

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET  
INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES  
DEPARTEMENT DE SANTE ANIMALE**

**PROJET DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
DOCTEUR VETERINAIRE**

**SOUS LE THEME**

**LA MORTALITE EMBRYONNAIRE  
CHEZ LES BOVINS "ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE"**

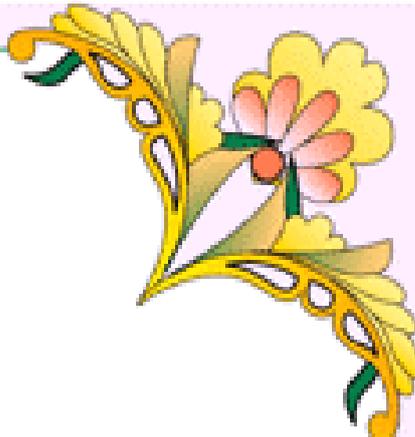
**PRESENTE PAR:**

**Mr.: MEKKAOUI Kada  
Mr.: BOUMEFTAH Kada**

**ENCADRE PAR:**

**Dr.: AMIROUCHE Morsli**





## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chers grands parents*

*A mes parents, pour avoir toujours cru en moi et m'avoir permis de réaliser ces longues études pour exercer le métier que j'avais choisi. Je ne vous le dirai jamais assez : merci pour tout !*

*A mes frères et mes sœurs*

*À mes oncles, mes tantes et leurs familles*

*A tous mes proches et à tous mes amis*

*A tous mes frères de l'institut Vétérinaire sans exception.*

**MEKKAOUI ET BOUMEFIAH**





# Remerciement

*Nous tenons à remercier notre responsable de projet*

*Mr*

*AMIROUCHE pour son encadrement, sa disponibilité, ses conseils avisés et son suivi attentif.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres d'examineurs d'avoir accepté d'examiner nos travail.*

*Que Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à toute personne ayant participé de près ou de loin dans l'élaboration de ce*

*travail, trouve aussi l'expression de mes très vifs remerciements*



# **SOMMAIRE**

## **Introduction**

### **1. Chapitre 1 : Physiologie embryo-maternelle**

1.1. Étapes du développement embryonnaire .....	02
1.1.1. Phase pré-implantatoire (vie libre).....	02
1.1.2. Implantation.....	06
1.1.3. Suite du développement embryonnaire.....	07
1.2. Reconnaissance maternelle de la gestation.....	08
1.2.1. Maintien du corps jaune.....	08
1.2.2. Tolérance immunologique de l'embryon.....	09
1.3. Besoins évolutifs et capacité d'adaptation de l'embryon.....	10

### **2. Chapitre 2 : Facteurs associés à la mortalité embryonnaire**

2.1. Facteurs gamétiques et embryonnaires.....	12
2.1.1. Facteurs liés aux gamètes.....	12
2.1.2. Causes génétiques.....	14
2.1.3. Sexe de l'embryon.....	16
2.1.4. Nombre d'embryons.....	16
2.1.5. Schéma récapitulatif.....	17
2.2. Facteurs maternels.....	17
2.2.1. Rôles de la progestérone.....	17
2.2.2. Anomalies de cyclicité post-partum .....	21
2.2.3. Rang de lactation.....	23
2.2.4. Anomalie du mécanisme de reconnaissance maternelle de la gestation.....	25
2.2.5. Maladies péri-partum.....	27
2.2.6. Composition du milieu utérin.....	29
2.2.7. Protocole d'insémination.....	30
2.2.8. Protocoles de synchronisation.....	32
2.2.9. Re-synchronisation des vaches vides.....	34
2.3. Facteurs extérieurs.....	35
2.3.1. Stress dû à la chaleur.....	35
2.3.2. Alimentation.....	42
2.3.3. Production laitière.....	48
2.3.4. Recours à la FIV et au TE.....	50
2.3.5. Le diagnostic de gestation par palpation transrectale et ses effets.....	51
2.3.6. Effet troupeau.....	52
2.3.7. Effet race.....	53
2.3.8. Schéma récapitulatif.....	55
2.4. Conclusion.....	55

### ***3. Chapitre 3 : Diagnostic et stratégies de lutte de la mortalité embryonnaire***

3.1. Méthodes de contrôle de la gestation et des mortalités embryonnaires chez les bovins ....	56
3.1.1. Surveillance des chaleurs.....	57
3.1.2. Dosage de la progestérone ou diagnostic de non gestation.....	58
3.1.3. Dosage de la PSPB (pregnancy spécifique protein B).....	59
3.1.4. Utilisation conjointe des dosages de progestérone et de PSPB et différentes situations après insémination artificielle correspondantes.....	60
3.1.5. Diagnostic échographique.....	61
3.1.6. Palpation transrectale.....	62
3.1.7. Conclusion sur les méthodes de contrôle.....	63
3.2. Stratégies pour améliorer la survie embryonnaire.....	64
3.2.1. Augmenter les concentrations en progestérone.....	64
3.2.2. Renforcement du signal embryonnaire.....	66
3.2.3. Inhibition de la synthèse de PGF2a.....	66
3.2.4. La somatotropine bovine (bST).....	66
3.2.5. Atténuation du développement folliculaire pendant la phase lutéale.....	67
3.2.6. Pré-synchronisation pour optimiser les protocoles.....	68
3.2.7. Débuter précocement les protocoles GPG de re-synchronisation.....	68
3.2.8. Nutrition.....	70
3.2.9. Prévention contre les effets d'une augmentation de température.....	72
3.2.10. Conclusion sur les stratégies de lutte.....	73

### **Conclusion**

## Liste des figures

<b>Figure1-1</b> : Évolution géographique et chronologique de renbryon (d'après Y. Ménézo).....	03
<b>Figure1-2</b> : Stades du développement embryonnaire pré-implantatoire.....	04
<b>Figure1-3</b> : Mise en route du génome embryonnaire ou MZT (d'après Piko et Clegg [61]).....	05
<b>Figure1-4</b> : Éclosion du blastocyste (d'après Y. Ménézo).....	06
<b>Figure1.5</b> : Paramètres à la variation desquels l'embryon est sensible.....	11
<b>Figure2.1</b> : Facteurs gamétiques et embryonnaires.....	17
<b>Figure2.2</b> : Probabilité de réussite à l'IA en fonction de l'IVIAI (Barbat [2]).....	30
<b>Figure2.3</b> : Influence de l'IVIAI sur les paramètres de reproduction (d'après Humblot [73]).....	32
<b>Figure2-4</b> : Influence de la chaleur sur les paramètres de reproduction (d'après Ryan [26]).....	38
<b>Figure2.5</b> : Relation note d'état/production laitière/ME (d'après Humblot [73])...	44
<b>Figure2.6</b> : Relation entre la quantité et la nature des matières azotées et la reproduction (d'après Enjalbert [30]).....	46
<b>Figure2.7</b> : Influence du ratio Concentrés/Matière sèche totale sur les paramètres de la reproduction (d'après Humblot [73]).....	47
<b>Figure2.8</b> : Mortalité embryonnaire et INEL (d'après les pourcentages de Humblot [73]).....	49
<b>Figure2.9</b> : Évolution du TRIAI par race et rang de lactation (Barbat [2]).....	54
<b>Figure2.10</b> : Facteurs extérieurs.....	55
<b>Figure3.1</b> : Profils des concentrations en PSPB lors de gestation normale et de MET (d'après Humblot [73]).....	60

## *Liste des tableaux*

**Tableau3-1** : correspondance entre différentes situations après IA et les résultats des dosages de progestérone et PSPB (**Humblot[74]**).....61

**Tableau3-2** : paramètres alimentaires a controler lors de mortalité embryonnaire pour éviterl'apparition des nouveaux cas au sein du troupeau (**d'après Enjalbert[30]**).....70

## Glossaire

<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>BHV</b>	Bovine Herpesvirus
<b>bST</b>	bovine Somatotropin
<b>BVD</b>	Bovine Virus Diarrhea
<b>Cenpc</b>	Centromere protein C
<b>Cox</b>	Cyclo-oxygénase
<b>CSF</b>	Colony Stvmulating Factor
<b>eCG</b>	equine Chorionic Gonadotropin
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EPSI</b>	Endometrial Prostaglandin Synthetase Inhibitor
<b>FSH</b>	Follicle Stvmulating Hormone
<b>GH</b>	Growth Hormone
<b>G11R</b>	Gonadotropin Releasing Hormone
<b>GSH</b>	Glutathion réduit
<b>hCG</b>	hurrian Chorionic Gonadotropin
<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>IGF</b>	Insulin-like Growth Factor
<b>IL</b>	Interleukine
<b>INF</b>	Interferon
<b>INFr</b>	Interferon tau
<b>LIF</b>	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
<b>LH</b>	<i>Luteinizing Horrnone</i>
<b>MZT</b>	<i>Maternal To Zygote Transition</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>PAG</b>	<i>Pregnancy Associated Glycoprotein</i>
<b>hPAG</b>	<i>bovine Pregnancy Associated</i>
<b>PGF2a</b>	Prostaglandine F2alpha
<b>PGE2</b>	Prostaglandine E2
<b>PIBF</b>	<i>Progesterone Induced Blocking Factor</i>
<b>PRID</b>	<i>PRogesterone Intravaginal Device</i>
<b>PSPB</b>	<i>Pregnancy Specific Protein B</i>
<b>PSP60</b>	<i>Pregnancy Serum Protein 60</i>
<b>TGF</b>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<b>UMP</b>	Uridine Monophosphate
<b>ZGA</b>	<i>Zygote Genomic Activation</i>

## Notation

<b>CMH</b>	Complexe Majeur d’Histocompatibilité	
<b>FIV</b>	Fécondation <i>in vitro</i>	
<b>GPG</b>	Protocole de synchronisation GnRH/PGF2a/GnRH	
<b>IA</b>	Insémination Artificielle	
<b>INEL</b>	INdex Économique Laitier	
<b>ISU</b>	Index de Synthèse UPRA	
<b>IVIA1</b>	Intervalle vêlage/insémination première	
<b>J</b>	Jour	
<b>MAT</b>	Matière Azotée Totale	
<b>ME</b>	Mortalité Embryonnaire	
<b>MEP</b>	Mortalité Embryonnaire Précoce	
<b>MET</b>	Mortalité Embryonnaire Tardive	
<b>MS</b>	Matière Sèche	
<b>NF</b>	Non Fécondation	
<b>P4</b>	Concentration en progestérone du lait	
<b>PP</b>	Post-partum	
<b>TE</b>	Transfert Embryonnaire	
<b>TRIAI</b>	Taux de réussite en 1 <sup>ere</sup> insémination	
<b>UNCEIA</b>	Union Nationale des Coopératives agricoles d’Elevage et d’insémination	Animale
<b>UPRA</b>	Unité nationale de sélection de Promotion de la RAce	
<b>VLHP</b>	Vache Laitière Haute Productrice	
<b>vs</b>	versus	

# Introduction

## Introduction

L'amélioration de la fertilité demeure un des objectifs prioritaires pour optimiser le potentiel de reproduction et donc de production de l'élevage.

Dans les troupeaux de vaches laitières, le pourcentage de vêlages qui suivent une insémination première est proche ou inférieur à 50%. Ainsi, sur 100 vaches ou génisses en première insémination, 50 d'entre elles seulement donneront naissance à un veau vivant [15], [73]. **Ledoux et al. [19]** précisent qu'en France, près de 2/3 des inséminations premières chez la vache laitière multipare Prim'Holstein (64%) sont suivies d'une remise à la reproduction. Les pertes rencontrées sont donc élevées et relèvent schématiquement de quatre grands syndromes que constituent l'absence de fécondation, la mortalité embryonnaire, l'avortement et l'accouchement prématuré.

Dans les années 80, le taux de fécondation ressortant des études était élevé : entre 71% et 100% pour **Diskin [66]**, et même presque 100% chez des génisses en première insémination pour **Ayalon [70]**, Chez les animaux infertiles, c'est-à-dire inséminés plus de deux" fois [15], ce pourcentage est par contre compris entre 60 et 72%. De plus, les avortements et accouchements prématurés ne représentent de quelques pourcents. Au vu de ces considérations, la mortalité embryonnaire était alors considérée comme la source principale des pertes en matière de reproduction. Ces affirmations sont aujourd'hui à reconsidérer car ces valeurs du taux de fécondation proviennent d'études anciennes réalisées sur des échantillons faibles [70], [66]. Dans une étude récente, **Ledoux et al. [19]** constatent que le TRIAI serait seulement de 48%. Les pertes lors de la fécondation seraient alors quantitativement les plus importantes (24%) alors que la MEP et la MET auraient des importances quantitatives proches (13%) et 15% respectivement).

En France mais aussi dans d'autres pays européens ainsi qu'aux Etats-Unis, un déclin de la fertilité des vaches Prim'Holstein a été constaté au cours des 10 dernières années. Cette baisse du TRIAI est proche de 1% par an [2]. Tout au long de cette décennie, l'amélioration génétique s'est, concentrée sur l'augmentation de la production laitière. Ainsi, une vache produit aujourd'hui 105 Kg de lait en plus par an qu'il y a 10 ans [10]. Dans la race Prim'Holstein, il a été démontré que l'amélioration génétique axée sur l'augmentation de production laitière est responsable de 30% à 50% du déclin du taux de réussite en première insémination [2], Bien qu'une part de ce déclin soit la conséquence d'une expression des chaleurs de plus en plus discrète, d'inséminations au mauvais moment, ou d'échecs de fécondation, une grande partie de la chute du taux de gestation reste due à la mortalité embryonnaire (28% pour un TRIAI de 48%, [19]).

Dans une première partie, la physiologie embryo-maternelle sera développée après avoir donné

quelques définitions préliminaires et fréquences de mortalité embryonnaire. Puis dans une deuxième partie, les facteurs associés à la mortalité embryonnaire seront étudiés. Pour finir, les méthodes de contrôle de la mortalité embryonnaire et les stratégies de lutte seront détaillées.

**CHAPITRE 1 :**  
***PHYSIOLOGIE EMBRYO-***  
***MATERNELLE***

**Définitions préliminaires :**

La période embryonnaire est classiquement définie comme la période comprise entre la fécondation et la fin de l'organogenèse soit le 42<sup>ème</sup> jour de gestation environ [95]. Cette date considérée comme marquant la fin de la période embryonnaire est estimée au 45<sup>ème</sup> jour par **Ayalon** [70]. Il précise également que plusieurs auteurs incluent dans cette période les échecs de fécondation au même titre que les échecs après la fécondation. On distingue deux types de mortalité embryonnaire : la mortalité embryonnaire précoce (MEP) et la mortalité embryonnaire tardive (MET). La MEP correspond à une perte embryonnaire se produisant avant le 16<sup>ème</sup> jour après l'insémination. Cliniquement, on observe un retour en chaleurs de l'animal 18 à 24 jours après la mise à la reproduction. La durée normale du cycle n'est donc pas modifiée. La MEP n'est pas différenciable de la non fécondation pour le praticien. La MET correspond à une perte embryonnaire ayant lieu entre le 16<sup>ème</sup> et le 42<sup>ème</sup> jour après l'insémination. Cliniquement, on constate un retour en chaleurs décalé entre 25 et 35 jours après l'insémination .

**Fréquences :**

La fréquence de mortalité embryonnaire précoce (MEP) ou non fécondation (NF) est comprise entre 20,5 et 43,6% du nombre total d'inséminations (en race Normande en 2000 et en race Prim'Holstein en 2000 respectivement) [73]. La fréquence de mortalité embryonnaire tardive (MET) est plus basse entre 8 et 17,5% (en races Normande et prim'Holstein en 2000 et en race prim'Holstein en 2000 respectivement) [73]. Dans son même article mais sur une étude réalisée en climat tempéré sur des Holstein en France, Humblot [73] aboutit à un pourcentage de MEP de 31,6% et de MET de 14,7% (pour un pourcentage de 57,1% d'échecs en IAI). La fréquence de mortalité fœtale est quant à elle de 2,5 à 5% [71]. Ainsi, la MEP ou NF représente la majorité des échecs de gestation [71], [28], [52], [73]. Cependant, malgré leur fréquence moins importante, les pertes tardives contribuent davantage à la dégradation de la fécondité que les pertes précoces du fait du retard pris pour la remise à la reproduction et du risque de réforme encouru. Dans l'étude de **Grimard et al.** [10] sur la MET en race Prim'Holstein, la fréquence de MET (MET/nombre de vaches inséminées) est estimée à 15,4% ce qui correspond à une incidence (MET/nombre de vaches pleines à J21-24) de 25,2% ce que les auteurs précisent comme étant un pourcentage élevé (peut être dû en partie à des maladies dans le domaine de la reproduction, hypothèse non explorée dans cette étude). Par exemple, dans leur étude ayant pour objectif de quantifier la mortalité embryonnaire tardive et la perte fœtale, **Starbuck et al.** [67] mettent en évidence 11,4% de perte totale entre la 5<sup>ème</sup> et la 9<sup>ème</sup> semaine de gestation dont 7,1% de mortalité embryonnaire tardive entre la 5<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine. Les échecs de fécondation et la mortalité embryonnaire sont tous

deux supérieurs chez les vaches " *repeat-breeders*" <sup>1</sup> par rapport aux vaches normales [70]. En effet, les pertes totales dégradant la fertilité sont deux fois plus élevées que celles de vaches normales environ 5 semaines après l'insémination [70].

## **1.1 Étapes du développement embryonnaire :**

### **Rappels :**

L'ovulation survient chez la vache douze heures après la fin des chaleurs soit environ trente heures après le début de l'œstrus. Il y a expulsion d'un ovocyte bloqué au stade métaphase de la seconde division méiotique. En effet, suite au pic pré-ovulatoire de l'hormone lutéotrope (LH), l'ovocyte a expulsé son premier globule polaire.

La pénétration de l'ovocyte par le spermatozoïde se fait environ deux heures après ovulation. Le 2<sup>me</sup> globule polaire est expulsé à ce moment-là. La fécondation a lieu dans l'ampoule de l'oviducte. L'embryon descendra ensuite vers l'utérus qu'il atteindra vers le 5<sup>me</sup> jour après la fécondation.

Durant sa descente, il sera nourri par les sécrétions tubaires. La fécondation marque le début de la période embryonnaire.

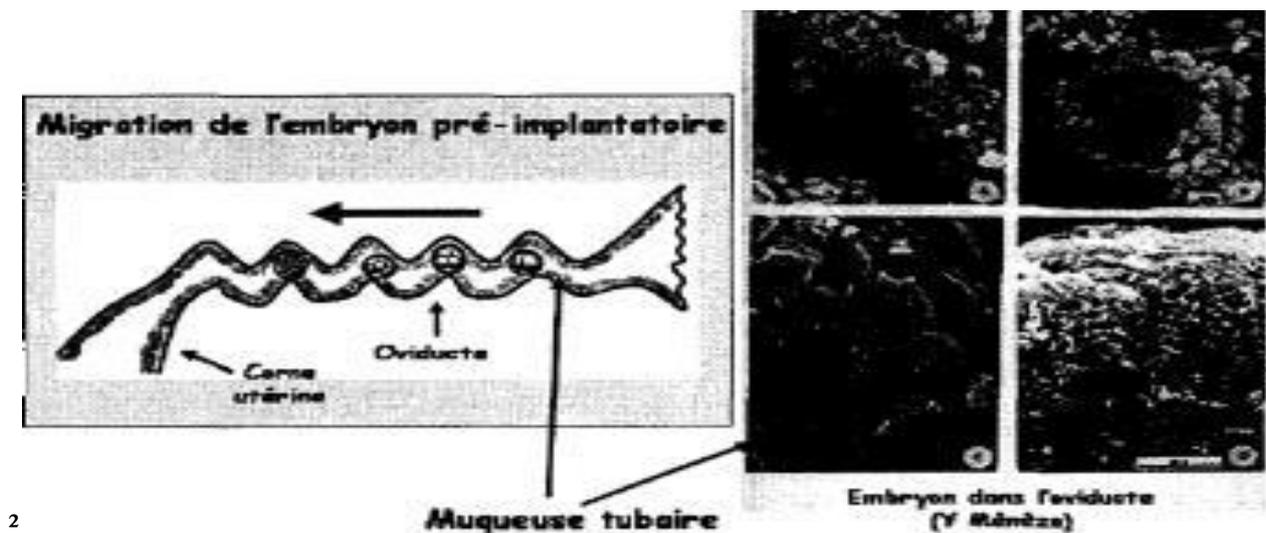
### **1.1.1 Phase pré-implantatoire (vie libre) :**

Chez les ruminants, la durée de vie libre de l'embryon est relativement longue ce qui le rend plus dépendant des sécrétions utérines. Durant cette phase pré-implantatoire, l'embryon migre de l'ampoule tubaire vers l'isthme puis il entre dans l'utérus. La figure 1.2 montre l'évolution géographique de l'embryon lors de son développement pré-implantatoire. A chaque stade du développement correspond un emplacement de l'embryon qui baigne dans des sécrétions dont la composition correspond à ses besoins. Si cette correspondance stade du développement/situation géographique n'est pas respectée l'embryon ne peut survivre. Ainsi, tout embryon qui prend du retard dans son développement est perdu .

Les stades du développement embryonnaire pré-implantatoire sont présentés dans la figure 1.3.

**Premières divisions cellulaires :**

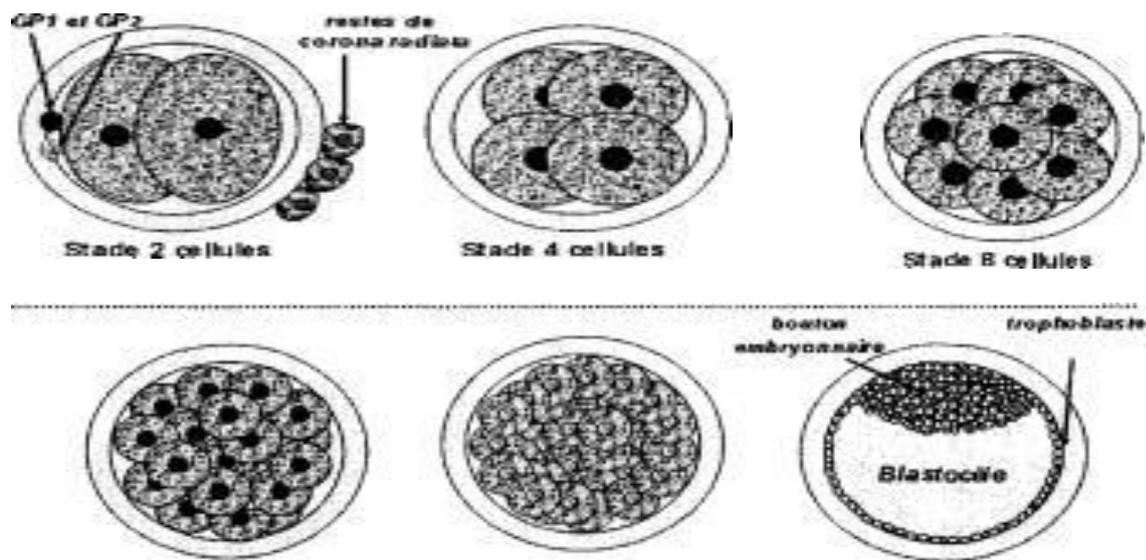
Une trentaine d'heures après la fécondation, il y a formation des deux premiers blastomères. Ce démarrage des divisions cellulaires s'observe plus tardivement *in vitro* (environ 44 heures post fécondation). Cette étape est considérée comme critique pour le développement ultérieur de l'embryon. En effet, une augmentation de quelques heures du délai de reprise de cette division cellulaire entraîne un développement moindre des embryons jusqu'au stade blastocyste [76], [14]. La mise en route du génome embryonnaire se produit à un moment précis du développement embryonnaire (au stade 8-16 cellules chez la vache). Cette étape s'appelle ZGA



2

**Fig. 1-1 :** Évolution géographique et chronologique de l'embryon (d'après Y. Ménézo).

globules polaires



**Fig .1-2 :** Stades du développement embryonnaire pré-implantatoire

[*Zygote Genomic Activation*) ou MZT (*Maternal to Zygote Transition*). Elle a été découverte en premier chez l'embryon de souris par **Piko et Clegg [61]**. Avant cela, l'embryon dépend entièrement des transcrits qui ont été stockés dans l'ovocyte au cours de la maturation ovocytaire. Ainsi, cette période de transition est délicate pour l'embryon puisqu'il dispose de peu de transcrits pour faire fonctionner sa machinerie cellulaire. La MZT est une étape cruciale du développement. Tout retard à la mise en route de la lecture du génome embryonnaire (se traduisant par un décalage de la MZT à droite sur la courbe présentée dans la figure 1.3) met l'embryon en danger. Or, tout retard de développement est pratiquement irrattrapable et l'embryon concerné est donc généralement perdu. Ainsi, lors de travail *in vitro*, les techniciens surveillent le développement des embryons et tout embryon qui prend du retard est éliminé car il mourra et rendra le milieu de culture toxique pour les autres embryons.

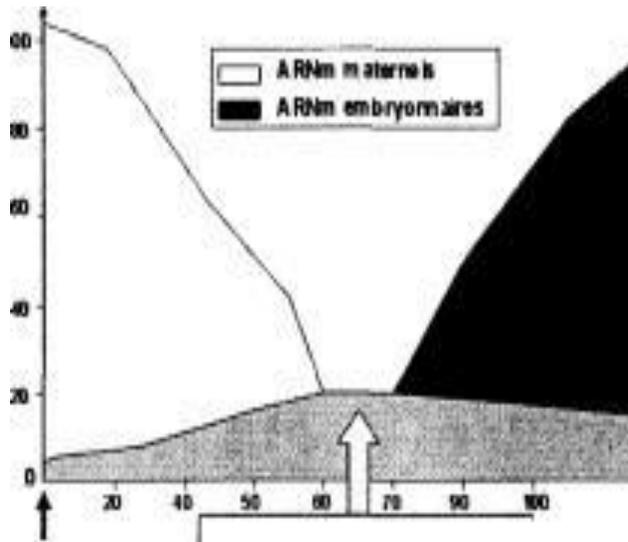


FIG. 1-3 : Mise en route du génome embryonnaire ou MZT (d'après Piko et Clegg [61]).

Ces divisions aboutissent à la formation d'une morula (32-64 cellules).

Le phénomène de compaction qui a lieu 5 à 6 jours après la fécondation (au stade 64 cellules) aboutit à la formation d'une cavité blastocœlique (blastocœle) et à l'expansion du blastocyste. La compaction est également une étape cruciale du développement embryonnaire.

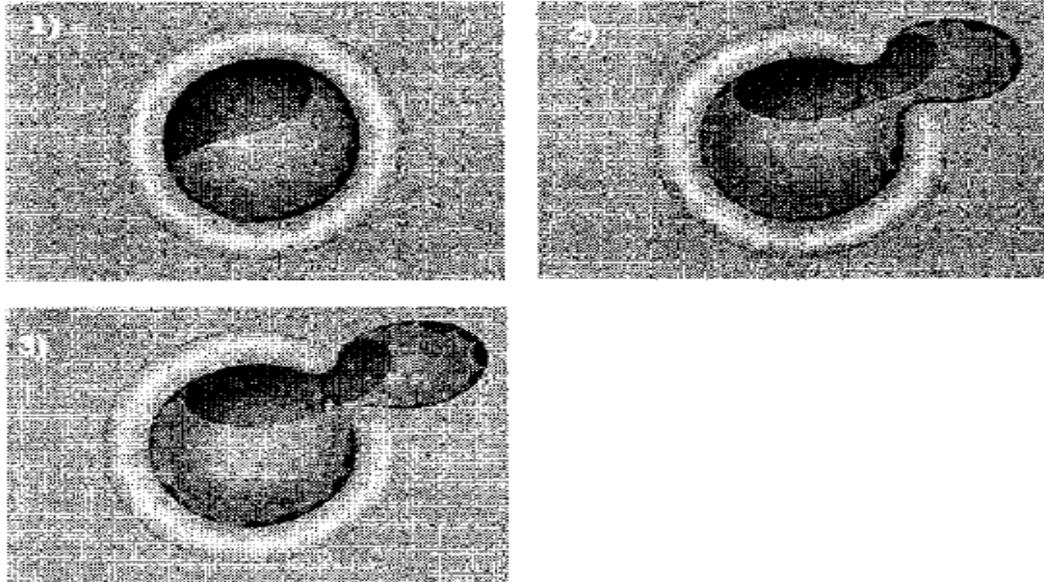
Les divisions suivantes sont asynchrones et aboutissent à la formation de deux populations cellulaires : l'une de petite taille appelée bouton embryonnaire et l'autre de grande taille appelée trophoctoderme ou trophoblaste.

#### Sortie de pellucide et phase d'élongation :

Le blastocyste se compose d'une centaine de cellules entourées par la zone pellucide. L'expansion du blastocyste par accumulation de liquide entraîne une augmentation de 60% de son diamètre. La pellucide s'amincit donc jusqu'à sa rupture. Il s'agit de l'éclosion qui a lieu vers le 9<sup>ème</sup> - 10<sup>ème</sup> jour après fécondation (voir la figure 1.4).

L'éclosion constitue une étape cruciale du développement embryonnaire. *in vitro*, un durcissement de la pellucide empêchant toute éclosion est parfois observé. Cela aboutit à la mort de l'embryon.

À 11 jours le blastocyste se compose de 1000 cellules dont 25% constituent le bouton embryonnaire. La phase d'élongation débute vers le 12<sup>ème</sup>-14<sup>ème</sup> jour. Le trophoblaste atteint une longueur de 2,5 cm en moyenne au 16<sup>ème</sup> jour de gestation [15]. A 19 jours l'embryon est long de 3-4 mm, le tube neural se ferme et le cœur commence à battre [95].



**Fig1-4 : Eclosion du blastocyste (d'après Y .Ménézio)**

### **1.1.2 Implantation :**

#### **Déroulement :**

L'implantation débute vers le 19<sup>ème</sup> jour. Il s'agit d'une interaction entre l'utérus et le trophoblaste aboutissant à la formation des structures placentaires. Elle se déroule en plusieurs étapes : orientation et accolement du blastocyste à l'endomètre, apposition et adhésion. Chez les ruminants, l'allongement du blastocyste est extrêmement important. Ainsi, le blastocyste occupe la totalité de la cavité utérine au moment de l'implantation. Cet allongement participe à la reconnaissance maternelle de la gestation car il permet de mettre en contact le trophoblaste avec la totalité de l'épithélium utérin. Une réduction de la taille des microvillosités des cellules du trophoblaste favorise l'adhésion aux cellules endométriales. L'ancrage définitif se fait par la mise en place d'un système d'interpénétration des microvillosités utérines et des cellules trophoblastiques. Au cours de l'implantation, les cellules trophoblastiques binucléées envahissent l'épithélium utérin et fusionnent avec des cellules utérines formant ainsi un syncytium. Pour que l'implantation réussisse, il doit y avoir une synchronisation précise entre le stade de développement du blastocyste et l'état de réceptivité endométriale. Un asynchronisme pourra entraîner la perte de l'embryon (voir

la partie 2.2.4).

### Régulation :

Les follicules ovariens en croissance produisent des œstrogènes qui permettent de préparer la maturation endométriale. Puis le corps jaune sécrète de la progestérone en quantités croissantes, hormone indispensable à l'implantation. Avant l'implantation, l'embryon émet divers signaux : le facteur d'activation plaquettaire (action vasodilatatrice locale), histamine et prostaglandine E2, *Pregnancy Specific Protein B* (PSPB), *bovine Pregnancy Associated Glycoprotein* (bPAG), *Pregnancy Serum Protein 60* (PSP60). PSPB, bPAG et PSP60 sont les plus précocement détectées dès 20-25 jours de gestation dans le sang. D'après **Gayrard [95]**, leur fonction n'est pas encore élucidée. Leurs concentrations augmentent au cours de la gestation. Elles pourraient avoir un rôle dans les mécanismes implantatoires. Il existerait un contrôle maternel de la sécrétion de PSPB (**Gayrard [95] citant un article non publié de Humblot**). En effet, sa production est différente d'une vache à l'autre mais identique d'une gestation à la gestation suivante sur la même vache. La PSPB est détectée dans le plasma des vaches gestantes à partir du 30<sup>ème</sup> jour. Cependant, chez les bovins, des concentrations persistent longtemps après le part (voir la partie 3.1.3).

### Mécanismes immunologiques :

Au moment de l'implantation, de fortes quantités d'interleukines (IL) sont sécrétées dans l'utérus. Les plus importantes chez les ruminants sont l'IL-1, le *TGF- $\beta$*  (*Transforming Growth Factor*), le CSF (*Colony Stimulating Factor*) et le LIF (*Liver Kinase Inhibitory Factor*) maternel. Cette sécrétion conduit à une régulation de l'adhésion et de l'invasion trophoblastique.

### 1.1.3 Suite du développement embryonnaire :

Vers 22 jours, les vésicules optiques se forment puis les 24<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup> jours, les bourgeons des membres se forment. A 26 jours l'embryon est très fortement incurvé sur lui-même et mesure 8-9 mm de long [95]. Vers 30 jours, l'embryon mesure 12 mm de long, les yeux sont saillants et dépourvus de paupières qui vont se former le 35<sup>ème</sup> jour (l'embryon mesure alors 14-15 mm). La période fœtale commence au 43<sup>ème</sup> jour.

## **1.2 Reconnaissance maternelle de la gestation :**

### **1.2.1 Maintien du corps jaune :**

En l'absence de fécondation, il y a lyse du corps jaune sous l'action de la prostaglandine F2a (PGF2a) produite par l'endomètre vers J16-J17. C'est la lutéolyse. Un rappel du mécanisme de cette lutéolyse est nécessaire pour pouvoir ensuite comprendre le mécanisme anti-lutéolytique permettant le maintien de la gestation.

Après ovulation, des changements morphologiques et biochimiques ont lieu au sein du follicule sous l'action de l'hormone LH. Il y a colonisation de la cavité folliculaire par des vaisseaux sanguins. De plus, les cellules théciales s'hypertrophient, se divisent et envahissent également cette cavité. Progressivement, la synthèse d'œstrogènes diminue tandis que celle de la progestérone augmente jusqu'au milieu du cycle sous l'effet de l'augmentation du nombre de récepteurs à la LH [14]. Le corps jaune se compose de deux populations cellulaires différentes : l'une composée de cellules de petite taille issues de la thèque interne, l'autre composée de cellules de grande taille issues de la granulosa. Les cellules de grande taille sont capables de sécréter de l'ocytocine, de la relaxine et produisent 80% de la progestérone synthétisée par le corps jaune au cours du cycle. Au cours des 10 à 12 premiers jours du cycle (phase de dominance endométriale par la progestérone), la progestérone stimule la synthèse de phospholipides et leur stockage endométrial en vue de leur utilisation ultérieure dans la synthèse de PGF2a. Elle est également responsable de l'inhibition de la synthèse de récepteurs à l'ocytocine par le myomètre [14]. Après cette période, l'utérus récupère petit à petit une sensibilité aux œstrogènes. Cela se traduit par une augmentation du nombre de récepteurs à l'ocytocine [14]. Les œstrogènes favorisent la transformation des phospholipides en acide arachidonique puis en prostaglandines de type F en agissant sur la phospholipase et sur le complexe prostaglandine-synthétase. Le corps jaune sécrète de l'ocytocine qui va interagir avec ses récepteurs et donc stimuler la production de PGF2a. Il existe un système de rétrocontrôle entre l'ocytocine lutéale et la PGF2a endométriale : une libération de pics de PGF2a de faible amplitude par l'endomètre entraîne l'exocytose d'ocytocine par les grandes cellules lutéales. En retour, l'ocytocine libérée provoque la libération de PGF2a endométriale.

Lorsqu'il y a fécondation, la sécrétion de progestérone par le corps jaune persiste. Ce maintien de la fonction lutéale est le résultat de deux mécanismes. D'une part, le conceptus inhibe la production de PGF2a et d'autre part, il diminue la sensibilité du corps jaune à l'action lutéolytique de la PGF2a. Cela est possible grâce à un facteur anti-lutéolytique sécrété par le conceptus appelé trophoblastine ou interféron r (INFr). Le trophoblaste embryonnaire sécrète l'INFr dès le 12<sup>ème</sup>

jour de gestation mais le pic de concentration est obtenu à J15-J17 [13]. Ce facteur entraîne une diminution du nombre de récepteurs endométriaux aux œstrogènes et à l'ocytocine [14]. De plus, il contribuerait à diminuer l'amplitude et la pulsativité de la sécrétion de PGF2a en stimulant la synthèse par l'endomètre d'un inhibiteur de la prostaglandine synthétase, l'EPSI (*Endometrial Prostaglandin Synthetase Inhibitor*) [14]. Cette inhibition ne concernerait que les cellules endométriales synthétisant la PGF2a et non pas celles du stroma qui continueraient à synthétiser la PGE2a. Or, la PGE2 possède un effet lutéotrope qui en antagonisant l'effet de la PGF2a permettrait la diminution de la sensibilité du corps jaune à la PGF2a-. Ceci est bénéfique pour le maintien de la gestation.

Cependant, le maintien de la gestation pourrait ne pas être uniquement dû à l'interféron r. Les follicules non ovulatoires présents au cours de la phase dioestrale sont impliqués dans la lutéolyse. Cette action est médiée par l'œstradiol qu'ils sécrètent. Cette hormone permet la synthèse de récepteurs endométriaux à l'ocytocine. Ainsi l'ocytocine lutéale va pouvoir agir en se fixant sur ses récepteurs ce qui stimule la synthèse de PGF2a. Une injection de GnRH entraîne une diminution de la synthèse d'œstradiol 8 à 12 jours suivant l'injection. Cela serait la conséquence d'une lutéinisation des follicules et/ou de l'induction d'une ovulation [77]. Cette stratégie de lutte contre la mortalité embryonnaire sera développée plus en détails dans la partie 3.2.5.

### **1.2.2 Tolérance immunologique de l'embryon :**

L'embryon est composé à 50% de matériel génétique paternel qui devrait être alors considéré comme "non soi" par l'organisme maternel. Ainsi, il serait susceptible d'être détruit au cours d'une réaction immunitaire à médiation cellulaire faisant intervenir les cellules T tueuses spécifiques ou les cellules NK (Natural Killers). Cependant, il existe une protection de l'embryon contre le rejet immunologique par les tissus maternels.

Les cellules NK utérines produisent des cytokines telles que CSF-1 (*Colony Stimulating Factor 1*) favorisant la croissance placentaire.

De plus, l'antigénicité du trophoblaste est réduite en début de gestation. En effet, chez les ruminants, les antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe 1 ne s'expriment pas sur les gamètes et sur les cellules externes de l'embryon au début du développement embryonnaire (ils s'exprimeront plus tard lorsque les couches externes du placenta se différencient, mais cela restera faible). Ainsi, les cellules T n'identifient pas le trophoblaste et donc l'embryon comme un élément étranger.

Pour finir, il existe une immunosuppression à l'interface embryo-maternelle. Le trophoblaste est capable de neutraliser le complément, indispensable à l'action des anticorps cytolytiques.

Parallèlement, des mécanismes de défense contre un rejet à médiation cellulaire existent. En effet, en présence de fortes concentrations de progestérone à l'interface embryo-maternelle et grâce à l'existence de protéines de surface toxiques pour les lymphocytes T, les cellules du trophoblaste sont résistantes à la lyse par les cellules tueuses et développent une résistance à l'apoptose. Les cellules du placenta sécrètent également des facteurs locaux immunosupresseurs. Il s'agit de l'INFr sécrété au début de l'implantation. Il participe au phénomène d'immunosuppression précoce pré-implantatoire. Chez l'homme, la progestérone permettrait une sécrétion de PIBF (*Progesterone induced Blocking Factor*) par les lymphocytes T inhibant l'action lytique des cellules tueuses. Cependant cela n'a pas encore été mis en évidence chez les ruminants.

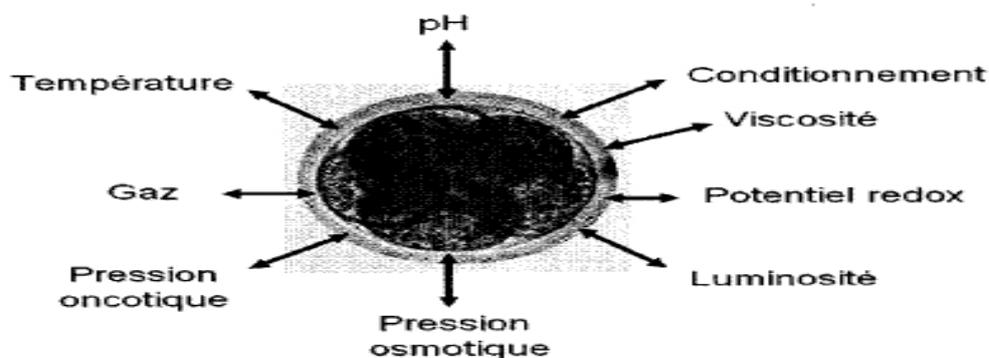
### **1.3 Besoins évolutifs et capacité d'adaptation de l'embryon :**

Les besoins de l'embryon sont différents en fonction du stade de développement. L'embryon est le siège d'un métabolisme considérable. Par exemple, le blastocyste bovin consomme 2 nL d'O<sub>2</sub> par heure soit environ 10 fois son propre volume. Son métabolisme évolue au cours du temps. Ainsi, l'embryon a très peu de besoins en glucose au tout début de son développement mais après la MZT ses besoins en glucose augmentent fortement. L'ajout de glucose au milieu de culture *in vitro* des embryons lors des premiers stades de développement provoque alors de la mortalité embryonnaire. D'autre part, les réserves de l'embryon sont quantitativement peu importantes et il est nourri par diffusion à partir du milieu qui l'entoure. Les sécrétions tubaires puis utérines dans lesquelles il baigne avant l'implantation ont donc une grande importance. Il est alors très vulnérable même s'il a une certaine capacité d'adaptation. Après l'implantation, il est nourri directement à partir du sang maternel et moins de pertes embryonnaires sont alors constatées.

Le milieu maternel qui entoure l'embryon évolue également pour satisfaire le métabolisme de l'embryon. Si ce n'est pas le cas, l'embryon a la faculté de s'adapter à des modifications de son environnement mais de manière limitée. Il peut aussi modifier son environnement pour survivre [77]. En effet, l'embryon est capable d'entraîner des modifications des fonctions endocrine et endométriale maternelles suite à sa sécrétion d'INF r à partir du 15-17<sup>ème</sup> jour de gestation [77]. Avant cette date, très peu de choses sont connues sur la capacité de l'embryon à changer l'environnement maternel. Néanmoins, l'embryon sécrète plusieurs facteurs de régulation durant la période pré-implantatoire. L'embryon bovin possède les transcrits de l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor a*), LIF (*leukemia inhibitory factor*), *basic fibroblast growth factor*, et IGF-I (*Insulin-like growth Factor-I*). Il est probable que ces molécules changent, au moins en partie, l'environnement maternel pendant la première partie de la période

embryonnaire [77].

Cependant, si l'embryon ne parvient pas à s'adapter ou à modifier son environnement, cela peut provoquer un retard de son développement le destinant à une mort certaine. Par exemple, lors de culture *in vitro*, l'embryon est sensible aux variations de pression osmotique. Ainsi, dans un milieu hypo ou hyperosmotique, l'embryon va s'épuiser à lutter en utilisant toute son énergie dans le fonctionnement de ses pompes ioniques dans le but de compenser cette différence osmotique. Il n'aura alors plus d'énergie à consacrer à son développement et prendra du retard ce qui le condamnera. *In vitro*, l'embryon est également sensible à des variations de pH, pression oncotique, luminosité, potentiel re- dox, température, viscosité, gaz et conditionnement. La figure 1.6 répertorie ces différents paramètres.



**Fig1-5 :** Paramètres a la variation desquel l'embryon est sensible

Au final, suite aux constatations faites *in vitro*, il en ressort que l'embryon est capable de survivre à un décalage de 24 heures maximum entre le milieu l'entourant et son stade de développement. Ce décalage toléré de maximum 24 heures est une contrainte lors de transfert embryonnaire au cours duquel tout décalage d'une durée supérieure entre la donneuse et la receveuse entraîne la mort de l'embryon.

**CHAPITRE 2 :**  
***FACTEURS ASSOCIES A***  
***LA MORTALITE***  
***EMBRYONNAIRE***

De nombreux facteurs sont à l'origine de mortalité embryonnaire. Certains sont parfois plus impliqués dans un type de mortalité que dans l'autre. Cependant, il n'est pas possible de mettre en évidence, à partir des données collectées en ferme dans les différentes études, les rôles respectifs des facteurs sur l'absence de fécondation ou la MEP puisqu'aucun test biologique ne permet de les distinguer.

Ces facteurs peuvent être regroupés dans trois grandes catégories : les facteurs gamétiques et embryonnaires, les facteurs maternels et les facteurs extérieurs.

## **2.1 Facteurs gamétiques et embryonnaires :**

### **2.1.1 Facteurs liés aux gamètes :**

Le zygote issu de la fécondation est composé de matériel génétique et non génétique provenant de l'oocyte et du spermatozoïde. L'oocyte apporte beaucoup plus de matériel que le spermatozoïde si bien que le cytoplasme du zygote est largement dérivé de l'oocyte et seules les mitochondries maternelles (et non celles issues du spermatozoïde) sont présentes dans le zygote. Jusqu'au passage du stade 4 à 8 cellules, l'embryon réalise très peu de transcription et est dépendant des transcrits et protéines maternels formés dans l'oocyte (voir la figure 1.3 dans la partie 1.1.1). Étant donné que le zygote dérive des gamètes, il n'est pas étonnant que des erreurs dans la formation ou les fonctions de l'oocyte et du spermatozoïde puissent altérer la survie de l'embryon.

#### **L'oocyte en tant que facteur déterminant :**

On appelle compétence de l'oocyte, le potentiel qu'a un oocyte de donner naissance à un embryon se développant normalement après la fécondation. La compétence de l'oocyte est quantifiée par la proportion d'oocytes se développant avec succès jusqu'au stade blastocyste.

De nombreux facteurs altèrent la compétence de l'oocyte et par là même la survie embryonnaire. Ainsi, les rations composées d'une grande quantité de protéines dégradables sont responsables d'une diminution de la compétence qui passe de 23,2% d'oocytes arrivant au stade blastocyste à seulement 8,8% [77]. De même, une note d'état basse comprise entre 1,5 et 2,5 ramène ce pourcentage à 3,0% contre 9,9% ( $P < 0,05$ ) lorsqu'elle est entre 3,3 et 4 [91]. Après collecte, une primipare aura une proportion de 3,9% d'oocytes donnant des blastocystes contre 10,4% ( $P < 0,05$ ) pour une vache en 3<sup>ème</sup> lactation [91]. Une vache à haut potentiel génétique (calculé à partir des potentiels transmissibles des ascendants) est associée à un pourcentage de 6,8% contre 11,4% ( $P < 0,05$ ) pour un index génétique moyen [77], [91]. De plus, la compétence de l'oocyte est réduite

chez les animaux prépubères [77]. La proportion d'oocytes parvenant au stade blastocyste est plus importante lorsqu'il s'agit d'oocytes provenant de grands follicules en comparaison à des oocytes issus de petits follicules [77]. La chaleur entraîne par exemple une augmentation du nombre de petits follicules [99]. En revanche, **Snijders [91]** ne trouve aucune influence significative de la quantité de lait produit par vache et par an sur la compétence de l'oocyte (9,9% pour 3162 à 3972 Kg contre 10,1% pour 4559 à 5114 Kg,  $P < 0,05$ ). Pour finir, cette proportion est de 17,6% pendant l'été contre 26,2% ( $P < 0,001$ ) en hiver [99]. Elle reste diminuée même si la vache est placée dans un système de refroidissement avec ventilateurs et brumisateurs durant l'été [99]. Le taux de clivage n'est cependant pas modifié par la chaleur [99]. De plus, en été, la composition de la membrane des oocytes et de la granulosa est modifiée [99].

Ces facteurs altèrent la compétence de l'oocyte en affectant directement le développement de l'oocyte ou en empêchant les cellules folliculaires d'accomplir leur rôle. Le follicule transmettrait des informations à l'oocyte lui permettant d'acquérir sa compétence [77]. Ainsi, la compétence de l'oocyte est altérée lors de changements dans la dynamique folliculaire. Par exemple, des cycles avec 2 vagues de croissance folliculaire au lieu de 3 compromettent la fertilité [23]. **Ahmad et al. [69]** affirment au contraire qu'il n'y a aucune différence du taux de gestation que le cycle ait 2 ou 3 vagues. Cela se produit également lors de l'utilisation de protocoles de synchronisation à base de progestagènes. En effet, ces implants sont responsables d'une suppression incomplète de la sécrétion de LH et du développement d'un follicule dominant persistant à durée de vie prolongée [77]. Or, la fertilité des vaches à follicules persistants est diminuée. D'après **Breuel [59]**, un grand follicule pré-ovulatoire, maintenant la dominance pendant une période plus étendue avant le pic de LH, est responsable d'une diminution du taux de conception en comparaison avec un plus petit follicule (36% versus 91%). Les oocytes issus de ces follicules subissent une méiose précoce suite à l'exposition prématurée à des concentrations élevées de LH. Ils présentent également des anomalies morphologiques telles qu'un élargissement de l'espace périvitellin, la présence de vacuoles intracellulaires et un nombre élevé de mitochondries [77]. Enfin, les vaches avec des follicules dominants persistants ont des modifications de leurs protéines tubaires [77]. D'un point de vue génétique, une ségrégation chromosomique impropre est responsable d'incompétence de l'oocyte. Les embryons issus d'oocytes possédant des anomalies chromosomiques (aneuploïdie ou diploïdie) ne parviennent pas à se développer. Le stress consécutif à la chaleur est un des facteurs pouvant causer ces anomalies chromosomiques [77]. D'un point de vue moléculaire, une incapacité de l'oocyte à synthétiser les transcrits maternels (ARNrn) en quantité suffisante pour permettre le développement embryonnaire entraîne de la mortalité embryonnaire.

Un follicule passe du stade follicule primordial au stade follicule pré-ovulatoire en 84 à 85 jours.

Or, un stress capable de provoquer des lésions de l'oocyte lors des premiers stades de croissance folliculaire pourrait altérer la fertilité pendant une période assez importante après l'élimination de ce stress [77].

Ces facteurs sont ici cités uniquement par rapport à leur influence sur la compétence de l'oocyte. Leur impact sur le reste de la période embryonnaire sera détaillé facteur après facteur dans la suite du chapitre.

### **Rôle du spermatozoïde dans la mortalité embryonnaire :**

Le spermatozoïde joue un rôle sur la fertilité non seulement en modifiant le taux de fécondation mais aussi en apportant à l'embryon des caractéristiques conditionnant son aptitude à se développer. Peu de choses sont cependant connues concernant l'impact du mâle sur la mortalité embryonnaire. D'après **Hanzen [15]**, un sperme de mauvaise qualité favoriserait la mortalité embryonnaire précoce. Ce même article de synthèse relate que les résultats des études divergent sur un effet possible du taureau sur le taux de mortalité embryonnaire tardive.

#### **2.1.2 Causes génétiques :**

##### **À l'échelle du gène :**

La reconnaissance maternelle de la gestation fait intervenir de nombreuses protéines sécrétées par l'embryon (INFr) et la mère (récepteurs à l'ocytocine par exemple). Ainsi certaines altérations des gènes codant pour l'INFr se traduisent par une synthèse de protéines insuffisante ou ayant lieu à un stade inadéquate du développement. Cela pourrait entraîner une mauvaise reconnaissance maternelle de la gestation et se solder par la mort de l'embryon [3].

De la même façon, des altérations d'autres gènes impliqués directement dans les mécanismes d'implantation de l'embryon, dans le développement du placenta sont responsables de mortalité embryonnaire chez la souris à titre expérimental. Par exemple, la mutation ciblée du gène *Cenpc* (*Centromere p/yein C*), qui code pour une protéine particulière du centromère des chromosomes de mammifères, induit à l'état homozygote chez la souris un arrêt des divisions cellulaires et de très importantes anomalies morphologiques dès le stade morula [3]. Cela n'a pas encore été démontré dans l'espèce bovine.

Il peut également se produire des mutations "naturelles" dont certaines sont responsables de mortalité embryonnaire. Des gènes léthaux récessifs contribuent aussi à la mortalité embryonnaire. Ainsi, dans l'espèce bovine, c'est le cas notamment de la déficience héréditaire en enzyme uridine-5'-monophosphate (UMP) synthétase. Cette anomalie a été décrite principalement dans la population Holstein Nord Américaine. Environ 2% des Holstein des Etats-Unis sont porteuses d'une forme autosomale récessive du gène. Cette enzyme permet la conversion de l'acide orotique en UMP, précurseurs des nucléotides pyrimidiques [3]. A l'état homozygote, la mutation entraîne la mort de l'embryon avant le 40<sup>ème</sup> jour [3], [77]. La fréquence des porteurs hétérozygotes a augmenté jusqu'à la fin des années 80. Elle diminue depuis la mise en place d'un programme d'éradication.

### À l'échelle du chromosome :

Dans l'espèce bovine, les anomalies chromosomiques seraient responsables de 20% des cas de mortalité embryonnaire et fœtale [3].

Les anomalies de nombre sont rares et non héréditaires. Si elles sont présentes, l'évolution de l'embryon dépendra à la fois du nombre de cellules concernées et de la destination de ces cellules (lignée embryonnaire ou trophoblastique). En effet, un embryon pourra être viable même si une partie des cellules qui le constituent possède un caryotype anormal. Cela est possible si ces cellules anormales sont compensées par des cellules normales ou si elles colonisent les annexes fœtales et non les tissus embryonnaires. Cependant, il y aura tout de même un effet sur le devenir de l'embryon. **Kawarsky et al. [92]** ont à ce propos démontré que des embryons (à J5) issus de fécondation *in vitro* présentent un taux de développement plus lent lorsqu'ils sont haploïdes ou polyploïdes que lorsqu'ils sont mixoploïdes<sup>1</sup> ou diploïdes. Le pourcentage d'embryons mixoploïdes augmente durant la période pré-implantatoire [77]. Dans ces embryons mixoploïdes, certaines cellules sont diploïdes et d'autres renferment une anomalie chromosomique.

Les anomalies de structure sont quant à elles plus fréquentes. Elles concernent le plus souvent des embryons âgés de moins de 7 jours et leur fréquence diminue avec l'âge de l'embryon (preuve indirecte de leur implication dans la mortalité embryonnaire permettant l'élimination d'embryons anormaux). Les remaniements de très loin les plus fréquents sont les translocations Robertsoniennes ou fusion centrique. La translocation 1/29 a été identifiée dans plus de 50 races sur l'ensemble des continents. Environ 10% de la population Blonde d'Aquitaine en France serait porteuse de cette anomalie. Elle est héréditaire. Elle résulte d'une ségrégation anormale des

<sup>1</sup>Mixoploidie : blastomères de ploidies différentes

chromosomes lors de la méiose qui entraîne la formation d'un chromosome submétacentrique issu de la fusion de deux chromosomes non homologues acrocentriques (les chromosomes 1 et 29). Elle s'accompagnerait d'une baisse de 5 à 10% [3], ou de 3 à 8% [15] de la fertilité des individus porteurs hétérozygotes. Les taureaux porteurs de cette translocation sont responsables d'un taux élevé d'embryons aneuploïdes et par là même non viables [92]. Ces remaniements de structure se trouvent généralement à l'état équilibré chez les porteurs. Cependant, la dégradation de la fertilité chez les porteurs hétérozygotes peut être importante. Cela se traduit par de la mortalité embryonnaire accrue dans la descendance des individus porteurs hétérozygotes. Il s'agit davantage de mortalité embryonnaire que de non fécondation [93]. Parmi les gamètes équilibrés produits par les porteurs hétérozygotes, la moitié est porteuse du remaniement. En France, il existe un programme de contrôle systématique des taureaux qui présentent des indicateurs de fertilité dégradés. Actuellement, seul un contrôle chromosomique des reproducteurs est réalisé.

En pratique, la FIV ou les traitements de superovulation (l'eCG davantage que la FSH) contribuent à augmenter les anomalies chromosomiques chez l'embryon.

### **2.1.3 Sexe de l'embryon :**

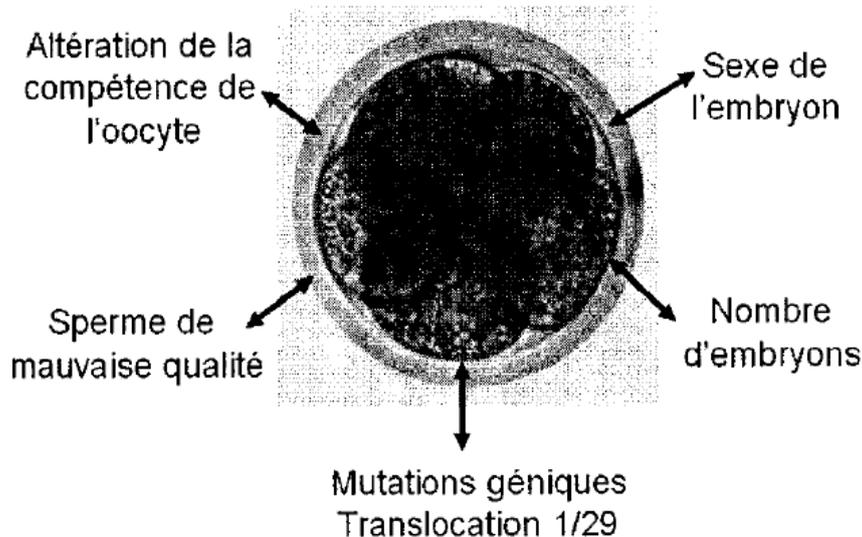
Les embryons de sexe mâle se développeraient plus rapidement que ceux de sexe femelle tout au moins jusqu'au stade blastocyste [15]. Ainsi, lors de stress consécutif à la chaleur, le *sex ratio* serait modifié en faveur du sexe mâle que la gestation soit gémellaire ou non. Ryan et al. constatent en effet que, sous un climat chaud (24-53°C), 54,1% des embryons sexés au 7<sup>ème</sup> jour de gestation sont des mâles contre 45,9% de femelles ( $P < 0,01$ ) [27]. Les embryons mâles tendent à être plus avancés à J7 et ont donc une meilleure viabilité. Etant donné l'absence de différences significatives du *sex ratio* habituellement rapportée chez les veaux nouveaux-nés, cela suppose que les embryons de sexe mâle seraient, par la suite, davantage exposés à une mortalité embryonnaire ou fœtale [94], [15].

### **2.1.4 Nombre d'embryons :**

Chez les bovins, la double ovulation s'observe dans 75% des cas sur le même ovaire [15]. Selon les auteurs, elle s'accompagne ou non, en cas de gestation, d'un plus grand risque de mortalité embryonnaire. Cependant, la mortalité embryonnaire est plus souvent observée si les deux embryons se développent dans la même corne utérine. Cette mortalité s'observe davantage encore si

la *corne droite* est concernée [90].

### 2.1.5 schéma récapitulatif :



**Fig2.1** : Facteurs gamétiques et embryonnaires

## 2.2 Facteurs maternels :

### 2.2.1 Rôles de la progestérone :

La relation entre l'insuffisance progestéronique et la mortalité embryonnaire est encore incomplètement élucidée [14]. Il a été démontré que la concentration systémique en progestérone agit sur le volume des sécrétions utérines, le taux de développement du conceptus, la capacité pour l'embryon à produire le signal anti-lutéolytique (INFr), et le développement du signal lutéolytique (PGF2a) [87].

**Relations progestérone/œstradiol/ocytocine :**

La progestérone inhibe la lutéolyse en diminuant la sensibilité de l'endomètre à l'ocytocine par sa liaison aux récepteurs endométriaux de l'ocytocine. En effet, cette hormone a, entre autres effets, celui de réduire le nombre de récepteurs à l'ocytocine [14]. Ainsi, une diminution de la concentration en progestérone favorise l'apparition plus précoce de récepteurs à l'ocytocine et par conséquent la mise en place du processus de lutéolyse [14]. De faibles concentrations de progestérone induisent une production de PGF2a plus élevée en réponse à l'ocytocine et le signal lutéolytique est donc plus important [71]. De plus, une exposition prolongée à la progestérone entraîne une sous-régulation de ses récepteurs permettant alors une sur-régulation des récepteurs endométriaux à l'œstradiol. L'œstradiol induit à son tour l'apparition des récepteurs à l'ocytocine [88].

**Ayalon [70]** n'observe aucune différence dans le taux d'excrétion urinaire d'œstrogènes mais le niveau plasmatique d'œstrogènes est plus élevé chez les vaches fertiles que chez les infertiles, en particulier 12 heures avant l'œstrus et pendant les 8 jours suivants. Une insuffisance lutéale peut également s'accompagner d'une libération plus importante d'hormone LH, responsable d'une synthèse plus importante d'œstradiol [14]. Celui-ci va alors favoriser le développement utérin de récepteurs à l'ocytocine et la synthèse de prostaglandines.

**Progestérone et interféron r :**

La sécrétion de progestérone par le corps jaune est essentielle dans l'établissement de l'environnement histotrophique permettant la nutrition du conceptus.

Un retard dans l'augmentation post-ovulatoire de la concentration en progestérone compromet le développement du conceptus et par là même sa capacité à sécréter l'INFr. **Darwash et al. [7]** constatent dans ces conditions une diminution du taux de conception. De plus, au moment où le signal anti-lutéolytique est sécrété (J17), si l'embryon est peu développé (longueur <15 mm), l'augmentation de progestéronémie est tardive et la production d'INFr n'est pas détectée dans les liquides utérins. Ce retard dans le développement embryonnaire est souvent observé dans les situations de stress consécutif à la chaleur (voir partie 2.3.1). Les concentrations en progestérone à J4 et J5 (avec JO=accouplement ou insémination) sont liées à celles de l'interféronr dans la lumière utérine à J16 [21].

**Concentration en progestérone et fertilité :**

**Niemann et al. [43]** ont effectué le transfert d'embryons âgés de 7 jours et mesuré la concentration sanguine en progestérone avant le transfert. Ils ont constaté que le meilleur taux de gestation est obtenu pour des concentrations en progestérone comprises entre 2 et 3 ng/mL. Ce taux de gestation diminue lorsque la concentration en progestérone est inférieure à 2 ng/mL ou supérieure à 5 ng/mL. Aucune gestation n'a lieu lorsque cette valeur est inférieure à 1 ng/mL.

**McNeill et al. [87]** ont cherché à préciser la relation possible entre la concentration en progestérone dans le lait et la survie embryonnaire entre JO et J8 (avec JO=jour de l'insémination) d'une part, et entre les concentrations en progestérone dans le lait chaque jour entre JO et J8 d'autre part. Dans leur étude, 37 des 77 inséminations (soit 48%) donnent lieu à des embryons viables entre J30 et J40. Ils constatent tout d'abord qu'il y a une relation linéaire significative ( $P < 0,05$ ) entre la concentration en progestérone dans le lait à J4, J5, J6 et le taux de survie embryonnaire. Cette relation n'est pas significative pour JO, J1, J2, J3, J7 et J8. En ce qui concerne une possible relation entre les concentrations en progestérone aux différents jours, ils rapportent que les concentrations en progestérone dans le lait des jours 4 à 7 ne sont pas associées à celles de JO à J2. Cependant, les concentrations des jours 6 et 7 sont très fortement associées à celles des jours précédents. En effet, les concentrations des jours 4 et 5 prédisent très fortement celles des jours 7 et 6, respectivement. Cette étude démontre une relation réelle entre les concentrations en progestérone dans le lait et la probabilité de survie embryonnaire chez les vaches laitières pour chacun des jours de J4 à J6 après ovulation. Cela va dans le même sens que **Diskin et al. [64]** qui rapportent une relation entre la concentration plasmatique en progestérone et le taux de survie embryonnaire à J7 après insémination. De la même façon, **Darwash et al. [7]** montrent qu'un retard de 1 à 1,7 jours dans l'augmentation de la concentration en progestérone à J5 après insémination est associé à une diminution du taux de survie embryonnaire. De plus, **McNeill et al. [87]** ont révélé une association entre les concentrations en progestérone dans le lait pendant les différents jours de la période embryonnaire précoce. L'existence de ces associations laisse entrevoir une possibilité de détecter, à partir de J4 après insémination, les vaches risquant une perte embryonnaire à cause de concentrations suboptimales en progestérone.

**Chagas e Silva et al. [28]** étudient la relation entre la concentration plasmatique en progestérone et la survie embryonnaire après transfert embryonnaire. Ils ne mettent en évidence aucune différence de concentration en progestérone à JO, J4, J7 entre les vaches présumées gestantes à J21 (concentration en progestérone  $< 1$  ng/mL à JO,  $> 1$  ng/mL à J7 et  $> 2$  ng/mL à J21) et les vaches non gestantes. Cependant, les receveuses ayant de faibles concentrations en progestérone au moment du

transfert (<1,0 ng/mL) semblent avoir un taux de gestation à J45 moindre et le rejet peut être important surtout s'il s'agit d'embryons de haute valeur. De plus, les vaches confirmées gestantes à J45 ont des concentrations en progestérone significativement plus hautes à J21 que celles présumées gestantes mais par la suite déclarées non gestantes. L'auteur suggère alors deux possibilités : soit la mort de l'embryon survient après J21 mais il avait déjà diminué sa sécrétion d'INFr avant J21, soit la mort survient avant J21 et la concentration en progestérone diminue déjà à ce moment. Il ajoute que les concentrations plasmatiques en progestérone à J6 et J7 renseignent sur les chances de poursuite de la gestation chez les vaches mais pas chez les génisses. Il note également une association entre de faibles concentrations en progestérone à J7 et un plus haut taux de mortalité embryonnaire chez les vaches par rapport aux génisses. Cependant, les causes de cette différence de concentration à J7 entre les vaches et les génisses n'ont pas pu être identifiées dans cette étude. Une hypothèse serait que la baisse du taux de gestation après transfert d'embryons congelés chez les vaches et non chez les génisses serait due à un plus faible stimulus lutéotrophique de l'embryon congelé/décongelé sur le corps jaune par rapport à un embryon frais. Cette différence n'est toutefois pas significative dans l'étude.

La concentration en progestérone joue également un rôle important lors de stades un peu plus avancés. Starbuck et al. ont essayé de quantifier la mortalité embryonnaire tardive mais également de mettre en évidence une éventuelle relation entre le maintien de la gestation entre les semaines 5 à 9 et la concentration en stéroïdes dans la circulation périphérique [67]. Il en résulte que le maintien de la gestation à la semaine 7 ou 9 est associé à la concentration en progestérone à la semaine 5 mais pas à celle de la semaine 7. Les femelles présentant de faibles concentrations en progestérone à la semaine 5 sont plus susceptibles de subir de la mortalité embryonnaire. Cela est d'autant plus vrai lorsque cette mortalité se produit avant la semaine 7. Seules 50% des gestations sont maintenues si la concentration en progestérone à la semaine 5 est inférieure ou égale à 2,8 ng/mL [67]. 95% des gestations sont maintenues à la semaine 9 lorsque la concentration en progestérone à la semaine 5 est supérieure ou égale à 6 ng/mL.

Starbuck et al. montrent que le nombre de corps jaunes n'affecterait pas les concentrations en progestérone. Ils constatent même que paradoxalement, dans leur étude, la probabilité de maintien de la gestation est plus faible (72,7%) chez les animaux avec deux corps jaunes que chez ceux possédant un unique corps jaune (90,5%) [67].

Cependant, la majorité des auteurs s'accorde sur le fait qu'une augmentation de la concentration en progestérone par mise en place d'un corps jaune accessoire grâce à l'hCG ou par supplémentation progestéronique constitue une stratégie pour lutter contre la mortalité embryonnaire. Ces stratégies

seront développées dans la partie 3.2,1.

### **2.2.2 Anomalies de cyclicité post-partum :**

#### **Durée du præstrus et conséquence sur la durée de la phase lutéale :**

Les vaches avec des petits follicules ovulatoires ou celles avec des præstrus courts ont un taux de gestation inférieur. Cela est à relier à une exposition réduite à l'œstradiol avant l'ovulation ce qui, d'après **Mann [38]** entraîne une augmentation de la capacité de réponse endométriale à l'ocytocine et une meilleure libération de prostaglandines. Ainsi, 0,25 mg de cypionate d'œstradiol administrés lors de la dernière injection de GnRH (dans le protocole de synchronisation Ovsynch : GnRH à JO, PGF2a à J7, GnRH à J9, IA 12-16h après) tend à augmenter le taux de conception (68% versus 57,5%,  $P=0,14$ ) [1],

Réduire la durée du præstrus entraîne une réduction de la phase lutéale et une diminution du taux de gestation quelle que soit la taille du follicule ovulatoire [52],[68]. Cela s'observe même lorsque les vaches reçoivent un embryon viable au 7<sup>ème</sup> jour de leur cycle dans le cadre du transfert embryonnaire.

La survie embryonnaire diminue lorsqu'un follicule de taille inférieure à 11 mm ovule suite à une induction par la GnRH. Cependant, on n'observe pas d'altération de la survie embryonnaire lors d'une ovulation spontanée [36]. Il est en effet possible que de petits follicules ovulant spontanément soient compétents et sécrètent des quantités adéquates d'œstradiol durant le præstrus alors que lors d'ovulation induite par la GnRH ces petits follicules ne sont alors pas suffisamment matures.

#### **Cycles à courte phase lutéale :**

Lors du 1<sup>er</sup> cycle post-partum, la phase lutéale peut s'avérer plus courte (<12j), ce qui est attribué à un manque d'exposition préalable à la progestérone [29] ou à l'œstradiol au cours du præstrus [38]. **Hernandez-Fonseca et al. [44]** précisent que cette phase lutéale plus courte est due à une sécrétion utérine trop précoce de PGF2a de J4 à J9 après l'ovulation. Le taux de gestation est alors extrêmement faible voire nul si la vache est saillie lors de l'œstrus de ce 1<sup>er</sup> cycle post-partum. Ce faible taux de gestation n'est pas dû à de la non fécondation car les auteurs observent que les ovocytes sont fécondés [44]. En réalité, la proportion d'ovocytes fécondés et transportés dans l'utérus est identique que la vache ait un cycle avec une phase lutéale écourtée ou normale. Les embryons sont perdus au moment où le corps jaune régresse prématurément puisque la progestérone sécrétée par ce dernier est essentielle au maintien de la gestation.

Une thérapie de remplacement à base de progestagènes à des doses efficaces sur des vaches ovariectomisées unilatéralement ou bilatéralement ne permet pas de maintenir une gestation chez des vaches à courte phase lutéale [44]. Ceci ne peut donc pas être utilisé comme solution pour inséminer une vache ayant un cycle à courte phase lutéale.

La perte embryonnaire malgré l'administration de progestagènes chez les vaches à phase lutéale courte a lieu au même moment qu'une augmentation de la sécrétion utérine de PGF2a. Ainsi, PGF2a serait un facteur embryotoxique. Le corps jaune en régression prématurée sécrète de la PGF2a en plus de celle sécrétée par l'utérus [44]. Une inhibition de la synthèse de prostaglandines grâce à de la flunixin méglumine administrée de J4 à J9 améliore la survie embryonnaire chez ces vaches.

Dans leur article [44], **Hernandez-Fonseca et al.** montrent que l'effet embryotoxique du corps jaune en régression précoce n'est pas orienté à l'encontre d'une corne utérine plus que de l'autre. Il a cependant déjà été démontré que la corne ipsilatérale au corps jaune offre un environnement plus favorable pour le développement embryonnaire que la corne controlatérale. Une supplémentation à base de progestérone (100 mg) améliore la survie embryonnaire dans la corne controlatérale mais une thérapie de remplacement à base de dérivés de progestérone (acétate de flurogestone équivalent à 300 mg de progestérone) n'est pas favorable à la survie d'un embryon congelé/décongelé implanté dans la corne controlatérale [44]. Dans leur expérience, des injections de prostaglandines après une supplémentation à base d'un dérivé de progestérone (acétate de flurogestone) sont réalisées : soit 3 fois par jour à J7 et J8 juste après transfert embryonnaire à 37 (expérience 1), soit 3 fois par jour de J5 à J8 avec transfert embryonnaire à J6 (expérience 2). Une baisse du taux de gestation par rapport au témoin (injection de solution saline) n'est observée que chez les vaches de l'expérience 2. Cela signifie que les injections de PGF2a ne diminuent le taux de gestation que lors de la présence d'un corps jaune en régression (simulé dans l'expérience 2 par une 1<sup>ère</sup> série d'injections de PGF2a un jour avant le TE). La durée et le jour initial du traitement à base de prostaglandines sont 2 facteurs importants. Ainsi le corps jaune produirait ou contrôlerait la sécrétion d'un facteur embryotoxique. D'autres auteurs ont montré que l'ocytocine lutéale diminue la viabilité embryonnaire en stimulant la sécrétion utérine de PGF2a.

### **Anœstrus post-partum :**

Entre 11 et 38% des vaches laitières des exploitations avec des vêlages répartis tout au long de

l'année sont en anœstrus<sup>2</sup> à J50/J60 post-partum. Par comparaison, 13 à 43% des vaches laitières en système d'exploitation sur pâturage sont en anœstrus au début de la saison de reproduction [34], Or une concentration en progestérone faible pendant le cycle précédent est responsable d'une libération prématurée de PGF2c\* lors du cycle suivant [4], Ainsi, l'état d'anœstrus constitue un risque pour l'établissement et le maintien d'une gestation débutant au cycle suivant. La majorité des études suggère que le taux de mortalité embryonnaire tardive est plus important pour des vaches en anœstrus avant insémination mais seule celle de **Cartmill et al.** [46] montre une différence significative. En revanche, **Santos et al.** [52] montrent que les vaches en anœstrus présentent moins de pertes embryonnaires que les vaches cyclées.

Au final, il semble que réduire le nombre de vaches en anœstrus avant une 1<sup>ère</sup> insémination post-partum permettrait de minimiser les pertes embryonnaires dans les troupeaux bovins.

### **2.2.3 Rang de lactation :**

L'étude de **Grimard et al.** [10] a pour objectifs d'identifier les facteurs associés à des variations du taux de conception et en particulier ceux associés à une mortalité embryonnaire tardive (MET) chez les vaches Prim'Holstein provenant de troupeaux à faible taux de fertilité en France. Ces facteurs potentiels sont au nombre de 12 : le centre d'insémination, le rang de lactation, la période du vêlage, les conditions du part (assistance ou non), l'index génétique de la vache (INEL< ou >27), le plus haut niveau de production laitière au cours des 3 premiers mois de lactation (< ou >39 Kg/j), le plus bas taux protéique du lait durant les 3 premiers mois de lactation (< ou >30 g/Kg), l'intervalle vêlage/1<sup>ère</sup> insémination (<70j, 70-89j, >90j), la note d'état corporel (<2, 2, ou >2,5), la période d'insémination, le mâle utilisé pour la vache et l'identité du mâle utilisé pour l'insémination. L'expérience a été conduite sur 1285 bovins avec un délai vêlage/1<sup>ère</sup> insémination élevé comme recommandé pour les troupeaux de vaches hautes productrices. La note d'état au moment de l'insémination était basse probablement en raison d'une forte lipomobilisation au cours des 3 premiers mois de lactation.

En ce qui concerne l'étude du facteur "rang de lactation", les auteurs observent que le taux de conception diminue lorsque le rang de lactation augmente en particulier lorsque le nombre de lactations est supérieur à 4 [10]. Ceci est en accord avec les observations de **Santos et al.** [50] : les primipares ont un taux de conception à J31 de 45,9% contre 41,5% pour les multipares

---

<sup>2</sup>Anœstrus : absence de manifestations œstrales par la femelle détectées par l'éleveur. Il s'agit ici d'anœstrus dit pathologique. L'anœstrus est dit pathologique lorsqu'il s'accompagne d'une pathologie ovarienne (kystes) ou utérine (pyométre) ou s'il est de durée excessive avant la puberté (14 mois pour les races laitières et 18 mois pour les races à viande) ou au cours du post-partum (50 jours pour la vache laitière et 70 jours pour la vache allaitante) (<http://www.fmv.ulg.ac.be/oga/formation/lexiq/lexique.html>).

( $P=0,09$ ). De même, **Chebel et al. [86]** montrent que les pertes embryonnaires entre J21 et J42 après l'insémination sont plus élevées chez une vache multipare que chez une primipare. Dans un autre article, Chebel observe que les vaches multipares ont un taux de conception inférieur de 13% par rapport aux primipares [85]. Il précise que cela peut être partiellement expliqué par une incidence plus élevée de maladies post-partum chez les vaches multipares (14,9% vs 6,2% pour les primipares). Or ces maladies sont responsables d'une diminution du taux de conception (voir la partie 2.2.5).

D'après **Humblot [73]**, les fréquences de mortalités embryonnaires précoce et tardive augmentent toutes deux avec le rang de lactation. Les taux de MEP sont de 29,3% pour les primipares, 31% pour les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> lactations, et 37,5% chez les vaches en 4<sup>ème</sup> lactation ou plus, respectivement, tandis que les taux de MET sont de 13%, 15%, 17,5%, respectivement.

D'après **Starbuck et al. [67]**, les génisses ont un plus grand pourcentage de maintien de gestation à la semaine 9 que les vaches âgées. Les vaches plus jeunes poursuivent 89,7% de gestations contre 81,1% pour des vaches plus âgées. En revanche, elles maintiennent moins de gestations que les génisses (100%).

**Chagas e Silva et al. [28]** observent que les vaches receveuses lors de transfert embryonnaire ont des concentrations plasmatiques en progestérone à 37 significativement inférieures à celles des génisses receveuses, sachant que des concentrations plus basses à J7 sont associées chez les vaches à un taux de gestation plus bas (association non démontrée pour les génisses). Ils concluent que les vaches ont plus de risque que les génisses de subir de la mortalité embryonnaire surtout s'il s'agit du transfert d'embryons congelés/décongelés (et non frais). Ceci est associé à une plus faible compétence du corps jaune à 37.

En revanche, **Snijders et al. [91]** observent que le nombre d'oocytes récoltés chez des vaches primipares après abattage est inférieur à celui de vaches en 3<sup>ème</sup> lactation. De plus, la proportion d'oocytes se développant jusqu'au stade blastocyste est moins importante chez les vaches en 1<sup>ère</sup> lactation que chez celles en 3<sup>ème</sup> lactation (3,9% contre 10,4%,  $P<0,05$ ). Ayalon rapporte une étude de 1958 dans laquelle les génisses ont un taux de mortalité embryonnaire supérieur à celui des vaches en 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> lactation [70].

### **Conclusion sur le facteur "rang de lactation" :**

Dans l'ensemble, il ressort de ces études qu'une vache multipare a des paramètres de reproduction dégradés (baisse du taux de conception, MEP et MET augmentées) par rapport à une vache primipare. Cela pourrait être dû au fait que les vaches multipares présentent plus souvent des

maladies post-partum telles que des métrites. L'environnement utérin serait alors moins propice au développement embryonnaire. La fréquence de mortalité embryonnaire, qu'elle soit précoce ou tardive, et même celle de non fécondation seraient donc augmentées. Une application pratique venant conforter cette hypothèse est que le transfert d'embryons de haute valeur se fait préférentiellement sur des génisses.

Si l'on confronte cela à la constatation de **Snijders et al. [91]**, on pourrait supposer que même si les primipares ont une proportion d'ovocytes se développant jusqu'au stade blastocyste inférieure à celle des multipares, elles seraient moins sujettes à de la ME par la suite. Dans l'étude de 1958 rapportée par **Ayalon [70]**, les génisses ont un taux de ME supérieur aux vaches multipares ce qui est exactement l'inverse des résultats des études citées précédemment. Cependant, cette étude était basée uniquement sur l'observation des retours en chaleurs après insémination et comme on le verra dans la partie 3.1, cet argument n'est pas fiable à lui seul pour caractériser la mortalité embryonnaire.

#### **2.2.4 Anomalie du mécanisme de reconnaissance maternelle de la gestation :**

##### **Asynchronisme embryo-maternel :**

Pour que le dialogue mère/conceptus puisse s'établir, il doit y avoir une synchronisation précise entre le stade de développement du blastocyste et l'état de réceptivité endométriale [71]. L'utérus n'est en effet que temporairement réceptif à l'embryon et la composition des sécrétions utérines est adaptée aux besoins évolutifs de l'embryon. Ainsi la lutéolyse pourrait survenir en présence de l'embryon si la sécrétion d'INFr est insuffisante ou trop tardive par rapport à la période de réceptivité utérine. La lutéolyse, et donc la mortalité embryonnaire, constituent la principale conséquence de l'asynchronisme embryo-maternel. Cette période de réceptivité passée, l'utérus entre dans une période réfractaire durant laquelle le milieu est défavorable à la survie embryonnaire. Par exemple, lors de transfert embryonnaire (TE), un manque de synchronisation œstrale et donc utérine entre la donneuse et la receveuse contribue à augmenter le risque de mortalité embryonnaire. Ainsi, lors de TE, tout écart de synchronisation supérieur à un jour entre la donneuse et la receveuse s'accompagne d'une diminution du pourcentage de gestation après transfert.

**Causes d'une sécrétion insuffisante de l'INFr :****Défaut de développement du trophoctoderme :**

Une partie de la mortalité embryonnaire est due à une incapacité pour l'embryon à supprimer la cascade lutéolytique durant la phase lutéale. Depuis longtemps, les auteurs supposent qu'une partie des gestations dans l'espèce bovine échoue car l'embryon produit des quantités d'INFr inadéquates pour bloquer la sécrétion de PGF2a (**Thatcher [98] cité par Hansen [77]**). Cela est en partie dû à un manque de développement du trophoctoderme embryonnaire. Le trophoctoderme embryonnaire sécrète l'INFr dès le 12<sup>ème</sup> jour de gestation mais le pic de concentration est obtenu à J15-J17 [**13**]. L'effet anti-lutéolytique de l'INFr consiste en l'inhibition de l'expression de récepteurs endométriaux à l'ocytocine. Ainsi, un embryon avec un trophoctoderme sous-développé sécrètera une quantité inadéquate d'INFr et sera alors la cible d'une lutéolyse prématurée. En effet, seuls les embryons ayant une taille supérieure à 15 mm entre le 15<sup>ème</sup> et le 17<sup>ème</sup> jour de gestation sont, chez la vache, capable de synthétiser la trophoblastine de type 1 ou INFr [**15**]. Cependant, **Hansen [77]** donne moins de précisions et dit simplement qu'il existe des variations considérables dans le degré d'élongation de l'embryon entre le 15<sup>ème</sup> et le 17<sup>ème</sup> jour de gestation, période durant laquelle il débute sa sécrétion d'INFr. Il ajoute que la quantité sécrétée d'INFr augmente lorsque la taille de l'embryon augmente. Selon **Hansen et al. [14]**, une fréquence plus grande de retard du développement embryonnaire est observée chez les animaux "repeat-breders" par rapport aux animaux normaux. **Hansen [77]** précise qu'entre J14 et J17 les embryons de génisses "repeat-breders" sont plus petits que ceux de génisses normales. Ainsi, si l'embryon ne produit pas de signal lutéotrophique ou si le corps jaune ne répond pas à ce signal, on observera de la mortalité embryonnaire précoce. Un retard dans le développement du trophoctoderme embryonnaire peut être l'expression de défauts intrinsèques à l'embryon.

**Rôle de l'environnement maternel :**

De plus, des altérations de l'environnement maternel peuvent également affecter la sécrétion embryonnaire d'INFr. **Mann et al. [40]** ont montré que des vaches avec un retard dans l'augmentation des concentrations en progestérone après ovulation, ont des liquides recueillis après *flushings* utérins à J16 avec des concentrations plus basses en INFr que les femelles dont les concentrations en progestérone augmentent plus précocement.

**Silva et al. [78] cités par [52]** ont démontré chez les ovins que le corps jaune est capable de transformer la prostaglandine PGF2a en son métabolite (13-14 dihydro15cetoPGF2a) ce qui est

associé dans l'étude à une résistance du corps jaune à la PGF2a. Cela n'a pas encore été démontré chez les bovins.

Des expériences ont montré qu'un traitement à base d'ocytocine de J5 à J8 après l'insémination réduit le taux de gestation de 80% à 33%. Cependant, cet effet est réversible lorsqu'un anti-prostaglandine est administré en même temps que l'ocytocine [52]. De plus, **Elli et al. [62] cités par Santos [52]** ont démontré que l'administration d'un anti-prostaglandine au moment du transfert d'embryon permet de faire passer le taux de gestation de 56% à 82%.

En conclusion, il semble que supprimer la sécrétion de PGF2a favorise l'établissement et le maintien de la gestation en réduisant la mortalité embryonnaire. Cette stratégie sera développée plus largement dans la partie 3.2.3.

### **2.2.5 Maladies péri-partum :**

#### **Mammite :**

Les mammites sont l'une des affections les plus courantes chez les vaches laitières. Elles sont responsables de pertes économiques majeures dans l'industrie laitière. En plus de causer une baisse de production laitière, une diminution de qualité du lait, des frais de traitement et des réformes, les mammites diminuent les performances de reproduction.

**Santos et al. [49]** ont réalisé une étude sur les mammites cliniques dans laquelle ils n'ont inclus que les mammites d'environnement. Ils ont montré que les performances de reproduction sont altérées lorsque la mammite se déclare avant l'insémination ou entre le jour de l'insémination (JO) et celui du diagnostic de gestation (J35). En effet, lorsque la mammite se déclare avant l'insémination, l'intervalle vêlage/1<sup>ère</sup> insémination augmente ( $P < 0,01$ ). De plus, le TRIAI diminue lorsque la mammite se déclare avant VIA ou entre JO et J35 ( $P < 0,01$ ) [49]. Le taux de conception est lui aussi diminué lorsque la mammite apparaît avant JO ou entre JO et J35, alors qu'il n'est pas modifié lorsqu'elle se déclare après le diagnostic de gestation [49]. **Barker et al. [8]** ajoutent que l'IVIAI passe à 93,6 jours contre 71 jours pour les vaches sans mammite. Ces résultats sont identiques qu'ils s'agissent de mammites à bactéries Gram- ou Gram+ [49], [8]. Cependant, **Huszenicza et al. [42]** constatent que la phase lutéale du cycle des vaches atteintes de mammite clinique est plus courte, et la phase folliculaire plus longue, uniquement lorsqu'il s'agit de bactéries Gram-. Pour finir, le nombre d'inséminations nécessaires augmente pour les vaches déclarant une mammite clinique après la 1<sup>ère</sup> insémination alors que ce n'est pas le cas pour les vaches infectées avant l'insémination [8].

**Chebel et al. [85]** observent qu'une mammite clinique se déclarant entre le jour de l'insémination (JO) et celui du diagnostic de gestation (J39) s'accompagne d'une augmentation des échecs de gestation. En effet, les vaches présentant une mammite ont 2,8 fois plus de risque de subir de la mortalité embryonnaire tardive entre J31 et J45 [85].

Le nombre de jours entre le vêlage et la 1<sup>ère</sup> insémination augmente lorsqu'une mammite subclinique est présente avant l'insémination [35]. En effet, ce délai est de 75,7 +/- 1,8 jours alors qu'il n'est que de 67,8 +/- 2,2 jours pour des vaches non infectées. Dans cette étude sur les mammites cliniques et **subcliniques**, **Schrick [35]** conclut qu'une mammite subclinique a les mêmes effets délétères sur les performances de reproduction qu'une mammite clinique. Cependant, il ajoute que les performances de reproduction sont encore plus sévèrement altérées lorsqu'une mammite subclinique avérée devient par la suite clinique. Le mécanisme par lequel une mammite subclinique ou clinique interfère avec les performances de reproduction est inconnu. Par conséquent, des mécanismes potentiels sont envisagés par certains auteurs. Une hypothèse serait que la libération d'endotoxines par les bactéries Gram- provoquent la sécrétion de médiateurs de l'inflammation tels que la PGF2a. Ainsi, les bactéries Gram- peuvent augmenter la sécrétion de PGF2a ce qui peut entraîner une régression lutéale précoce. Une autre hypothèse invoquée est que l'infection par les bactéries Gram- et Gram+ peut s'accompagner d'une augmentation de température corporelle et donc d'une libération de médiateurs de l'inflammation comme la PGF2a. Ces deux raisons peuvent donc expliquer la diminution du taux de conception et l'augmentation des pertes embryonnaires lors de mammite clinique et subclinique [49],[35]. De plus, **Barker et al. [8]** rapportent qu'il existe une inhibition de la GnRH par les endotoxines. Il s'en suit un développement folliculaire insuffisant. Cela peut mener à une production d'œstrogènes trop faible et donc à une anovulation suite au blocage du pic de LH.

**Santos [49] et Barker [8]** avancent qu'une mammite apparaissant avant insémination ou entre JO et J35 entraîne une augmentation de l'intervalle entre le vêlage et l'IAI. L'affirmation des auteurs rapportant qu'une mammite apparaissant après JO a une influence sur l'IVIAI mériterait d'être clarifiée. Il s'agirait peut être en réalité de l'intervalle vêlage/diagnostic de gestation positif. Cependant, ils ne précisent pas cela ni ce qui cause cette augmentation.

Des recherches complémentaires pour savoir si la présence d'une mammite clinique ou subclinique est associée plus particulièrement à de la NF, de la MEP ou de la MET auraient été intéressantes.

Une prévention contre les mammites d'environnement est donc essentielle.

**Autres maladies post-partum :**

D'autres affections telles qu'une rétention placentaire ou une fièvre de lait interviennent dans la diminution du taux de gestation.

**Chebel et al. [85]** ont observé une association entre le taux de gestation à **J39**, les rétentions placentaires et les fièvres de lait. Une fièvre de lait est associée à une diminution du taux de gestation à **J39** et une rétention placentaire semble entraîner une réduction de ce taux de gestation à **J39**. Une vache qui n'a pas eu de fièvre de lait est 2,25 fois plus capable de concevoir qu'une vache ayant eu une fièvre de lait. Pareillement, une vache sans rétention placentaire a 1,2 fois plus de chance de concevoir qu'une vache avec rétention placentaire. D'après **Santos et al. [52]**, les vaches présentant des problèmes utérins tels qu'une endomé- trite subclinique vers **J40** ont un taux de conception inférieur.

Les maladies péri-partum vont donc à l'encontre de la survie embryonnaire en affectant la santé de la vache et/ou en détériorant l'environnement utérin.

**Effet direct des germes :**

L'injection expérimentale intra-utérine d' *Arcanobacterium pyogenes* entre **J27** et **J41** entraîne une mortalité embryonnaire dans les 6 jours suivant l'injection [24]. De même, l'inoculation *Haemophilus somnus* à des génisses superovulées entraîne une diminution du nombre d'embryons récoltés et une réduction de leur capacité à se développer en milieu de culture [15]. L'injection expérimentale de virus BHV-1 par voie intraveineuse à des génisses séronégatives 7 à 14 jours après l'insémination induit une mortalité embryonnaire. L'administration intra-utérine du virus de la maladie des muqueuses (BVD) au moment de l'insémination ou en début de gestation est responsable d'une diminution du pourcentage de fécondation et d'une augmentation du pourcentage d'embryons dégénérés [15].

**2.2.6 Composition du milieu utérin :**

Plusieurs auteurs ont étudié la composition du milieu utérin. Lorsqu'un embryon dégénéré est récolté, **Wiebold [54]** observe parallèlement une augmentation significative du glucose, des protéines totales, du calcium, du magnésium, du potassium, du zinc et du phosphore dans les sécrétions utérines. **Ayalon [70]** observe le même type d'augmentation sauf en ce qui concerne les protéines totales qui sont quant à elles plus élevées chez les vaches fertiles que chez les vaches

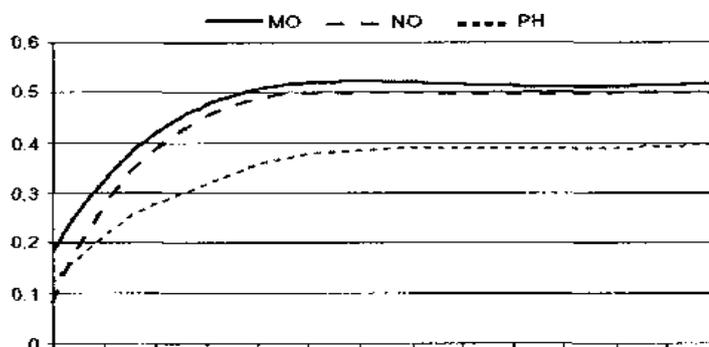
infertiles. Il précise que des différences frappantes sont observées pour les concentrations en ions particulièrement le 7<sup>ème</sup> jour après l'œstrus. La concentration en ions calcium à J7 dans les liquides issus de lavages utérins de vaches avec embryons anormaux est égale à plus de 12 fois celle de vaches avec embryons normaux. Des concentrations augmentées en potassium, zinc, phosphore et calcium se retrouvent également dans les liquides issus de lavages de l'oviducte. L'auteur suggère que cette augmentation pourrait être liée à l'augmentation de la concentration plasmatique en œstradiol observée chez les vaches " *repeat-breeders*" avec embryons anormaux [70]. **Lamothe et al. [75]** relatent des concentrations utérines plus faibles en protéines, sodium, phosphore et glucose mais plus élevées en calcium, potassium et magnésium chez les vaches " *repeat-breeders*" que chez les vaches normales.

De nombreuses protéines d'origine maternelle et embryonnaire participent au mécanisme de survie embryonnaire. Par exemple, la phosphatase alcaline est impliquée dans les interactions endomètre-trophoblaste entre le 22<sup>ème</sup> et le 24<sup>ème</sup> jour de gestation [82].

### 2.2.7 Protocole d'insémination :

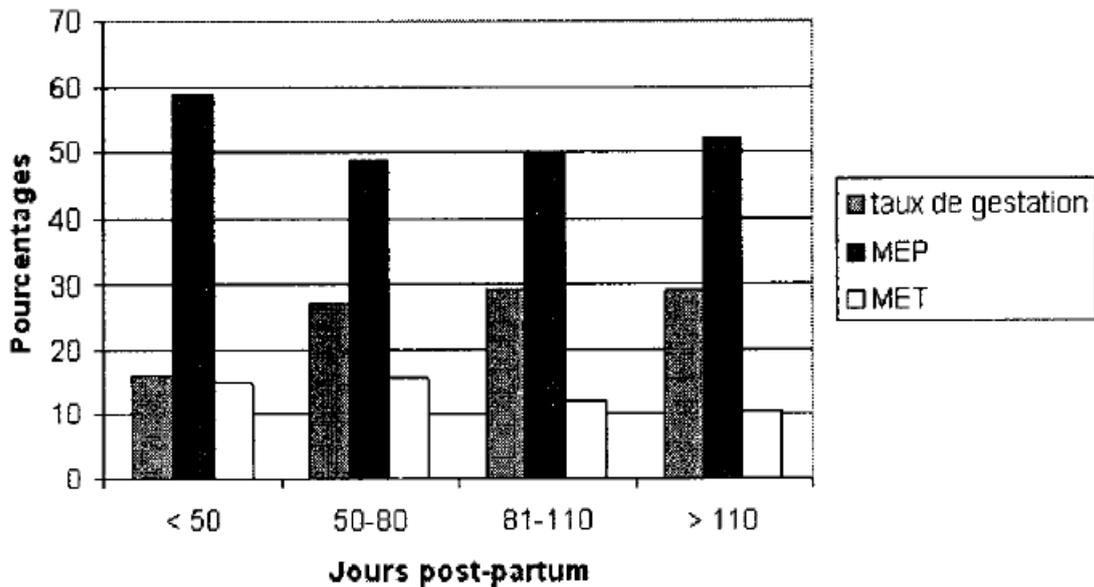
#### **Intervalle vêlage/1<sup>ère</sup> insémination :**

Plusieurs études s'accordent sur le fait que le taux de conception augmente lorsque l'intervalle vêlage/1<sup>ère</sup> insémination (IVIAI) augmente. Ainsi, d'après **Grimard et al. [10]**, le taux de réussite en 1<sup>ère</sup> insémination (TRIAI) augmente significativement lorsque la 1<sup>ère</sup> insémination a lieu après 90 jours post-partum (PP) par rapport à une insémination faite à moins de 70 jours PP ( $P < 0,05$ ). Ces affirmations sont en accord avec les résultats de l'étude récente de **Barbat et al. [2]**. Leur étude dresse un bilan phénotypique sur 10 ans de la fertilité à l'IA chez les bovins des trois principales races laitières françaises. Les résultats concernant l'influence de l'IVIAI sont présentés dans la figure 2.2.



**Fig. 2-2 :** Probabilité de réussite à PIA en fonction de l'IVIAI (**Barbat [2]**).

1. Pour les trois races, l'allure de la courbe est identique avec un accroissement de la probabilité jusqu'à 70 jours PP en races Montbéliarde (MO) et Normande (NO) et 80 PP jours en race Prim'Holstein (PH). Ensuite, la courbe atteint un plateau où un accroissement de l'IVIAI ne s'accompagne plus d'un meilleur TRIAI. Ainsi, les auteurs conseillent un seuil supérieur de 90 jours PP et suggèrent de remonter le seuil inférieur de 50 jours à 70 jours si l'on veut maximiser le TRIAI. Cela signifie que toute IAI devrait être faite après 70 jours PP dans le but d'améliorer le TRIAI et donc de diminuer la ME. Néanmoins, si l'objectif est de féconder la vache avant 100 jours, il est envisageable de réaliser la 1<sup>ère</sup> IA avant 60 jours (mais après 50 jours) quitte à devoir réinséminer après [2].
2. Dans son étude en climat tempéré, **Humblot [73]** observe que la mortalité embryonnaire tardive tend à diminuer lorsque l'intervalle vêlage/1<sup>ère</sup> insémination augmente (17% lorsque l'insémination a lieu à moins de 70 jours post-partum contre 13% à plus de 70 jours,  $P < 0,07$ ). Cette différence est en revanche peu perceptible en ce qui concerne la mortalité embryonnaire précoce (31,3 vs 31,9%). Ces constatations se retrouvent dans son étude à l'Ile de La Réunion en conditions subtropicales [73]. Les résultats sont présentés dans l'histogramme 2.3 Le taux de gestation consécutif à une 1<sup>ère</sup> insémination passe de 16% à 29% lorsque l'intervalle entre le vêlage et la 1<sup>ère</sup> insémination augmente. Ceci est à relier à une diminution de la MEP lorsque l'IA est réalisée au-delà de 50 jours post-partum et à une diminution continue du taux de MET qui passe de 15% à 10,5% [73].
3. Nombre d'inséminations et intervalle ovulation/insémination
4. La fréquence de mortalité embryonnaire est quatre fois plus élevée chez les animaux inséminés plus de trois fois (**Vaillancourt [20] cité par hanzen [15]**).une augmentation



**Fig2-3** : Influence de LIVIA1 sur les paramètres de reproduction (d'après Humblot [73])

Du nombre d'inséminations est clairement associée à une réduction du taux de conception [85]. Ainsi, seuls 9,8% des vaches inséminées une seule fois présentent des maladies post-partum. En revanche, 17,0% des vaches avec plus de 6 **inséminations** ont des pathologies post-partum. Or les maladies post-partum affectent également le taux de conception et sont responsables de ME (voir la partie 2.2.5). Pour finir, **Chebel et al. [85]** ajoutent que les vaches inséminées plus de 9 fois ont 77% de chance en moins de concevoir que les vaches inséminées une seule fois. D'autre part, le moment de l'insémination par rapport à celui de l'ovulation est très important. **Kastelic [56] cité par [15]** observe une fréquence de mortalité embryonnaire plus élevée entre le 29<sup>ème</sup> et le 32<sup>ème</sup> jour chez les animaux inséminés deux jours avant l'ovulation au lieu du jour précédent l'ovulation. D'après **Ayalon [70]**, le taux de fécondation chute suite à une augmentation de la mortalité embryonnaire lorsque les vaches sont inséminées plus de 6 heures après l'ovulation. Il est donc très important qu'il y ait une bonne détection des chaleurs

### **2.2.8 Protocoles de synchronisation :**

De nombreux protocoles de synchronisation sont utilisés pour optimiser la reproduction des vaches. Une pré-synchronisation peut-être réalisée au préalable. Cette pré-synchronisation (ou

*Presynch*) consiste en 2 injections de 25 mg de PGF2a (posologie valable pour le Dinolytic®) à 14 jours d'intervalle à partir du 33<sup>ème</sup> ([85]) ou 37<sup>ème</sup> jour ([50]) post-partum. Puis, 12 jours après la 2<sup>ème</sup> injection de PGF2a, deux types de protocole peuvent être débutés : GPG (ou *Ovsynch*) et *Selectsynch*. Le protocole GPG est le suivant : GnRH à J0, PGF2a à J7, GnRH à J9, IA 12-16h après. Le protocole *Selectsynch* est le suivant : GnRH à J0, PGF2a à J7 suivie d'une insémination sur chaleurs observées.

Il existe aussi des protocoles de synchronisation à base de progestagènes qui consistent en la mise en place d'une spirale vaginale de progestérone (de nom déposé CIDR® aux Etats- Unis, PRID® en France) ou d'un implant de norgestomet dans l'oreille (de nom déposé Crestar S.O.®).

### **Implants à base de progestagènes :**

Inskip observe que les traitements au long terme à base de progestagènes entraînent une présence prolongée du follicule ovulatoire ce qui réduit le taux de conception et augmente les pertes embryonnaires [29]. En effet, ils sont responsables d'une suppression incomplète de la sécrétion de LH et du développement d'un follicule dominant persistant à durée de vie prolongée. L'oocyte qui en résulte présente une diminution de compétence [77]. Pareillement, les traitements hormonaux courts (inférieurs à 8 jours) diminuent le taux de conception selon **Chenault [57] (cité par Santos [52])**.

### **Prostaglandines :**

Une seule injection de PGF2a pendant le diœstrus améliore le taux de conception si l'on compare à des vaches n'ayant reçu aucune injection (**Macmillan [60] cité par [52]**). Cependant, d'après **Xu [100] (cite par Santos [52])**, il semblerait que 2 injections de PGF2a à 13 jours d'intervalle s'accompagnent d'une réduction du taux de conception avec une diminution marquée lorsque la 2<sup>ème</sup> injection a lieu entre J5 et J9 .

### **Protocole GPG (ou *Ovsynch*) et protocole *Selectsynch* :**

Les protocoles standardisés (type *Ovsynch* : GnRH à J0, PGF2a à J7, GnRH à J9, IA 12-16h après) utilisant des doses standards (100/ug de gonadoréline) pour provoquer l'ovulation seraient susceptibles de diminuer le taux de conception. En effet, comme vu précédemment, si la GnRH agit sur des petits follicules, ils donneront naissance à un corps jaune incompetent et à des cycles plus courts (**Macmillan [60] cité par [52]**). D'après **Santos et al. [50]**, le taux de conception des vaches inséminées 16 heures après la 2<sup>ème</sup> injection de GnRH dans le protocole GPG est plus faible

que celui de vaches inséminées sur chaleurs observées.

Les vaches inséminées sur chaleurs observées à la suite d'un protocole *Selectsynch* (avec pré-synchronisation) ont un taux de conception supérieur à celles inséminées à heure fixe à la suite d'un protocole *Ovsynch* (avec pré-synchronisation) [50].

### **Conclusion sur les protocoles de synchronisation :**

Même si l'on manque de preuves concernant l'implication des protocoles de synchronisation dans l'augmentation de la mortalité embryonnaire, une hypothèse serait qu'ils compromettent la fertilité en limitant la durée du proœstrus ou en donnant des ovocytes incompetents.

Cependant, ils sont largement utilisés sur le terrain pour améliorer les performances de reproduction et optimiser la remise à la reproduction.

Au vu des constatations pratiques, on peut en déduire que bien qu'ayant les effets négatifs cités ci-dessus, les protocoles de synchronisation améliorent la reproduction des vaches plus qu'ils ne la détériorent.

### **2.2.9 Re-synchronisation des vaches vides :**

La re-synchronisation consiste à mettre en place un nouveau protocole hormonal suite à un échec en première insémination.

#### **Re-synchronisation avec un protocole à base de progestérone :**

Lorsqu'une spirale vaginale CIDR® est mise en place à J14 ± 1 après l'insémination et retirée 7 jours après, le taux de gestation suivant est diminué pour les vaches laitières hautes productrices (**Chenault [86] cité par [52]**). Cependant, pour les vaches à faible production laitière, la re-synchronisation grâce au CIDR® mise en place entre J16 et J21 n'a pas d'effet négatif sur la fertilité (**Xu [100] cité par [52]**). La présence d'irritation vaginale en relation avec la pose du CIDR® est associée à une diminution du taux de conception (**Chenault [86] cité par [52]**).

#### **Re-synchronisation avec un protocole GPG ( *Ovsynch* ) :**

**Chenault et al. [86]** ont observé qu'une injection de GnRH à J21 après l'insémination, lorsque le diagnostic de gestation n'est pas encore établi, n'a pas d'effet sur le taux de gestation ni sur les pertes embryonnaires et aboutit à un taux de gestation similaire après re-synchronisation. Cependant, **Fricke et al. [79]** ont observé que les vaches traitées avec de la GnRH à J19 après l'insémination ont un taux de gestation après re-synchronisation plus bas que celles traitées à J26 et J33. De plus, lorsque les vaches sont traitées avec la bST, le taux de gestation augmente, mais si la GnRH est administrée à J20 après l'insémination, le traitement avec la bST (*bovine Somatotropin*) n'a ensuite aucun effet sur la fertilité [32]. Ainsi, une re-synchronisation avec un protocole Ovsynch débutant à J20 après l'insémination initiale diminue la probabilité de survie embryonnaire consécutive à la 1<sup>ère</sup> insémination [32]. En effet, une injection de GnRH est suivie d'une rapide sécrétion de LH et est aussi associée à une augmentation transitoire de l'œstradiol plasmatique. Ces événements peuvent stimuler la sécrétion de PGF2t\* entraînant la lutéolyse mettant fin à la gestation.

Ainsi dans le cadre de la re-synchronisation des vaches non gestantes, la GnRH devrait être utilisée après le 20<sup>ème</sup> jour suivant l'insémination. Ceci sera développé plus en détails dans la partie 3.2.7.

## **2.3 Facteurs extérieurs :**

### **2.3.1 Stress dû à la chaleur :**

#### **Constatations cliniques d'un stress dû à la chaleur (ou choc thermique) :**

Si l'on fait une synthèse des différentes études lues sur le sujet, on peut dire que l'exposition à des températures élevées compromet la fabrication des stéroïdes, la viabilité et la qualité de l'oocyte, la viabilité des embryons et diminue le taux de fertilisation ([15], [22], [26], [70], [77], [85], [99]). En effet, la chaleur altère le développement des follicules en diminuant la production d'hormones stéroïdes et elle freine la croissance du follicule dominant ce qui entraîne un phénomène de dominante incomplète permettant une croissance plus importante de follicules secondaires [99]. L'hyperthermie résultant de la chaleur est directement responsable d'une altération des fonctions de l'ovocyte [99].

**Chebel et al. [85]** ont récemment observé que les vaches exposées à la chaleur avant insémination (entre 50 et 20 jours avant insémination) ont un taux de gestation inférieur de 31 à 33% par rapport à celles non exposées. Cependant, une exposition à la chaleur du 20<sup>ème</sup> jour avant l'insémination au jour de l'insémination n'entraîne pas de réduction du taux de conception [85]. De plus, les auteurs ajoutent que les vaches laitières hautes productrices sont davantage susceptibles de subir une

diminution de leurs performances reproductrices après un stress thermique. Le choc thermique a un effet désastreux sur des génisses exposées à 32°C pendant les 72 heures suivant l'accouplement : aucune d'entre elles n'est au final gestante alors qu'un taux de gestation de 48% est observé sur des génisses exposées

à 21°C [70].

Dans les régions tropicales et subtropicales, divers auteurs ont observé une diminution de la fertilité au cours des mois d'été coïncidant avec des périodes prolongées de températures élevées [15]. Cet effet se traduirait par une diminution des signes de chaleurs, une diminution de la progestéronémie, ou par une réduction de la libération préovulatoire de LH. Ainsi, **Humblot [73]** précise qu'un pourcentage important de vaches inséminées au mauvais moment est constaté dans les régions à température élevée ce qui pourrait être attribué à une atténuation de l'expression des chaleurs chez la vache.

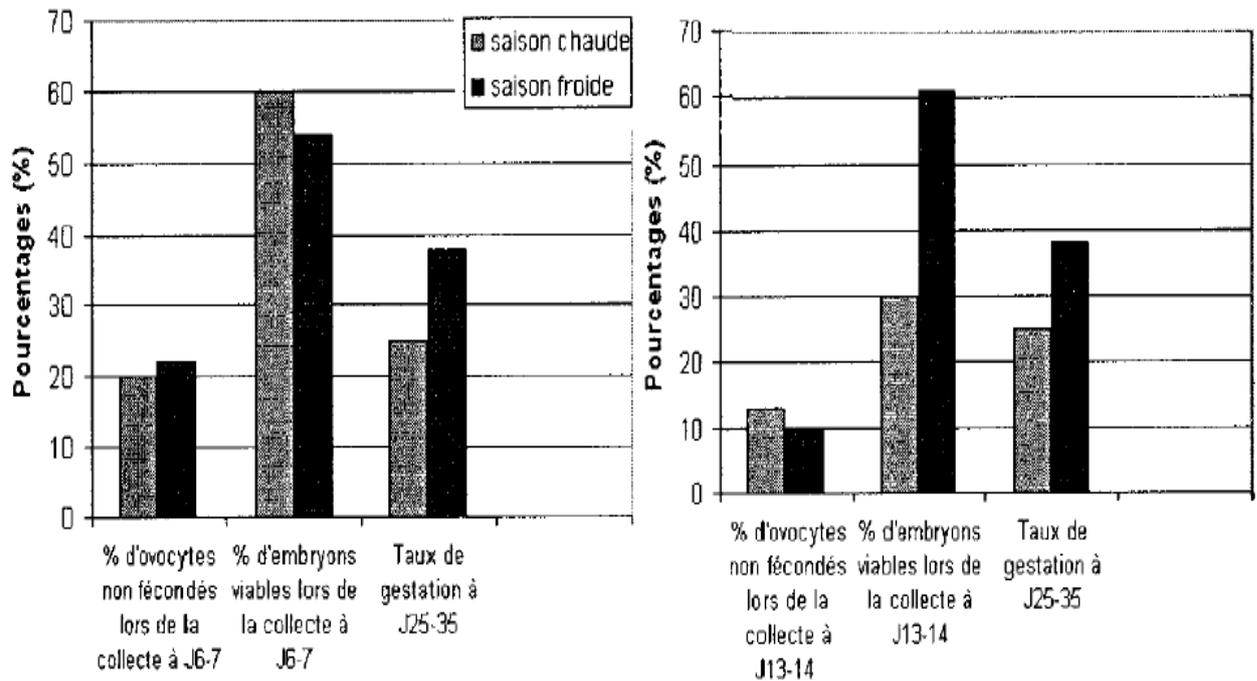
**Monty et al. [22] (cités par Hanzen et al. [15])** ont comparé la qualité d'embryons obtenus chez des vaches de race Holstein dans deux environnements différents (12 à 25°C vs 26 à 39°C). Ils constatent une augmentation significative d'ovocytes non fécondés et d'embryons dégénérés lorsque les températures extérieures augmentent.

Cependant, tous les résultats rapportés dans la littérature au sujet de l'influence de la température sur les performances de reproduction ne coïncident pas. Au final, l'effet de la température semble dépendre de sa durée et du stade de gestation auquel elle s'exerce. Ainsi, **Ealy et al. [5] (cités par [15])** montrent que l'embryon de vache serait davantage sensible à une augmentation de température dans les 24 premières heures de gestation. D'après **Hansen [15]**, un stress consécutif à la chaleur réduirait de 72% la synthèse de trophoblastine par l'embryon et augmenterait celle de prostaglandine par l'endomètre. De même, un stress thermique pendant la deuxième et troisième semaine de gestation s'accompagne d'une réduction du poids de l'embryon et de la progestéronémie. **Hansen et al. [14]** ajoutent qu'un stress thermique appliqué entre le 8<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour de gestation perturbe le développement embryonnaire.

**Ryan et al. [27]** ont mené une étude sur des vaches issues de 9 troupeaux d'Arabie Saoudite. Ils ont constaté que le type de saison (été : températures entre 24°C et 53°C ; hiver : températures entre -1°C et 20°C) a un effet significatif sur la fréquence de gestations gémellaires quel que soit le rang de lactation de la vache excepté pour les vaches primipares. Lorsque les températures diminuent, la fréquence des gémellités augmente, le pic de gestation gémellaire étant atteint en Mai/Juin. Cependant, **Ryan [25]** a également observé dans une étude antérieure que l'effet de la saison sur les gestations gémellaires ne s'expliquait pas par une dégradation du taux d'ovulation puisqu'il observe

au contraire 23,4% d'ovulations pendant la saison chaude contre 19,2% pendant la saison froide. Par conséquent, on peut en déduire que l'effet de la saison sur le taux de gémellité s'explique par une diminution de la viabilité des embryons dans les tous premiers stades de gestation pendant la saison chaude. De plus, le *sex ratio* est modifié en faveur du sexe mâle que la gestation soit gémellaire ou non [25]. Les embryons mâles tendent à être plus avancés à J7 et ont donc une meilleure viabilité.

Dans une autre étude, **Ryan et al.** [26] ont réalisé une expérience sur 530 femelles venant de 3 troupeaux différents d'Arabie Saoudite. L'expérience a été conduite pendant la saison chaude (de 24,5°C à 34°C) et répétée pendant la saison froide (de -1°C à 20°C). Les femelles ont été réparties aléatoirement en 3 groupes (I à III). Toutes ont été inséminées une seule fois avec de la semence congelée. Dans le groupe I, les embryons sont collectés à J6 ou J7 après l'IA pendant la saison chaude et la saison froide. Pour le groupe II, la collecte s'effectue à J13 ou J14 après l'IA. Le groupe III est le témoin. Les embryons ont été classés selon les critères morphologiques définis dans l'article de **Lindner** [41] : forme, couleur, nombre et état de compaction des cellules, taille de l'espace périvitellin, nombre de cellules dégénérées, nombre et taille des vésicules cytoplasmiques. Ainsi, un embryon est dit "excellent" s'il est sphérique, symétrique avec des cellules de taille, de couleur et de texture uniformes. A l'inverse, il est dit "dégénéré" s'il possède de nombreux blastomères dégénérés, des cellules de différentes tailles, et de multiples vésicules cytoplasmiques de grande taille. Les résultats de l'expérience sur les paramètres de reproduction sont présentés sur la figure 2.4.



**Fig 2-4 :** Influence de la chaleur sur les paramètres de reproduction (d'après Ryan [26]).

la saison froide. Le taux de gestation à J25-35 est de 22% pendant la saison chaude contre 38% pendant la saison froide. La température affecte donc significativement le taux de gestation ( $P < 0,05$ ). Cependant, ils observent également qu'il n'y a pas de différence significative entre le taux de réussite à la fécondation pendant la saison chaude (51,5%) et celui correspondant à la saison froide (59,8%). De plus, les pourcentages d'ovocytes non fécondés Durant la saison chaude, 45,8% des femelles collectées à J6 ou J7 ont au moins un embryon viable contre 24% des femelles collectées à J13 ou J14 ( $P < 0,05$ ). Ces pertes sont le résultat de mortalité embryonnaire [26]. La saison n'a pas d'effet significatif sur la viabilité des embryons lorsque ceux-ci sont âgés de 6 ou 7 jours (une différence d'à peine 6% est lisible sur l'histogramme). En revanche, lorsqu'ils sont âgés de 13 ou 14 jours, 27,1% sont viables pendant la saison chaude contre 59,5% pendant la saison froide. Ainsi, la viabilité des embryons diminue ( $P < 0,05$ ) entre le 6<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour de gestation durant la saison chaude ce qui n'est pas le cas pendant à J6-7 ou J13-14 ne sont pas significativement différents qu'il s'agisse de la saison chaude ou de la saison froide (voir la figure 2.4). À nouveau l'on constate que le stade de développement embryonnaire est donc le principal facteur entrant en jeu dans l'étude de l'influence des hautes températures sur la viabilité de l'embryon Il n'y a aucune corrélation établie entre la viabilité de l'embryon et le nombre d'insémina-

tions d'une part, ni entre la viabilité de l'embryon et l'intervalle vêlage/1<sup>ère</sup> insémination d'autre part que ce soit pendant la saison chaude ou la saison froide ( $P > 0,10$ ) [26]. Les seuls paramètres corrélés au degré de viabilité de l'embryon pendant la saison chaude sont le poids de la vache, sa note d'état et son taux respiratoire (nombre de respirations par minute). Ainsi, une prise de poids ( $P = 0,07$ ) et une augmentation de la note d'état ( $P = 0,08$ ) sont positivement corrélées à la viabilité de l'embryon [26]. En revanche, une augmentation du taux respiratoire est négativement corrélée à la viabilité dans cette étude. Pendant la saison froide, c'est le nombre de corps jaunes qui semble jouer un rôle : lorsque ce nombre augmente, la probabilité d'avoir un embryon viable augmente ( $P < 0,01$ ) [26].

En résumé de ces 3 articles, il existe une augmentation de la mortalité embryonnaire entre J6 et J14 après l'IA pendant la saison chaude. Cette mortalité concernerait surtout les embryons femelles déjà moins développés que les mâles au préalable ce qui expliquerait la différence observée dans le *sex ratio* des gestations gémellaires au cours de la saison chaude.

L'humidité accentue les effets négatifs sur la fertilité dus aux hautes températures et l'index température/humidité deux jours avant insémination est très fortement relié à la réussite à l'insémination [70].

En revanche, **Grimard et al.** [10] observent au contraire qu'il y a significativement moins de mortalité embryonnaire tardive en été qu'en automne ( $P < 0,05$ ).

### **Etude du stress dû à la chaleur à l'échelle de l'embryon :**

La mortalité embryonnaire peut se produire suite à des perturbations dans la régulation des fonctions de l'utérus et de l'oviducte consécutives à un stress environnemental spécifique imposé à la mère. La capacité de survie d'un embryon suite à des modifications de l'environnement maternel dépend d'une part de sa capacité à adapter sa propre physiologie dans le but de poursuivre malgré tout son développement et d'autre part de son aptitude à rétablir son micro-environnement en agissant sur sa mère. Les mécanismes grâce auxquels l'embryon réussit à s'adapter malgré les altérations de son environnement sont peu connus sauf dans le cas du stress consécutif à la chaleur [77]. L'embryon acquiert des mécanismes pour lutter contre des températures élevées au fur et à mesure qu'il se développe. L'exposition à des températures élevées entraînerait la perturbation du développement embryonnaire ce qui serait une des raisons conduisant à la mort de l'embryon [77]. Cette exposition à la chaleur pourrait aussi être responsable d'une réduction de la synthèse protéique [77].

La mortalité embryonnaire consécutive à un stress thermique est moins importante lorsque ce stress a lieu tardivement dans la période pré-implantatoire plutôt que très tôt dans le développement. Chez la vache, l'exposition à la chaleur de femelles superovulées à J1 après l'accouplement (embryon au stade 1 ou 2 cellules) réduit la proportion d'embryons atteignant le stade blastocyste à J8. Cependant, la chaleur appliquée à J3 (stade 4/8 cellules), J5 (morula à 16 cellules) ou J7 (stade morula/blastocyste) n'a pas d'effet sur la proportion d'embryons atteignant le stade blastocyste à J8 [77]. D'après **Al-Katanani et al. [99]**, la proportion d'oocytes parvenant au stade blastocyste durant l'été est diminuée que la vache soit placée sous système de refroidissement avec ventilateurs et brumisateurs 42 jours avant collecte ou non. L'auteur explique que la chaleur endommage l'oocyte beaucoup plus tôt dans son développement que 42 jours avant la récolte. Durant les 42 jours précédents la collecte, le follicule passe du stade follicule à antrum au stade follicule pré-ovulatoire. En revanche, les follicules primordiaux débutent leur croissance 84 à 85 jours avant l'ovulation et la chaleur appliquée à cette période peut compromettre la qualité de l'oocyte [99]. Cette résistance à la chaleur plus marquée au fur et à mesure du développement a conduit à l'utilisation du transfert d'embryons comme méthode pour améliorer le taux de gestation en période de hautes températures. Ainsi, la chaleur aurait moins d'effet sur une receveuse sur laquelle un embryon est transféré à J7 après l'œstrus que sur une vache inséminée. En effet, les embryons transférés aux receveuses ont déjà dépassé les stades les plus sensibles à la chaleur. Les vaches laitières soumises au transfert d'embryons durant l'été ont un taux de gestation supérieur à celui de vaches ayant subi une insémination artificielle durant cette période [77]. La chaleur n'affecte pas seulement la qualité de l'oocyte mais augmente aussi le nombre de cellules dégénérées de la thèque et de la granulosa. Cela compromet la fabrication des stéroïdes et réduit la production de progestérone par le corps jaune issu de ce follicule altéré [85]. La qualité et le développement de l'embryon qui en résulte seront moindres.

### **Bases cellulaires et biochimiques de l'acquisition de la thermotolérance au cours du développement embryonnaire :**

#### **1<sup>er</sup> système de résistance : la HSP70**

La protéine HSP70 (*Heat Shock Protein 70*) est nécessaire au développement de l'embryon. Son rôle est accru lors d'exposition à des températures élevées puisqu'elle participe au mécanisme de

résistance cellulaire à la chaleur [77], [15]. Elle agit en stabilisant la structure des protéines cellulaires évitant ainsi leur dénaturation [77]. Elle empêche également les phénomènes d'apoptose [77].

Les embryons bovins acquièrent l'aptitude à produire la protéine HSP70 en réponse à un choc thermique dès le stade 2 cellules c'est-à-dire avant même l'activation de son génome (stade 8-16 cellules) (voir la partie 1.1.1) ([77], [15]). Cependant, ils se mettent à fabriquer cette protéine en réponse au stress qu'un peu plus tard. Ainsi, malgré le fait qu'un embryon au stade 2 cellules ait l'aptitude de produire la HSP70, il reste sensible au stress thermique. Une hypothèse serait que la quantité de protéine HSP70 que l'embryon au stade 2 cellules est capable de synthétiser en réponse au choc est insuffisante pour compenser les effets délétères de la chaleur [77].

### **2<sup>ème</sup> système de résistance : glutathion (GSH)**

Il a été démontré chez la souris qu'un choc à la chaleur est responsable d'une réduction des concentrations intracellulaires en glutathion, un tripeptide anti-oxydant participant à de nombreuses réactions visant à éliminer les radicaux libres oxygénés dans la cellule. De plus, l'administration de sulfoximine de buthionine, un inhibiteur de la synthèse de GSH, empêche la mise en place de la thermotolérance de l'embryon de souris [77]. La thermotolérance est le phénomène par lequel une exposition de l'embryon à un faible choc thermique le rend plus résistant à un choc thermique ultérieur de plus forte intensité. Chez la vache, il y a une diminution de la teneur en GSH de l'embryon du stade 1 cellule au stade 8 cellules. Puis, cette teneur augmente des stades 9 à 16 cellules [77].

### **3<sup>ème</sup> système de résistance : résistance au phénomène d'apoptose induit par le choc**

L'embryon est capable d'une certaine résistance au phénomène d'apoptose induit lors de stress consécutif à la chaleur. Un stress consécutif à la chaleur peut être par exemple créé lors d'une exposition de ranimai à 32°C pendant les 72 heures suivant l'accouplement [70]. Pour les embryons de plus de 16 cellules à J5 après fécondation, la proportion de cellules subissant le phénomène d'apoptose suite au stress augmente. Au contraire, le stress n'augmente pas cette proportion chez des embryons aux stades 2, 4 et 8 cellules. En ce qui concerne les stades 8 à 16 cellules, les résultats sont très variables [77]. La capacité de l'embryon à survivre au choc thermique est donc liée à sa capacité à subir le phénomène d'apoptose consécutif au choc. L'apoptose ferait donc partie du mécanisme de résistance de l'embryon aux températures élevées. Ainsi, Hansen [77] émet l'hypothèse qu'une petite quantité d'apoptose cellulaire serait bénéfique pour les embryons ayant

subi un choc thermique. En effet, elle permettrait d'éliminer les cellules endommagées lors du choc et d'empêcher la nécrose cellulaire.

### **Conclusion sur le facteur "stress dû à la chaleur" :**

Ces constatations sur les effets délétères de la chaleur sur les performances de reproduction sont à prendre encore plus en considération à l'heure actuelle. En effet, si l'on reprend l'étude de Ryan [26], on s'aperçoit que les pertes importantes d'embryons âgés de 13 à 14 jours s'observent pour des températures comprises entre 24,5 °C et 34°C. Or, les dérèglements climatiques de ces dernières années ont provoqué des périodes de canicules de plus en plus tôt dans l'année. Ainsi, l'année 2007 aura été marquée par des températures avoisinant les 30°C pendant plusieurs jours consécutifs du mois d'Avril en France. Des vaches vêlant au cours des mois d'hiver (Janvier/Février) et inséminées 2 mois plus tard (selon les recommandations actuelles) pourraient alors voir leur TRIAI diminué en raison de MEP comme celle décrite par Ryan [26]. Leur fertilité pourrait donc se dégrader petit à petit si ce type de dérèglement climatique venait à se reproduire.

Bien sûr il ne s'agit là que d'hypothèses et de nouvelles études seraient nécessaires pour voir si cet effet "chaleur" responsable de ME se répète d'une étude à l'autre. Si c'est le cas, d'autres études à grande échelle seront encore nécessaires pour comprendre dans quelles conditions (nombre de jours consécutifs, température à risque, effet significatif ou non, période sensible du développement embryonnaire) il peut y avoir un risque réel sur la fertilité des bovins. Tout ceci n'est donc que suppositions, mais la question mérite d'être soulevée. Ces différentes observations concernant l'effet de l'augmentation de température sur les performances de reproduction ont conduit à la mise en place de différentes mesures sur le terrain qui seront développées dans la partie 3.2.9.

### **2.3.2 Alimentation :**

#### **Influence de l'état d'engraissement de la vache (alimentation énergétique) :**

Silke et al. [96] ont observé que la perte d'un point d'état entre J28 et J56 entraîne une augmentation des pertes embryonnaires. Le statut métabolique de la vache, s'exprimant par son état d'embonpoint, affecte la survie embryonnaire. En effet, une balance énergétique négative entraînerait une concentration en progestérone plus faible et donc augmenterait les pertes embryonnaires [15]. D'après Ayalon [70], une sous-alimentation diminue les concentrations

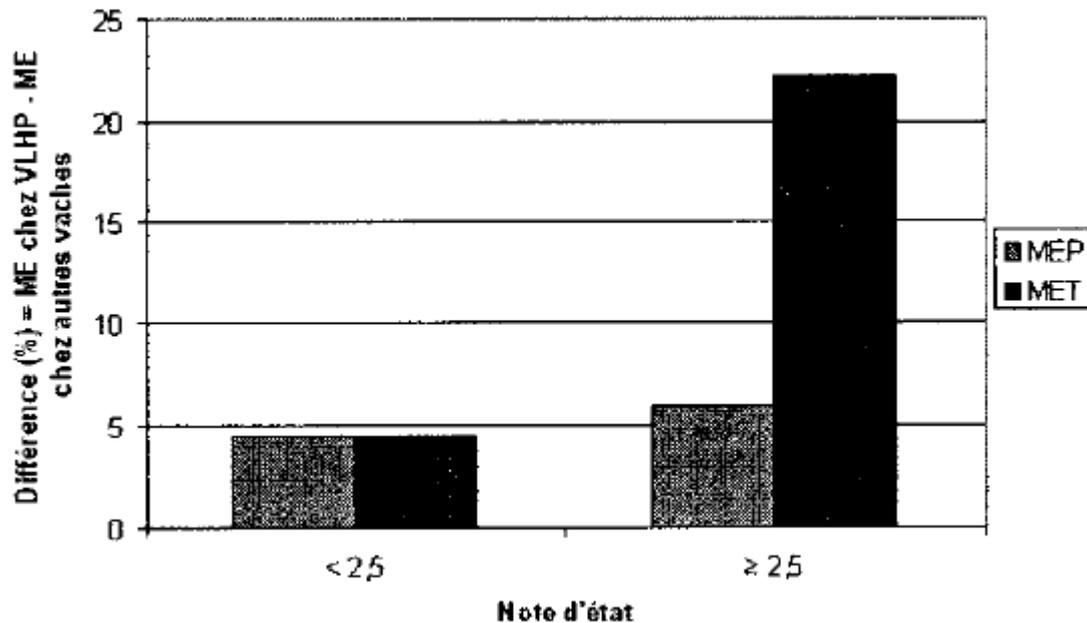
plasmatiques en progestérone ainsi que la proportion de génisses avec un ovocyte fécondé d'aspect normal. Cependant, la relation existant entre l'énergie contenue dans l'alimentation et la mortalité embryonnaire ne s'expliquerait pas seulement par le taux de progestérone. Par exemple, **Enjalbert [30]** constate que chez les génisses une suralimentation avant insémination suivie d'une sous-alimentation diminue sensiblement le taux de survie des embryons sans modifier la progestéronémie. Ainsi, chez la brebis, la sous-alimentation diminue la sécrétion d'interféron r par le conceptus. Pour l'instant aucune étude n'a montré l'existence de cette même relation chez la vache.

**Grimard et al. [10]** observent qu'il y a plus de mortalité embryonnaire tardive lorsque les vaches ont des notes d'état au vêlage et à l'insémination suivante supérieures à 2,5 (**P<0,05**). Les auteurs précisent que cela nécessiterait des études complémentaires pour confirmer cette relation. Se basant sur une étude similaire, **Humblot [73]** souligne l'existence d'une interaction entre la note d'état corporel et la production laitière totale. La figure 2.6 illustre cette interaction. Les pourcentages représentés sur l'axe des ordonnées correspondent à la différence obtenue en soustrayant les pourcentages de MEP (pour les colonnes claires) des vaches laitières hautes productrices (>39 Kg de lait/jour) avec ceux de MEP des autres vaches. Pour les colonnes foncées, il s'agit du même type de différence mais cette fois entre les valeurs de MET. A chaque fois, ces valeurs sont données pour une note d'état inférieure à 2,5 et supérieure ou égale à 2,5.

Les vaches qui produisent moins de 39 Kg de lait par jour ont un taux de fertilité constant quelle que soit la note d'état. En revanche, les vaches laitières hautes productrices (>39 Kg de lait par jour) ont un taux de gestation de 38% lorsque leur note d'état à l'insémination est inférieure à 2,5 mais de 20% seulement lorsque la note est supérieure ou égale à 2,5. Comme montré sur la figure 2.5, cette différence est due à une forte augmentation de la mortalité embryonnaire tardive chez les vaches hautes productrices et de note d'état supérieure ou égale à 2,5 (13,6 vs 20,9%,  $P=0,02$ ) [73]. Pour la MET, la différence de pourcentages entre les vaches hautes productrices et les autres est 5 fois supérieure pour les vaches avec des notes d'état élevées par rapport à celles avec des notes d'état inférieures à 2,5 (22,2% sur la colonne la plus à droite de l'histogramme).

**Starbuck et al. [67]** arrivent quant à eux aux conclusions suivantes : les vaches avec une note d'état comprise entre 2,75 et 3,25 maintiennent le plus de gestations (92,1%), celles avec une note supérieure ou égale à 3,5 n'en maintiennent que 78,0% et celles avec une note inférieure ou égale à 2,5 se situent en position intermédiaire (84,2%). Ils suggèrent que les vaches avec des notes supérieures à 3,5 sont certainement celles mangeant le plus, ce qui augmente le métabolisme de la progestérone entraînant de plus faibles concentrations plasmatiques en progestérone.

Aucune relation entre l'état d'engraissement et le taux de conception n'est cependant observée dans les études ci-dessus ce qui est contredit par d'autres articles. **Snijders et al. [91]** rapportent que la proportion d'oocytes se développant jusqu'au stade blastocyste est de 3,0% pour une note d'état comprise entre 1,5 et 2,5 contre 9,9% pour une note comprise entre 3,3 et 4,0.



**Fig2-5** : Relation note d'état /production / ME (d'après Humblot[73]).

### **Influence de la composition de la ration :**

**Excès d'azote dégradable (ration de base riche en azote soluble "herbe jeune, ensilage de mauvaise qualité "ou complémentation concentrée inadaptée) :**

Dans les conditions normales, l'ammoniac est le résultat de la dégradation ruminale de l'azote. Il est ensuite transformé en urée dans le foie de façon presque totale ce qui correspond à sa détoxification. Cependant, l'augmentation de protéines dégradables dans le rumen constituerait un risque d'augmentation de la concentration en ammoniac et donc de l'urée plasmatique et urinaire

[15]. **Hanzen et al.** [15] observent l'existence d'une relation négative entre la fertilité et l'urémie.

En effet, la circulation de ces dérivés du métabolisme azoté entraîne :

- une modification du pH utérin qui affecte la survie des spermatozoïdes, en raison d'une baisse des concentrations en magnésium, potassium et phosphates qui inhibent l'anhydrase carbonique [12] ;
- un effet cytotoxique potentiel sur les spermatozoïdes et l'ovocyte voire sur l'embryon [12].

**D'après Enjalbert [30]**, une ration qui induit une ammoniémie élevée limite la capacité des oocytes fécondés *in vitro* à se développer jusqu'au stade blastocyste (l'effet est plus net pour les oocytes issus de follicules de taille moyenne) ; une diminution de la progestéronémie [17] et donc une augmentation de la ME; une augmentation de la sécrétion de PGF2a [97].

Les conséquences de ces effets sur le taux de réussite à l'insémination ont donc été largement décrits mais les études qui envisagent les effets sur la survie embryonnaire sont moins nombreuses et pas toutes concordantes. Les vaches à "MET probable" (c'est-à-dire avec un retour en chaleurs décalé après insémination mais avec une progestéronémie élevée à 21 jours suggérant un début de gestation) ont en moyenne une urémie supérieure à celle de vaches gravides [30]. **McCormick et al [65] (cités par [30])** ont mis en évidence expérimentalement que la distribution d'une ration riche en azote total ou en azote dégradable dans le rumen accroît sensiblement le taux de mortalité embryonnaire. La figure 2.6 montre en effet que le taux de mortalité embryonnaire est sensiblement plus élevé lors de la distribution de la ration la plus riche en azote dans l'expérience (M A.T.— 30,8%). Cette ration la plus riche en azote est également associée à l'urémie la plus élevée (0,54 g/L) et au taux de réussite en IA le plus faible (26%). D'autres auteurs n'observent pas d'effet sur la survie des embryons à 30 jours lors de la consommation de pâturage riche en azote et ce malgré une urémie moyenne de 0,4 g/L

[30].

Ceci est lié au fait que les effets d'un apport azoté important sont très dépendants de l'apport énergétique simultané. Le contrôle biochimique des excès azotés peut être réalisé par la mesure de la teneur en urée du sang, ou de celle du lait en troupeau laitier.

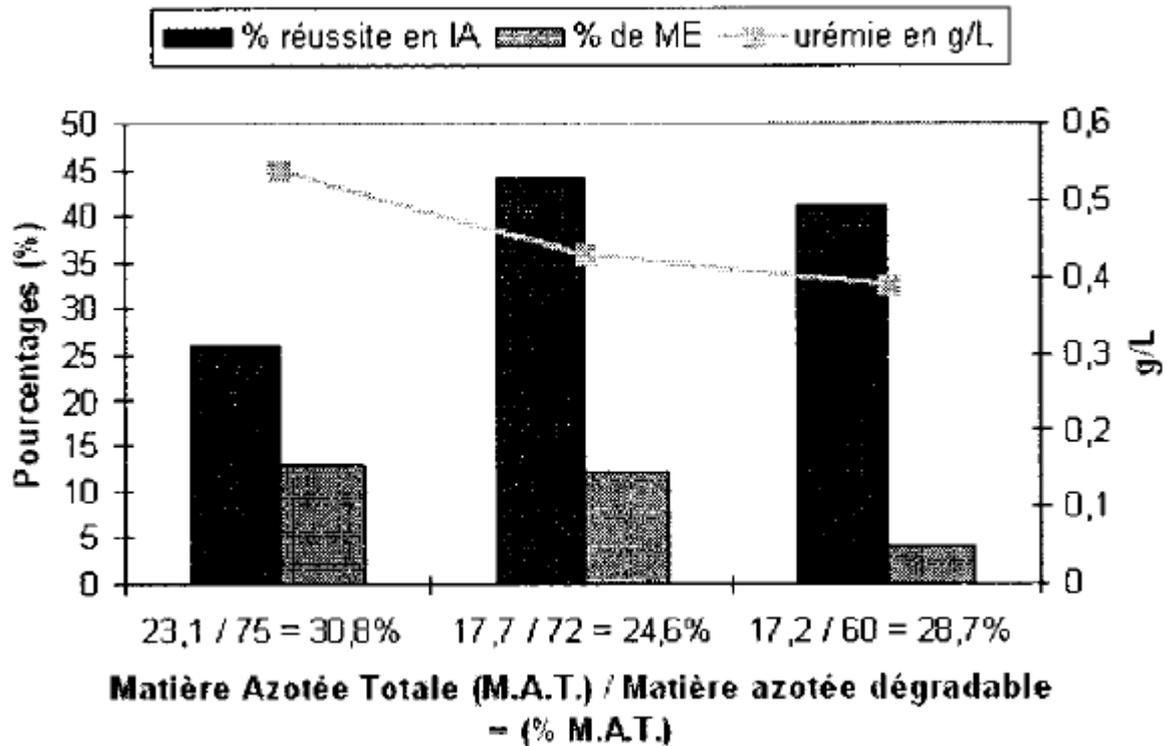


FIG2-6 : Relation entre la quantité et la nature des matières azotées et la reproduction (d'après Enjalbert [30]).

### Déficits minéraux et vitaminiques :

Cela se produit lors d'un défaut d'apports dans la ration (cela arrive plus souvent chez les vaches allaitantes que chez les vaches laitières) ou alors ces déficits sont dus à des carences secondaires. L'implication du cuivre est signalée pour la mortalité embryonnaire. Ainsi, une supplémentation de magnésium, manganèse, fer, cuivre et zinc sous forme organique diminuerait les mortalités embryonnaires précoces [30].

Une carence en vitamine A favorise également la mortalité embryonnaire [30].

### Composants particuliers :

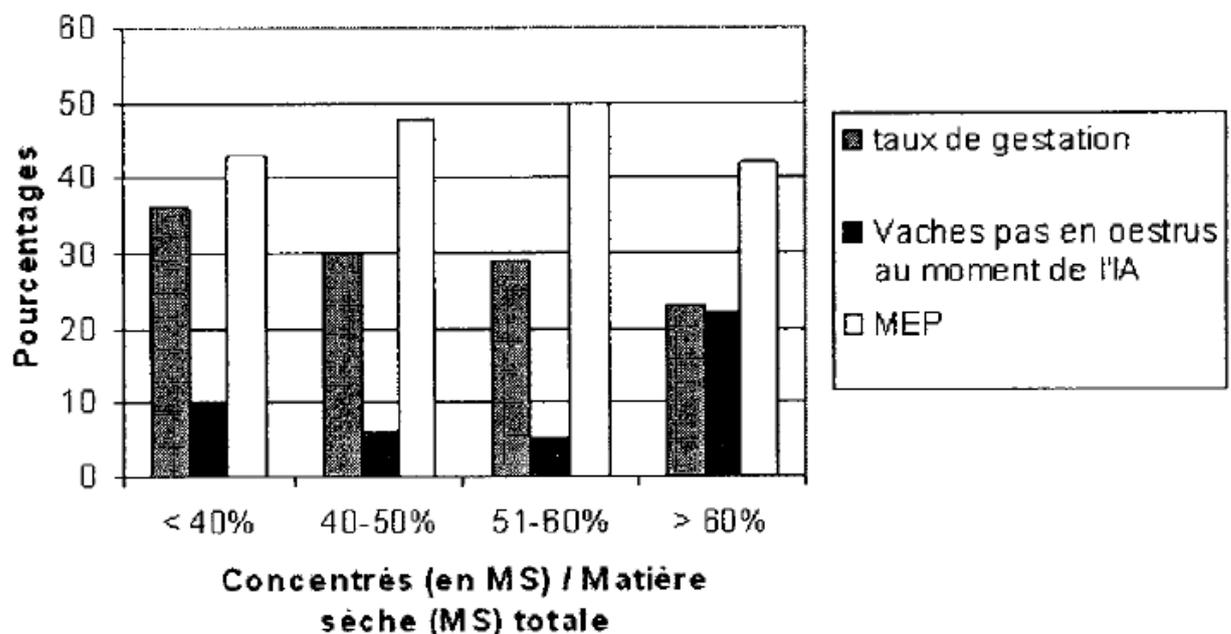
Le gossypol contenu dans certains aliments (graines de coton) et la gossypolone (un de ses principaux métabolites) sont toxiques pour les cellules des mammifères. Des concentrations plasmatiques élevées en gossypol entraînent une diminution de la qualité de l'embryon . et de son développement ainsi qu'une diminution du taux de conception [48]. Il inhibe également la synthèse

de progestérone par les cellules lutéales [15]. Le gossypol a donc à la fois un effet direct sur l'embryon et un effet indirect par inhibition de la synthèse de progestérone.

### Quantité de concentrés par rapport à la matière sèche totale :

L'histogramme 2.7 présente l'effet de la quantité de concentrés présents dans l'alimentation sur le taux de gestation, la MEP et l'œstrus.

Cet histogramme, présentant les résultats de l'étude **d'Hamblot [73]**, montre que le taux de gestation diminue lorsque le ratio concentrés/matière sèche totale augmente. Ainsi, il est de 36% pour un ratio inférieur à 40% et de 23% pour un ratio supérieur à 60%. Cette différence s'explique d'une part par un taux élevé de vaches n'étant pas en œstrus au moment de l'insémination [73]. D'autre part, la MEP augmente en même temps que la quantité de concentrés mais revient à sa valeur de départ lorsque le ratio est supérieur à 60%.



**Fig2.7 :** Influence du ratio Concentrés/Matière sèche/ sur les paramètres de la reproduction (d'après Hamblot [73]).

### **2.3.3 Production laitière :**

Les auteurs s'accordent pour dire que les performances reproductrices des troupeaux laitiers ont diminué en Europe, Amérique du Nord et Israël ([2], [10], [73], [91]). Une enquête réalisée en France entre 1995 et 2005 sur un grand nombre d'inséminations artificielles montre que le déclin du taux de conception est proche de 1% par an [2]. Les effectifs considérés dans l'étude sont de 5 256 226 pour la race Montbéliarde, 5 233 955 pour la race Normande et 35 641 705 pour la race Prim'Holstein, ce qui constitue un échantillon représentatif. Pendant cette même décennie, l'amélioration génétique a abouti à des gains en production laitière (+ 105 Kg/an), taux protéique (+3,9 Kg/an) et taux butyreux (+3,5 Kg/an) dans la race Prim'Holstein en France (UNCEIA, 2003).

#### **Influence de la quantité de lait produite :**

Dans la race Prim'Holstein, en France, la production laitière est reliée négativement à la fertilité post-partum et l'amélioration génétique en production laitière expliquerait 30 à 50% du déclin du taux de conception [2], Cela signifie que 0,3 à 0,5% du déclin de 1% par an du taux de conception seraient dus à la sélection laitière [2]. **Humblot [73]** ajoute que l'effet négatif de la sélection sur potentiel laitier sur les performances de reproduction pourrait être responsable du déclin du taux de fertilité observé depuis les années 70 dans

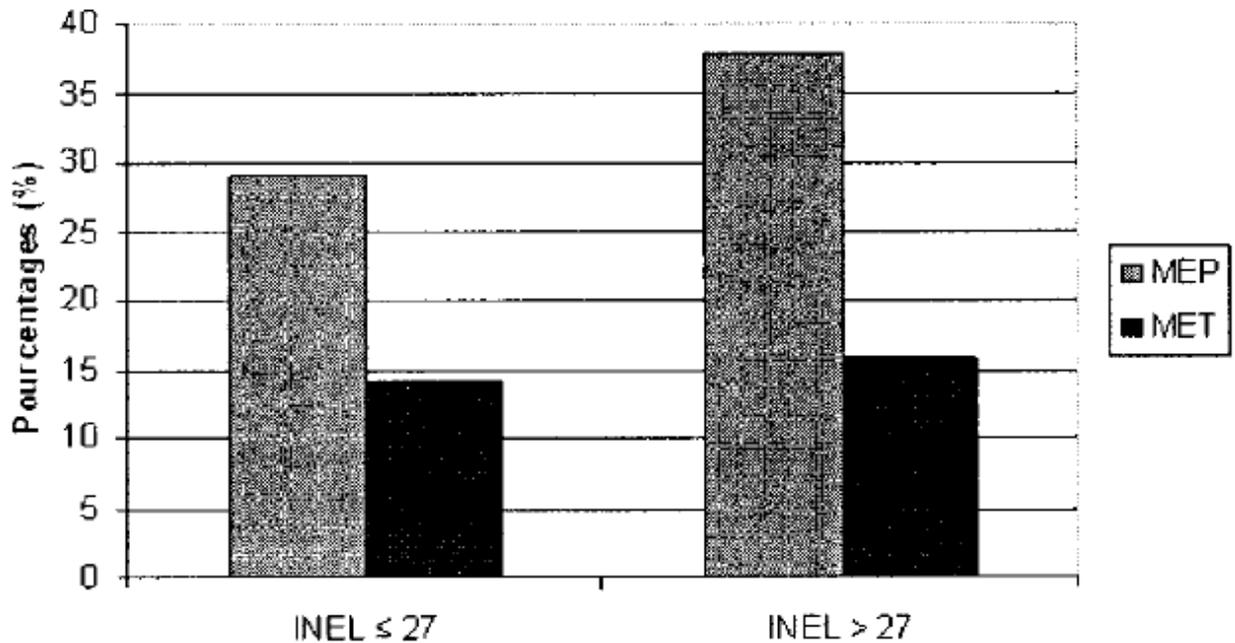
de nombreux pays à politique de sélection intensive.

Une explication possible serait que l'augmentation de la production laitière s'accompagne d'une augmentation du métabolisme ce qui pourrait influencer les concentrations périphériques en stéroïdes. Cela peut alors être responsable d'une augmentation plus lente des concentrations en progestérone pendant le début du diœstrus et donc de mortalité embryonnaire précoce [37].

**Grimard et al. [10]** observent que le taux de conception diminue significativement lorsque la production laitière augmente (pour une production supérieure à 39 Kg/j) et lorsque l'index de mérite génétique (Index Economique Laitier INEL) augmente (>27 points). Il faut noter que dans cette étude, l'index de mérite génétique est une combinaison linéaire entre la quantité de protéines (QP) dans le lait (Kg/an) et la concentration en protéines (CP en g/Kg;  $INEL = 1,15(QP + 3CP)$ ).

**Humblot [73]** ajoute que la diminution du taux de fertilité pour les vaches à fort INEL est due à une forte augmentation de la mortalité embryonnaire précoce (29,1% pour un  $INEL < 27$  vs 37,9% pour un  $INEL > 27$ ,  $P=0,01$ ). Cela serait dû à une mauvaise qualité de l'oocyte et/ou du follicule avant ovulation. En revanche, les résultats de son étude indiquent que la fréquence de mortalité embryonnaire tardive n'est pas significativement différente (14,2% vs 15,9%). Ces valeurs sont

représentées sur l'histogramme 2.8.



**Fig2- 8 :** Mortalité embryonnaire et INEL (d'après les pourcentages de Humblot [73]).

Cependant, **Grimard et al. [10]** rapportent que la mortalité embryonnaire tardive est plus forte pour des vaches laitières hautes productrices (>39 Kg/j) ( $P < 0,01$ ). Il est à noter que l'effet négatif d'une importante production laitière sur le taux de conception a été observé dans cette étude sur des vaches hautes productrices représentant 30% de la population. En conclusion des deux articles, en analysant simultanément les effets de l'index de mérite génétique et de la production laitière phénotypique, l'INEL influence principalement la MEP alors qu'une production laitière élevée est associée à une augmentation de la MET chez les vaches à note d'état élevée.

**Fréret et al. [89]** observent également que le taux de gestation diminue lorsque la production laitière moyenne du troupeau augmente (50,5% pour une production inférieure à 8500 Kg/an vs 40,1% pour une production supérieure à 9500 Kg/an,  $P = 0,025$ ). De plus, dans leur étude, un pourcentage élevé de 20,2% de MET (soit une incidence de 31,1%) est observé [89]. Il est précisé que 35 des 135 élevages ont même présenté des taux de MET supérieurs ou égaux à 40%. Il s'agit pourtant d'élevages avec de bonnes pratiques de conduite de la reproduction (large utilisation d'un support de suivi, nombreuses informations notées, notation des 1<sup>ères</sup> chaleurs, utilisation

systématique du constat de gestation...) [89]. Ainsi, au vu de cette étude, nous pouvons supposer que comme dit précédemment une forte production laitière augmente le pourcentage de MET même si des bonnes pratiques de conduite de la reproduction sont appliquées. Cependant, les auteurs n'ont pas mis en relation les paramètres "pourcentage de MET" et "quantité de lait produite". Cela aurait permis de savoir plus précisément si les 27 élevages recensés dans l'étude comme produisant plus de 9500 Kg de lait par an (en moyenne troupeau) faisaient partie des 35 présentant un pourcentage de MET supérieur à 40.

L'index de mérite génétique utilisé par **Grimard et al. [10]** correspond à l'INEL alors que dans l'étude de **Snijders et al. [91]** il s'agit d'un index calculé sur les ascendances. Malgré cette différence dans la définition de l'index, **Snijders et al. [91]** trouvent également que les vaches à haut mérite génétique ont une proportion d'ovocytes se développant jusqu'au stade blastocyste inférieure aux vaches à mérite génétique moyen. Cependant, l'auteur n'observe aucun effet de la quantité de lait produite par vache et par an sur la compétence ovocytaire c'est-à-dire la proportion d'ovocyte se développant jusqu'au stade blastocyste (voir la partie 2.1.1). De même, **Chebel et al. [85]** n'observent pas de relation directe entre la production laitière et le taux de conception. Ainsi, ils suggèrent que la baisse de fertilité observée chez les vaches laitières hautes productrices serait associée à d'autres facteurs que la quantité de lait produite. Par exemple, les vaches hautes productrices présenteraient davantage de maladies post-partum du fait de la quantité élevée de lait produite ce qui diminuerait les performances reproductrices [85].

### **Influence de la teneur du lait en protéines :**

La composition du lait entre également en jeu. Ainsi, la mortalité embryonnaire précoce est inférieure pour les vaches dont la concentration protéique du lait est supérieure à 30 g/Kg par rapport à celles avec une concentration protéique inférieure à 30 g/Kg (28,6% vs 32,8%). Cependant, aucune influence de la composition protéique du lait n'est observée en ce qui concerne le taux de mortalité embryonnaire tardive (14,6% vs 15%) [73].

### **2.3.4 Recours à la FIV et au TE :**

#### **Fécondation *in-vitro* :**

Les embryons obtenus *in vivo* et *in vitro* présentent des caractéristiques morphologiques et physiologiques fort différentes. Les embryons produits *in vitro* ont, par exemple, une densité moindre ce qui les rend plus sensibles à la congélation. Dans son article de synthèse, **Hansen [15]**

rapporte que l'interruption de la gestation pendant la période embryonnaire est plus fréquente après le transfert d'embryons obtenus *in vitro* qu'*in vivo* et surtout si les embryons obtenus *in vitro* ont été congelés. L'obtention d'un embryon par méthode *in vitro* peut avoir des conséquences sur son développement ultérieur jusqu'au stade fœtal. Ainsi, dans l'espèce bovine, des embryons de classe 1 obtenus *in vitro* présentent plus fréquemment de la mortalité embryonnaire que les embryons morphologiquement de même qualité produits *in vivo* [15]. Un embryon de classe 1 correspond à un embryon de qualité excellente c'est-à-dire sphérique avec des cellules de taille et d'aspect comparables (voir la définition de **Lindner** [41] dans la partie 2.3.1).

La membrane pellucide des embryons constitue une barrière de protection à rencontre des agents infectieux. Cependant, la membrane obtenue dans des conditions *in vitro* possède des différences de structure et de contenu protéique [15]. Ces différences pourraient être responsables d'une modification de la capacité de résistance de la membrane pellucide mais le risque est limité par le recours, d'une part, à des procédés visant à réduire, voire éliminer les bactéries présentes dans le sperme utilisé pour la FIV (gradients de percoll, procédures de *swim-up*). D'autre part, l'addition d'antibiotiques au milieu de culture, le lavage des embryons au moyen de trypsine (permettant d'éliminer les particules virales), l'utilisation de sérums décontaminés par irradiation ou de substituts de sérums sont autant de méthodes permettant de limiter les risques.

### **Traitement de superovulation :**

D'après **Hanzen et al.** [15], plusieurs études ont démontré que les traitements de superovulation au moyen d'eCG ou FSH étaient responsables d'une absence de fécondation et d'une augmentation de la fréquence d'embryons dégénérés récoltés. Cela serait dû à un effet sur le transport du sperme dans les voies génitales mais surtout à l'induction d'un profil hormonal anormal. Ce profil se caractérise par une concentration plasmatique en progestérone trop élevée pendant l'œstrus induit et par une insuffisance de la libération préovulatoire d'hormone LH voire par l'ovulation prématurée d'un follicule dominant éventuellement présent lors de la mise en place du traitement. Le nombre d'embryons dégénérés récoltés après superovulation augmente. Cela est dû à une accélération de leur passage dans l'oviducte sous l'effet d'une augmentation trop précoce de la progestérone synthétisée par des follicules prématurément lutéinisés [15].

### **2.3.5 Le diagnostic de gestation par palpation transrectale et ses effets :**

Le fœtus et les cotylédons sont palpables manuellement après 60 voire 75 jours de gestation. Avant cette période, le diagnostic de gestation est fondé sur l'identification d'une distension de la corne par les liquides, ou sur le glissement des membranes chorioallantoïdiennes (dès 35-45 jours) ou sur

la palpation de la vésicule amniotique (dès 30-35 jours). La fréquence de mortalité embryonnaire va être influencée par divers facteurs liés à la palpation manuelle du tractus génital. D'après **Picard-Hagen [72]**, le pourcentage de pertes embryonnaires après mise en évidence de la fluctuation liquidienne, recherche de la vésicule amniotique et/ou glissement des membranes annexielles est de 10% environ. L'expérience du clinicien entre en jeu et l'on constate une augmentation de la fréquence de pertes embryonnaires chez les animaux des troupeaux suivis par des universités vétérinaires. Cela pourrait résulter d'une palpation plus intense et parfois plus répétée par des personnes moins expérimentées [15]. Cependant, les facteurs les plus importants restent la méthode de diagnostic et le stade de gestation. La méthode de diagnostic basée sur le glissement des membranes fœtales a été considérée comme un facteur de risque de mortalité embryonnaire par certains auteurs mais pas par d'autres. **Abitt et al. [9] (cités par [15])** montrent qu'elle augmente la fréquence de mortalité embryonnaire alors que **Alexander et al. [11] (cités par [15])** ne notent pas d'effet significatif lorsque ce diagnostic est réalisé entre le 30<sup>ème</sup> et le 45<sup>ème</sup> jour de gestation. Le stade de gestation exerce une influence certaine. Indépendamment de la méthode utilisée, la plupart des auteurs rapportés dans l'article de synthèse [15] s'accordent sur un plus grand risque de réforme ou de pertes embryonnaires chez les animaux examinés par palpation manuelle avant le 37<sup>ème</sup>, 45<sup>ème</sup>, 48<sup>ème</sup>, ou 50<sup>ème</sup> jour selon les auteurs. Si ces deux facteurs de risque sont mis en relation, il en résulte qu'un diagnostic basé sur le glissement des membranes fœtales engendre davantage de pertes que la palpation de la vésicule amniotique entre le 45<sup>ème</sup> et le 70<sup>ème</sup> jour de gestation (6,3% vs 4,3%) tandis que cette seconde méthode induit plus de pertes entre le 30<sup>ème</sup> et le 44<sup>ème</sup> jour de gestation (5,1% vs 4,8%) [15]. De même, **Vaillancourt et al. [20]** observent une fréquence de mortalité embryonnaire plus élevée lors de diagnostic par glissement des membranes avant le 50<sup>ème</sup> jour de gestation.

### **2.3.6 Effet troupeau :**

#### **Influence de la taille du troupeau :**

D'après [73], le taux de gestation diminue lorsque la taille du troupeau augmente (46,9% pour un troupeau de moins de 40 vaches contre 39,4% pour un troupeau de plus de 40 vaches,  $P < 0,001$ ).

#### **Influence du type de production :**

Le taux de gestation est de 45% pour les élevages laitiers et de 46% pour les élevages laitiers gérant en plus des cultures. Cependant, il est seulement de 40% pour les exploitations gérant

différents types de production animale ( $P < 0,001$ ) [73].

### **Influence de la Date de Réintroduction de la vache au sein du Troupeau (DRT) :**

D'après **Humblot** [73], la date à laquelle la vache tarie est réintroduite au sein du troupeau avant vêlage est un facteur ayant une influence sur les taux de mortalité embryonnaire et de gestation des vaches du troupeau. Ainsi, lorsque la vache tarie est rentrée le jour du vêlage (DRT1), le taux de gestation est de 45,5% alors qu'il est de 41,7% lorsqu'elle est rentrée de 5 à 15 jours avant vêlage (DRT2) et de 35% à plus de 15 jours avant vêlage (DRT3) ( $P < 0,001$ ). Lorsque la vache est rentrée le jour du vêlage (DRT1), aucune différence en ce qui concerne les taux de fertilité et de mortalité embryonnaire n'est observée entre les vaches à INEL élevé ( $>27$ ) et les autres. L'augmentation de la mortalité embryonnaire tardive due à une rentrée trop précoce est différente selon que l'on considère les vaches à haut ou faible index génétique. En effet, les vaches DRT2 à INEL inférieur ou égal à 27 ne subissent aucune baisse de fertilité en comparaison aux vaches DRT1. Au contraire, pour les vaches DRT2 à INEL élevé ( $>27$ ), les taux de mortalité embryonnaire précoce et tardive augmentent. Pour les vaches DTR3 à INEL supérieur à 27, ces taux sont également supérieurs à ceux des vaches DTR1. Les vaches DTR3 à INEL supérieur ou égal à 27, ont une fertilité plus basse mais cela est dû à l'augmentation du taux de mortalité embryonnaire tardive uniquement qui est alors proche de 20%. Pour conclure, l'effet négatif sur la fertilité d'une réintroduction trop précoce au sein du troupeau est plus prononcé chez les vaches à INEL élevé, d'autant plus si la réintroduction s'effectue plus de deux semaines avant vêlage (DTR3).

### **2.3.7 Effet race :**

**Barbat et al.** [2] ont fait un bilan phénotypique de la fertilité à l'IA chez les trois principales races laitières françaises : race Prim'Holstein, race Normande et race Montbéliarde. Un des paramètres étudiés est le taux de réussite en 1<sup>ère</sup> insémination (TRIAI).

Chez les génisses, on observe, pour les 3 races, une forte chute du TRIAI de 63% en 1995 à 55% en 2003. Si la réduction est régulière pour les génisses Montbéliarde et Prim'Holstein (1% par an), elle est surtout marquée en Normande entre les campagnes 2001 et 2002.

La figure 2.9 présente les résultats du TRIAI pour les vaches Prim'Holstein (PH), Normandes (NO) et Montbéliardes (MO) en lactation.

Chez la vache en lactation Normande et Montbéliarde (voir la figure 2.9), le TRIAI est relativement stable depuis 1995 avec néanmoins une tendance à la baisse en race Normande

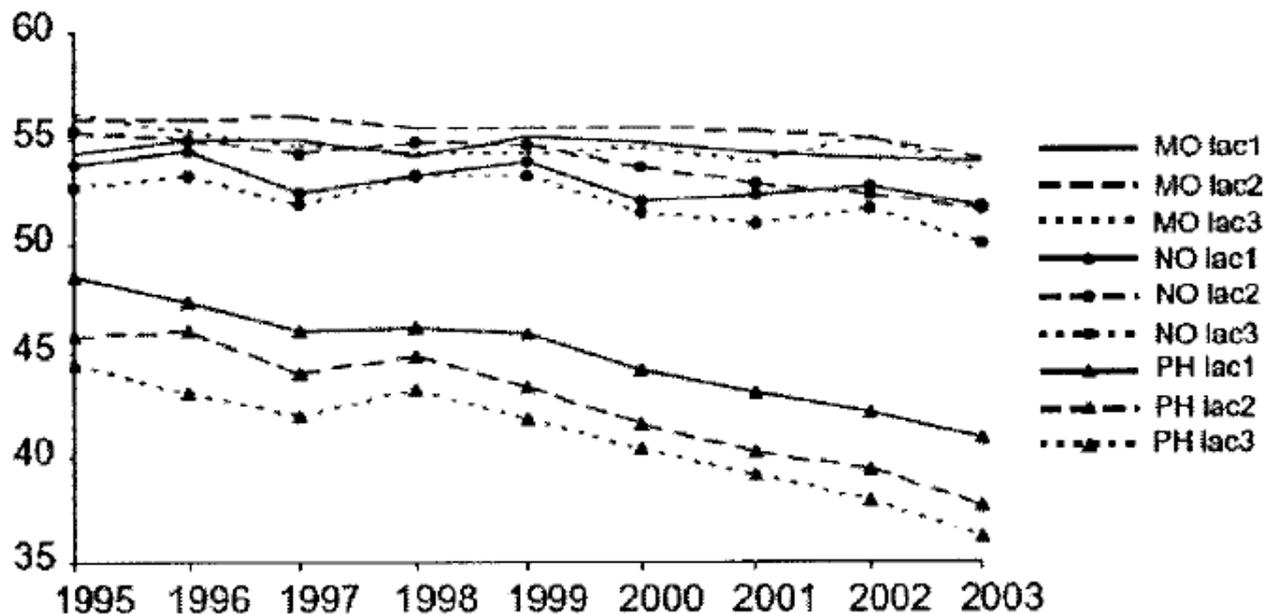


FIG 2-9 : Évolution du TRIAI par race et rang de lactation (Barbat [2]).

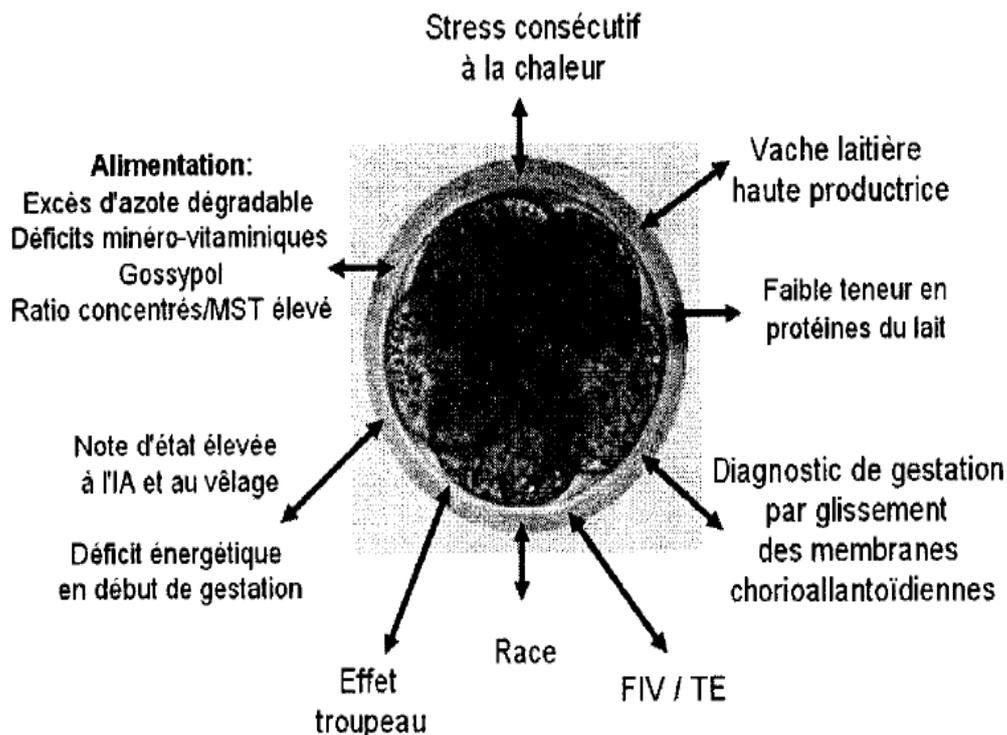
après 1999. En revanche, pour la race Prim'Holstein, on observe pour les 3 premières lactations et comme pour les génisses une baisse de 1% par an depuis 1995, augmentant encore son déficit de fertilité vis-à-vis des deux autres races [2],

En conclusion, une dégradation continue et rapide des performances de reproduction de la race Prim'Holstein est observée ce qui en fait la race laitière française dont la fertilité est la plus atteinte. En race Normande une baisse nettement moins marquée est observée alors qu'en race Montbéliarde, les performances de reproduction sont relativement stables au cours des 10 dernières années.

Le TRIAI utilisé dans l'article de Barbat et al. [2] peut être utilisé comme un indicateur de la ME. En effet, il englobe la ME puisque pour le définir on observe les retours en chaleurs à partir de J28 généralement (date à laquelle en cas d'échec, de nouvelles chaleurs apparaissent). Au moins une partie de la période embryonnaire est donc comprise dans cet indice de fertilité. Cependant, l'étude du TRIAI ne permet pas de savoir s'il s'agit de non fécondation, de MEP ou de MET. Des études complémentaires seraient donc nécessaires pour préciser quel type d'échec précoce de

gestation est responsable de cette dégradation du TRIAI rapportée dans l'article de **Barbat et al.** [2].

### 2.3.8 Schéma récapitulatif :



**Fig2-10** : Facteurs extérieurs

### 2.4 Conclusion :

De nombreux facteurs prédisposants aux échecs de gestation précoces existent. Certains jouent un rôle plus important envers la MEP (ou NF) et d'autres envers la MET. Cependant, hiérarchiser les facteurs influents et identifier leur impact sur les échecs de gestation aux différents stades nécessitent des études épidémiologiques à grande échelle. Ce type d'études fondé sur l'enregistrement combiné des facteurs de risque et des résultats de dosages hormonaux est très coûteux à mettre en œuvre et rarement réalisé. C'est pourquoi ni un ni plusieurs facteurs ne sont identifiés comme ayant un impact dominant sur les pertes précoces de gestation

**CHAPITRE 3 :**  
***DIAGNOSTIC ET***  
***STRATEGIES DE LUTTE***  
***DE LA MORTALITE***  
***EMBRYONNAIRE***

### **3.1 Méthodes de contrôle de la gestation et des mortalités embryonnaires chez les bovins :**

La quantification de la mortalité embryonnaire dans l'espèce bovine n'est pas chose aisée [15]. Il faut y voir le manque d'harmonisation de sa définition et donc de la période considérée mais également l'emploi de méthodes aussi différentes que l'abattage des animaux, la récolte d'embryons, les dosages hormonaux, la palpation transrectale ou l'échographie. La méthode d'étude de la mortalité embryonnaire par abattage des animaux est utilisée uniquement dans les études expérimentales et n'est pas la technique employée en pratique sur le terrain pour des raisons économiques évidentes. Cependant, il s'agit de la méthode la plus fiable pour étudier les échecs de fécondation et la mortalité embryonnaire [70]. De plus, l'abattage suivi de la perfusion de l'oviducte est la seule méthode qui permet de différencier la non fécondation de la MEP lors d'intervention dès le 3<sup>ème</sup> jour après la mise à la reproduction.

De nombreux signaux sont émis par le conceptus dès le premier mois de gestation mais certaines molécules (cytokines, facteurs de croissance, progestérone) ne sont pas spécifiques de la gestation. En outre, parmi les molécules spécifiques de l'activité embryonnaire, certaines ne passent pas dans la circulation périphérique maternelle et ne peuvent donc pas être utilisées pour établir un constat de gestation. En effet, les protéines embryonnaires, telles que l'interféron  $\gamma$ , responsables du maintien du corps jaune, restent localisées dans la cavité utérine [72]. Certains signaux sont sécrétés tardivement et ne peuvent pas servir à la détection des stades précoces du développement du conceptus.

La quantification de la mortalité embryonnaire tardive relève le plus souvent de l'association de méthodes précoces de diagnostic de nature hormonale (dosage de progestérone à J21-24 et dosage de PSPB ou PAG à J30-35), échographique (à partir de 28-30 jours) ou manuelle et de méthodes tardives par palpation transrectale ou simple notation du retour en chaleurs de l'animal ou de sa réinsémination. Ces méthodes sont de nature à surévaluer ou sous-évaluer, selon les circonstances, la fréquence de la mortalité embryonnaire. Divers biais sont possibles et résultent de différences voire de variations en fonction du stade de gestation de la sensibilité des méthodes utilisées [15]. Ils peuvent également relever du fait que certaines méthodes telles que la palpation transrectale peuvent dans certaines circonstances être responsables d'une mortalité embryonnaire. Enfin le degré d'exactitude du diagnostic peut également dépendre de la qualité de la détection des chaleurs.

### 3.1.1 Surveillance des chaleurs :

Au niveau du troupeau, le critère global analysé est le taux de retour en chaleurs régulier (vers 3 semaines) ou irrégulier. En effet, suivant le moment où la vache revient en chaleurs par rapport au jour de l'insémination, il sera alors possible d'avoir déjà une présomption d'un type de mortalité embryonnaire plutôt que l'autre.

En cas de mortalité embryonnaire précoce, la durée du cycle sexuel n'est pas modifiée. Si un retour en chaleurs a lieu, il se fait alors entre le 18<sup>ème</sup> et le 24<sup>ème</sup> jour après la mise à la reproduction. Cependant, cela ne permet pas de dire s'il y a eu non fécondation ou mortalité embryonnaire précoce. Au contraire, lors de mortalité embryonnaire tardive, l'embryon a eu le temps d'émettre un signal anti-lutéolytique. Ainsi, la lutéolyse et l'ovulation suivante se produisent plus tard qu'au cours d'un cycle normal. Généralement les retours en chaleurs s'observent alors entre le 25<sup>ème</sup> et le 35<sup>ème</sup> jour suivant l'insémination. Dans ce cas, une forte présomption de mortalité embryonnaire tardive existe, si toutefois la vache mise à la reproduction était bien en œstrus au moment de l'insémination et la détection des chaleurs efficace. Dans ce cas, l'absence d'œstrus à 21 jours est liée au maintien du corps jaune. Cependant, en raison des difficultés rencontrées en pratique dans la détection des chaleurs, les deux types de mortalité peuvent être facilement confondus si l'on se base uniquement sur l'observation des retours en chaleurs. **Ayalon [70]** précise que rallongement des intervalles entre l'insémination et le retour en chaleurs ne doit en aucun cas être retenu comme la principale preuve de l'existence de mortalité embryonnaire. En effet, la spécificité de détection des retours est élevée en moyenne dans les élevages (90 à 95%) mais de grands écarts existent d'une exploitation à l'autre. La sensibilité de la détection des retours est en revanche très faible (50% en moyenne). Si l'on se fie uniquement à ce critère, des erreurs d'interprétation peuvent donc être commises. Ainsi même si un animal n'est pas gestant et ovule 21 jours après l'insémination, des chaleurs non détectées à cette date, suivies d'un retour plus tardif peut être interprété comme le signe d'une mortalité embryonnaire tardive. De plus, suite à une mauvaise détection des chaleurs, une confirmation progestéronique d'une gestation peut être erronée si l'animal inséminé 21 jours plus tôt n'était pas en chaleurs. En effet, selon **Ayalon [70]**, environ 20% des vaches inséminées ne sont probablement pas en œstrus au moment de l'insémination. De même, la manifestation de chaleurs par un animal auparavant confirmé gestant ne constitue pas nécessairement la preuve d'une interruption de gestation. Pour finir, l'inflammation utérine ou l'infection pouvant arriver après l'insémination sont associées à une persistance du corps jaune et à des retours en chaleurs décalés **[70]**. Seul le recours aux différentes méthodes décrites par la suite permettra de confirmer la présomption.

### **3.1.2 Dosage de la progestérone ou diagnostic de non gestation :**

Afin d'estimer la fréquence de mortalité embryonnaire précoce ou non fécondation, l'observation des retours en chaleurs n'est pas suffisante. Il est nécessaire de connaître les concentrations de progestérone. Le dosage s'effectue dans un intervalle compris entre le 21<sup>ème</sup> et le 24<sup>ème</sup> jour après l'insémination, moment où le résultat est différent si l'animal est gravide ou non. Un niveau de progestérone bas (<5 ng/mL) exclu toute gestation. Ainsi, la mortalité embryonnaire précoce ou la non fécondation peuvent être établies avec certitude si les dosages effectués le jour de l'insémination et celui réalisé à 21 jours révèlent tous deux de faibles concentrations en progestérone (<3 ng/mL à J0 et <5 ng/mL à J21). La fréquence d'animaux non fécondés, parmi ceux qui ont une concentration en progestérone faible, est peu élevée et représente un facteur de biais incontournable pour identifier les mortalités embryonnaires précoces. En effet, les méthodes fondées sur le dosage de signaux de reconnaissance maternelle très précoces, qui permettraient d'identifier tôt les femelles fécondées ne sont pas encore fiables et donc pas utilisées en pratique. D'après **Humblot [74]**, 30 à 50% des vaches subissant une mortalité embryonnaire précoce ne présentent pas de chaleurs au moment attendu, à 21-24 jours après insémination. L'absence de gestation n'est détectée qu'au cycle suivant, parfois même après plusieurs cycles. Ainsi, en l'absence de dosage de la progestérone chez les animaux fécondés, qui permettrait de révéler précocement l'état de non gestation, la fréquence des mortalités embryonnaires précoces est sous-évaluée, et celle des mortalités embryonnaires tardives est surestimée. La fréquence de mortalité embryonnaire précoce ou non fécondation est de 20,5 à 43,6% et celle de mortalité embryonnaire tardive est de 8 à 17,5% **[73]**. L'essentiel de la mortalité embryonnaire étant précoce, les dosages de progestérone présentent donc un intérêt majeur.

Un niveau élevé de progestérone à J21 précédé d'un niveau bas à JO ne permet pas de dire avec certitude que la vache est gravide. En effet, ce niveau élevé peut signer soit un état de gestation, soit le maintien d'un corps jaune sécrétant au 21<sup>ème</sup> jour (et donc en réalité de la mortalité embryonnaire tardive).

Lorsqu'elle est utilisée seule, cette méthode de diagnostic est donc un diagnostic de non gestation. En pratique, le vétérinaire réalise un prélèvement de sang ou de lait de préférence les 23-24<sup>ème</sup> jours, après avoir au préalable réalisé un premier prélèvement le jour de l'insémination (JO). Ces prélèvements sont placés sur des milieux spécifiques contenant un conservateur. Le laboratoire réalise des dosages par des méthodes radio-immunologiques ou des tests ELISA. Actuellement, les seules méthodes de dosage commercialisées pour mesurer les concentrations de progestérone sont adaptées pour le dosage en laboratoire. L'importance grandissante des problèmes de fertilité, en particulier dans les élevages laitiers, provoque un regain d'intérêt, pour les techniques de dosage à la

ferme, non commercialisées pour le moment. Concernant les tests de laboratoire, l'exactitude des résultats négatifs (nombre de négatifs/nombre de femelles vides) est pratiquement de 100% et celle des résultats positifs (nombre de femelles mettant bas/nombre de positifs) est de 70 à 75%. Les faux positifs s'expliquent soit par un allongement du cycle œstral, soit lorsque l'insémination a eu lieu en phase lutéale (5 à 10% des IA), soit lors de mortalité embryonnaire tardive (10 à 12%), soit lors d'interruption plus tardive de la gestation (2 à 5% des cas)

[72].

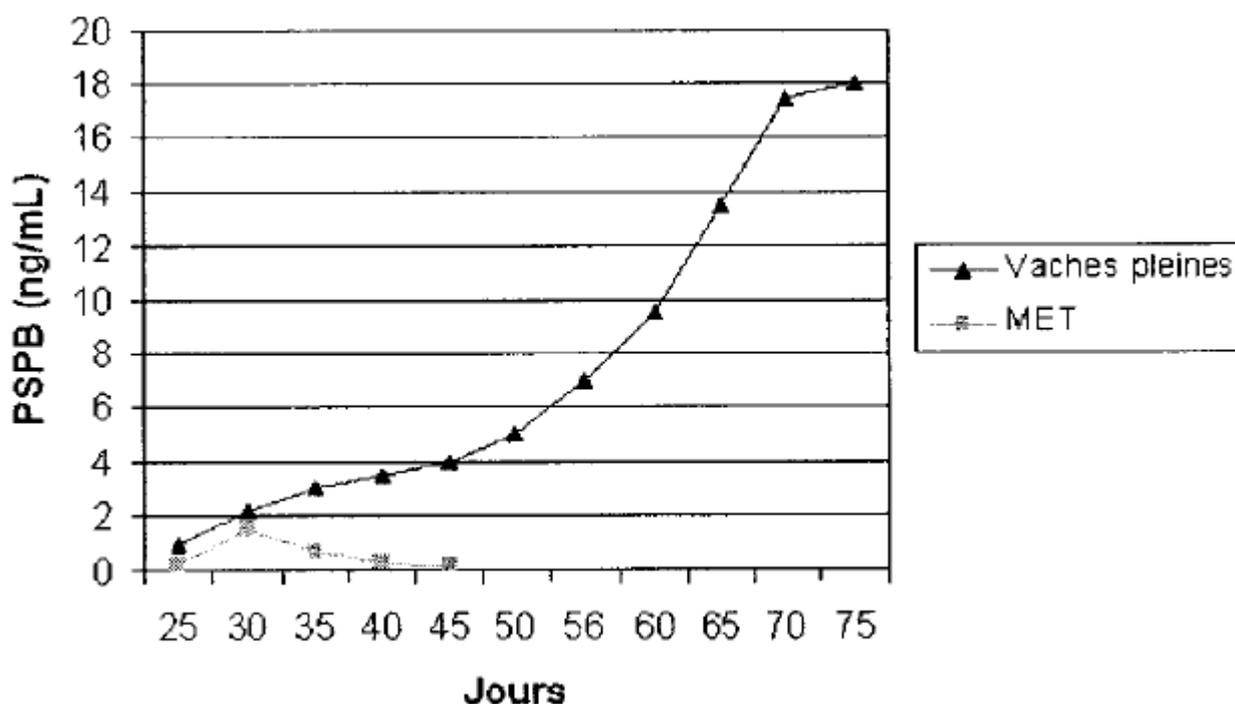
Une insémination en phase lutéale peut être évitée par un dosage de progestérone juste avant insémination : si la concentration en progestérone est élevée la vache est en phase lutéale et l'insémination doit être reportée. Considérant que l'exactitude des résultats positifs n'est que de 70-75%, cela signifie qu'un pourcentage important de vaches présentent une activité lutéale entre J21 et J24 mais ne mettent pas bas. Ainsi, il est intéressant d'effectuer un diagnostic de confirmation de gestation par dosage de PSPB, et/ou échographie, et/ou palpation transrectale.

### **3.1.3 Dosage de la PSPB (Pregnancy Spécifié Protein B) :**

La PSPB appartient à une famille de glycoprotéines spécifiques de la gestation chez les ruminants tout comme la *Pregnancy Associated Glycoprotein (PAG)* et la *Pregnancy Serum Protein 60 (PSP60)*. Elles sont synthétisées par les cellules binucléées du trophoblaste et caractéristiques du placenta cotylédonnaire des ruminants. Elles sont détectées dans le sang dès le 15<sup>ème</sup> jour (PSPB), le 22<sup>ème</sup> jour (PAG) ou le 27<sup>ème</sup> jour (PSP60) après la fécondation [14]- Ces trois protéines sont similaires mise à part quelques différences biochimiques. Chez la vache gravide, les concentrations en PSPB augmentent entre le 15<sup>ème</sup> et le 35<sup>ème</sup> jour de gestation pour atteindre des concentrations plasmatiques de l'ordre de 2 à 3 ng/mL à J35 [73]. Cependant, des variations individuelles très importantes existent lors des mesures des concentrations périphériques en PSPB au début de la gestation. Cela explique que l'augmentation de la concentration en PSPB peut parfois être détectée uniquement à partir de J30 chez certaines femelles. La détection de cette protéine se fait donc habituellement chez les bovins gravides à partir du 30<sup>ème</sup> jour dans le plasma sanguin. La production de PSPB est variable d'une vache à l'autre mais reproductible pour la même vache d'une gestation à l'autre [72]. Des concentrations de PSPB élevées persistent au cours du post-partum chez les bovins en raison de la longue demi-vie de 7 jours de cette protéine. Ainsi, le dosage de PSPB chez les bovins est effectué à partir de prélèvements sanguins réalisés plus de 30 jours après l'insémination à condition que l'intervalle vêlage/insémination ait été supérieur à 70 jours. Ainsi, **Hanzen et al.** [14] préconisent de respecter une période d'attente de 100 jours post-partum pour effectuer le dosage.

L'exactitude des résultats positifs est de 90% et celle des résultats négatifs est de 99,5% [73].

En cas de non fécondation ou de mortalité embryonnaire précoce, des concentrations de PSPB seront détectées à J30 dans moins de 3% des cas [72]. Humblot [73] précise même que cette protéine est habituellement non détectable lorsque quantifiée entre J24 et J30 en cas de MEP. En revanche, en cas de mortalité embryonnaire tardive, des concentrations de PSPB inférieures à celles d'animaux gestants peuvent être détectées 30 jours après l'insémination chez 20 à 30% des femelles ([73]. [72]). La figure 3.1 donne les profils des concentrations plasmatiques en PSPB pour une vache-gestante et une vache ayant subi de la MET.



**Fig3-1** : Profils des concentrations en PSPB lors de gestation normale et de MET (d'après Humblot [73]).

### **3.1.4 Utilisation conjointe des dosages de progestérone et de PSPB et différentes situations après insémination artificielle correspondantes :**

En pratique, des concentrations de progestérone élevées 21-24 jours après insémination associées à des concentrations en PSPB faibles à 30 jours signent une interruption de gestation en période embryonnaire. Cependant, différentes configurations existent et sont rapportées dans le tableau 3.1.

Progestérone à JO (jour de l'IA)	Progestérone à J21-24	PSPB à J30-35	Gestation (J60 à J90)	Diagnostic
Elevée	élevée	non détectée	non détectée	vache inséminée à un mauvais moment
Faible	faible	non détectée	non détectée	MEP ou NF
Faible	élevée	non détectée	non détectée	MET
Faible	élevée	détectée	non détectée	MET
Faible	élevée	détectée	Détectée	Gestation

**Tab. 3-1 :** Correspondance entre différentes situations après IA et les résultats des dosages de progestérone et PSPB (**Humblot [74]**).

Expérimentalement, après induction de l'avortement vers le 40<sup>ème</sup> jour de gestation à l'aide de prostaglandines ou par infection intra-utérine par *Arcanobacterium pyogenes*, **Semambo et al. [24]** ont montré que les concentrations de PSPB ne sont plus détectables environ 15 jours après l'injection de PGF2a. Les concentrations de progestérone chutent rapidement après une administration de PGF2a alors qu'elles persistent 20 à 40 jours après une infection expérimentale par *Arcanobacterium pyogenes*. Lors de mortalité embryonnaire tardive spontanée, la progestéronémie diminue 3 à 42 jours plus tard **[15]**. Cette diminution s'accompagne dans 60% des cas de celle de la PSPB. L'absence de corrélation entre ces deux hormones implique donc la détermination simultanée de leurs concentrations pour contrôler une mortalité embryonnaire. D'après **Hanzen et al. [15]**, la mortalité embryonnaire ne s'accompagne d'aucune libération importante de PGF2a.

### **3.1.5 Diagnostic échographique :**

#### **Diagnostic de gestation :**

En fonction du matériel utilisé et des fréquences d'ultrasons, la date à laquelle un diagnostic de gestation positif peut être affirmé varie. Avant 25 jours, le diamètre transversal de l'allantochorion et de la vésicule amniotique sont trop réduits pour que la vésicule embryonnaire remplie de liquide soit visible. Le diagnostic peut être aisément réalisé à partir du 28<sup>ème</sup> jour. L'embryon apparaît alors sous la forme d'une petite tâche claire dans une poche liquidienne. Les battements cardiaques sont visibles dès J26-29. La longueur tête- croupe de l'embryon est de 12 mm à J30, 15 mm à J35, 22 mm à J40. A ce stade un diagnostic positif peut être pris en compte. En revanche, si le résultat est douteux, un nouveau contrôle échographique doit être réalisé une semaine plus tard.

### **Diagnostic de mort embryonnaire :**

A l'examen échographique, la mortalité embryonnaire peut être mise en évidence avec certitude à partir de 28-30 jours, date à laquelle l'embryon devient normalement visible. Le diagnostic repose sur la mise en évidence de la vésicule embryonnaire ou de l'embryon à un stade donné lors d'un premier contrôle échographique et par la suite sur l'absence de gestation lors d'un second contrôle.

Si l'embryon est encore visible, le diagnostic de mortalité embryonnaire tardive est fondé sur l'arrêt des battements cardiaques. Quelques jours avant la mort de l'embryon, une diminution des battements cardiaques de 200 à 150-100 battements par minute peut être observée [15]. Ainsi, pour permettre un diagnostic de mortalité embryonnaire cette technique nécessite des examens échographiques répétés pour surveiller le développement et la viabilité de l'embryon.

Le devenir de l'embryon et de ses annexes va dépendre du fait que la mortalité embryonnaire précède ou non la régression lutéale. Si l'interruption de gestation est consécutive à la mort embryonnaire (mortalité embryonnaire primaire), le maintien du corps jaune entraîne la rétention prolongée du conceptus dans l'utérus (de quelques jours à plusieurs semaines) jusqu'à la survenue des chaleurs et la dégénérescence du conceptus [74]. **Hanzen et al. [15]** précisent que la mort de l'embryon naturelle ou induite (par une injection intra-utérine de colchicine ou par un écrasement manuel de la vésicule embryonnaire) s'accompagne d'une régression lutéale dont la durée moyenne est de 3 jours mais peut être de 42 jours. Il s'en suit la possibilité d'une rétention prolongée de l'embryon et de ses enveloppes qui dans ce cas prennent un aspect dégénéré à l'échographie.

Si la mortalité embryonnaire est consécutive à la lutéolyse suite à une régression lutéale spontanée ou induite par injection de PGF2a le 24<sup>eme</sup>, 40<sup>eme</sup>, 29-52<sup>eme</sup> ou 70<sup>eme</sup> jour selon les études, le conceptus non dégénéré et ses enveloppes seront rapidement expulsés dans les quelques jours qui suivent (mortalité embryonnaire secondaire) [15].

Dans les deux cas cependant, l'embryon et ses enveloppes sont plus fréquemment expulsés au travers du col utérin que résorbés.

### **3.1.6 Palpation transrectale :**

Le diagnostic de gestation est fondé sur l'identification d'une distension de la corne par les liquides, sur le glissement des membranes annexielles ou sur la palpation de la vésicule amniotique. L'accroissement précoce de la taille de l'utérus et surtout de la corne gravide le rendant alors asymétrique est surtout perceptible chez les primipares. L'asymétrie peut être nulle ou négligeable les deux premiers mois de gestation chez les multipares. Une modification de consistance des cornes est le premier signe de gestation perceptible. Une corne vide est de consistance charnue alors qu'une

corne gravide présente à partir du 35- 45<sup>ème</sup> jour une consistance fluctuante due à l'accumulation de liquides dans la lumière utérine. Le test de glissement des membranes annexielles peut être réalisé à partir du 35- 45<sup>ème</sup> jour mais comme on l'a vu dans le paragraphe 2.3.5, cette technique augmente le risque de mortalité embryonnaire. La vésicule amniotique est palpable du 30-35<sup>ème</sup> jour au 60<sup>ème</sup> jour après la conception. Elle a la forme d'un petit haricot turgescent.

### **3.1.7 Conclusion sur les méthodes de contrôle :**

Il est difficile pour un clinicien de mettre en évidence la mortalité embryonnaire, les données cliniques étant souvent trop tardives par rapport à l'événement qui a entraîné la mort embryonnaire. En pratique, la phase la plus précoce du développement embryonnaire échappe complètement au praticien et aucune méthode ne permet de distinguer la mortalité embryonnaire précoce de la non fécondation [72].

Les protocoles expérimentaux de mise en évidence de la mortalité embryonnaire (décrits dans tous les articles lus sur le sujet) combinent tous enregistrement des dates de retours, dosages conjoints progestérone/PSPB avec palpation manuelle et/ou échographie. En recoupant les articles, il en ressort que la méthodologie standard requise est par exemple celle définie dans l'article de **Grimard et al. [10]**. Dans cette étude, les vaches sont dites gestantes lorsque : la concentration en progestérone du lait (P4) est <3 ng/mL à J0 (valeurs seuil pour le test Ovucheck® de Vétoquinol), et >5 ng/mL entre J21 et 24, PSPB détectée à J35, pas de 2<sup>ème</sup> insémination et/ou palpation transrectale positive par la suite. La mortalité embryonnaire précoce (MEP) ou non fécondation (NF) est invoquée lorsque : P4<5 ng/mL entre J21 et 24, recours à une 2<sup>ème</sup> insémination ou palpation transrectale négative. La MET est invoquée lorsque : P4<3 ng/mL à J0, P4>5 ng/mL entre J21 et 24 mais déclarée 11011 «estante après dosage de PSPB ou palpation transrectale. Le même type de protocole est utilisé dans l'étude de **Fréret et al. [89]**. Des biais sont à éviter lorsque l'on veut estimer le pourcentage de mortalité embryonnaire. A l'issue de la lecture des articles, il semble nécessaire d'insister sur le fait que le dosage de la progestérone à JO est indispensable pour éviter que des vaches soient inséminées en phase lutéale. Si cela se produit, ces vaches auront à nouveau un taux de progestérone élevé à J21 et seront comptabilisées comme gestantes alors qu'elles sont non gestantes en réalité. Ce pourcentage de vaches inséminées en phase lutéale est par exemple de 4,5% en moyenne (avec certains élevages à 0% et d'autres à 10%) dans l'étude de **Fréret et al. [89]**.

Ces techniques sont essentielles pour parvenir à mettre en évidence la mortalité embryonnaire au sein d'un élevage. Cela permet ensuite de mettre en place des stratégies adaptées aux facteurs associés au problème de mortalité dans le but de le limiter.

### **3.2 Stratégies pour améliorer la survie embryonnaire :**

Le développement normal de l'embryon requiert :

- la maîtrise de la croissance folliculaire et une bonne synchronisation entre ovulation et insémination ;
- le contrôle de la croissance du corps jaune et de sa sécrétion de progestérone ; la sécrétion par le conceptus du signal anti-lutéolytique ;  
un environnement utérin adéquat.

Différentes stratégies thérapeutiques ont été développées pour parer à une éventuelle perturbation de ces différentes étapes.

#### **3.2.1 Augmenter les concentrations en progestérone :**

##### **Mise en place d'un corps jaune accessoire (ou secondaire) grâce à l'Hcg :**

L'injection de 3300 UI d'hCG (*human Chorionic Gonadotropin*) à des vaches laitières le 5<sup>ème</sup> jour post IA augmente le nombre de corps jaunes et les concentrations plasmatiques en progestérone [51]. Ce traitement permet également la lutéinisation d'un éventuel follicule dominant dont la production d'œstradiol pourrait favoriser la mortalité embryonnaire [71]. Bien que le taux de conception à J28, J42 et J90 soit amélioré lors d'un traitement à l'hCG, l'on constate autant de mortalité embryonnaire tardive que sans ce traitement.

Ainsi, un traitement à base d'hCG améliore le taux de conception en diminuant la mortalité embryonnaire précoce. Une injection d'hCG à j6 (donnant lieu à la formation d'un corps jaune) permet l'augmentation du taux de gestation des vaches traitées (67,5%) par rapport à celui des vaches témoins (45,0%) ainsi que celui des vaches ayant reçu l'injection à J1 (42,5%) [63]. On peut également utiliser un analogue de la GnRH [71].

##### **Supplémentation en progestérone :**

**Mann et Lamming [37]** ont démontré qu'une supplémentation en progestérone permet d'augmenter le taux de conception lorsqu'elle est effectuée avant le 6<sup>ème</sup> jour après insémination chez la vache laitière. Cela est d'autant plus évident lorsque l'on réalise cette supplémentation sur des vaches à faible taux de fertilité c'est-à-dire dont le taux de conception est inférieur à 50%. **Garret et al. [47]** ont montré qu'une supplémentation en progestérone pendant les 4 premiers jours suivant l'insémination augmente le développement morphologique et l'activité de synthèse des conceptus

âgés de 14 jours. Ils concluent que la supplémentation doit être effectuée à une date précise probablement parce qu'elle altère l'activité sécrétoire de l'endomètre et par la même la croissance de l'embryon. Une supplémentation en progestérone est efficace uniquement sur des vaches dont les concentrations en progestérone se situent entre 1 et 2 ng/mL à J5 après insémination [87]. Cependant, **Lynch et al. [80]** ont mis en évidence qu'une administration systématique de progestérone par voie vaginale chez les génisses à partir de J2-J3 et ce pendant 10 jours entraîne une diminution de l'intervalle interœstral (17 jours vs 20 jours,  $P < 0,001$ ). Une injection de GnRH à la fin du traitement à base de progestérone (à J12-J13) permet d'éviter ce raccourcissement des cycles [80]. On peut expliquer cela par le fait que la GnRH permettrait la mise en place de cycles à au moins 3 vagues folliculaires ce qui re-allongerait les cycles.

De plus, **Hanzen et al. [14]** mettent en garde contre le fait qu'un apport trop important en progestérone est de nature à réduire la libération en hormone LH et par conséquent le support lutéotrophique indispensable au maintien du corps jaune .

Une fois l'administration de progestérone stoppée, le corps jaune peut être incapable de sécréter suffisamment de progestérone pour maintenir la gestation. Ainsi, cette supplémentation devrait être stratégiquement ciblée envers les animaux pour qui elle sera bénéfique [87]. Cette supplémentation peut aussi être utilisée dans le but de réduire le taux d'œstrus rencontré dans les troupeaux avant la 1<sup>re</sup> insémination post-partum responsable d'une diminution des performances reproductrices [29]. Par conséquent, l'incorporation de progestérone dans des protocoles tels que ceux de pré-synchronisation permettrait d'augmenter le nombre de vaches cyclées avant la 1<sup>re</sup> insémination post-partum et d'améliorer la survie embryonnaire.

L'administration de progestérone par voie vaginale sous forme de PRID® ou de CIDR® contribue chez les vaches à augmenter le pourcentage de gestation [14]. Cependant, chez la génisse, un tel traitement administré entre le 7<sup>eme</sup> et le 13<sup>eme</sup> jour suivant l'insémination serait sans effet [14].

La supplémentation en progestérone semble donc être une stratégie efficace pour limiter la mortalité embryonnaire. Cependant, **Peterson [6]** souligne que la survie embryonnaire dans le cadre du transfert d'embryons est indépendante de la supplémentation en progestérone de la receveuse après transfert.

### **3.2.2 Renforcement du signal embryonnaire :**

Des espoirs thérapeutiques sont fondés sur l'utilisation de l'INFr pour diminuer la mortalité embryonnaire observée lors de retard dans le développement du conceptus. L'administration d'INFr recombinant par voie intra-utérine permet de maintenir la sécrétion lutéale de progestérone pendant 8 à 10 jours supplémentaires chez des vaches cyclées (**Gabrilovac [45] cité par [71]**). Des expérimentations conduites sur des souris mais pas reproduites chez les bovins ont montré que l'administration d'INFr au moment de l'implantation diminue la mortalité embryonnaire (**Cocchiara [81] cité par [71]**).

**Barros et al. [16]** ont administré de l'INFa chez les vaches après l'insémination dans le but de mimer l'effet de l'INFr mais au lieu d'améliorer la fertilité cela a entraîné une légère réduction du taux de gestation. De plus, les vaches ayant reçu cet INFa ont présenté une hyperthermie aiguë, des perturbations de leur sécrétion de LH et une diminution à court terme des concentrations en progestérone circulante.

### **3.2.3 Inhibition de la synthèse de PGF2a :**

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que la flunixin inhibent la formation de la cyclo-oxygénase 2 (Cox2). La Cox2 intervient dans la cascade de fabrication de la PGF2a. Ainsi la flunixin administrée de façon expérimentale à partir du 14<sup>ème</sup> jour du cycle à des génisses cyclées induit un retard de sécrétion de PGF2a et un allongement du cycle oestral [71].

### **3.2.4 La somatotropine bovine (bST) :**

La bST est généralement utilisée aux États-Unis sous la forme d'injections répétées tous les 14 jours pendant la période post-partum dans le but d'augmenter la production laitière. Cela permet d'atteindre une augmentation de 3,9 Kg/jour pendant les 242 jours de traitement [50].

Un traitement à base de bST améliore également le taux de fertilisation, accélère le développement embryonnaire et améliore la qualité de l'embryon [33].

D'après **Santos et al. [50]**, l'amélioration du taux de conception grâce à la bST est le résultat d'une diminution de la mortalité embryonnaire entre J31 et J45 (8,4% lors de traitement avec bST vs 14,1%

sans traitement,  $P=0,06$ ). Un traitement à base de bST entraîne une augmentation des concentrations circulantes de l'Hormone de Croissance ( *Growth Hormone*, GH). Cela accélère le développement embryonnaire jusqu'à J8 après la fécondation et augmente ainsi le nombre de cellules par embryon. Il en résulte des embryons mieux développés qui sont davantage capables de sécréter l'INFr [39]. Un traitement à base de bST permet une amélioration du maintien de la gestation chez les vaches traitées [50]. De plus, la bST serait susceptible d'entraîner une augmentation des concentrations périphériques en progestérone [58] et pourrait potentiellement moduler la synthèse de PGF2a. Cependant, la bST possède également des effets négatifs. Une diminution de l'expression des chaleurs est observée suite à l'action de la bST sur les centres nerveux cérébraux contrôlant l'expression des chaleurs. Ce traitement réduit également le nombre de retours en œstrus chez les vaches non gestantes ce qui rallonge l'intervalle entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> insémination [50].

L'usage de la bST pour améliorer la production laitière et/ou les performances de reproduction est interdit en France.

### **3.2.5 Atténuation du développement folliculaire pendant la phase lutéale :**

L'administration d'une injection unique de GnRH ou de son analogue entre les 11<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours après l'insémination serait une méthode permettant d'augmenter le taux de gestation. En effet, la GnRH agirait en lutéinisant les follicules qui ne peuvent ainsi favoriser la lutéolyse [77], En effet, ces follicules non ovulatoires présents au cours de la phase diœstrale sont impliqués dans la lutéolyse. La présence d'un follicule sécrétant de l'œstradiol pendant la phase lutéale a tendance à augmenter le nombre de récepteurs endométriaux à l'ocytocine. L'ocytocine lutéale va alors pouvoir agir en se fixant sur ses récepteurs ce qui stimule la synthèse de PGF2a et donc favorise potentiellement la libération de PGF2a [88]. Ainsi, la GnRH permet de retarder la régression du corps jaune laissant alors plus de temps à un embryon en retard de développement pour acquérir sa capacité à synthétiser les concentrations en INFr adéquates à sa survie [77].

**Santos et al. [49]** ont montré l'efficacité de cette méthode en remplaçant la seconde injection de GnRH du protocole GPG ( *Ovsynch*) par un implant contenant son agoniste (la desloréline). Ceci a pour but de supprimer l'activité folliculaire et d'améliorer le maintien de la gestation. Ils constatent que la desloréline 450 tend à faire diminuer les pertes de gestation par rapport à la GnRH.

Cette stratégie visant à minimiser la croissance folliculaire pendant la phase lutéale permet de réduire la perte embryonnaire.

### **3.2.6 Pré-synchronisation pour optimiser les protocoles :**

Les protocoles de synchronisation comme *Ovsynch* (GPG) sont largement utilisés dans les troupeaux de vaches laitières en raison des difficultés de détection des chaleurs communément rencontrées chez les vaches hautes productrices [52].

Cependant, l'effet sur la fertilité du protocole *Ovsynch* dépend du stade du cycle auquel est effectuée la seconde injection de GnRH [55]. Débuter le protocole vers le milieu du diœstrus (J5-12) améliore le taux de conception chez les vaches laitières. En effet, cela augmente le pourcentage d'ovulation à la suite de la 1<sup>ère</sup> injection de GnRH ainsi que le nombre de vaches avec des concentrations en progestérone élevées (>1 ng/mL) [31]. De plus, l'auteur indique que la réponse à des protocoles de pré-synchronisation ne se fait que lorsque la vache est cyclée. La réalisation de la 1<sup>ère</sup> injection de GnRH du protocole entre le 5<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour après l'ovulation améliore le taux de gestation [55].

Les recherches futures sur ces protocoles de pré-synchronisation ne devront donc pas seulement permettre d'optimiser le taux d'ovulation suivant la 1<sup>ère</sup> injection de GnRH mais également permettre une diminution du nombre de vaches en anœstrus avant la 1<sup>ère</sup> IA post-partum.

### **3.2.7 Débuter précocement les protocoles GPG de re-synchronisation :**

La re-synchronisation consiste à mettre en place un nouveau protocole hormonal de type GPG (*Ovsynch*) suite à un échec en première insémination. Cette technique ne permet pas d'empêcher la mortalité embryonnaire en tant que telle mais plutôt de lutter contre la perte de temps consécutive à cet échec. C'est pour cela que nous avons jugé intéressant de développer cette stratégie. En effet, une vache subissant de la mortalité embryonnaire reviendra en chaleurs et devra être ré-inséminée. La durée d'un cycle et le temps de la réalisation complète du protocole seront autant de temps perdu pour l'éleveur. Ainsi, dans un but économique, les vaches diagnostiquées non gestantes après une première insémination doivent pouvoir être ré-inséminées le plus rapidement possible. Or, un diagnostic de gestation réalisé par palpation transrectale ne peut être fait qu'après le 35<sup>ème</sup> jour suivant l'insémination. Une des techniques pour gagner du temps sur la mise en place du protocole est alors de réaliser un diagnostic de gestation par échographie dès le 28<sup>ème</sup> jour après l'insémination. Le protocole pourra ainsi être mis en place plus rapidement sur les vaches non gestantes. Cependant, pour raccourcir encore plus l'intervalle entre le diagnostic de non gestation et la ré-insémination, la resynchronisation avec le protocole *Ovsynch* devrait être débutée avant le diagnostic de gestation sans causer pour autant des perturbations sur les vaches susceptibles d'être gestantes à ce moment.

Ainsi différentes études ont été réalisées.

**Chebel et al. [86]** ont réalisé une étude sur la mise en place du protocole GPG avant le diagnostic de gestation. Les vaches sont réparties dans deux groupes : le groupe de vaches resynchronisées (RES) et le groupe de contrôle (CON). Le diagnostic de gestation est effectué par échographie à J28 pour les deux groupes. Toutes les vaches RES reçoivent une injection de GnRH à J21 puis les vaches RES déclarées non gestantes à J28 reçoivent une injection de PGF2ct suivie d'une dernière injection de GnRH 48 heures après. La réinsémination des vaches RES a lieu à J31. Les vaches CON diagnostiquées non gestantes à J28 reçoivent à ce moment-là leur 1<sup>ère</sup> injection de GnRH puis le protocole est poursuivi et les vaches ré-inséminées à J38. Le groupe RES correspond donc à celui pour lequel le protocole de resynchronisation est débuté avant même que le diagnostic de gestation soit effectué. Il en résulte que débiter un protocole *Ovsynch* dès le 21<sup>ème</sup> jour après l'insémination avant la réalisation du diagnostic de gestation, n'affecte pas le taux de gestation (27,0% pour RES vs 26,9% pour CON) et n'augmente pas le pourcentage de pertes (61,8% pour RES vs 62,7% pour CON) durant les 42 premiers jours de gestation. Cette technique ne fait donc pas de tort à la gestation. Ainsi, une resynchronisation des vaches laitières, avec un protocole GPG débutant à J21 après insémination et avant le 1<sup>er</sup> diagnostic de gestation, permet de raccourcir l'intervalle entre le diagnostic de non gestation et l'insémination qui suit.

Cependant, **Moreira et al. [32]** étudient l'effet de la bST et de la resynchronisation avec la GnRH sur le taux de gestation des vaches laitières. Lorsque les vaches sont traitées avec la bST, le taux de gestation augmente, mais si la GnRH est administrée à J20 après l'insémination, le traitement avec la bST n'a ensuite aucun effet sur la fertilité. Les auteurs en déduisent qu'une resynchronisation avec un protocole *Ovsynch* débutant à J20 après l'insémination initiale diminue la probabilité de survie embryonnaire consécutive à la 1<sup>ère</sup> insémination (voir la partie 2.2.9).

Ainsi, en associant les articles **[86] et [32]**, une sensibilité des vaches gestantes à une injection de GnRH avant le 20<sup>ème</sup> jour suivant l'insémination serait possible. De plus, **Fricke et al. [79]** observent que les vaches traitées avec de la GnRH à J19 post IA ont un taux de gestation après resynchronisation plus bas que celles traitées à J26 et J33.

Ainsi dans le cadre de la resynchronisation des vaches non gestantes après une 1<sup>ère</sup> insémination (à JO), la 1<sup>ère</sup> injection de GnRH du protocole GPG peut être réalisée dès J21 avant le diagnostic de non gestation pour gagner du temps mais pas avant J20.

**Chebel [85]** précise que les protocoles de resynchronisation peuvent être utilisés sans pré-synchronisation préalable ce qui n'augmente pas le nombre des échecs de gestation. Une resynchronisation à l'aide du CIDR® est moins utilisée et peu de données existent dans la littérature. Pour les vaches à faible production laitière, la resynchronisation grâce au CIDR® mis en place entre

J16 et J21 n'a pas d'effet négatif sur la fertilité [100].

### 3.2.8 Nutrition :

#### Critères nutritionnels à contrôler en élevage lors de mortalité embryonnaire :

Le tableau 3.2 définit les paramètres alimentaires à contrôler lors de mortalité embryonnaire pour éviter l'apparition de nouveaux cas au sein du troupeau [30].

Si :	Suspecter :
Abaissement supérieur à un point de la note d'état corporel après vêlage en moyenne de troupeau	Déficit Energétique
Mortalité embryonnaire associée à un retard de reprise d'activité ovarienne	
Urée sanguine élevée	Excès azotés
Urée dans le lait >0,32g/L	
Fréquence élevée de mortalités embryonnaires	Carence en vitamines ou en oligo-éléments
Dosage sanguin des oligo-éléments anormal	
Dosage sanguin des activités enzymatiques anormal	

**TAB 3-2 :** Paramètres alimentaires à contrôler lors de mortalité embryonnaire pour éviter l'apparition de nouveaux cas au sein du troupeau (d'après Enjalbert [30]).

#### Contrôle de l'apport énergétique :

Les déficits énergétiques ont plus d'effet sur les intervalles vêlage- chaleurs ou vêlage- insémination que sur le risque de mortalité embryonnaire. Aussi, leur implication dans ces troubles n'est à envisager que lorsque les mortalités embryonnaires s'ajoutent à un contexte de retard de reprise d'activité ovarienne. Il convient alors de s'intéresser à la note d'état corporel après vêlage : tout abaissement de plus d'un point en moyenne de troupeau représente un facteur de risque de moindre performance de reproduction en élevage.

#### Contrôle de l'apport azoté :

En ce qui concerne les excès azotés, l'analyse des risques porte sur une étude critique des apports alimentaires et sur les critères biochimiques, qui permettent de préciser le statut nutritionnel des

animaux. Ainsi, il sera possible d'invoquer un excès d'azote dégradable dans la ration dans deux situations :

1. la ration de base est riche en azote soluble : pâturages d'herbe jeune riche en azote dégradable et, ensilage d'herbe de qualité de conservation médiocre dont la majorité de l'azote est rendue dégradable au cours des fermentations après mise en silo
2. la complémentation concentrée est inadaptée : source de protéines trop solubles sur une ration de base riche en azote dégradable (graines protéagineuses ou tourteau de tournesol sur des ensilages d'herbe), ou apport excessif d'azote non protéique (urée seule ou dans des aliments liquides).

En cas de suspicion, il faudra donc réaliser un contrôle biochimique des excès azotés en mesurant la teneur en urée du sang ou de celle du lait en troupeau laitier. L'urémie pouvant varier sensiblement au cours de la journée, le contrôle de la teneur en urée du lait peut s'avérer plus fiable. Des teneurs comprises entre 0,25 et 0,32 g/L de lait sont normales. En l'absence d'effet de seuil net, toute teneur élevée en urée sanguine, dans un contexte de fréquence élevée de mortalité embryonnaire, doit être considérée comme un facteur de risque potentiel. Si un excès azoté est ainsi confirmé, il convient de réajuster la ration pour prévenir de nouveaux cas de mortalité embryonnaire. Une diminution des apports d'azote dégradable dans le rumen, et/ou une augmentation de l'apport énergétique fermentescible s'imposent.

### **Contrôle des apports minéro-vitaminiques :**

Comme pour les apports azotés, l'analyse des risques lors de déséquilibres minéraux et vitaminiques porte sur une étude critique des apports alimentaires et sur les critères biochimiques, qui permettent de préciser le statut nutritionnel des animaux. Les situations qui conduisent à des carences en oligo-éléments et vitamines sont de deux types :

1. les défauts d'apports : les carences primaires, plus fréquentes en élevage allaitant qu'en élevage laitier.
2. les carences secondaires : les interactions entre un oligo-élément et un autre constituant de la ration, qui empêchent l'utilisation normale de l'oligo-élément.

En cas de suspicion, une analyse critique des apports peut être réalisée en comparant les apports des aliments minéraux et vitaminés administrés avec les recommandations courantes. Il faudra toutefois

tenir compte d'une marge de sécurité dans l'évaluation du fait de la méconnaissance des apports réalisés par les fourrages et concentrés. Le plus souvent, la complémentation minérale et vitaminée doit couvrir la quasi-totalité des apports recommandés. Un dosage sanguin des oligo-éléments ou des activités enzymatiques qui en dépendent peut être réalisé. Cette démarche permet d'obtenir un bilan final qui peut être interprété même en dehors d'une connaissance précise des facteurs de risques de carences primaire ou secondaire.

### **Supplémentation en acides gras et effet sur la sécrétion de PGF2a :**

Une supplémentation en graisses à raison de 2-4% de la ration influe sur le statut reproducteur des vaches [18]. Les acides gras  $n-3$  (acide  $\alpha$  linoléique, eicosapentaénoïque (EPA), docosahexaénoïque (DHA)) et  $n-6$  (acide linoléique) modulent la sécrétion de PGF2a par les cellules endométriales [83]. Il a été suggéré qu'ils contribuent ainsi à la survie embryonnaire [84]. Dans certaines études, il a été démontré que l'ajout d'acides gras  $n-3$  au sein de la ration pourrait renforcer la reconnaissance maternelle de la gestation et donc améliorer la survie embryonnaire [52]. Une hypothèse serait que cela entraîne une modification du métabolisme lipidique dans les cellules de l'endomètre qui permettrait d'inhiber la production de PGF2a [71].

### **3.2.9 Prévention contre les effets d'une augmentation de température :**

Les différentes observations relatées dans la partie 2.3.1 concernant l'effet de l'augmentation de température sur les performances de reproduction ont conduit à la mise en place de différentes mesures sur le terrain. Elles consistent à rafraîchir les animaux au cours de la période péri-œstrale voire à leur administrer avant le troisième jour de gestation du glutathion réduit (GSH), agent connu pour avoir un effet protecteur contre l'hyperthermie [15].

Dans leur étude réalisée pendant la saison chaude (44 à 53°C), **Ryan et al. [26]** ont placé les vaches dans deux situations différentes. Une partie des vaches ont été abritées sous un système portatif de rafraîchissement de marque "Korral Kool" et l'autre partie sous un système de refroidissement par vaporisation et ventilation. Le but de l'un comme de l'autre système est de maintenir la production laitière. Le système de chez "Korral Kool" permet d'humidifier les vaches et de faire évaporer instantanément cette humidité grâce à un système de micro-ventilation dirigé sur l'animal. De plus, ce système adapte en permanence la quantité de vapeur d'eau répandue en fonction de la température ambiante et de l'humidité ressenties. Sous le système de chez "Korral Kool", le taux de gestation des vaches 40 à 60 jours après insémination est supérieur à celui des vaches bénéficiant du système de

refroidissement. Une partie de ces résultats est attribuée à l'existence de conditions de repos améliorées dans le système de chez "Korral Kool" grâce à un procédé de rafraîchissement adapté décrit un peu plus haut.

Cependant, d'après **Al-Katanani et al. [99]**, la proportion d'oocytes parvenant au stade blastocyste à J8 est diminuée pendant la saison chaude que la vache soit placée sous un système de refroidissement ou non 42 jours avant la récolte des oocytes. Il constate en effet que la température rectale des vaches sous système de refroidissement reste tout de même augmentée (39,2°C contre 38,7°C en hiver). Or une température corporelle augmentée de 0,5°C entraîne une diminution du taux de gestation.

Au début de la période post-partum, le maintien de leur production laitière habituelle sous des températures élevées constitue une charge supplémentaire pour les vaches qui doivent alors s'adapter. Ainsi, les systèmes d'exploitation employés sous des climats chauds influencent le stade de développement auquel survient de la mortalité embryonnaire.

Le problème de gestion zootechnique de la chaleur pourrait prendre de l'ampleur dans les années à venir au vu de ce qui a été dit en conclusion de la partie 2.3.1.

### **3.2.10 Conclusion sur les stratégies de lutte :**

Les stratégies de lutte contre la mortalité embryonnaire existent même si elles sont peu nombreuses. Cependant, elles sont encore peu utilisées sur le terrain. Ces stratégies sont principalement de nature hormonale, mais aussi nutritionnelle et zootechnique.

En ce qui concerne les stratégies hormonales, la question de la complexité et du bien-fondé de l'utilisation de trop d'hormones mérite d'être posée. Par exemple, l'administration de progestérone dans le but de favoriser le maintien de la gestation entraîne un raccourcissement de l'intervalle interœstral [80]. Ainsi, pour contrer cet effet négatif indésirable, une injection de GnRH est effectuée [80]. Une hormone est donc à nouveau injectée pour contrer les effets non désirés d'une première hormone qui avait initialement pour but d'améliorer la reproduction. Supplémenter en progestérone uniquement les vaches reconnues comme ayant un faible taux de fertilité semble être la stratégie à adopter et par là même un bon compromis. Pour finir, le contrôle des apports nutritionnels devrait être plus souvent réalisé en pratique si de la mortalité embryonnaire est suspectée au sein de l'élevage.

# Conclusion

## **Conclusion :**

La mortalité embryonnaire représente une forte composante de l'infertilité dans l'espèce bovine. Que cette mortalité embryonnaire se produise avant le I6<sup>ème</sup> jour suivant l'insémination (MEP) ou dans la suite de la période embryonnaire (MET), son impact économique est dans les deux cas important.

La première partie de ce mémoire a rappelé que le développement embryonnaire est une suite d'événements chronologiques orchestrés de façon précise par différentes hormones. Un certain nombre d'étapes y sont cruciales et des erreurs à ces stades du développement peuvent être fatales pour l'embryon. Le développement embryonnaire relève en plus d'un ajustement aussi bien morphologique qu'hormonal et nutritionnel entre l'embryon et son environnement maternel. Ainsi, toute perturbation de cet équilibre s'accompagnera de mortalité embryonnaire.

Les facteurs à l'origine de ces perturbations ont été développés dans une deuxième partie. Ces facteurs influents sont nombreux. Les hiérarchiser et identifier leur impact sur les échecs de gestation aux différents stades nécessitent des études épidémiologiques à grande échelle. Or, ce type d'études fondé sur l'enregistrement combiné des facteurs de risque et des résultats de dosages hormonaux est très coûteux à mettre en œuvre et rarement réalisé. C'est pourquoi aucun facteur en particulier n'est identifié comme ayant un impact dominant sur les pertes précoces de gestation.

Pour finir, la troisième partie a permis d'expliquer les méthodes de mise en évidence de la mortalité embryonnaire aussi bien à l'échelle du troupeau que de l'individu. En pratique, compte tenu de la faible sensibilité des techniques de détection des chaleurs, l'utilisation conjointe des différentes méthodes développées en troisième partie permettrait de remettre les animaux le plus précocement possible à la reproduction afin de limiter les effets économiques des pertes tardives. Ainsi, dans un élevage à faible fertilité, la mesure du taux de progestérone à JO et J21-24 pourrait être systématisée pour détecter la MEP/NF grâce à la commercialisation de tests simples, utilisables à la ferme sur le lait. Ensuite, dans ces élevages ayant des problèmes de fertilité, l'usage systématique de l'échographie dès J28 et/ou du dosage de PSPB dès J30 permettrait l'identification la plus rapide possible des échecs plus tardifs. Toutes ces méthodes devraient tenir une place de choix en élevage laitier d'autant plus que des stratégies de lutte contre la ME existent mais sont encore peu utilisées

sur le terrain.

Au vu des considérations sur la dégradation de la fertilité en particulier de la race laitière Prim'Holstein en France, un nouvel Index de Synthèse UPRA (ISU) a été défini en Juin 2001 par **Colleau [53]**. Dans cet index, utilisé pour la sélection des races laitières en France, un poids plus conséquent a été attribué au caractère fonctionnel "fertilité". Le but de cette nouvelle définition de l'index est de supprimer l'ensemble des évolutions génétiques défavorables liées à l'ancien ISU. Grâce à cet index, la dégradation génétique de la fertilité devrait donc être enrayerée. Cependant, il reste à tenter de maîtriser tous les autres facteurs responsables de mortalité embryonnaire, d'autant plus que certains pourraient à l'avenir tenir une place plus importante.

# Références

## Références bibliographiques

- [1] Ahmadzadeh A., Falk D.G., Manzo R., Sellars C.B., and Dalton J.C. Effect of incorporation of a low dose of estradiol cypionate (ECP) into a timed artificial insemination protocol on estrus behavior and conception rates in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 81 :180 (Abstract), 2003.
- [2] Barbat A., Druet T., Bonaiti B., Guillaume F., Colleau J.J., and Boichard D. Bilan phénotypique de la fertilité à l'insemination artificielle dans les trois principales races laitières françaises. In *1<sup>me</sup> Jounées Renc. Rech. Ruminants*, volume 12, pages 137-140, 2005.
- [3] Ducos A. Les causes génétiques des mortalités embryonnaires. *Bulletin des GTV*, 21 :48-52, 2003.
- [4] Shaham-Albalaiicy A., Folrnau Y., Kaim M., Rosenberg M., and Wolfenson D. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF2a secretion in the subsequent œstrus cycle. *Reproduction*, 122 :643-648, 2001.
- [5] Ealy A.D., Drost M., and Hansen P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.*, 76 :2899-2905, 1993.
- [6] Peterson A.J. and Lee R.S-F. Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology*, 59 :687-697, 2003.
- [7] Darwash A.O. and Lamming G.E. The importance of milk progesterone concentrations during early pregnancy in the cow. *J. Anim. Breed*, 2 :41-43, 1998.
- [8] Barker A.R., Schrick F.N., Lewis M.J., Dowlen H.H., and Oliver S.P. Influence of clinical mastitis during early lactation on reproductive performance of jersey cows. *J. Dairy Sci.*, 81 :1285-1290, 1998.
- [9] Abbitt B., Ball L., Kitto G.P., Sitzman C.G., Wilgenburg B., Raiin L.W., and Seidel G.E. Effect of three methods of palpation for pregnancy diagnosis per rectum on embryonic and fetal attrition in cows. *J.A.V.M.A.*, 173 :973-977, 1978.
- [10] Grimard B., Freret S., Chevallier A., Pinto A., Ponsart C., and Humblot P. Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. *Anim. Reprod. Sci.*, 91 :31-44, 2006.
- [11] Alexander B.M., Johnson M.S., Guardia R.O., Vandegraaf W.L., Senger P.L., and Sasser R.G. Embryonic loss from 30 to 60 days post breeding and the effect of palpation per rectum on pregnancy. *Theriogenology*, 43 :551-556, 1995.

- [12] Elrod C.C. and Butler W.R. Réduction of fertility and altération of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable proteini. *J. Anim. Sci.*, 71 :694-701, 1993.
- [13] Farin C.E., Imakawa K., Hansen T.R., McDonnell J.J., Farin P.W. Murphy C.N., and Roberts R.M. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. *Bioi Reprod.*, 43 :210-218, 1990.
- [14] Hanzen C.H., Lourtie O., Drion P.V., Depierreux C., and Christians E. La mortalité embryonnaire 2.implications hormonales. *Ann. Méd. Vét.*, 143 :179-189, 1999.
- [15] Hanzen C.H., Drion P.V., Lourtie O., Depierreux C., and Christians E. La mortalité embryonnaire 1.aspects cliniques et facteurs étiologiques dans l'espèce bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 143 :91-118, 1999.
- [16] Barros C.M., Newton G.R., Thatcher W.W., Drost M., Plante C., and Hansen P.J. The effect of bovine interferon *a* on pregnancy rate in heifers. *J. Anim. Sci*70 :1471-1477, 1992.
- [17] Garcia-Bojalil C.M., Staples C.R., Risco C.A., Savio J.D., and Thatcher W.W. Protein degradability and calcium salts of long-chain fatty acids in the diets of lactating dairy cows : reproductive responses. *J. Dairy Sci*81 :1385—1395, 1998.
- [18] Staples C.R., Burke J.M., and Thatcher W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 81 :856-871, 1998.
- [19] Ledoux D., Humblot P., Constant F., Ponter A.A., and Grimard B. Importance des" échecs précoces de gestation chez la vache laitière. *Point Vét.*, 37 :50 55, 2006.
- [20] Vaillancourt D., Bierschwal C.J., and Ogwu D. Corrélation between pregnancy diagnosis by membrane slip and embryonic mortality. *J.A.V.M.A.*, 175 :466-468, 1979.
- [21] Wathes D.C., Taylor V.J., Clieng Z., and Mann G.E. Follicle growth, corpus luteum function and their effect on embryo development in postpartum dairy cows. *Reproduction Suppl.*, 61 :219-237, 2003.
- [22] Monty D.E. and Racowsky C. In vitro évaluation of early embryo viability and development in summer heat-stressed superovulated cows. *Theriogenology*, 28 :451-465, 1987.
- [23] Townson D.H., Tsang P.C.W., Butler W.R., Frajblat M., Johnson C.J. Griel Jr. L.C., Milvae RA., Niksic G.M., and Pate J.L. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 80 :1053-1058, 2002.
- [24] Setriambo D.K.N., Ayliffe T.R., Boyd J.S., and Taylor D.J. Early abortion in cattle induced by experimental intrauterine infection with pure cultures of *Actinomyces pyogenes*. *Vet. Rec.*, 129 :12—16, 1991.
- [25] Ryan D.P. Factors affecting conceptus loss in cattle. *Ph.D Dissertation, Louisiana*

*State University*, pages 63-97, 1990.

- [26] Ryan D.P., Prichard J.F., Kopel E., and Godke RA. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology*, 39 :719-737, 1993.
- [27] Ryan D.P. and Boland M.P. Frequency of twin births among holstein-friesian cows in a warm dry climate. *Theriogenology*, 36 :1—10, July 1991.
- [28] Chagas e Silva J., Lopes da Costa L., and Robalo Silva J. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, 58 :51—59, 2002.
- [29] Inskip E.K. Factors that affect embryo survival in the cow : application of technology to improve calf crop. *GRC Press, Boca Raton, FL*, pages 255-279, 2002.
- [30] Enjalbert F. Les déséquilibres alimentaires à l'origine de mortalité embryonnaire chez la vache. *Bulletin des GTV*, 21 :53 56, 2003.
- [31] Moreira F., Orlandi C., Risco C.A., Mattos R., Lopes F., and Thatcher W.W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 84 :1646-1659, 2001.
- [32] Moreira F., Risco C.A., Pires M.F.A., Ambrose J.D., Drost M., and Thatcher W.W. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.*, 83 :1237 1247, 2000.
- [33] Moreira F., Badinga L., Burnley C., and Thatcher W.W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, 57 :1371 - 1387, 2002.
- [34] Rhodes F.M., McDougall S., Burke C.R., Verkerk G.A., and MacMillan K.L. Invited review : treatment of cows with extended postpartum anestrus interval. *J. Dairy Sci.*, 86 :1876-1894, 2003.
- [35] Schrick F.N., Hockett M.E., Saxton A.M., Lewis M.J., Dowlen H.H., and Oliver S.P. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J. Dairy Sci.*, 84 :1407-1412, 2001.
- [36] Perry GA., Smith M.F., Lucy M.C., Roberts A.J., MacNeil M.D., and Geary T.W. Effect of ovulatory follicle size at time of GnRH injection or standing estrus on pregnancy rates and embryonic/fetal mortality in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 81 Suppl.1 :52 (Abstract), 2003.
- [37] Mann G.E. and Lamming G.E. The influence of progesterone during early pregnancy

- in cattle. *Reprod. Dom. Anim.*, 34 :269—274, 1999.
- [38] Mann G.E. and Lamming G.E. The rôle of sub-optimal preovulatory estradiol sécrétion in aetiology of prématuré luteolysis during the short estrus cycle in the cow. *Anim. Reprod. Sci.*, 64 :171—180, 2000.
- [39] Mann G.E. and Lamming G.E. Relationship between maternai endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121 :175—180, 2001.
- [40] Mann G.E., Lamming G.E., and Fisher PA. Progesterone control of embryonic interferonr production during early pregnancy in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 21 :37 (Abstract), 1998.
- [41] Lindner G.M. and Wright RWJr. Bovine embryo morphology and évaluation. *Theriogenology*, 20 :407—416, 1983.
- [42] Huszenicza Gy, Janosi Sz, Kulcsar M., Korodi P., Reiczigel J., Katai L., Peters A.R., and De Rensis F. Effects of clinical mastitis on ovarian function in post-partum dairy cows. *Reprod. Dom. Anim.*, 40 :199 204, 2005.
- [43] Niemann H., Sacher B., and Elsaesser F. Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 23 :631—639, 1985.
- [44] Hernandez-Fonseca H.J., Sayre B.L., Butcher R.L., and Inskip E.K. Embryotoxic effects adjacent and opposite to the early regressing bovine corpus luteum. *Theriogenology*, 54 :83—91, 2000.
- [45] Gabrilovac J. NK cell activity and estrogen hormone levels during normal human pregnancy. *Gynecol. Obstet. Invest*25 :165—172, 1988.
- [46] Cartmill J.A., El-Zarkouny S.Z., Hensley B.A., Larrib G.C., and Stevenson J.S. Stage of cycle, incidence, and timing of ovulation, and pregnancy rates in dairy cattle after three timed breeding protocols. *J. Dairy Sci.*, 84 ;1051--1059, 2001.
- [47] Garret J.E., Geisert R.D., Zavv M.T., and Morgan G.L. Evidence for maternai régulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J. Reprod. Fertil.*, 84 :437-446, 1998.
- [48] Santos J.E.P., Villasenor M., DePeters E.J., Robinson P.H., and Holmberg C.H. Type of cottonseed and level of gossypol in diets of lactating dairy cows : plasma gossypol, health and reproductive performance. *J. Dairy Sci.*, 86 :892—905, 2003.
- [49] Santos J.E.P., Cerri R.L.A., Ballou M.A., Higginbotham G.E., and Kirk J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of holstein dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 80 :31-45, 2004.
- [50] Santos J.E.P., Juchem S.O., Cerri R.L.A., Galvao K.N., Thatcher W.W. Chebel R.C.,

- Dei C.S., and Bilby C.R. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 87 :868-881, 2004.
- [51] Santos J.E.P., Thatcher W.W., Pool L., and Overton M.W. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 79 :2881-2894, 2001.
- [52] Santos J.E.P., Thatcher W.W., Chebel R.C., Cerri R.L.A., and Galvao K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83 :513—535, 2004.
- [53] Colleau J. J. and Regaldo D. Définition de l'objectif de sélection dans les races bovines laitières. In *8<sup>ème</sup> Journées Renc. Rech. Ruminants*, volume 8, pages 329-332, 2001.
- [54] Wiebold J.L. Embryonic mortality and the uterine environment in first-service lactating dairy cows. *J. Reprod. Fert*84 :393—399, 1988.
- [55] Vasconcelos J.L.m., Silcox R.W., Rosa G.J., Pursley J.R., and Wiltbank m.c. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrus cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52 :1067-1078, 1999.
- [56] Kastelic J.P., Northey D.L., and Ginther O.J. Spontaneous embryonic death on day 20 to 40 in heifers. *Theriogenology*, 35 :351-363, 1991.
- [57] Chenault J.R., Boucher J.F., Dame K.J., Meyer J.A., and Wood-Follis S.L. Intravaginal progesterone inserts to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86 :2039-2049, 2003.
- [58] Morales-Roura J.S., Zarco L., Hernandez-Ceron J., and Rodriguez G. Effect of short-terril treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. *Theriogenology*, 55 :1831 1841, 2001.
- [59] Breuel K.F., Lewis P.E., Schrick F.N., Lishman A.W., and Butcher R.L. Inskip E.K. Factors affecting fertility in the postpartum cow : rôle of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol. Reprod.*, 48 :655 661, 1993.
- [60] Macmillan K.L., Segwagwe B.V.E., and Pino C.S. Association between manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 78 :327 344, 2003. "
- [61] Piko L. and Clegg K.B. Quantitative changes in total RNA, total poly(A), and ribosomes in early mouse embryos. *Dev. Biol.*, 89 :362-378, 1982.
- [62] Elli M., Gaffuri B., Frigerio A., Zanardelli M., Covini D., Candiani M., and Vignali M. Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. *Reproduction*, 121 :151 154, 2001.

- [63] Nishigai M., Kamomae H., Tanaka T., and Kaneda Y. Improvement of pregnancy rate in Japanese black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen/thawed embryos. *Theriogenology*, 58 :1597—1606, 2002.
- [64] Diskin M.D., Kenny D.A., Duime L.D., and Sreenan J.M. Systemic progesterone pre- and post-AI and embryo survival in heifers. In *Proc Agric Res Forum*, 2002.
- [65] McCorinick M.E., French D.D., Brown T.F., Cuomo G.J., Fernandez J.M., Chapa A.M., Beatty J.F., and Blouin D.C. Crude protein and rumen undegradable protein effects on reproduction and lactation performance of Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 82 :2697-2708, 1999.
- [66] Diskin M.G. and Sreenan J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J. Reprod. Fertil.*, 59 :463-468, 1980.
- [67] Starbuck M.J., Dailey R.A., and Inskeep E.K. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 84 :27-39, 2004.
- [68] Mussard M.L., Burke C.R., and Day M.L. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. In *Proceedings of the Annual Conference of the Society for Theriogenology, Columbus, OH*, 2003.
- [69] Ahmad N., Townsend E.C., Dailey R.A., and Inskeep E.K. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before or after breeding, in beef cows and heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 49 :13—28, 1997.
- [70] Ayalon N. A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 54 :483—493, 1978.
- [71] Picard-Hagen N., Gayrard V., and Berthelot X. Les causes de la mortalité embryonnaire chez les ruminants. *Bulletin des GTV*, 21 :39-42, 2003.
- [72] Picard-Hagen N., Gayrard V., Berthelot X., and Humblot P. Méthodes de contrôle de la gestation et des mortalités embryonnaires chez les ruminants. *Bulletin des GTV*, 21 :31-36, 2003.
- [73] Humblot P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology*, 56 :1417—1433, 2001.
- [74] Humblot P. Diagnostic des mortalités embryonnaires : l'intérêt des dosages hormonaux. *Bulletin des GTV*, 21 :43-47, 2003.
- [75] Lamothe P. and Guay P. Electrolytes of bovine intra-uterine secretions during infertility *sine materia*. *Can. J. Comp. Med.*, 34 :167—176, 1970.
- [76] Lonergan P., Fair T., and Gordon I. Effects of time of transfer to granulosa cell

- monolayer and cell stage at 48 hours post-insemination on bovine oocyte development following IVM/IVF/IVC. In 8th Scientific meeting of the European Embryo Transfer Association, *Septembre 1992*.
- [77] Hansen P.J. Embryonic mortality in cattle from an embryo's perspective. *J. Anim. Sci.*, 80 (E.SuppI.2) :E33-E44, 2002.
- [78] Silva P.J., Juengel J.L., Rollyson M.K., and Niswender G.D. Prostaglandin metabolism in the ovine corpus luteum : catabolism of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha (PGF<sub>2</sub>α) coincides with resistance of the corpus luteum to PGF<sub>2</sub>α. *Biol. Reprod.*, 63 :1229-1236, 2000.
- [79] Fricke P.M., Caraviello D.Z., Weigel K.A., and Welle M.L. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J. Dairy Sci.*, 86 :3941-3950, 2003.
- [80] Lynch P.R., Macmillan K.L., and Taufa V.K. Treating cattle with progesterone as well as a GnRH analogue affects oestrous cycle length and fertility. *Anim. Reprod. Sci.*, 56 :189—200, 1999.
- [81] Cocchiara R. Immunosuppressive effect of early pregnancy factor on early expression of cell surface membrane IgG. *J. Reprod. Immunol.*, 9 :23-32, 1986.
- [82] Leiser R. and Wille K.H. Alkaline phosphatase in the bovine endometrium and trophoblast during the early phase of implantation. *Anat. Embryol.*, 148 :145-157, 1975.
- [83] Mattos R., Guzeloglu A., Badinga L., Staples C.R., and Thatcher W.W. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon modify phorbol ester-induced secretion of PGF<sub>2</sub>α and expression of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and phospholipase-A<sub>2</sub> in bovine endometrial cells. *Biol. Reprod.* 102 :2-37, 2003.
- [84] Mattos R., Staples C.R., and Thatcher W.W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *J. Reprod. Fertil.*, 5 :38-45, 2000.
- [85] Chebel R.C., Santos J.E.P., Reynolds J.P., Cerri R.L.A., Juchem S.O., and Overton M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 84 :239-255, 2004.
- [86] Chebel R.C., Santos J.E.P., Cerri R.L.A., Galvao K.N., and Thatcher W.W. Juchem S.O. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 60 :1389-1399, 2003.
- [87] McNeill R.E., Diskin M.G., Sreenan J.M., and Morris D.G. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the

- early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology*, 65 :1435-1441, 2006.
- [88] Robinson R.W., Mann G.E., Lamming G.E., and Wathes D.C. Expression of oxytocin, oestrogen, and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrus cycle and pregnancy in cows. *Reproduction*, 122 :965-979, 2001.
- [89] Freret S., Ponsart C., Rai D.B., Jeanguyot N., Paccard P., and Humblot P. Facteurs de variation de la fertilité en première insémination et des taux de mortalités embryonnaires en élevages laitiers *Prim'Holstein*. In *13<sup>eme</sup> Journées Renc. Rech. Ruminants*, volume 13, pages 281-284, 2006.
- [90] Echtenkamp S.E., Gregory K.E., Dickerson G.E., Cundiff L.V., Koch R.M., and Vanvleck L.D. Twinning in cattle. 2. genetic and environmental effects on ovulation rate in puberal heifers and post-partum cows and the effects of ovulation rate on embryonic survival. *J. Anim. Sci.*, 68 :1877--1888, 1990.
- [91] Snijders S.E.M., Dillon P., O'Callaghan D., and Boland M.P. Effect of genetic merit, body condition and lactation number on *in vitro* oocyte development in dairy cows. *Theriogenology*, 53 :981-989, 2000.
- [92] Kawarsky S.J., Basrur P.K., Stubbings R.B., Hansen P.J., and King W.A. Chromosomal abnormalities in bovine embryos and their influence on development. *Biol. Reprod.*, 54 :53-59, 1996.
- [93] Schmutz S.M., Moker J.S., Barth A.D., and Mapletoft M.J. Embryonic loss in superovulated cattle caused by the 1-29 robertsonian translocation. *Theriogenology*, 35 :705-714, 1991.
- [94] Berg U., Reichenbach H.D., Liebrich J., and Brern G. Sex ratio of calves born after transfer of *in vitro* produced embryos. *Theriogenology*, 37 :191, 1992.
- [95] Gayrard V., Picard-Hagen N., Berthelot X., and Humblot P. La gestation chez les ruminants : comment l'embryon se développe et se maintient dans l'utérus. *Bulletin des GTV*, 21 :23-30, 2003.
- [96] Silke V., Diskin M.G., Kermy D.A., Boland M.P., Dillon P., and Sreenan J.M. Mee J.F. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 71 :1—12, 2002.
- [97] Butler W.R. Review : effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 81 :2533-2539, 1998.
- [98] Thatcher W.W., Macmillan K.L., Hansen P.J., and Drost M. Concepts for régulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology*, 31 :149-164, 1989.
- [99] Al Katanani Et Al Y.M., Paula-Lopes F.F., and Hansen P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte compétence in holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 85 :390-

396, 2002.

- [100] Xu Z.Z., Burton L.J., and Macmillan K.L. Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF<sub>2a</sub> and progesterone. *Theriogenology*, 47 :687 701, 1997.