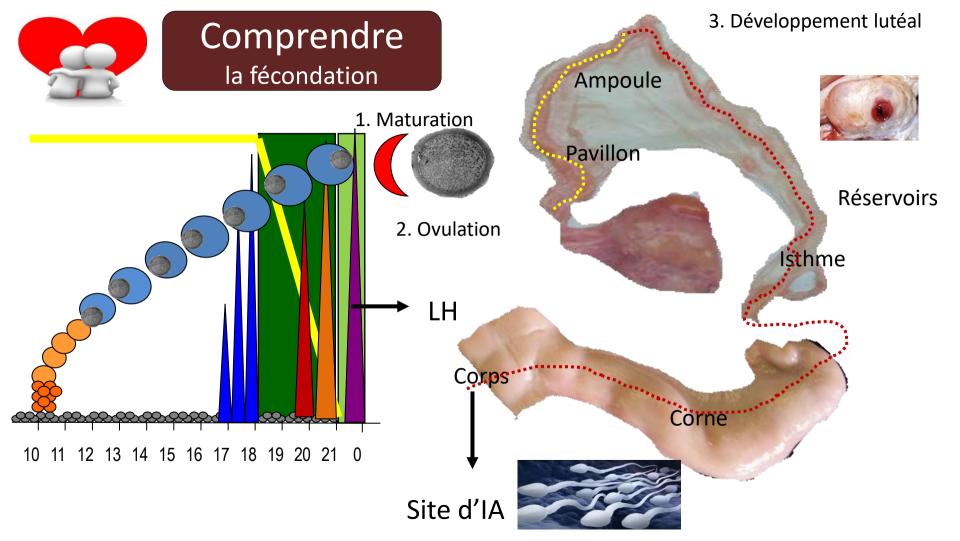
C'est quoi un embryon?

Un embryon est le produit de la fécondation d'un ovocyte par un spermatozoïde : il change de nom au cours de son développement

Définir

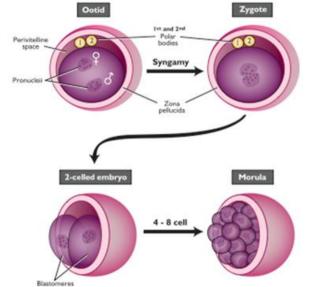
la période embryonnaire





Définir l'embryon

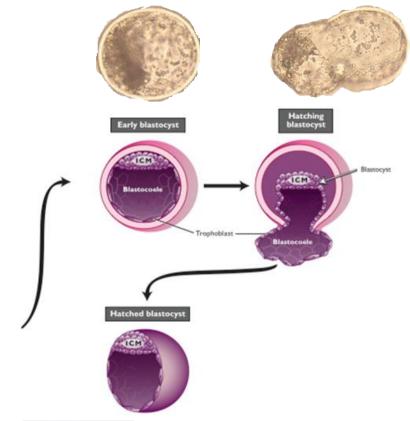












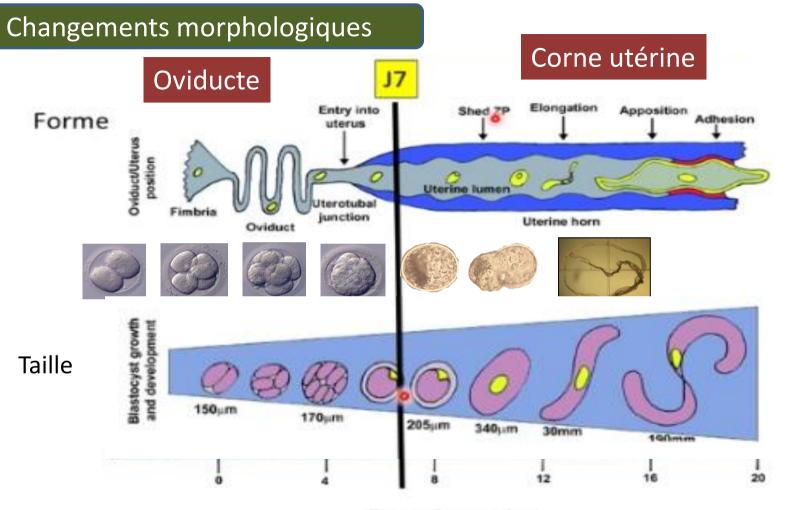


http://www.embryology.ch/
 (University of Lausanne)
 Senger Pathways to pregnancy and parturition 2005

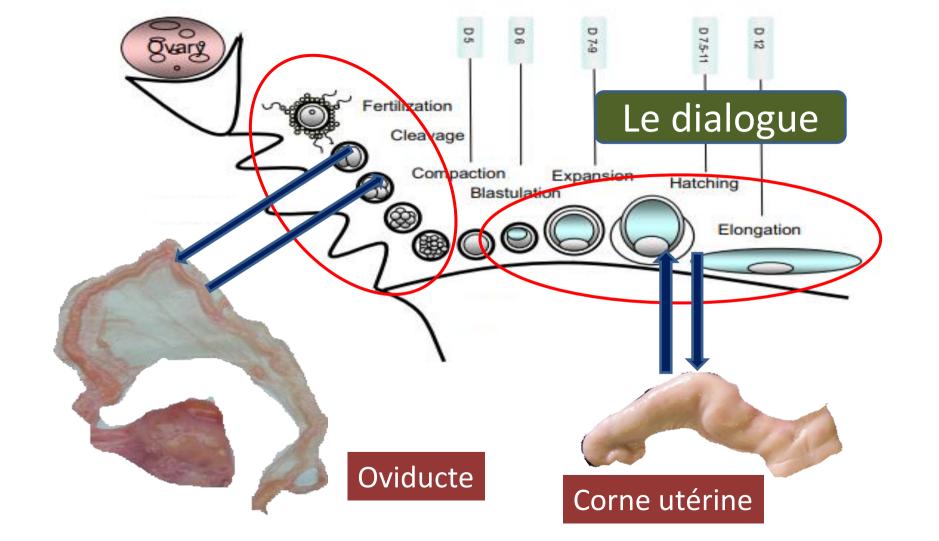
Que devriez-vous retenir?

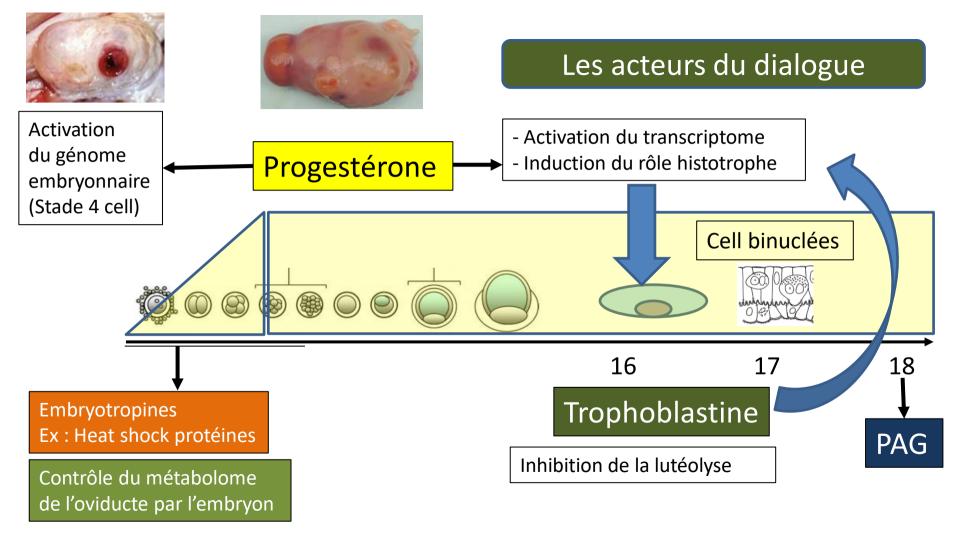
- 1. Il ne faut pas confondre embryon et fœtus
- 2. Il ne faut pas confondre mortalité embryonnaire et avortement

Quels dialogues entre l'utérus et l'embryon pour une implantation réussie ?



Days after mating

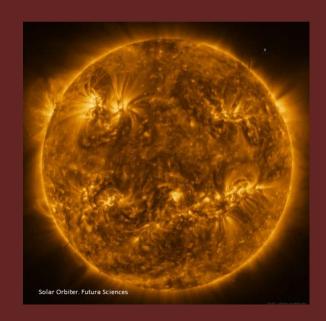




Que devriez-vous retenir?

- 1. En 20 jours, la longueur de « l'embryon » est multipliée par 1.300 (0,15 mm à 20 cm)
- Progestérone, trophoblastine et PAG sont les acteurs essentiels du dialogue entre l'embryon et l'utérus

Comment identifier par échographie un corps jaune de qualité ?



Le corps jaune de dioestrus



Ovaire non incisé



Ovaire et CJ incisé

Degré d'exactitude du diagnostic du corps jaune

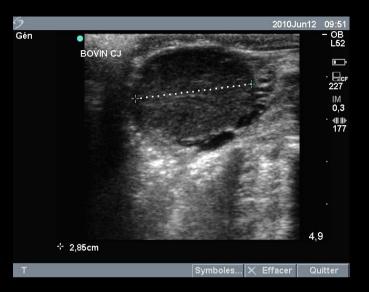
- Palpation manuelle / progestérone
 - Valeur prédictive + (présence) : 79 %
 - Valeur prédictive (absence) : 75 %
- Echographie / dissection des ovaires
 - Valeur prédictive + (présence) : 81 à 100 %
 - Valeur prédictive (absence) : 98 %
- Palpation et échographie
 - Sans valeur pour diagnostiquer corps jaune hémorragique ou en régression

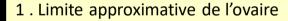
The Veterinary Journal, 2000, 159:161-170

RELATIVE ACCURACY OF THE IDENTIFICATION OF OVARIAN STRUCTURES IN THE COW BY ULTRASONOGRAPHY AND PALPATION PER RECTUM

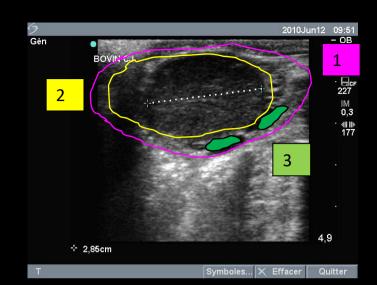
Ch. Hanzen (1), M. Pieterse (2), O. Scenczi (3) and M. Drost (4)

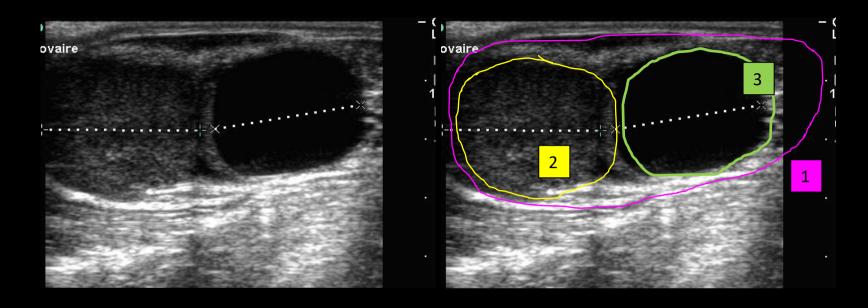
http://hdl.handle.net/2268/8976





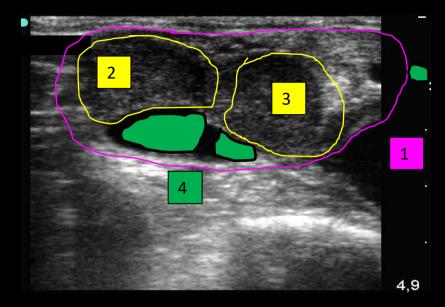
- 2. Contour du CJ
- 3. Follicule: (zone anéchogène)



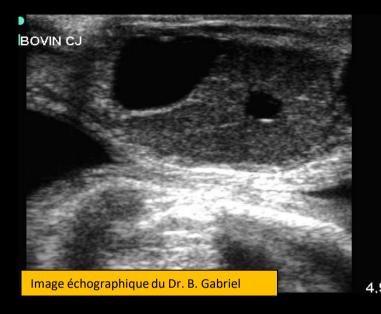


- 1 . Limite approximative de l'ovaire
- 2. contour du CJ
- 3. Follicule: (zone anéchogène)

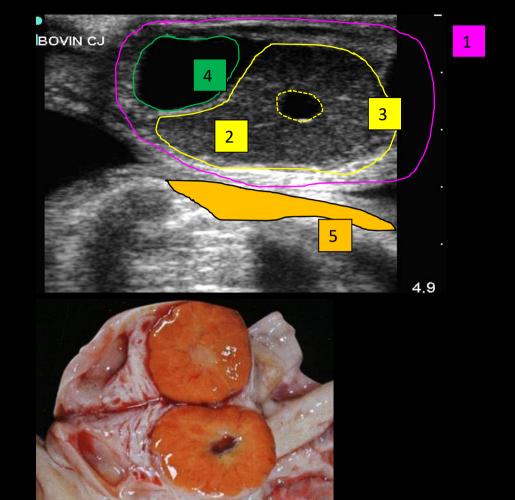


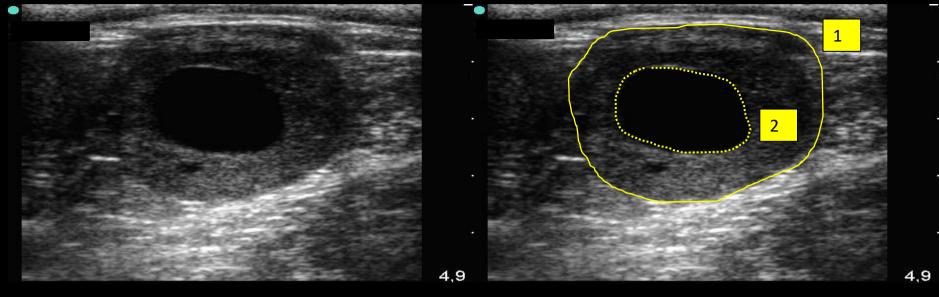


- 1 . Limite approximative de l'ovaire
- 2. Contour du premier CJ
- 3. Contour du second corps jaune
- 4. Follicules



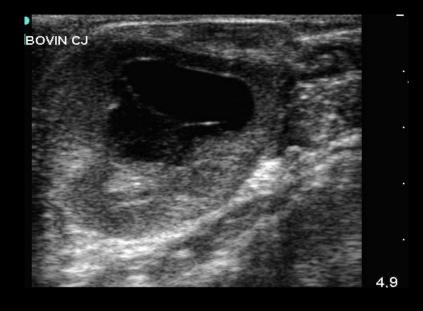
- 1 . Limite approximative de l'ovaire
- 2. Contour du CJ
- 3. Contour de la cavité du CJ
- 4. Follicules
- 5. Zone hyperéchogène du pubis

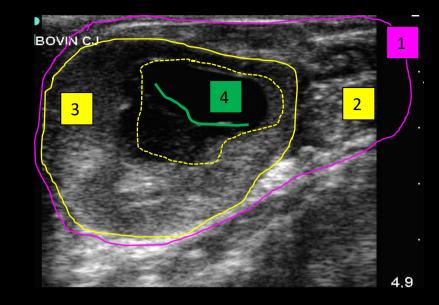




- 1. Contour du CJ cavitaire
- 2. Contour de la cavité du CJ

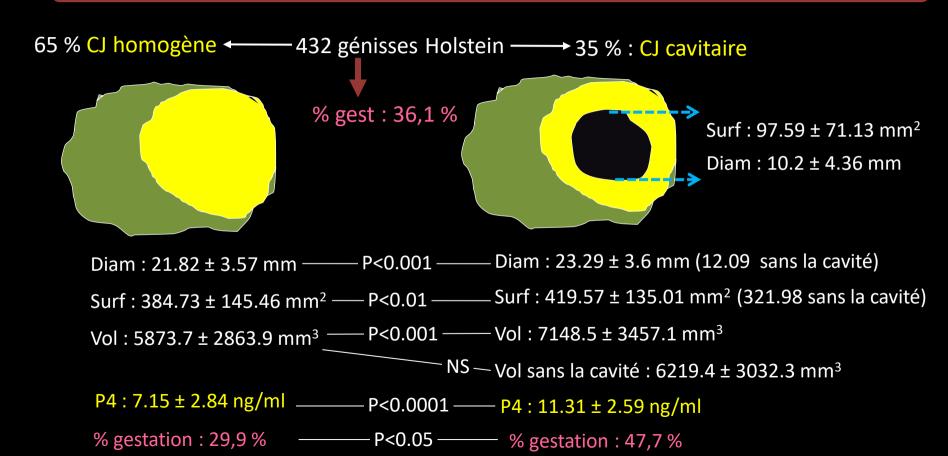






- 1 . Limite approximative de l'ovaire
- 2. contour du CJ
- 3. Contour de la cavité du corps jaune
- 4. Traces de fibrine

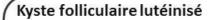
Caractéristiques des corps jaunes cavitaires et gestation après transfert d'embryon Jaskowski BM et al. Theriogenology 178 (2022) 73-76.



Kyste folliculaire

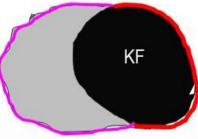
- Diamètre > 24 mm
- $(31 \pm 4 \text{ mm à } 33 \pm 7 \text{ mm})$
- Paroi < 3mm

(Gascon et Hanzen)

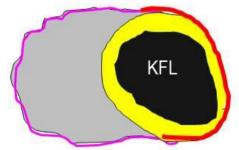


- Diamètre > 24 mm
- $(35 \pm 7 \text{ mm à } 39 \pm 9 \text{ mm})$
- Paroi 3 à 9 mm
- Cavité 24 à 49 mm

(Gascon et Hanzen)

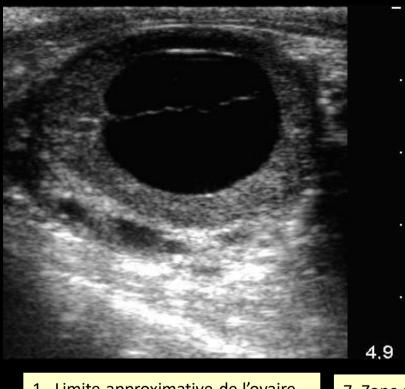


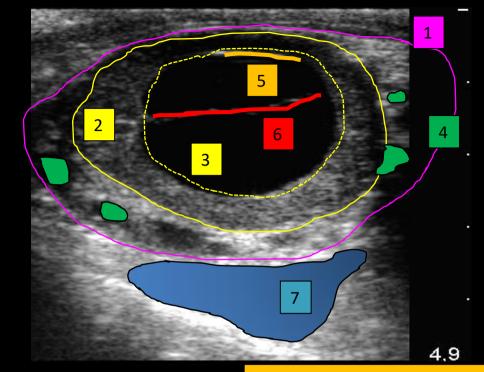






Photos Hanze





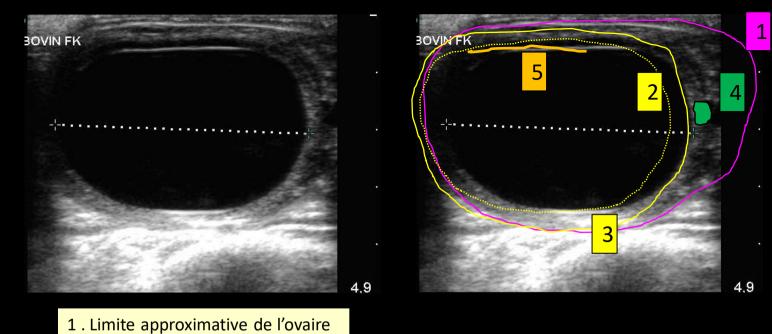
1 . Limite approximative de l'ovaire

7. Zone pubienne

- 2. Limite externe de la paroi du kyste folliculaire lutéinisé
- 3. Limite interne de la paroi du kyste folliculaire lutéinisé
- 4. Follicule 5. Artéfact
 - fact 6. Fibrine

Image échographique du Dr. B. Gabriel





- 1. Ellitte approximative de rovaire
- 2. Limite externe de la paroi du kyste folliculaire
- 3. Limite interne de la paroi du kyste folliculaire
- 4. Follicule
- 5. Artéfact

Que devriez-vous retenir?

- 1. On se trompe une fois sur 4 quand il s'agit de confirmer manuellement la présence ou l'absence de corps jaune
- L'échographe est un outil indispensable pour sélectioner une receveuse

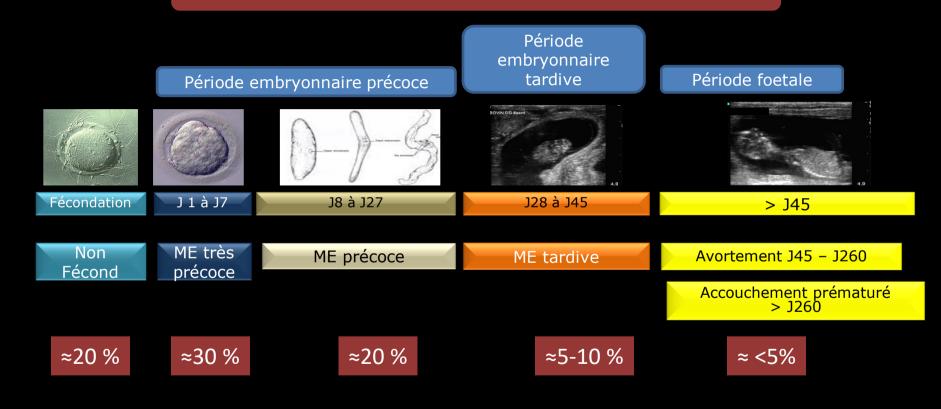
Quels sont les facteurs de réussite d'un transfert d'embryon ?

Ce que vous devriez connaître et comprendre

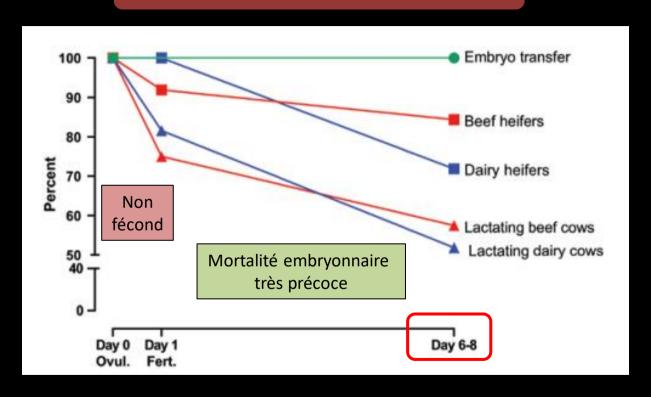
Le mieux est de transférer

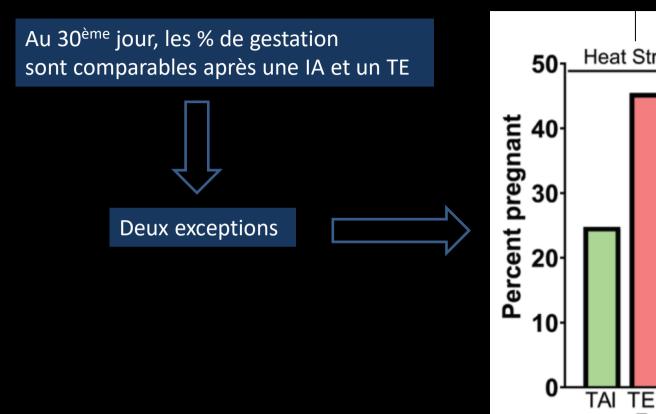
- un embryon
 - non congelé,
 - obtenu in vivo
 - de qualité 1 voire 2
 - récolté en-dehors d'une période de stress thermique
- sur une receveuse
 - qui est une génisse pubère, cyclée, de race laitière ou à viande
 - en bon état corporel (3 à 3,5)
 - qui présente un CJ de > 20 mm identifié par échographie
 - bien synchronisée avec l'œstrus de la donneuse (-1 à +1 j)
 - après une chaleur manifeste naturelle ou induite
 - exempte d'infection utérine
 - « calme »
- dans la corne ispsilatérale au CJ
- de manière aussi rapide que possible (< 60 sec)

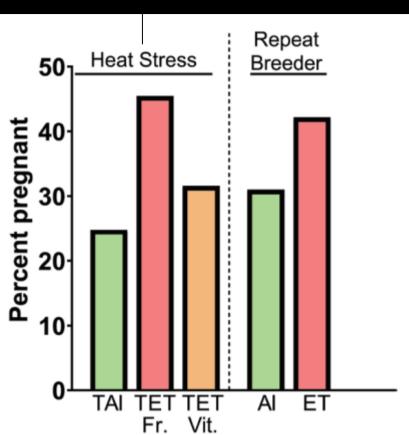
Définir périodes et prévalence des pertes de gestation



% de gestation à J7 : TE vs IA







Quels sont les facteurs de réussite d'un transfert d'embryon ?

Qualité embryon

- In vivo vs in vitro
- Congelé vs frais
- Grade de qualité

Environnement

- Stress thermique (THI)
- Nutrition

Technicien

- Stratégie d'examen clinique
- Technicité
- Stratégie thérapeutique

Receveuse

- Œstrus naturel vs induit
- Qualité du CJ et P4
- Etat corporel
- Pathologies du PP
- Tempérament
- Age
- Race
- Stress
- Site utérin du transfert
- Côté du transfert
- Degré de synchronisation
- Spéculation
- N° de lactation
- Stade de lactation

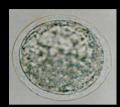
Embryon

Qualité embryon

- In vivo vs in vitro
- Congelé vs frais
- Grade de qualité



Evaluation of the quality of the embryo: 4 grades (Bo and Mapletoft Anim Reprod 2013) (IETS)



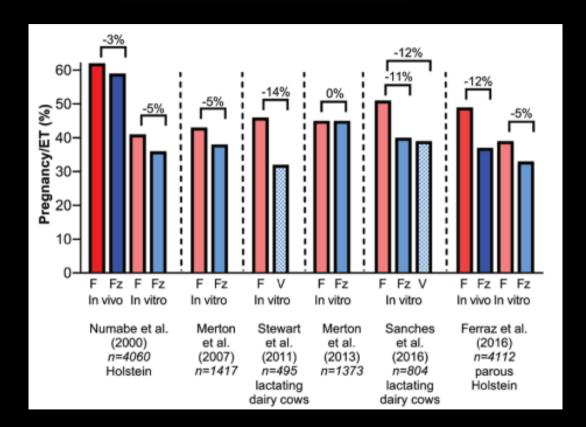






- Code 1: Excellent or Good (freezable embryos, international trade).
 - Symmetrical and spherical aspect
 - Individual blastomeres are uniform in size, color, and density
 - 85% of the cellular material should be an intact (no or few extruded material in the perivitelline space.
 - The zona pellucida should be smooth and have no concave or flat surfaces of the zona pellucida (that might cause the embryo to adhere to a petri dish or a straw).
- Code 2: Fair Transferable but not freezable embryos.
 - Moderate irregularities in the overall shape of the embryonic mass or in size, color, and density of individual cells.
 - Delay of development according to the stage of transfer
 - At least 50% of the embryonic mass should be intact.
- Code 3: Poor (not transferable or freezable)
 - Major irregularities in shape of the embryonic mass or in size, color, and density of individual cells (wall of the cell are difficult identify).
 - 25% of embryo mass must be intact.
- Code 4: Dead or degenerating.

Conservation de l'embryon



La congélation réduit le % de gestation après une production in vivo ou in vitro d'un embryon

Facteurs d'influence du résultat d'un transfert d'embryon

Variable

1-Excellent/good

2-Fair 3-Poor

Chebel	et al.	Theriog	enology	2008	69,	,98-106

Items	P/E1 (no./no.)	P value
Embryo quality grade		
1	59.4 (443/746)	< 0.01
2	53.8 (157/292)	
3	35.2 (51/145)	
Embryo status		
Frozen/thawed	44.2 (76/172)	< 0.01
Fresh	56.9 (575/1011)	

D/ET (no /no)

Transfer (n)

7763

P/FT

 42.2^{a}

Ferraz et al Theriogenology 2016, 86,1834-1846

Après transfert d'embryons obtenus in
vitro, les % de gestation sont 10 à 40 %
inférieurs à ceux observés après transfe
d'embryons obtenus in vivo (Ealy et al
Anim. Sci. 2019.97:2555–2568)

mansier (ii)	r/E1
867	49.3ª
1725	36.8 ^b
7428	39.0 ^b
377	32.9 ^b
2180	36.5ª
2125	34.1 ^a
2803	38.1ª
3289	45.3 ^b
	867 1725 7428 377 2180 2125 2803

Environnement



Stress thermique chez la vache

http://www.fidocl.fr/content/lait-dete-et-chaleur-limiter-le-stress-thermique-chez-lavache-laitiere

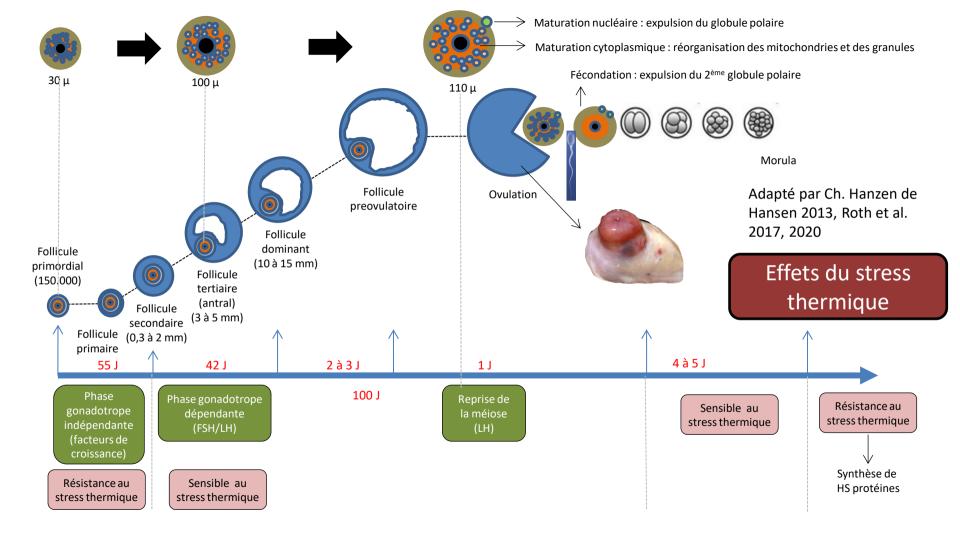
Indice température humidité pour les vaches laitières.

				%	d'humi	dité rela	ative					
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
18	61	61	62	62	62	63	63	64	64	64	65	Zone de confort
19	62	62	63	63	64	64	65	65	65	66	66	
20	63	63	64	64	65	65	66	67	67	68	68	Seuil de stress
21	1 63	64	65	65	66	67	67	68	69	69	70	
22	2 64	65	66	67	67	68	69	70	70	71	72	Stress léger
23	65	66	67	68	68	69	70	71	72	73	74	à modéré
24	1 66	67	68	69	70	71	72	73	74	74	75	
25	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	
26	67	69	70	71	72	73	74	76	77	78	79	
26 27 28 29 30 31	7 68	70	71	72	73	75	76	77	78	80	81	Stress modéré
28	69	70	72	73	75	76	77	79	80	81	83	à majeur
29	70	71	73	74	76	77	79	80	82	83	84	
30	71	72	74	75	77	79	80	82	83	85	86	
31	72	73	75	76	78	80	81	83	85	86	88	
32	2 72	74	76	78	79	81	83	85	86	88	90	Stress majeur
33	3 73	75	77	79	81	82	84	86	88	90	92	
34	74	76	78	80	82	84	86	88	90	92	94	
35	75	77	79	81	83	85	87	89	91	93	95	
36	76	78	80	82	84	86	89	91		95	97	
37	76	79	81	83	85	88	90	92	94	97	99	
20	-		-		-							

THI at ET < 7272-79 80-89

6172 39.7ª 39.4ª 3533 34.8^b 692

Ferraz et al Theriogenology 2016, 86,1834(p<0.05)



Receveuse

- Œstrus naturel vs induit
- Qualité du CJ et P4
- Etat corporel
- Pathologies du PP
- Tempérament
- Age
- Race
- Stress
- Site utérin du transfert
- Côté du transfert
- Degré de synchronisation
- Spéculation
- N° de lactation
- Stade de lactation



Receveuse

Hasler J. Bovine embryo transfer: are efficiencies improving? Applied Reproductive Strategies Conference Proceedings August 5th & 6th, 2010 Nashville, TN

- Œstrus naturel vs induit : pas d'effet si détection des chaleurs est optimale
- Qualité du CJ et P4
- Etat corporel : > 2.5 et < 4
- Pathologies du PP : effet négatif des infections utérines et anoestrus
- Stress, tempérament : ?
- Race : résultats moins bons avec Bos indicus que taurus (nervosité , col utérin, œstrus ?)
- Age : résultats moins bons avec des génisses prepubères que pubères
- Site utérin du transfert : après un transfert chirurgical, meilleurs résultats si transfert dans le tiers supérieur mais pas d'effets si embryon de qualité 1. Moins bon est l'embryon et plus haut il doit être transféré.
- Côté du transfert : pas d'effet mais facilité différente selon gaucher et droitier
- Degré de synchronisation : pas d'effet si synchronisation comprise entre -1 et + 1 j (emb frais ou cong)
- Spéculation : pas de différence entre génisses laitières et à viande (emb congelé ou non)
- N° de lactation : moins bons résultats avec les vaches que les génisses laitières (emb cong ou non)
- Stade de lactation : éviter le premier tiers de lactation (?) (BEN)

Facteurs d'influence du résultat d'un transfert d'embryon : NL, degré de synchronisation, J du TE

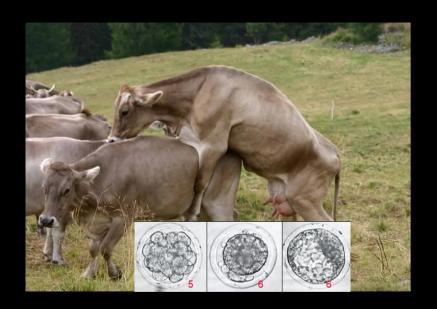
Chebel et al. Theriogenology 2008, 69,98-106

Items	P/ET (no./no.)	P value
Donor class		
Non-lactating	52.2 (405/776)	0.83
Lactating	60.4 (246/407)	
Synchronization (days)		
-1	58.6 (51/87)	0.99
0	53.7 (464/864)	
+1	58.6 (136/232)	

Ferraz et al Theriogenology 2016, 86,1834-1846

Variable	Transfer (n)	P/ET
Recipient parity		
Nulliparous	6285	42.0 ^a
Primiparous	2235	37.8 ^b
Multiparous	1877	31.6 ^c
Recipient EC day at ETe		
6	2225	36.4ª
7	3712	40.9 ^b
8	3158	40.4 ^b
9	1302	36.6 ^{a,b}

Les manifestations oestrales



Le % de gestation au 29^{ème} jour est corrélée à l'intensité des manifestations oestrales

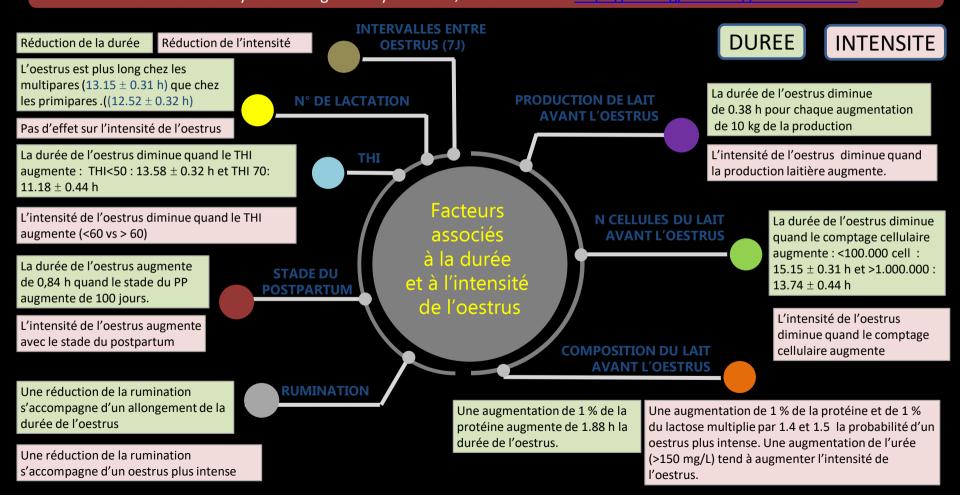
• Intense: 41,3

Moyenne: 32,7 %;

• Absente: 11,3 %

Madureira et al. Occurrence and greater intensity of estrus in recipient lactating dairy cows improve pregnancy per embryo transfer. J. Dairy Sci. 2022, 105:877–888 (2548 TE)

Selon Tippenhauer et al. Factors associated with estrous expression and subsequent fertility in lactating dairy cows using automated activity monitoring. J. Dairy Sci. 2020,104:6267–6282 https://doi.org/10.3168/ids.2020-19578



Importance de la détection d'un corps jaune et de sa qualité

(Yoshida et al. Animal Science Journal 2012,83,207-212)

Corpus luteum	Diam CL (mm)	P4 (ng/ml)	CL (%) (n=543)	PR (n=370)
1	22,9 ± 3,0	8,9 ± 2,2	32,2	76,0
II	19,7 ± 2,4	6,9 ± 1,8	42,0	74,6
I + II	20,1 ± 3,1	8,1 ± 2,3	74,2	75,2
III	15,4 ± 1,1	4,6 ± 3,0	24,3	47,7
IV	6,4 ± 5,6	3,5 ± 2,5	1,5	50,0
III + IV	12,4 ± 5,4	4,0 ± 2,8	25,8	47,9
Total			100	68,1

P < 0,0001

CL I : >= 20 mm

CL II : >= 20 mm avec une cavité

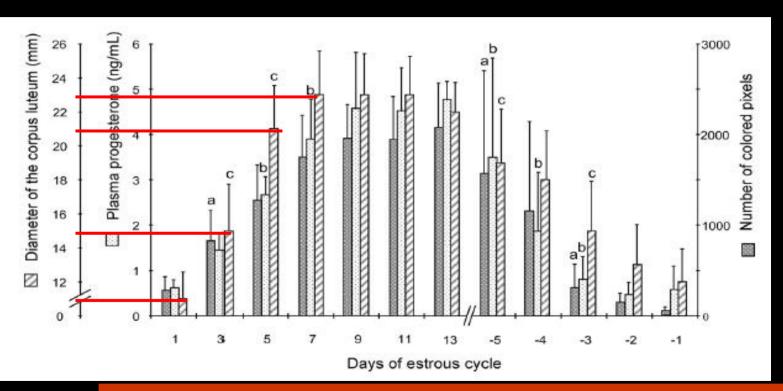
CL III: >=15 mm et < 20 mm avec ou pas une cavité

CL IV: < 15 mm



Plus la taille ↑ et plus le % de gestation ↑

Taille du CJ et synthèse de progestérone (Luttgenau and Bollwein Reproductive biology 2014,14,103)



Etroite corrélation entre la taille du CJ et la concentration en P4 (r = 0.70, p < 0.05)

Technicien

- Stratégie d'examen clinique le jour du transfert et 7 jours avant
 - Manuel vs échographie ?
 - Maîtrise des critères ?
 - Technicité du geste
 - Durée du passage du col
 - Site utérin du transfert
 - Lésions induites
 - Délai entre décongélation et TE : pas d'effet (Bo et al. 2012)
- Stratégie thérapeutique
- •



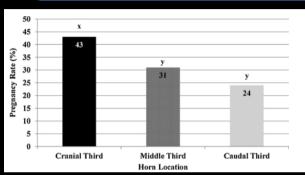


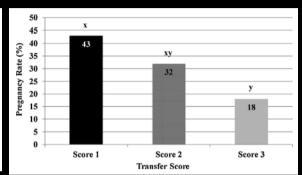
Alkan H et al. Evaluation of the factors that affect the pregnancy rates during embryo transfer (embryons frais) in beef heifers (n=561 synchronisées à l'Ovsynch et détectées avec un Kamar).

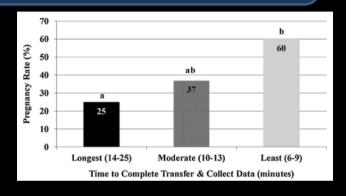
Reprod Dom Anim. 2020;55:421–428.

Qualité embryon	Grade 1 : 44,6	Grade 2 : 33,1		S
Passage du col	Aisé (<60 sec) : 41,2	Moyen (60 à 80 sec) : 34,9	Difficile (> 80 sec) : 30,3	NS
Côté du transfert	Gauche : 42,2	Droit : 37,0		NS
Site du transfert	Tiers supérieur : 41,0	Tiers moyen : 30,0		S
Diamètre du CJ	15 à 20 mm : 33,5	20 à 25 mm : 40,8	> 25 mm : 46,7	S

Roper DA et al. Alkan H et al. Factors in cattle affecting embryo (frais et congelés in vivo de grade 1 ou 2) transfer (7 techniciens) pregnancies in recipient animals (256 vaches Angus synchronisées avec un CIDR). Animal Reproduction Science 199 (2018) 79–83







Site du transfert : Effet S (P<0.08) du 1/3 super

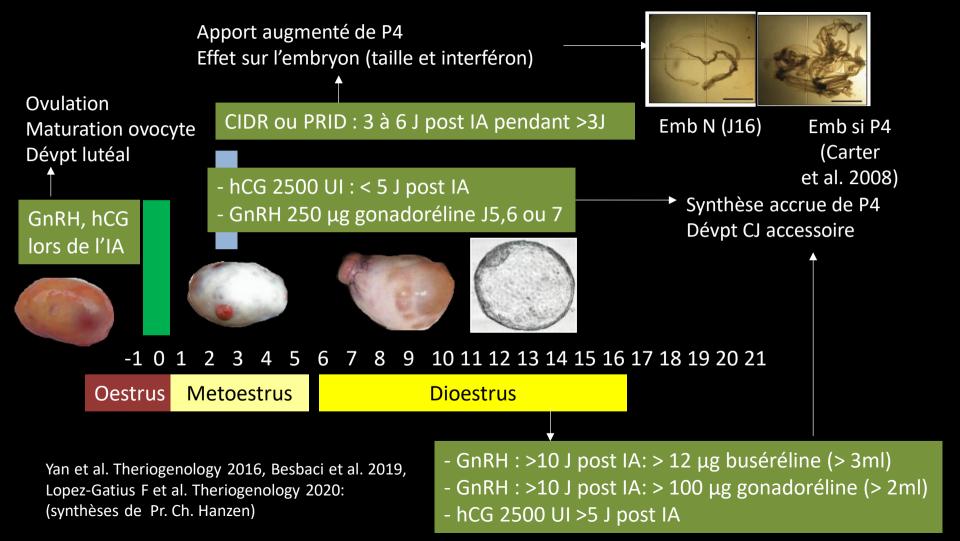
Pas d'effet selon Bo et al. 2012 avec des embryons de grade 1

« Score » de difficulté Effet S (P<0.07)

Plus il augmente, plus on manipule l'utérus et plus on risque de libérer des PGF2a Délai entre palpation des ovaires et la fin du TE (temps de maintien du bras dans le rectum) : : Effet S (P<0.03)

> Variable selon l'expérience, la nervosité de la vache, le site du TE...

Quels traitements possibles pour augmenter la réussite d'un transfert d'embryon?



Effet de l'hCG

Hazano K et al. Effects of the formation and regression of accessory corpus lutea during pregnancy on plasma progesterone concentration and pregnancy status in cross-bred beef heifers. Animal Reproduction Science 232 (2021) 106825.



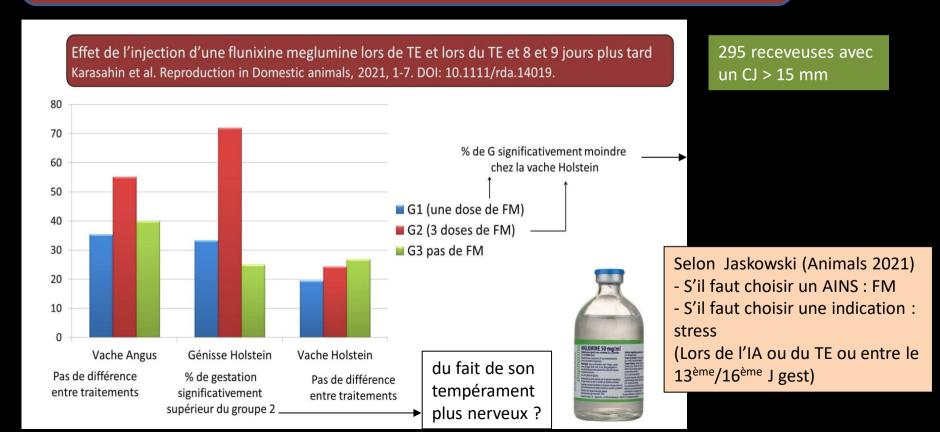
Transfert d'un embryon congelé aux jours 6 à 8 du cycle à des 571 génisses croisées.

- Les % de gestation ont été au 30ème jour respectivement de 68,6 et 80,5 % chez les animaux non traités et traités et au 50ème jour de respectivement 65,3 et 76,2 % (P<0.002 et 0.007).
- La progestéronémie s'avère être supérieure 33 à 47 jours après l'œstrus chez les animaux traités (9 à 10 ng/ml) que chez les animaux non traités (6 à 7 ng/ml).
- 24 % des corps jaunes accessoires (CJa de diamètre ≥ 10 mm, observés dans 90,3 % des cas) régressent 30 à 50 jours après l'œstrus.

L'effet n'a pas été observé après traitement au moment du transfert à des génisses (Niles et al. 2019).

Effet d'un AINS : la flunixine meglumine (1,1 mg/kg)

Karasahin et al. Effect of flunixin meglumine treatment during and after embryo transfer on the pregnancy rate in cattle. Reproduction in Domestic animals, 2021, 1-7. DOI: 10.1111/rda.14019.



Un embryon thérapeutique ?



TEF : transfert d'embryon frais TEC : transfert d'embryon congelé

IA : Insémination artificielle

IAS : IA systématique DG : constat de gestation Nowicki A. Embryo transfer as an option to improve fertility in repeat breeder dairy cows. J Vet Res 65, 231-237, 2021 (Adapté par Ch. Hanzen 2022)

N RB	N IA	% Gest	Commentaire	Référence
23	Moy 6.2	72	TEF in vivo	Tanabe et al. 1985
5693		41,7	TE in vivo	Rodrigues et al. 2007
		17,9	IA	
24	>1	53,8	TEC in vivo	Son et al. 2007
13	>1	18,5	IA sur œstrus détecté	
13	>1	7,7	TAI	
334	>2	43,1	IA puis TEC in vitro; DG 35-70: vaches et génisses	Dochi et al. 2008
198	>2	23,2	TEC in vitro; DG 35-70: vaches et génisses	
61	>2	49,2	IA puis TEC in vitro; DG 35-70: génisses	
273	>2	41,5	IA puis TEC in vitro; DG 35-70: vaches	
61	>2	29,5	TEC in vitro; DG 35-70: génisses	
137	>2	20,4	TEC in vitro; DG 35-70: vaches	
151	> 3	31,3	IAS, DG 32	Block et al. 2010
142	> 3	27,7	TEC in vitro sperme sexé, DG 32	
96	> 3	50,5	TEF in vitro sperme sexé, DG 32	
651	> 3	42,9	TEC in vivo, DG 30	Rodrigues et al. 2010
114	> 3	52,6	IA puis TEC in vivo, vaches	Canu et al. 2010
14	> 3	57	IA puis TEC in vivo, génisses	
51	> 3	49	TEC in vivo, vaches	
373	> 3	66,2	TEC in vivo, génisses	
1122	> 3	46,9	IA puis TEC in vitro; DG 40-60	Yaginuma et al 2019

Un embryon thérapeutique pour les repeat-breeders ? Pourquoi pas mais ...

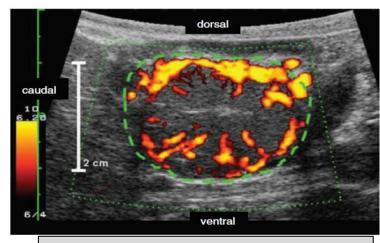
- Il contribue à augmenter le % de gestation
- Son effet est supérieur chez les génisses
- Son effet peut dépendre du nombre d'IA déjà réalisées
- Son effet est supérieur s'il est précédé d'une IA
- Il augmente le risque de gémellité s'il suit une IA
- Son coût n'est-il pas prohibitif par rapport à un traitement hormonal?

L'écho-Doppler Comment cela fonctionne ?

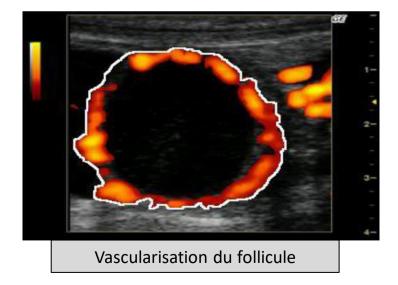
Principes de base de chez base

L'écho Doppler (Johann Christian Doppler, 1903)

- Echographie : la fréquence de l'écho est équivalente à celle des ultrasons
- Echo-Doppler : la fréquence de l'écho est différente de celle des US du fait que les US rencontrent une structure en mouvement tel que le sang. Elle est plus élevée quand le sang se rapproche de la sonde et moins élevée quand il s'en écarte.



Vascularisation du corps jaune



See: Herzog et Bollwein in Reprod Dom Anim 42 (Suppl.2), 51–58 (2007)

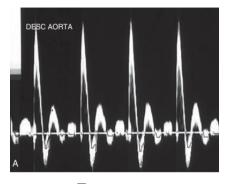
Echo-Doppler spectral

Echo-Doppler couleur (Duplex)

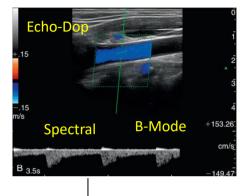
Echo-Doppler couleur (Triplex)

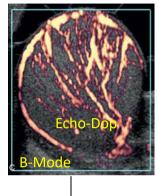
Echo-Doppler énergie (Duplex)

Vit



Echo Dop





Temps

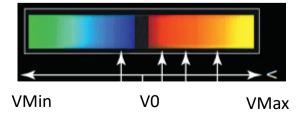
Le signal échographique capté est traduit en spectre, en son ou en couleur (du rouge vers le jaune si le sang se rapproche de la sonde et du bleu vers le vert s'il s'en écarte)



- Permet de mesurer la vitesse du flux sanguin
- Permet de distinguer flux artériel et veineux

Perpendicularité de la sonde

- · pas nécessaire
- Permet de mesurer l'intensité du flux sangui n



Mattoon JS. Fundamental of ultrasound diagnostic

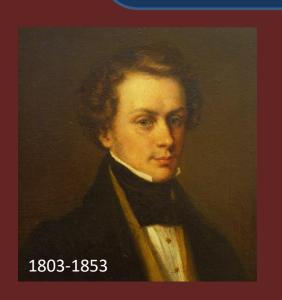
- <u>Doppler continu</u>: émission continue d'ultrasons avec une sonde à deux cristaux, l'un émetteur, l'autre récepteur : pas d'adaptation du signal en fonction de la profondeur
- <u>Doppler pulsé</u>: la sonde émet alternativement un faisceau ultrasonore et reçoit le faisceau réfléchi: le signal s'adapte à la profondeur d'exploration





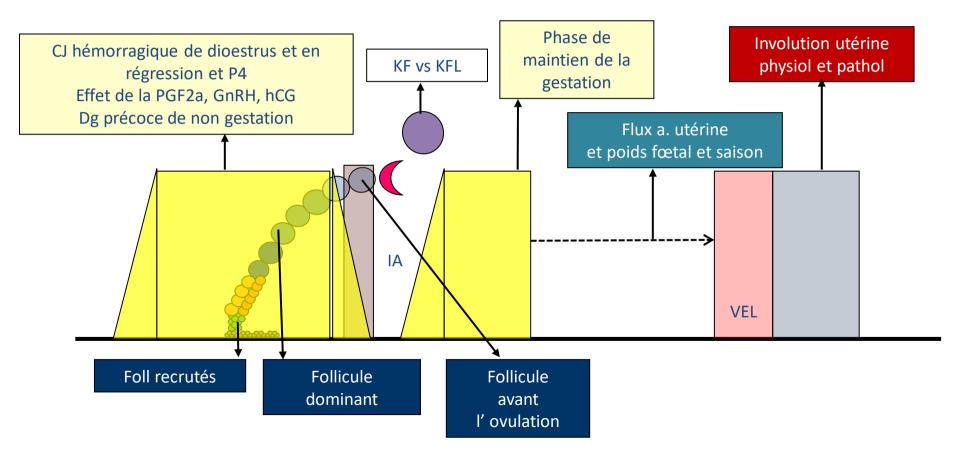
Mindray Vetus E7 info@echomedic.be

L'écho-Doppler Quelles applications possibles en reproduction bovine ?



Les caractéristiques physiologiques d'une structure sont directement liées à sa vascularisation.

Applications de l'écho-Doppler en reproduction bovine (Follicules, corps jaunes, gestation et postpartum)



Utérus et ovaires

Uterus

- Le flux sanguin au niveau de l'artère utérine est maximal en prooestrus et en œstrus.
- La relation avec les stéroïdes sexuels est peu significative (Bollwein et al. 2016, Bollwein et al. 2000)
- En dioestrus, le flux sanguin est minimal (Bollwein et al. 2016)
- Au debut de la 3ème semaine de gestation, le flux sanguin est plus élevé au niveau de la corne gestante que non-gestante (Silva and Ginther, 2010).

Ovaire

• L'ovaire porteur d'un follicule dominant et/ou d'un corps jaune est mieux vascularisé (Ginther et al. 2014)



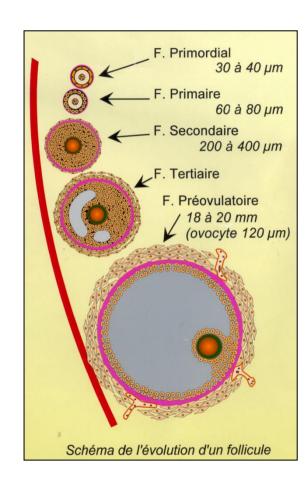
Les follicules

Follicules recrutés

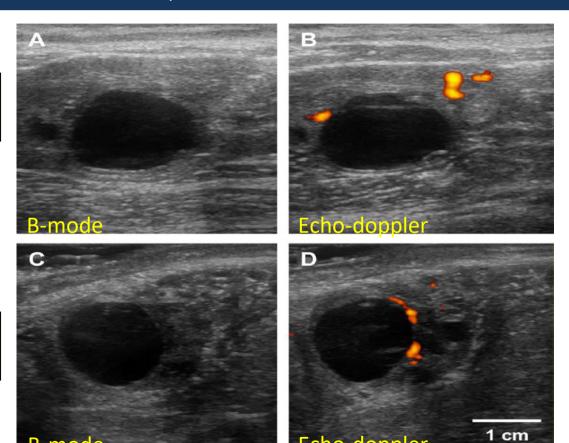
• Des signes de vascularisation sont plus souvent détectés au niveau des petits follicules (2,5 à 4 mm) qui vont poursuivre leur croissance (Miyamoto et al. 2006) : on peut y voir un intérêt pour décider ou non d'une superovulation.

Follicule en croissance

- Le flux sanguin est plus élevé 1 à 2 j avant la déviation chez le futur follicule dominant (Ginther et al. 2014)
- Follicule preovulatoire : l'augmentation de la vascularisation du follicule préovulatoire est associée à
 - celle du taux de gestation (Siddiqui et al. 2009, Varughese et al. 2017)
 - une meilleure synthèse de l'oestradiol (Mesquita e al., 2014; Pugliesi et al., 2016)
 - un meilleur clivage des ovocytes et un meilleur développement de l'embryon (Siddiqui et al. 2009).
 - la ponction de COCs de meilleure qualité (Pancarci et al. 2012).



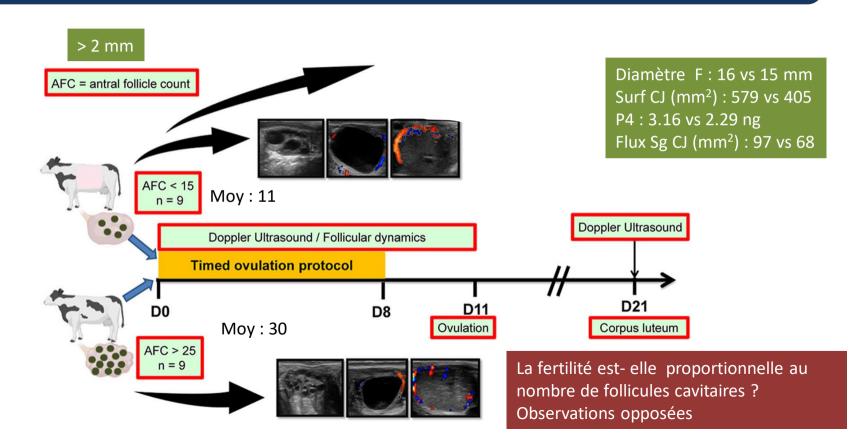
FD vague 1 J8



Echo-doppler

FD: 36 h Avant l'ovulation Effet du nombre de follicules antraux sur le diamètre et la vascularisation du follicule ovulatoire, le diamètre du corps jaune et la concentration en P4

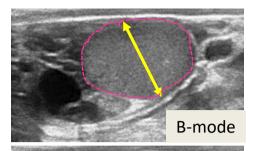
Bonato et al. Theriogenology, 2022, 179, 223-229.

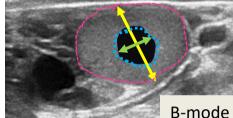


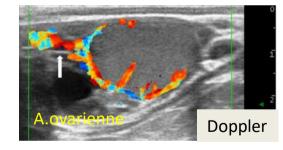
Le corps jaune

Paramètres d'évaluation du corps jaune

- Diamètre
- Surface totale
- Echogénicité ?

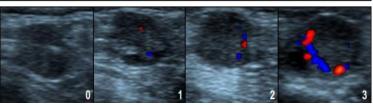






- Diamètre total
- Diamètre cavité
- Surface totale (ST)
- Surface lutéale : ST S cavité
- Echogénicité ?
- Flux sanguin (mesure de la perfusion)
 - évaluation au moyen de scores
 - Calcul de la surface (Logiciel Image J (http://imagej.nih.gov/ij/).
- Vélocité du flux au niveau de l'a.ovarienne

Attention aux réglages de l'appareil



Images: Kanazawa 2022

Images échographiques du corps jaune en développement et en atrésie en B-mode et écho-doppler

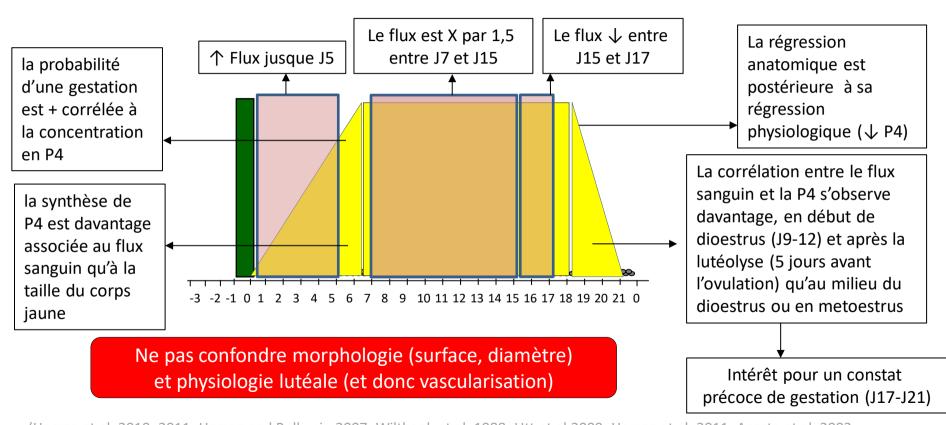
J4 : développement Echo-doppler **B-mode** Echo-doppler 1 cm **B-mode**

Diamètre important mais vascularisation importante

Diamètre important mais vascularisation réduite

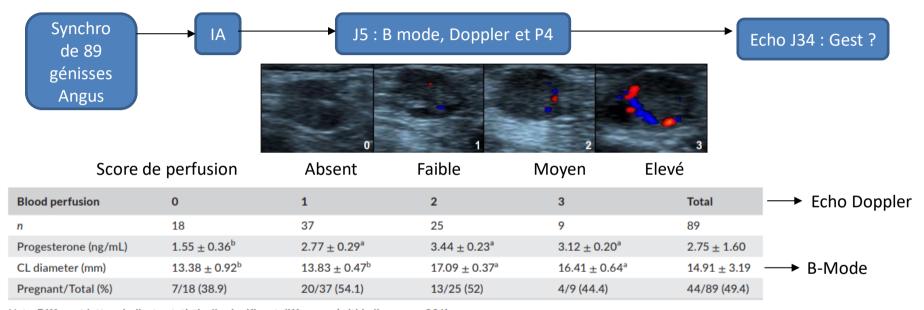
J18: atrésie

L'évaluation du corps jaune : pourquoi l'écho-Doppler et pas la palpation, le dosage de la P4 ou l'échographie B-mode ?



(Herzog et al. 2010, 2011, Herzog and Bollwein 2007, Wiltbank et al. 1988, Utt et al. 2009, Herzog et al. 2011, Acosta et al. 2002, Shirasuna et al. 2004, Miyamoto et al. 2005, Luttgenau et al. 2011, Vasconcelos et al. 2001, Herzog et al. 2010, Scully et al. 2014)

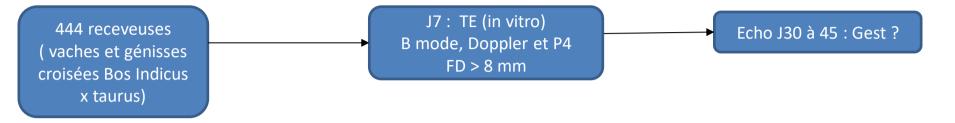
dos Santos Velho et al. Reprod in Domest Anim. 2022;57:246–252 : EchoDoppler, B mode ou P4 à J5 pour sélectionner une receveuse et/ou décider d'un traitement ?



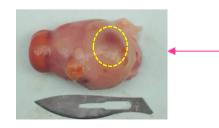
Note: Different letters indicate statistically significant difference (within lines; p < .001).

- Un CJ de diamètre > 14.95 mm s'accompagne d'une plus grande probabilité de gestation
- Un CJ de diamètre > 14.95 mm s'accompagne d'une perfusion plus élevée
- Un score ≥ 1 augmente la probabilité d'une P4 > 2,39 ng
- Mais pas de relation entre score et % de gestation : problème de n ?

Pugliesi et al. Effets des caractéristiques lutéales (Diam, flux et P4) et folliculaires (FD > 8 mm) sur le % de gestation après transfert d'embryons obtenus in vitro . Theriogenology 2019, 135,73-79



- Le % de gestation total a été de 52,9 %
- L'augmentation de la perfusion sanguine du CJ (zones centrale et périphérique) s'accompagne S de celle de la concentration en P4 : il en résulte une augmentation significative du % de gestation : un % de vascularisation > 40 % semble constituer un minimum
- Pas d'effet de la surface lutéale sur le % de gestation si comprise entre 2 et 6 cm².
- Pas d'effet de la présence d'un FD ipsilatéral sur le % de gestation



- Après une IA, le % de gestation est > si le FD est contralatéral. Après un TE, l'embryon échappe aux influences possibles des stéroïdes du FD sur l'oviducte.
- Le développement de la vascularisation du CJ peut contribuer à l'apparition plus fréquente d'un FD ipsilatéral .

- Corps jaune : quelques autres effets potentiels
- Le flux sanguin lutéal est comparable jusqu'au jour 13 suivant l'IA en cas ou non de mortalité embryonnaire. Il augmente par la suite en cas de maintien de la gestation (Herzog et al. 2011).
- <u>l'injection d'une PGF2a</u> en dioestrus se traduit dans un premier temps par une augmentation du flux sanguin (Acosta et al. 2002), l'oxyde nitrique pouvant constituer le médiateur endothélial de l'effet vasodilatatoire de la PGF2a (Shirasuna et al. 2008).
- L'injection d'une GnRH ou d'hCG au moment de l'œstrus ne se traduit pas par une modification du flux sanguin, de la P4 et de la surface du CJ 9 à 12 jours plus tard (Aslan et al. 2011).
- <u>Une injection d'hCG</u> au 6ème jour du cycle se traduit par une augmentation transitoire (1h) du flux sanguin
- La mise en place durant 14 jours d'une <u>spirale vaginale</u> au 5^{ème} jour du cycle réduit le flux sanguin lutéal entre le 7^{ème} et le 12^{ème} jour du cycle
- L'injection de <u>0.5 mg/kg de LPS</u> s'accompagne d'une diminution transitoire de la P4, de la surface lutéale et du flux sanguin (Herzog et al. 2012)

Méthodes de constat de gestation Actualisation

How to cite: Pohler KG. Reese ST. Franco GA. Oliveira Filho RV. Paiva R. Fernandez L. Melo G. Vasconcelos ILM. Cooke R. Poole RK. New approaches to diagnose and target reproductive failure in cattle. Anim Reprod. 2020:17(3):e20200057. https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0057

Période

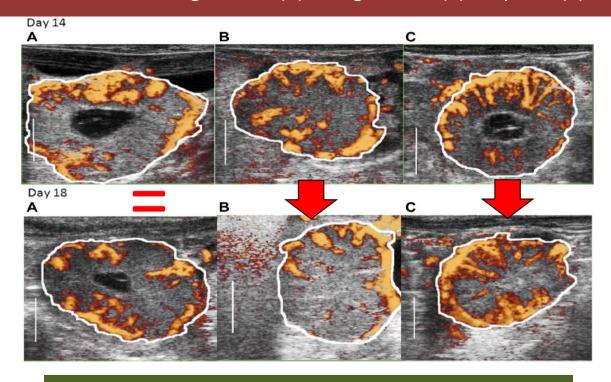
embryonnaire Période foetale Période embryonnaire précoce tardive J 1 à J7 J8 à J27 J28 à J45 > 145 Fécondation PAG microRNAs Récolte J30-31 3D/4D (J45) J17-24 d'embryons Palpation (J35 voire J45) P4 J18-24 Echographie transrectale (> J25) interféron Ovocyte Non fécondé tau J18-20 Blastocyste Doppler

J5 – J21 PAG

J22-24

Embryon dégénéré

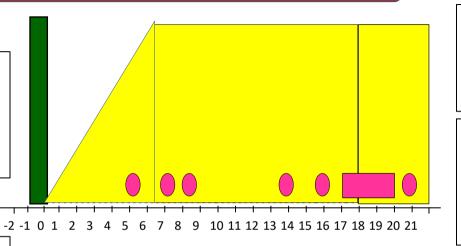
Comparaison de la vascularisation du corps jaune 14 et 18 jours après l'IA chez des génisses gestantes (A), non gestantes (B) et cyclées (C)



Le rapport entre la surface vascularisée et la surface du CJ est significativement différente entre les trois groupes

L'évaluation du corps jaune et le constat de gestation : observations

J5: Le diamètre (≥15 mm) du CJ et le flux sanguin lutéal sont au 5ème jour suivant l'IA corrélés à la présence d'une gestation (Dos Santos Velho et al. 2022).



J7, 8 ou 16: Le flux sanguin lutéal est plus élevé chez les animaux gestants que non gestants (Hassan et al. 2019, Salzano et al. 2020, Siqueira et al. 2019, Utt et al. 2009, Herzog et al. 2011, Scully et al. 2014, Pinaffi et al. 2015 >40% de vascularisation, Pugliesi et al. 2016: ↑ Probabilité de gestation avec le degré de vascularisation).

J14: La perfusion sanguine lutéale (BFA) associée à la vélocité sanguine sont les meilleurs prédicteurs de la gestation (Kanazawa et al. 2016). J16: L'absence de diminution du flux sanguin lutéal (après le début de la lutéolyse à J16) constituerait un signe très précoce de gestation (Matsui and Miyamoto 2009; Utt et al. 2009).

< 60 jours, le flux sanguin utérin et lutéal est corrélé à la progestéronémie et au développement de l'allantochorion (Pinaffi et al. 2017)

J21: L'écho-Doppler est plus apte à identifier les non-gestants (Pugliesi et al.2014) (Surface du CJ de < 2 cm² et < 25 % de la surface présentant des signes de flux sanguin (perfusion)

A 21 jours, la S du CJ et la S lutéale (> 268 mm²) sont les meilleurs prédicteurs de la gestation. (Kanazawa et al. 2022)

De 17 à 21 jours, la perfusion sanguine lutéale (BFA) est le meilleur prédicteur de la gestation (Seuil de 64 mm²) surtout si la cavité lutéale est absente ou réduite (S <10 mm²) (Kanazawa et al.. 2022)

Sensibilité et spécificité des paramètres lutéaux d'évaluation de la gestation aux jours 7 (Jour du transfert de l'embryon) et 14 (58 vaches Holstein) Kanazawa et al. / Theriogenology 86 (2016) 1436–1444



J7: sélection des receveuses

Summary of the ROC analyses of five independent variables on Day 7.

Items	Cutoff value	Sensitivity	Specificity
BFA (cm ²)	0.43	0.794	0.750
TAMV (cm/s)	41.83	0.533	0.583
CL area (cm ²)	5.12	0.324	0.667
CL tissue area (cm ²)	3.86	0.618	0.500
P ₄ concentrations (ng/mL)	1.32	0.588	0.458

La perfusion sanguine lutéale (BFA) est un bon prédicteur de la gestation à la différence de la vélocité (TAMV), de la surface lutéale, de la surface du CJ, de la P4 ou de la surface du FD

REM : les receveuses ont été sélectionnées sur base d'un diamètre de CJ> 20 mm

Summary of the ROC analyses of five independent variables on Day 14.

Items	Cutoff value	Sensitivity	Specificity
BFA and TAMV	0.60 ^a	0.853	0.917
BFA (cm ²)	0.56	0.882	0.792
TAMV (cm/s)	52.8	0.618	0.917
CL area (cm²)	5.11	0.529	0.500
CL tissue area (cm ²)	4.28	0.794	0.417
P ₄ concentrations (ng/mL)	3.21	0.647	0.500

La perfusion sanguine lutéale (BFA) associée à la vélocité sanguine sont les meilleurs prédicteurs de la gestation.



TAMV : time-averaged mean velocity

BFA: blood flow area

Sensibilité et spécificité de la morphologie lutéale et de la perfusion sanguine 17 à 21 jours après l'IA (202 vaches et 28 génisses de race Black Japanese) (% de gestation : 61 %) Kanazawa et al. Theriogenology 181 (2022) 69-78

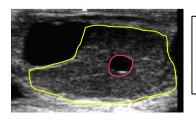
	G (n=141)	NG (n=89)	P
Surface du CJ (mm²) (médiane)	247	237	<0.001
Prévalence d'une cavité (Tot : 11,7 %)	5,7	21,3	<0.001
Surface de la cavité (mm²) (médiane)	9,6	98,5 (Diam : 11,2 mm)	<0.001
Surface lutéale (mm²) (médiane)	347	233	<0.001
Surface du flux sanguin (mm²) (médiane)	109,4	22,5	<0.001



De 17 à 21 jours, la perfusion sanguine lutéale (BFA) est le meilleur prédicteur de la gestation (Seuil de 64 mm²) surtout si la cavité lutéale est absente ou réduite (S <10 mm²).

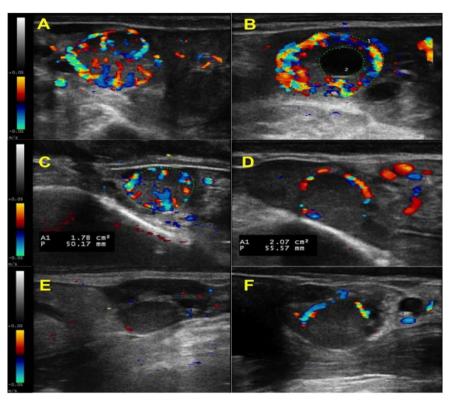


A 21 jours, la S du CJ et la S lutéale (> 268 mm²) sont les meilleurs prédicteurs de la gestation. Ces S correspondraient chez la Holstein a un diamètre > 23 mm.



- 37 à 79 % des CJ ont une cavité détectable entre J3-J5 et un diamètre maximal entre J6-J12.
- La majorité régresse entre J16-J20 ou persiste pfs jusque J21-J48 (surtout si diam > 10 mm).
- Plus grande est la cavité et moindre sera la probabilité d'une gestation

Degré d'exactitude (Accuracy) du constat de gestation 20 jours post IA selon les critères échographiques considérés (Bos indicus : Nelore) (Pugliesi et al. Biology of reproduction 2014)



Double critère possible de non gestation

- Surface du CJ de < 2 cm²
- < 25 % de la surface présentant des signes de flux sanguin

Endpoint	Only luteal area	Only luteal blood flow	Both	
No. of cows	111	111	111	
TP	41	41	42	
TN	61	59	59	
FP	8	10	10	
FN	1	1	0	
Sensitivity ^d	97.6%	97.6%	100%	
Specificity ^e	88.4%	85.5%	85.5%	
PPV^{\dagger}	83.7%	80.4%	80.8%	
NPV^g	98.4%	98.4%	100%	
Accuracy ⁿ	92%	90.1%	91%	

Donnler USa

- PPV (probabilité qu'une vache soit gestante si test +.
- NPV (probabilité qu'une vache soit non gestante si test -.

A à D : gestantes et E et F : non gestantes

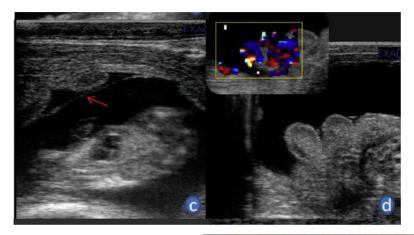
Degré d'exactitude du constat de gestation à J21 (TE + 14J) sur base de l'examen du CJ par Echo Doppler (Guimaraes et al. 2015 http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.005

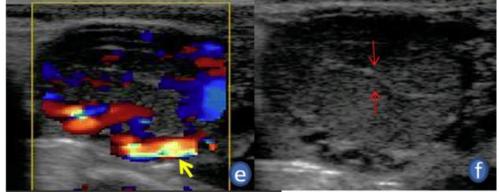
- 165 vaches et génisses , embryons congelés à J7
- Examen échographique B mode et Color Doppler à J21 et mesure de la P4
- Echographie à J35
- 10 à 15 sec pour l'examen à J21 (intérêt de connaître le côté du CJ à J7)

	DG 21		DG21	
	n	S Total (mm²)	n	S flux (mm²)
Gestation	90	312.3 ± 64.3	89	65.0 ± 25.3
Non gestation	73	102.1 ± 60.9	73	3.1 ± 9.9

- Valeur prédictive des constats négatifs : 100 % donc resynchronisation plus rapide possible
- Valeur prédictive des constats positifs : 79,3 %: 20,7 % de faux positifs
 - cycles allongés (> 21 jours)
 - ME entre J21 et J35 (55,2 % de gestation à J21 et 43,6 % à J35)
- Les valeurs prédictives sont plus élevées au J21 que 18,19 ou 20 (voir d'autres études)
- La progestéronémie est corrélée au degré d'irrigation du CJ mais aussi au volume et à la surface du CJ
- Le degré d'exactitude dépend des réglages de l'appareil et du technicien

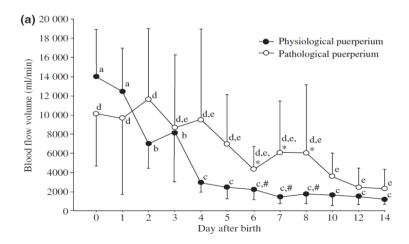
Identification par echo-Doppler de la vascularisation des placentomes et du corps jaune au 60^{ème} jour de gestation chez la vache (Varughese et al. Theriogenology 103 (2017) 59-68)





Le post-partum

- Après le vêlage, la diminution du flux sanguin est corrélée à celle de la régression utérine jusqu'au 28^{ème} jour voire 65 ou 86 jours après le vêlage (Leidl 2000, Heppelman et al. 2013, 2014, Kruger et al. 2000, Herzog et Bollwein 2007, Bollwein et al. 2016)
- La rétention placentaire et la métrite puerpérale s'accompagnent d'altérations du flux sanguin (Heppelman et al. 2014, Hartmann et al. 2013) qui en cas de rétention placentaire ne sont pas modifiées par l'ocytocine (Magata et al. 2013).



Que devriez-vous retenir?

- La synthèse de progestérone est proportionnelle au degré de vascularisation du corps jaune.
- 2. Au moment du transfert (J7) l'analyse du flux sanguin du CJ permet de pronostiquer une gestation.
- 3. Au 21^{ème} jour de gestation, l'écho-Doppler permet plus d'identifier les animaux non-gestants que gestants.
- 4. Le recours à l'écho-Doppler requiert une réelle expertise

Merci de votre attention