

# Dossier Biotechnologie animale – I

## Le diagnostic de la reproduction : fertilité, gestation, anœstrus

Philippe Delahaut, José Sulon, Francis Ectors,  
Jean-François Beckers

III<sup>es</sup> Journées scientifiques du Réseau  
biotechnologies animales de l'UREF  
(Université des réseaux d'expression  
française), Rabat, 26-28 septembre 1995.

Établir un diagnostic signifie, d'après le dictionnaire *Le Petit Robert* de 1993 : « déterminer une maladie d'après ses symptômes ».

Nous envisageons ici le diagnostic dans un sens plus large, visant à préciser un état physiologique ou pathologique dans le contexte précis de la reproduction, en vue de préciser avec exactitude la prédiction et la programmation de cette reproduction au sein des troupeaux.

Dès la haute Antiquité, les hommes se sont intéressés au diagnostic ; 600 ans avant notre ère, les Égyptiens avaient imaginé de vérifier le diagnostic de grossesse en testant les propriétés de l'urine de femmes présumées enceintes sur la germination de graines diverses. Si le processus de germination était rapide, le diagnostic était considéré comme positif ; dans le cas contraire, il était négatif. En 1997, cette anecdote laisse rêveur : les diagnostics *in vitro* ont progressé considérablement dans tous les domaines, aussi bien en médecine humaine que vétérinaire. Pourtant, dans de nombreuses situations, nous restons démunis, désappointés de ne pouvoir appliquer tel ou tel système, ou incécis quant au programme à proposer en prenant en compte l'ensemble des paramètres locaux, parmi lesquels les contraintes économiques sont prépondérantes.

Qu'en est-il des moyens de diagnostics *in vitro* disponibles chez les bovins quant à la fonction de reproduction ?

La vache est une espèce à activité sexuelle continue non saisonnière, avec un cycle se déroulant sur une période de 21 jours ; sa gestation a une durée d'environ 280 jours. Après la parturition, la vache présente une

période d'anœstrus allant de 20 à 100 jours et parfois davantage selon la race, la lactation, l'allaitement, les conditions d'alimentation ou d'exploitation.

À partir de 1965, grâce aux méthodes de couplage moléculaire et de purification des protéines, les dosages radio-immunologiques des hormones stéroïdiennes et des protéines ont permis de dessiner les concentrations physiologiques en fonction du cycle, de la gestation et de l'œstrus. Ces dosages ont été appliqués dans des situations dites de pathologie de la reproduction et ont permis de suivre les concentrations hormonales lors d'altérations du cycle, en particulier dans les cas extrêmes d'anœstrus et de nymphomanie.

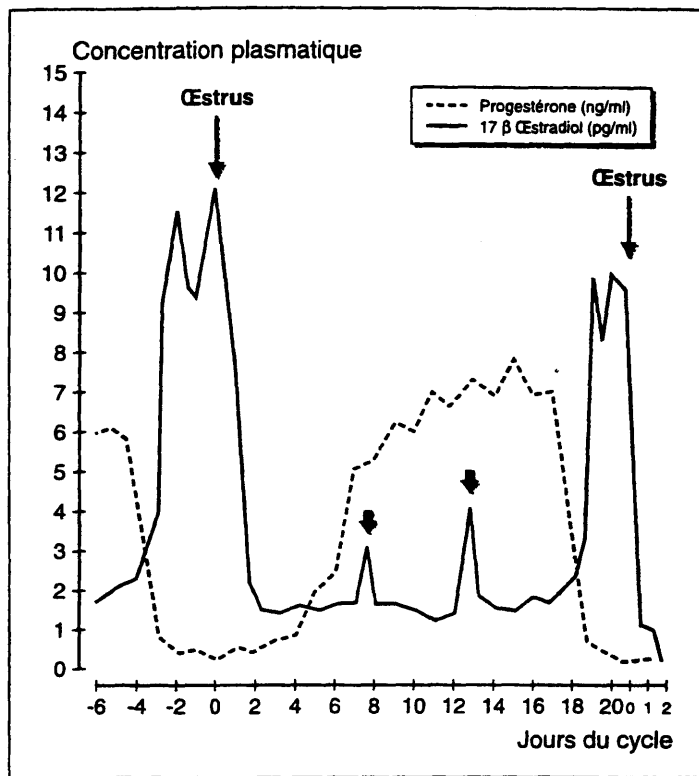
## Endocrinologie du cycle et de la gestation

Minimale pendant l'œstrus (jour 0), la concentration de **progestérone** s'élève progressivement à partir du 3<sup>e</sup> ou 4<sup>e</sup> jour pour atteindre un maximum du 7<sup>e</sup> au 10<sup>e</sup> jour du cycle [1]. Elle se maintient jusqu'au 17<sup>e</sup> ou 18<sup>e</sup> jour, période à laquelle elle chute brutalement suite à la lutéolyse produite par les prostaglandines d'origine utérine, et plus précisément endométriale ; ce mécanisme a été décrit en détail dès 1972 [2] (*figure 1*). Le rôle du « conceptus » dans l'inhibition de la lutéolyse a été ensuite précisé (*figure 2*). Le 17 $\beta$ -œstradiol montre un profil différent : sa concentration est beaucoup plus

P. Delahaut : Laboratoire d'hormonologie,  
8, rue du Point-du-Jour, B-6900 Marloie,  
Belgique.

J. Sulon, F. Ectors, J.F. Beckers : Université  
de Liège, Faculté de médecine vétérinaire,  
20 B-41, bd de Colonster, B-4000  
Liège, Belgique.

Tirés à part : P. Delahaut



**Figure 1.** Profils hormonaux de la progestérone et du 17 $\beta$ -œstradiol au cours du cycle œstral chez la vache. Les concentrations plasmatiques du 17 $\beta$ -œstradiol s'expriment en pg/ml ; elles sont maximales durant les trois jours qui précèdent l'œstrus (dont la durée est de 16 heures) et décroissent rapidement avant l'ovulation. Le pic préovulatoire de LH est intense (40 à 60 ng/ml) mais de courte durée (6 à 8 heures). Chez les bovins, l'ovulation survient environ 10 heures après la fin de l'œstrus, soit environ 15 heures après le pic pré-ovulatoire de LH (d'après Derivaux *et al.* [6]).

**Figure 1.** Hormonal profiles of progesterone and 17 $\beta$  Estradiol during the oestrous cycle in the bovine female. Plasmatic levels of 17 $\beta$  Estradiol are given in pg/ml : maximal prior (2-3 days) and during œstrus (duration of œstrus : 16 hours), levels decrease shortly before ovulation. The preovulatory surge of LH is high (40 to 60 mg/ml) and of short duration (6 to 8 hours). In the bovine species, ovulation occurs about 10 hours after the end of œstrus or about 15 hours after the LH surge.

basse que celle de la progestérone (exprimée en pg au lieu de ng par ml). Elle s'élève en phase pro-œstrale pour atteindre un maximum au moment de l'œstrus. Vers la fin de l'œstrus, la concentration de 17 $\beta$ -œstradiol chute brutalement, avant même l'ovulation pour revenir à son niveau de base. Durant la phase lutéale du cycle, on peut observer un, deux ou trois pics dits « accessoires », moins élevés et de plus courte durée que le pic œstral, qui correspondent aux vagues de croissance folliculaire terminale [3].

La **lutopine**, quant à elle, montre un profil pulsatile plus accentué en phase folliculaire qu'en phase progestéronique. Le pic préovulatoire, particulièrement bien marqué chez les bovins, est très élevé et de courte durée (6 à 9 heures). Au cours de la gestation, la concentration de progestérone reste élevée, le maintien du corps jaune étant indispensable à l'installation et à la poursuite de la gravidité. Cette observation est à la base du **diagnostic précoce de la gestation** par le dosage de la progestérone [4, 5]. Ce principe peut s'étendre à la plupart des espèces animales pour autant que les caractéristiques physiologiques du cycle et que les concentrations hormonales soient connues précisément. Du point de vue de la gestion du troupeau, le dosage de la progestérone peut rendre un service appréciable dans la mesure où il est intégré dans un programme éduca-

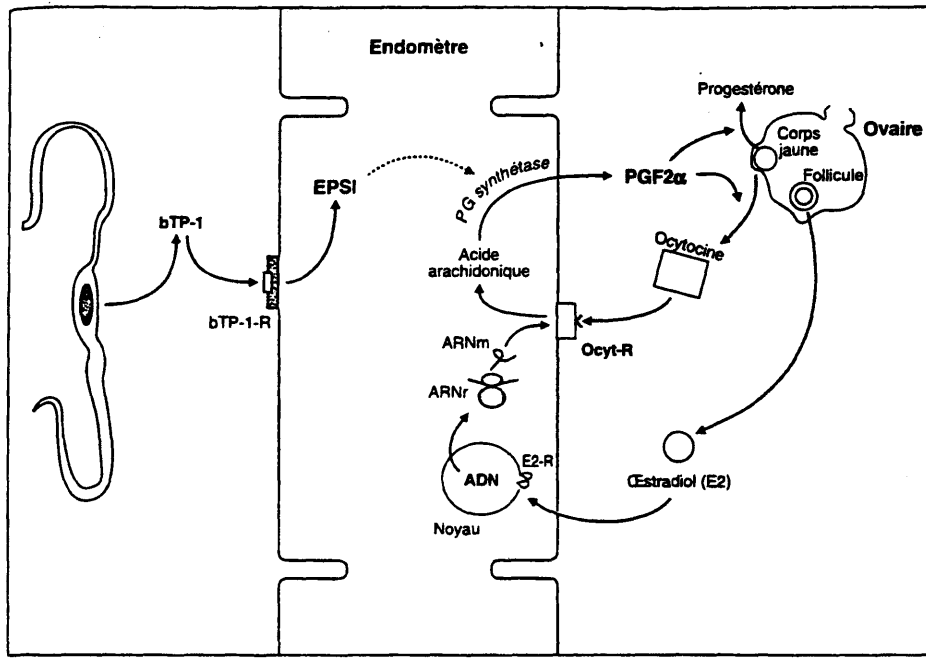
tif approprié. La réalisation de ce dosage a été simplifiée en vue de tests réalisables à la ferme [7]. Toutefois, comme la progestérone est rapidement transformée au contact des globules rouges, les dosages à partir du sang complet exigent des précautions particulières : centrifugation immédiate ou utilisation d'inhibiteurs enzymatiques [8-11].

Chez la vache gestante, les concentrations d'œstrogènes restent faibles tout au long de la gravidité, sauf le sulfate d'œstrone dont le taux s'élève à partir du 20<sup>e</sup> jour ; par conséquent, leur dosage ne présente guère d'intérêt dans le cadre de l'établissement ou de la confirmation du diagnostic de gestation.

Chez les ruminants en général et chez les bovins en particulier, nombreuses ont été les tentatives de mise en évidence d'une hormone gonadotrope chorionique de type hCG ou PMSG. La gonadotropine chorionique humaine (hCG) est une hormone similaire à la LH hypophysaire. Sa concentration s'élève entre le 8<sup>e</sup> et le 10<sup>e</sup> jour après la conception, atteignant des niveaux élevés dans le sang et dans l'urine, de sorte que son dosage ou sa détection par un test immunologique simplifié permet un diagnostic précoce de la grossesse. Les concentrations de l'hCG sont élevées durant le premier trimestre de la grossesse, puis diminuent et demeurent moyennes jusqu'à la parturition.

La gonadotropine chorionique équine (eCG), encore appelée PMSG (*pregnant mare serum gonadotropin*), est une hormone glycoprotéique similaire à la LH équine ; elle est sécrétée par les cupules endométriales à partir du 38<sup>e</sup> ou du 40<sup>e</sup> jour après la fécondation. Sa concentration s'élève considérablement dans le sang, mais elle n'est ni excrétée ni sécrétée dans l'urine, en raison de sa taille et surtout de sa charge liée à sa haute teneur en acide sialique. Aux environs du 120<sup>e</sup> jour de gestation, la concentration de l'eCG diminue, pour redevenir indétectable durant la deuxième moitié de la gravidité.

Chez les bovins, aucune hormone équivalente à l'hCG ou à la PMSG n'a été caractérisée [12]. Si le placenta des ruminants exprime peu de gonadotropine chorionique, il sécrète, en revanche, plusieurs membres d'une famille de glycoprotéines du groupe des protéases aspartiques, protéines connues sous le nom de PSPB (*pregnancy specific protein B*) [13, 14] et de PAG (*pregnancy associated glycoprotein*) [15]. Le dosage de ces protéines est utilisé pour le diagnostic de la gestation en France dans les laboratoires de l'UNCEIA et en Belgique au laboratoire de Marloie. Les limites de la méthode résident dans la montée lente des concentrations entre le 25<sup>e</sup> et le 60<sup>e</sup> jour après la conception et sa disparition lente après parturition.



**Figure 2.** Conceptualisation des interactions entre l'ovaire, l'endomètre et le conceptus en début de gestation chez les ruminants. bTTP-1: protéine trophoblastique bovine-1; bTTP-1-R: récepteur à la trophoblastine; ADN: acide désoxyribonucléique; EPSI: inhibiteur de la synthèse endométriale de prostaglandines; ARNm: E2-R: récepteur à l'œstradiol; ARNm: acide ribonucléique messager; PG: prostaglandines; PGF2 $\alpha$ : prostaglandines F2 $\alpha$ ; ARNr: acide ribonucléique ribosomal; Ocyt-R: récepteur à l'ocytocine. (d'après Thatcher *et al.* [20], reproduit avec l'autorisation des auteurs et de la revue *Theriogenology*)

**Figure 2.** Conceptualisation of the interaction between the ovary, the endometrium and the conceptus during early pregnancy in ruminants.

Des protéines analogues existent dans les autres espèces de ruminants domestiques (ovins, caprins) et sauvages (daims, cervidés) [14]. Cependant, pour conférer aux dosages un maximum de spécificité et de sensibilité, il importe de purifier la protéine car sa séquence varie sensiblement d'une espèce à l'autre.

## Dosages hormonaux et pathologies

Le dosage des protéines associées à la gestation permet des études sur la mortalité embryonnaire tardive et l'avortement, en vue d'en déterminer la fréquence et l'époque en relation avec l'incidence de pathologies telles que l'anaplasmose, la brucellose, la trypanosomiase et autre maladie affectant le déroulement de la gestation. Nous collaborons à de telles études en réalisant les dosages de PAG ou en fournissant les réactifs nécessaires aux dosages.

Les dosages hormonaux ont permis de préciser les diagnostics d'acyclicité chez

les bovins et, plus précisément, les diagnostics d'œstrus saisonnier et d'œstrus du post-partum [6, 16] en fonction du climat, de la race et des conditions d'exploitation. Cependant, de nombreux prélèvements de sang sont le plus souvent nécessaires pour établir des profils précis.

## Dosages hormonaux et contrôle de la reproduction

Les méthodes de synchronisation et d'induction de l'œstrus ainsi que la technique de superovulation sont en extension. Elles ont été utilisées très intensivement dans des élevages caractérisés par une composition génétique adaptée aux exigences de production. De tels schémas de maîtrise de l'œstrus, de l'ovulation ou de la superovulation impliquent l'injection d'hormones gonadotropes telles que l'hCG, le PMSG ou les gonadotropines hypophysaires. L'injection systématique et répétée de celles-ci fait apparaître chez les femelles

une résistance progressive au traitement, suite à la production d'anticorps antigonadotropine. Grâce à une collaboration avec l'INRA de France et au développement d'une méthode radiométrique adaptée [17], nous avons mis en évidence des anticorps anti-PMSG chez les chèvres, les bovins et les lapins ayant reçu des injections répétées de cette hormone [18, 19].

## Conclusions et perspectives

Malgré des investissements considérables en personnel et en éducation dans bien des pays, de tels dosages sont relativement peu utilisés dans la gestion des élevages bovins. D'abord réalisés par la méthode radio-immunologique, ils ont été progressivement transformés (suite aux contraintes liées à l'utilisation d'isotopes) par les méthodes immuno-enzymatiques. Le remplacement du tube coâté (ou de l'immunoprécipitant) par une tigelette (à l'instar de ce qui se fait couramment pour la mise en évidence du glucose dans l'urine) permettrait de simplifier la technique, de sorte qu'elle puisse se réaliser à la ferme en un temps très court.

Parallèlement aux dosages *in vitro*, on a développé des techniques d'imagerie médicale, en particulier l'ultrasonographie. La palpation rectale est importante chez les espèces de grande taille (telles que les bovins, les équins et les camélidés) où elle permet des diagnostics de cyclicité et de gestation (dès la 7<sup>e</sup> semaine chez la vache, dès la 4<sup>e</sup> semaine chez la jument). Les structures présentes à la surface de l'ovaire (comme le follicule pré-ovulatoire ou le corps jaune) sont identifiées ou suivies avec une grande précision et de façon très simple. Associée au cathétérisme du col utérin, la palpation rectale facilite l'insémination artificielle ainsi que la récolte ou le transfert d'embryons.

Dans le cadre de l'agriculture extensive, l'avenir du diagnostic en relation avec la reproduction sera probablement lié à celui des tests visant à détecter ou à quantifier les niveaux d'incidence de maladies microbiennes ou parasitaires ■

## Références

1. Beckers JF, Ballman P, Ectors F, Derivaux J, transmise par Herliant M. Le dosage radio-immunologique de la progestérone plasmatique chez la vache. *C R Acad Sc Paris* 1975; 280: 335-8.

# Production laitière : problématique et services vétérinaires en Amérique du Nord

Émile Bouchard, Michel Bigras-Poulin

2. McCracken JA, Glew ME, Goding JR, Baird DT. Prostaglandin F2 identified as a luteolytic hormone in sheep. *Nature New Biology* 1972 ; 238.
3. Mariana JC, Millier C. Application de quelques modèles de dynamique des populations à l'étude de la folliculogénèse ovarienne. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 1977 ; 17 : 193-206.
4. Robertson HA, Sarda IR. A very early pregnancy test for mammals : its application to the cow, ewe and sow. *J Endocr* 1971 ; 49 : 407-19.
5. Thimonier J. Diagnostic précoce de la gestation par l'estimation du taux de progestérone plasmatique chez la brebis, la vache et la jument. *Rec Med Vet* 1973 ; 149 : 1303-18.
6. Derivaux J, Beckers JF, Ectors F. L'œstrus du post-partum. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 1984 ; 53 : 215-29.
7. Thibier M. Stéroïdes sexuels et diagnostic de gestation chez les bovins. Test en ferme. *Reprod Nutr Develop* 1988 ; 28 (6B) : 1747-52.
8. Oltner R, Eqvist L-E. Changes in plasma progesterone levels during storage of heparinized whole blood from cow, horse, dog and pig. *Acta Vet Scand* 1982 ; 23 : 1-8.
9. Delahaut P, Beckers JF, Ectors F. Diagnostic précoce de gestation chez les différentes espèces animales. *Ann Med Vet* 1978 ; 122 : 205-8.
10. Delahaut P, Beckers JF, Ectors F. Effet de l'azide de sodium sur la dégradation de la progestérone dans les échantillons de sang total chez les bovins. *Ann Med Vet* 1979 ; 123 : 567-72.
11. Reimers TJ, McCann JP, Cowan RG. Effects of storage times and temperatures on T3, T4, LH, Prolactin, Insulin, Cortisol and progesterone concentrations in blood samples from cows. *J Animal Science* 1983 ; 57 : 683-91.
12. Xie S, Lom BG, Nagel RJ, Beckers JF, Roberts RM. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophoblast. *Biol Reprod* 1994 ; 51 : 1145-53.
13. Butler JE, Hamilton WC, Sasser RG, Ruder CA, Hass GM, Williams RJ. Detection and partial purification of two bovine pregnancy. *Biol Reprod* 1982 ; 26 : 925-33.
14. Sasser RG, Ruder CA, Ivani KA, Butler JE, Hamilton WC. Detection of pregnancy by radioimmuno assay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentration during gestation. *Biol Reprod* 1986 ; 35 : 936-42.
15. Zoli PA, Beckers JF, Wouters-Ballman P, Closset J, Falmagne P, Ectors F. Purification and characterization of a bovine pregnancy associated glycoprotein. *Biol Reprod* 1991 ; 45 : 1-10.
16. Beckers JF, Wouters-Ballman P, Ectors F, Derivaux J. Induction de l'œstrus chez les génisses en œstrus fonctionnel. *Ann Med Vet* 1978 ; 122 : 597-605.
17. Berson SA, Yalow RS, Bauman A, Rothschild MA, Nuverly K. Insulin-<sup>125</sup>I metabolism in human subjects : demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J Clin Invest* 1956 ; 35 : 170-90.
18. Remy B, Baril G, Vallet JC, et al. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone ? *Theriogenology* 1991 ; 36 : 389-99.
19. Baril G, Remy B, Vallet JC, Beckers JF. Effects of repeated use of progestagen-PMSG treatment for estrus control in dairy goats out of breeding season. *Reprod Dom Anim* 1992 ; 27 : 161-8.
20. Thatcher WW, Macmillan KL, Hansen PJ, Drost M. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 1989 ; 31 : 149-64.

**L**e rôle joué par le médecin vétérinaire auprès de l'industrie laitière en Amérique du Nord s'est modifié au cours des vingt dernières années et il prend un nouvel aspect pour le futur. L'introduction de nouvelles techniques (transfert d'embryons, développement de tests diagnostiques, de vaccins et de substances pharmacologiques issus de la biotechnologie, informatique) a modifié l'environnement du troupeau. En particulier, la pression exercée par l'industrie laitière et les producteurs qui visent une rentabilité accrue par une meilleure gestion des ressources, a amené le médecin vétérinaire à revoir son rôle auprès de cette industrie. En plus de contrôler les maladies contagieuses et de soigner les animaux malades, il doit agir comme consultant en gestion de santé et de production, en se servant des nouvelles technologies et en puisant dans les sciences de l'épidémiologie et dans l'informatique pour compléter et soutenir son approche. Le suivi en reproduction, qui a servi de modèle pour l'intégration de nouvelles technologies, fait désormais partie d'une approche plus globale des questions d'élevage.

É. Bouchard, M. Bigras-Poulin : Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada.

Tirés à part : É. Bouchard

## Problématique

### Modification des exploitations laitières

Les exploitations laitières sont en mutation en Amérique du Nord. Le nombre total de fermes est en déclin aux États-Unis, mais les proportions de grosses fermes et de petites fermes sont en augmentation [1]. Le nombre de troupeaux en 1990 (194 000 troupeaux) représente 34 % de ce qu'il était en 1970 (tableau 1). Au Canada, en raison d'un système de quotas réglementant l'offre et la demande, la production est stable, mais on note une diminution marquée du nombre de fermes laitières. Cela est dû en partie à une augmentation de la production moyenne par vache et à un accroissement de la taille des exploitations. Les consultants doivent dès lors définir de nouvelles stratégies et modifier les services offerts à ces exploitations en changement.

### Amélioration génétique du bétail

La production moyenne par vache ne cesse d'augmenter en Amérique du Nord (tableau 2). Aux États-Unis, on note une augmentation de 3 000 kilos par vache et par lactation de 1960 à 1990. Les troupeaux à forte production atteignent une moyenne de 13 600 kilos par lactation. En plus de l'amélioration de la gestion, une partie de cette augmentation est due