

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR**  
**ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE IBN KHALDOUN DE TIARET**  
**INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES**



**Mémoire de fin d'études**  
**en vue de l'obtention du diplôme de docteur veterinaire**

**THEME :**

**etude comparatif entre les différentes techniques de diagnostic de**  
**gestation chez les bovins**

**Présenté par :**

- **Graya Ahmed Yassine**
- **Moulay Mohamed Djamel Eddine**

**Encadre par :**

- **Dr Ayad Mohamed Amine**

**Année universitaire : 2016 – 2017**



# Remerciement

**Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et mes  
sincères**

**Remerciement à Mon tuteur de projet de fin d'étude Mr Ayad Mohamed  
Amine**

**qui a accepté d'encadrer mes travaux .**

**Ainsi que les membres de jury Mr Derrar Sofiane et Mr Saim Mohamed  
Said qui ont accepté d'évaluer notre travail**

**Mes plus vifs remerciements s'adressent aussi à tout le cadre professoral et  
administratif de**

**L'institut vétérinaire de tiaret**

**Mes remerciements à mes chères parents qui sont eux tout cela n'aurai jamais  
été**

**Possible, je n'oublierai jamais leur dévouement et leurs sacrifices.**

**J'espère pouvoir un jour les remercier à la hauteur de ce qu'ils m'ont  
apportés**

**Mes remerciements vont enfin à toute personne qui a contribué de près ou  
de loin à**

**l'élaboration de ce mémoire**

# ***Dédicaces***

**Je dédie ce memoire  
a tous ceux et toutes celles qui m'ont accompagnés et  
soutenus  
Durant ces années de formations**

# Table des matières

Remerciements .....	1
Table des matières .....	3
Table des figures.....	6
Table des tableaux .....	7
Liste des abréviations .....	8
Introduction.....	9
Etude bibliographique .....	11
I. Physiologie sexuelle de la vache .....	12
A. Caractéristiques générales du cycle œstral de la vache .....	12
1. Définition .....	12
2. Les étapes du cycle œstral .....	12
a. Pro-œstrus ou phase de maturation folliculaire .....	12
b. Œstrus (Chaleurs).....	13
c. Metoestrus .....	13
d. Dioestrus.....	13
B. Les modifications au sein de l’ovaire .....	14
1. La gamétogénèse.....	14
a. L’ovogenèse et la folliculogénèse.....	14
b. Cinétique de la croissance folliculaire .....	14
c. L’ovulation .....	17
2. La fonction lutéale cyclique .....	19
a. Caractéristique morphologique du corps jaune .....	19
b. Sécrétion de progestérone et facteurs lutéotropes.....	19
c. Différents types de cycles .....	20
II. Physiologie du début de la gestation .....	20
A. Le developement embryonnaire.....	20
1. La vie libre de l’œuf.....	20
2. Phase de l’implantation.....	21

B.	Formation du placenta et annexes fœtales .....	22
1.	Formation du placenta .....	22
2.	Formation des annexes fœtales.....	23
C.	Physiologie placentaire .....	24
1.	Fonction métabolique du placenta.....	24
2.	Fonction endocrine du placenta.....	25
D.	Contrôle hormonal du début de la gestation.....	25
1.	Contrôle stéroïdien .....	26
a.	Progestérone .....	26
b.	Œstrogènes .....	27
2.	Signaux embryonnaires et reconnaissance maternelle de la gestation.....	27
a.	Early pregnancy factor (EPF).....	27
b.	Interféron tau bovin (boIFN $\tau$ ).....	28
c.	Hormone lactogène placentaire bovine (bPL) .....	28
d.	Protéines associées à la gestation (PAG's).....	29
E.	Mortalité embryonnaire .....	29
III.	Le diagnostic de gestation chez la vache .....	30
A.	Intérêt du diagnostic de gestation précoce.....	31
B.	Qualité d'une méthode de diagnostic de gestation.....	31
C.	Critères de choix d'une méthode .....	31
D.	Méthodes diagnostiques utilisables .....	31
1.	Examens gynécologiques .....	31
a.	Palpation transrectale .....	31
b.	Echographie transrectale .....	33
2.	Analyses de laboratoire .....	36
a.	Dosage de l'Early Pregnancy Factor (L'EPF) .....	36
b.	Dosage de la progestérone .....	37
c.	Dosage de la PSPB.....	39

d. Dosage de la boPAG-1 .....	39
e. Dosage du sulfate d'œstrone .....	40
Conclusion .....	42
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>43</b>

# Table des figures

<i>Figure 1 : Evolution morphologique du follicule au sein du stroma ovarien.....</i>	<i>15</i>
<i>Figure 2 : Régulation neuro-endocrinienne de la vache lors de son cycle sexuel ..</i>	<i>17</i>
<i>Figure 3 : Croissance folliculaire au cours d'un cycle hormonal : représentation des vagues folliculaires et évolution des concentrations hormonales.....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 4 : Placentation épithélio-chorial de la vache .....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 5 : Placentation et annexes extra-embryonnaires chez les bovins.....</i>	<i>24</i>
<i>Figure 6 : Représentation schématique de la migration des cellules binucléées chez la vache.....</i>	<i>25</i>

# Table des tableaux

- *Tableau I : Durée des différentes phases du cycle sexuel de la vache et situation de l'ovulation par rapport à l'œstrus ..... 13*
- *Tableau II : Diagnostic différentiel des images échographiques visibles en transrectale ..... 34*
- *Tableau III : Performance de l'échographie transrectale en fonction de la date de l'examen 29*  
*Tableau IV : Résultats de différentes études du Test ECF™ chez la vache ..... 35*
- *Tableau V : Résultats de différentes études du dosage de la PSPB chez la vache ..... 37*
- *Tableau VI : Résultats de différentes études du dosage de la boPAG-1 chez la vache ..... 40*
- *Tableau VII : Techniques usuelles pour le diagnostic de gestation chez la vache : avantages et inconvénients..... 41*

# Liste des abréviations

boPAG-1 à 22 : Protéines associées à la gestation bovines 1 à 22

EPF: Early pregnancy factor

FSH: Hormone folliculostimulante

GnRH : Gonadotropin-Releasing-Hormone

LH : Hormone lutéinisante

ovPAG-1 à 8 : Protéines associées à la gestation ovines 1 à 8

PAG: Pregnancy associated glycoproteins

PGF2 $\alpha$  : Prostaglandine F2 $\alpha$

PSPB: Pregnancy specific protein B

VPN: Valeur prédictive négative

VPP : Valeur prédictive positive

# Introduction

La détection précoce et fiable de la gestation chez la vache est un élément essentiel dans le suivi de reproduction. L'enjeu est de diagnostiquer le plus tôt possible les vaches non gestantes afin de mieux les surveiller, voire de les traiter pour leur permettre une nouvelle gestation. Ce diagnostic précoce permet de réduire l'intervalle vêlage-vêlage et ainsi d'optimiser la production de lait sur la carrière d'une vache. Le coût de l'allongement de l'intervalle vêlage-vêlage peut représenter jusqu'à 0,70 € par vache par jour supplémentaire, ce qui, à l'échelle d'un troupeau sur un an, peut constituer une perte économique importante (Inchaisri, et al., 2010). En plus d'une détection rapide, la méthode doit impérativement être fiable, afin d'éviter toute erreur diagnostic. Ainsi, l'observation du simple non-retour en chaleur à 21 jours post saillie n'est malheureusement pas assez fiable, c'est pourquoi cette méthode, si elle est utilisée seule, reste déconseillée ; on s'oriente donc plutôt vers des examens complémentaires.

Plusieurs méthodes diagnostiques sont déjà disponibles et sont utilisées plus ou moins couramment dans la pratique : la palpation transrectale, l'échographie transrectale, le dosage de la progestérone ou de protéines associées à la gestation (PAG's) dans le sang et le lait, etc. Elles présentent toutes des avantages et des inconvénients.

L'existence des PAG's, détectables dans la circulation périphérique maternelle, a été publiée pour la première fois dans les années 80, sous l'appellation protéines spécifiques de la gestation (PSP). Ces protéines appartiennent à la grande famille des glycoprotéines placentaires principalement synthétisées par les cellules binucléées et mononucléées présentes dans les couches superficielles du trophoctoderme (Zoli, et al., 1992). Aujourd'hui, une vingtaine de PAG's sont connues et sécrétées durant différents moments de la gestation (Green et al., 2005), ainsi, ces sécrétions décalées dans le temps rendent certaines PAG's très intéressantes en terme de diagnostic précoce de gestation.

Dans ce contexte, le laboratoire IDEXX a développé un test ELISA ciblant des PAG's chez la vache. Grâce à une étroite collaboration avec IDEXX, l'objet de ce travail est de réaliser une étude expérimentale visant à améliorer et évaluer ce test et notamment à le rendre possible sur du lait.

Dans une première partie, notre travail consistera à réaliser une étude bibliographique afin de rappeler la physiologie sexuelle de la vache en insistant sur le début de gestation puis nous présenterons les connaissances actuelles sur les PAG's enfin nous décrirons les méthodes de diagnostic de gestation utilisées en routine, en présentant leurs avantages et inconvénients. La seconde partie de notre manuscrit présentera le protocole expérimental ainsi que les résultats obtenus, avant de les discuter.

# **Etude bibliographique**

# I. Physiologie sexuelle de la vache

Améliorer les performances reproductives d'une vache ou d'un troupeau nécessite une très bonne connaissance des principes de base de la physiologie et de l'endocrinologie sexuelle de la vache.

## A. Caractéristiques générales du cycle œstral de la vache

### 1. Définition

Le cycle œstral correspond à l'ensemble des modifications périodiques morphologiques, histologiques et physiologiques des organes génitaux et de la glande mammaire. L'ensemble de ces modifications ont pour but de créer des conditions favorables pour l'accouplement, la migration des gamètes, la fécondation, la nidation et la gestation. Ce cycle est centré sur l'œstrus, période où la femelle accepte la monte et est féconde.

La vache est une espèce polyœstrienne de type continu (conséquence de la domestication) à ovulation spontanée. La durée du cycle œstral est de 21 jours (Tableau I), plus ou moins 4 jours, soit 17 à 25 jours. Ce cycle est un à deux jours plus court chez les nullipares. La mise en place des cycles ovariens débute à l'âge de 6 à 18 mois, au moment de la puberté (Stevenson, 2007).

Après la puberté, les cycles œstraux se déroulent en continu sauf interruptions : gestation, période post-partum (interruption de 3 à 6 semaines), période de forte production laitière, pathologies (anœstrus permanent, carences alimentaires, etc.).

### 2. Les étapes du cycle œstral

En 1900, Walter Heape est le premier à utiliser le terme « œstrus » pour décrire la période d'acceptation du mâle. Les différentes phases du cycle sont alors décrites en utilisant le suffixe œstrus et les préfixes pro-, met- et di-.

#### *a. Pro-œstrus ou phase de maturation folliculaire*

Elle correspond à la croissance et à la maturation terminale des follicules ovariens. En deux à trois jours, le diamètre des follicules passe de 2 à 20 mm. De ces nombreux follicules un seul d'entre eux persiste : le follicule de De Graff qui est recouvert de plusieurs enveloppes périphériques et creusé d'une cavité dans laquelle fait saillie le cumulus oophorus contenant

l'ovule.

### ***b. Œstrus (Chaleurs)***

C'est la période d'acceptation du mâle par la femelle. Elle se traduit par des modifications organiques et des modifications du comportement de la femelle. Les manifestations des chaleurs sont plus ou moins marquées selon les individus et les conditions du milieu environnant. Elles se traduisent surtout par l'agitation, la sollicitation et le chevauchement des congénères. Cette période brève de 12 à 18h se termine par l'ovulation (Tableau I).

### ***c. Metoestrus***

Cette phase qui dure 2 jours (Tableau I) est caractérisée par la mise en place du corps jaune à partir du follicule ovulé.

### ***d. Dioestrus***

Le dioestrus est caractérisé par la croissance et le maintien du corps jaune pendant 17 jours. En l'absence de fécondation, le corps jaune régresse, les animaux retournent en pro-œstrus et ainsi débute un nouveau cycle.

Une autre terminologie est régulièrement utilisée pour caractériser les différentes phases du cycle. Le cycle ovarien est ainsi divisé en 2 phases :

- ***Une phase folliculaire*** : qui correspond à la période qui s'étend de la fin de la croissance folliculaire à l'ovulation (phases de proœstrus et d'œstrus).
- ***Une phase lutéale*** : qui débute après l'ovulation et s'achève avec la régression du ou des corps jaunes (phases de metoestrus et de dioestrus).

Tableau I : Durée des différentes phases du cycle sexuel de la vache et situation de l'ovulation par rapport à l'œstrus

<b>Espèce</b>	<b>Pro-œstrus</b>	<b>Œstrus</b>	<b>Metoestrus</b>	<b>Dioestrus</b>	<b>Durée cycle</b>	<b>Moment de l'ovulation</b>
<b>Vache</b>	2-3 jours	12-18 heures	2 jours	15 jours	21 jours	10-12h post œstrus

## **B. Les modifications au sein de l'ovaire**

### **1. La gamétogénèse**

#### *a. L'ovogenèse et la folliculogénèse*

L'ovogenèse qui débute pendant la vie fœtale correspond aux étapes de divisions des cellules germinales primordiales et à la méiose qui va conduire à la formation de l'ovule. Ce processus ne peut être distingué de l'évolution du follicule ovarien au sein duquel il se déroule en grande partie. L'ovogenèse comporte trois phases : une phase de multiplication, une phase d'accroissement et une phase de maturation.

La folliculogénèse débute également durant la vie fœtale, mais dépasse rarement le stade de follicule primaire. En effet, tous les follicules qui ont entamé leur croissance avant la puberté sont voués à l'atrésie (dégénérescence par apoptose).

A la naissance, il existe une réserve intra-ovarienne d'environ 70000 follicules primordiaux chez la vache. La phase de croissance ne concernera qu'un nombre réduit de ces follicules, la plupart d'entre eux subissant l'atrésie (Hanzen, et al., 2000).

#### *b. Cinétique de la croissance folliculaire*

Cette croissance folliculaire se déroule en deux étapes :

- **Croissance continue** : indépendante de l'action des gonadotrophines.
- **Croissance cyclique** : soumise à l'influence des gonadotrophines (hormone folliculostimulante (FSH) et hormone lutéinisante (LH)).

##### *i. Phase non gonado-dépendante*

Au cours de cette phase continue, la maturation des follicules primordiaux aboutit après plus de six mois à la formation de follicules tertiaires recrutables pour être intégrés à une vague folliculaire.

Pour commencer, l'ovocyte I s'entoure d'une couche simple de cellules aplaties pour constituer le follicule primordial. Le diamètre du follicule est d'environ 0,02 mm (Figure 1).

Les cellules folliculeuses prolifèrent pour former d'abord un épithélium cubique monostratifié, puis une structure pluristratifiée : la granulosa. L'assise cellulaire la plus interne conserve sa morphologie épithéliale cubique et prend le nom de *corona radiata*. Pendant ce temps, l'ovocyte I entre en accroissement. A ce stade, le follicule est qualifié de follicule primaire (Figure 1).

La prolifération des cellules de la granulosa se poursuit activement, augmentant le diamètre du follicule. Une cavité se différencie au sein de la granulosa, l'antrum. Le follicule

prend le nom de follicule secondaire. La condensation des cellules du stroma ovarien autour du follicule se différencie en deux couches distinctes : la thèque interne de nature épithéliale et la thèque externe de nature conjonctivo-musculaire. L'ovocyte est refoulé à un pôle de l'antrum, entouré de sa zone pellucide et de quelques assises de cellules folliculeuses. L'ensemble, qui fait saillie dans l'antrum, prend le nom de cumulus oophorus (Figure 1).

Au cours de cette maturation, les cellules de la thèque interne du follicule acquièrent des récepteurs à LH et les cellules de la granulosa acquièrent des récepteurs à FSH. Le follicule secondaire poursuit sa croissance pour devenir un follicule tertiaire atteignant une taille de 3 à 4 mm et l'ovocyte un diamètre compris entre 100 et 130  $\mu\text{m}$  (Figure 1).

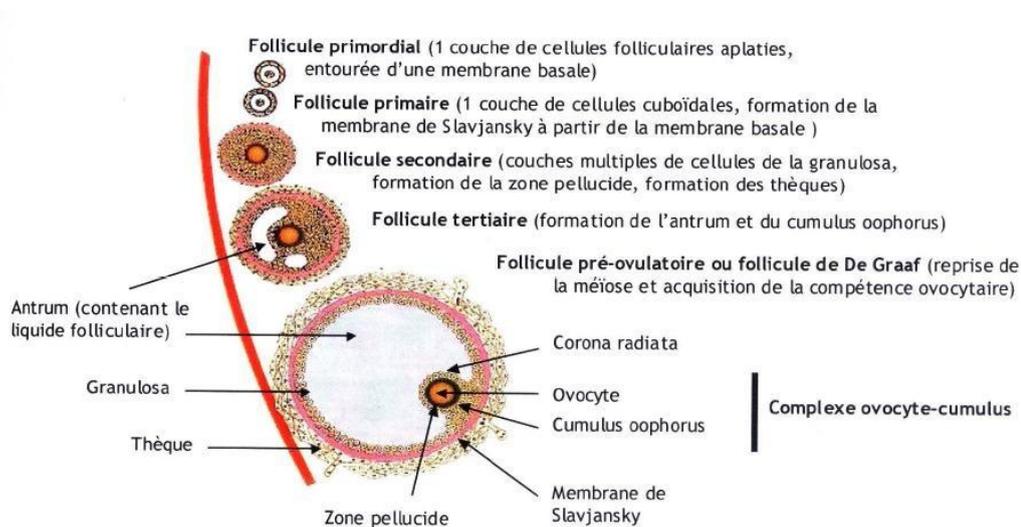


Figure 1 : Evolution morphologique du follicule au sein du stroma ovarien (D'après Drion et al., 1996 ; modifié par Fréret, 2007)

### *i. Phase gonado-dépendante*

Un follicule tertiaire est recruté lorsqu'il acquiert la capacité à répondre à la stimulation par les gonadotrophines (FSH et LH). Ces deux hormones, FSH et LH, sont sécrétées par l'hypophyse. Cette sécrétion est directement sous contrôle de la GnRH qui est le régulateur principal de cette phase. La GnRH est synthétisée et libérée par les neurones de l'hypothalamus et provoque la synthèse et la libération des gonadotrophines (FSH et LH) par les cellules gonadotropes de l'antéhypophyse (Figure 2).

- **Phase de recrutement (FSH-dépendante)**

Le développement folliculaire apparaît sous la forme de croissances ou de régressions successives de plusieurs follicules : les vagues folliculaires. Chaque vague consiste en l'émergence tous les sept à neuf jours environ d'une quinzaine de follicules tertiaires sous l'action de la FSH.

En synergie avec la FSH, les œstrogènes induisent la croissance des follicules et le développement de leur cavité antrale. L'augmentation du taux d'œstradiol a un effet positif sur la production de GnRH (Figure 2 et Figure 3).

Associée à la FSH, l'augmentation de la fréquence des décharges de LH provoque un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse et une baisse de la production de FSH.

- **Phase de sélection du follicule dominant**

La sélection correspond à l'émergence de 2 ou 3 follicules parmi l'ensemble des follicules recrutés. Ces follicules sécrètent des œstrogènes et de l'inhibine dans la circulation générale qui par un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse entraîne une baisse de la sécrétion de FSH (Figure 3).

- **Phase de dominance (phase LH-dépendante)**

La diminution de FSH est à l'origine de la sélection du follicule dominant. Le follicule dit « dominant » aura acquis suffisamment de récepteurs à LH pour survivre lors de la chute de taux de FSH par la production de facteurs de croissance locaux. La LH assure la maturation et la croissance terminale du follicule dominant qui devient le follicule de De Graaf. L'avenir de ce follicule dépend de la fréquence des décharges de LH, régulées par la GnRH (Figure 3).

- Soit un corps jaune est présent, la fréquence de décharge de LH est faible, une toutes les trois ou quatre heures (Figure 2). Ce qui aboutit à la perte de dominance et à l'atréisie du follicule, donc à l'absence d'ovulation et d'œstrus. Une nouvelle vague folliculaire émerge alors, également précédée d'une augmentation de FSH.
- Soit il y a lutéolyse et donc levée de l'inhibition de la progestérone sur la production de GnRH. La concentration et la fréquence de décharge de LH sont donc plus élevées, une décharge toutes les heures. L'ovulation a lieu (Ennuyer, 2000) (Rathbone, et al., 2001).

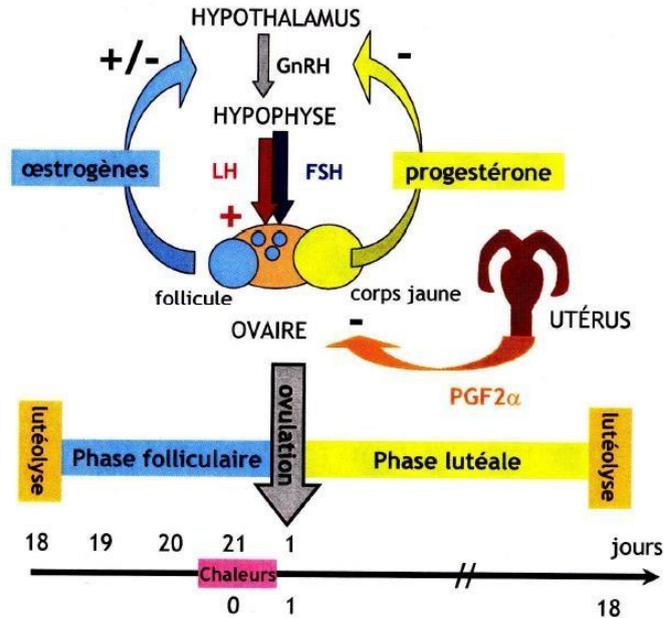


Figure 2 : Régulation neuro-endocrinienne de la vache lors de son cycle sexuel (D'après UNCEIA Groupe Fertilité Femelle, 2006)

### c. L'ovulation

L'ovulation correspond à la rupture du follicule ovulatoire permettant la libération d'un ovocyte fécondable, dans les 12 heures après la fin de l'œstrus suite au pic pré ovulatoire de LH (Bencharif, et al., 2003).

La rupture du follicule et l'expulsion de l'ovocyte résultent de la séquence des événements suivants :

- Augmentation du flux sanguin
- Augmentation du volume de l'antrum par suite d'un appel d'eau sous l'action de la FSH/LH
- Dissociation des faisceaux de fibres de collagène de la thèque externe sous l'action d'une collagénase
- Les cellules de la granulosa se détachent de la lame basale. Seules les cellules qui ont assuré la jonction entre la granulosa et l'ovocyte restent plus ou moins longtemps attachées à l'ovocyte et forment la corona radiata
- Rupture de la lame basale.

Une fois l'ovocyte libéré, il reprend sa méiose avec émission d'un premier globule polaire puis la méiose s'arrête à nouveau en métaphase de deuxième division méiotique. Elle ne reprend alors que lorsqu'un spermatozoïde pénètre dans l'ovocyte et se termine avec l'émission du deuxième globule polaire. En l'absence de fécondation, il dégénère.

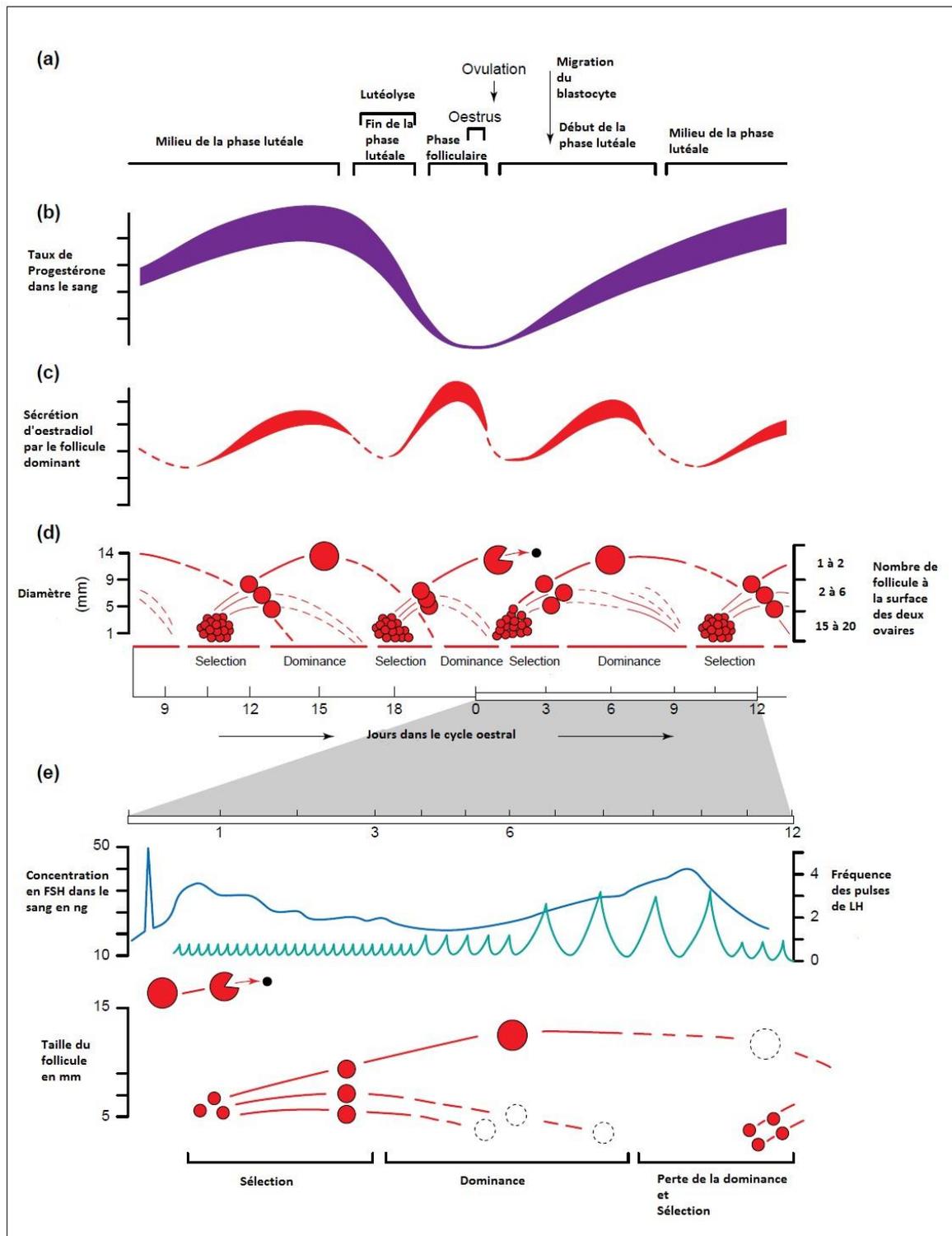


Figure 3 : Croissance folliculaire au cours d'un cycle hormonal : représentation des vagues folliculaires et évolution des concentrations hormonales (D'après Roche, 1996)

(a) Les différentes phases du cycle œstral ; (b) variation des concentrations plasmatiques de progestérone au cours du cycle œstral ; (c) variation des concentrations plasmatiques d'œstradiol au cours du cycle œstral ; (d) vagues folliculaires au cours d'un cycle œstral ; (e) variation des concentrations de FSH et de LH au cours du cycle en fonction de la dynamique ovarienne folliculaire

## 2. La fonction lutéale cyclique

Le corps jaune est un organe endocrine transitoire qui se met en place à la suite de l'ovulation. L'ensemble de la rythmicité du cycle œstrale dépend de la vie du corps jaune. La formation du corps jaune résulte d'une transformation morphologique (lutéinisation) des cellules de la thèque interne et de la granulosa du follicule ovulant.

Trois phases peuvent être distinguées dans l'évolution du corps jaune : une phase de croissance ou lutéogénèse, une phase de maintien ou lutéotrophie, et une phase de régression ou lutéolyse (Figure 3).

### *a. Caractéristiques morphologiques du corps jaune*

Après l'ovulation, la LH déclenche la transformation des cellules de la thèque et de la granulosa du follicule rompu en cellules lutéales pour donner le corps jaune.

- les cellules de la granulosa donnent les grandes cellules lutéiniques (sécrétrices de progestérone).
- les cellules de la thèque interne donnent les petites cellules lutéiniques et des capillaires.
- les cellules de la thèque externe forment des travées de tissu conjonctif.

### *b. Sécrétion de progestérone et facteurs lutéotropes*

Le corps jaune se comporte comme une véritable glande qui sécrète de la progestérone en plateau et de l'œstradiol. Ceci correspond à la phase lutéale du cycle. Le corps jaune reste fonctionnel jusqu'à la lutéolyse.

S'il n'y a pas eu fécondation, cette lutéolyse survient vers le 17<sup>ème</sup> jour, au moment où l'endomètre sécrète une prostaglandine : PGF2 $\alpha$ . Le corps jaune reste cependant présent pendant plusieurs semaines sous la forme d'un organite de petite taille. Cette régression est suivie d'un nouveau cycle ovarien.

S'il y a eu fécondation et formation d'un embryon, un signal provenant de l'embryon inhibe la production de PGF2 $\alpha$  et permet le maintien du corps jaune. Le corps jaune continue de sécréter de la progestérone en plateau ce qui est nécessaire au maintien de la gestation (Rathbone, et al., 2001).

La progestérone et l'œstradiol, par leur action synergique, exercent un rétrocontrôle négatif sur le fonctionnement hypophysaire, ce qui provoque une diminution des pulses de GnRH et une inhibition de la croissance d'autres follicules (Figure 2) (Ennuyer, 2000).

La dominance des sécrétions de progestérone pendant la phase lutéale induit une inhibition des contractions utérines et favorise l'implantation de l'œuf.

## **C. Différents types de cycles**

Il n'est plus possible de parler « du » cycle de la vache. Il convient de distinguer plusieurs types de cycles selon le nombre de vagues qu'ils contiennent (Ennuyer, 2000). Selon les animaux, il est possible de distinguer de 2 à 4 vagues de croissance (voire 6 exceptionnellement). En pratique, il est impossible de savoir pour une vache donnée quel est le nombre de vagues dans un cycle.

Lors de cycles à trois vagues : Si on considère J0 le jour de l'ovulation, une nouvelle vague émerge à J1, J6 et J16.

Lors de cycles à deux vagues : Si on considère toujours J0 comme le jour de l'ovulation, une nouvelle vague émerge à J1 et à J9 ou J10.

La durée de la vague ovulatoire est différente selon les types de cycles : si l'intervalle de temps entre le recrutement et la sélection est toujours de 2,5 jours, il s'écoule ensuite six à sept jours avant l'ovulation dans les cycles à deux vagues, contre 4 jours dans les cycles à trois vagues.

La durée du cycle varie également en fonction du nombre de vagues : 21 jours avec deux vagues, 24 jours avec trois vagues (Ennuyer, 2000) .

## **II. Physiologie du début de la gestation**

Chez les bovins, la durée moyenne de la gestation est de 282 jours. Cette gestation peut être décrite en trois phases successives : la vie libre de l'œuf, l'implantation du conceptus et la phase placentaire (nous ne détaillerons que la formation du placenta dans cette synthèse).

### **A. Le développement embryonnaire**

#### **1. La vie libre de l'œuf**

La fécondation a lieu dans l'ampoule de l'oviducte environ 20h après l'ovulation et se caractérise par la fusion des gamètes mâle (spermatozoïde) et femelle (ovocyte). L'ovocyte bloqué en métaphase II lors de l'ovulation, reprend sa division cellulaire.

Une fois la fécondation réalisée, l'œuf formé entreprend ses divisions. La première division a lieu vers la 8<sup>ème</sup> heure après la fécondation (Bencharif, et al., 2003). Vingt-quatre

heures après la fécondation, l'œuf se divise quatre fois, sans modification de taille, aboutissant à la formation d'une morula (32 cellules).

Sept à huit jours après la fécondation, la taille de la morula n'a pas augmenté, elle migre le long de l'oviducte et atteint l'utérus. La morula se creuse d'une cavité blastocœlique. C'est la formation du **blastocyste**. Celui-ci est sphérique avec une cavité centrale, le blastocœle, complètement entouré par une assise cellulaire appelée **trophectoderme** ou **trophoblaste** et par un petit groupe de cellules situé sous le trophoctoderme, le disque embryonnaire.

Neuf à dix jours après la fécondation, la zone pellucide s'amincit jusqu'à provoquer sa rupture, c'est l'éclosion. Le blastocyste entre dans une période de croissance considérable. Cette élongation favorise l'établissement des premiers contacts cellulaires entre le trophoblaste et l'épithélium utérin, ce qui empêche la sécrétion du facteur lutéolytique. De 150µm avant éclosion, le conceptus bovin mesure 15 à 20 mm au terme de cette phase d'élongation (Constant, et al., 2006). La longueur de la vésicule embryonnaire présente toutefois des variations interindividuelles importantes, elle mesure entre 7 et 24 mm au 16<sup>e</sup> jour de gestation, alors que son diamètre est constant.

## 1. Phase de l'implantation

Après la phase de vie libre dans la corne utérine, le blastocyste se fixe sur l'endomètre et s'y implante plus ou moins profondément. L'implantation de l'œuf sur la paroi utérine est une stratégie reproductive qui assure efficacement la nutrition et la protection des embryons. Cette implantation est tardive et lente chez la vache vers le 19<sup>ème</sup> jour (Guillomot, 2001) et aboutit à la mise en place des structures placentaires. Il s'agit d'une suite d'interactions complexes caractérisées par des degrés divers de contact entre le tissu maternel et fœtal, soit : l'orientation du blastocyste et l'accolement, l'apposition du blastocyste éclos à la muqueuse utérine, l'adhérence des cellules du trophoctoderme aux cellules de la muqueuse utérine et l'invasion de l'endomètre.

## B. Formation du placenta et annexes fœtales

### 1. Formation du placenta

La placentation **épithélio-choriale**, de type cotylédonaire, avec 6 couches cellulaires séparant le sang maternel du sang fœtal se met en place progressivement par apposition et /ou fusion de cellules épithéliales de l'endomètre et du trophoblaste (Figure 4). **Chez la vache, le trophoblaste n'envahit pas la muqueuse utérine.**

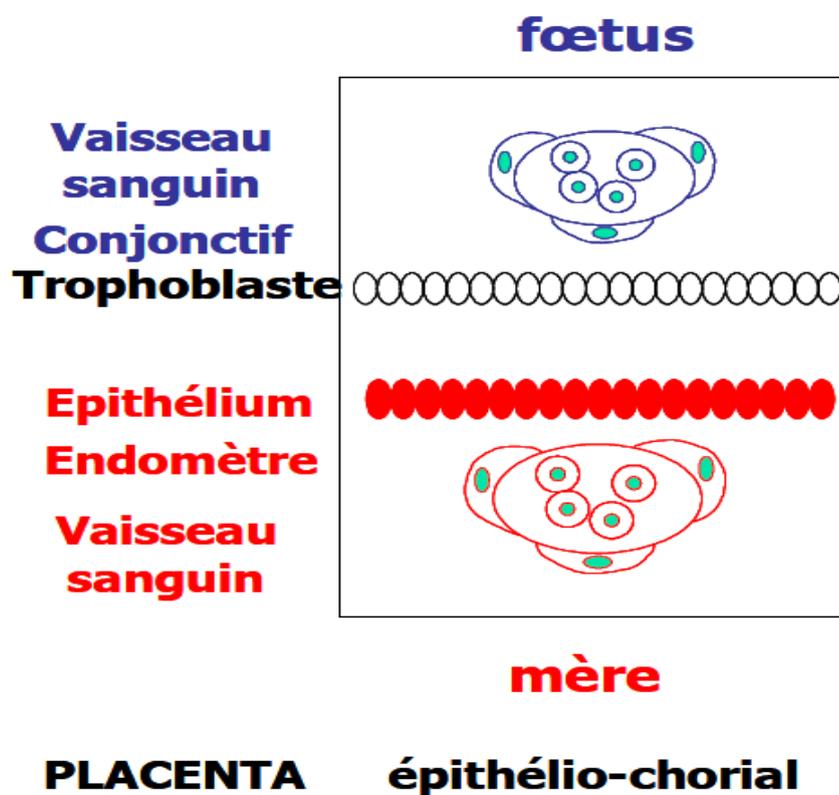


Figure 4 : Placentation épithélio-choriale de la vache

Vers le 19<sup>e</sup> jour, les premiers contacts cellulaires sont d'abord observés dans la zone proche de l'embryon, puis ils s'étendent le long du sac chorionique et vers l'extrémité des cornes utérines.

Au cours de l'**aposition**, la membrane plasmique du trophoblaste est encore apposée de manière lâche sur les cellules utérines. Pendant cette phase, des proliférations villosités du chorion s'enfoncent dans les orifices des glandes utérines. C'est la formation d'un premier placenta, diffus, absorbant le contenu des sécrétions glandulaires qui vise à disparaître à la fin du processus implantatoire à J25.

L'aposition laisse place à l'**adhésion** qui est assurée par l'interdigitation des microvillosités des cellules épithéliales utérines et de la membrane plasmique des cellules trophoblastiques (Constant, et al., 2006).

Puis à partir de J30, l'enveloppe la plus externe du conceptus, le **chorion**, présente sur sa surface externe des microvillosités cotylédonaire qui s'engrènent dans les formations spécialisées de la muqueuse utérine : les caroncules utérines. L'association d'un cotylédon et d'une caroncule forme un placentome, véritable surface d'attache utéroplacentaire. Chez la vache, ils sont en nombre important, de 60 à 120 lors de gestation simple. Les espaces intercotylédonaire lisses forment le paraplacenta. L'ensemble des éléments, placentomes et paraplacenta, concourent à former le placenta dans son entièreté (Figure 5).

## 2. Formation des annexes fœtales

Il y a formation de trois annexes fœtales : le sac vitellin, l'allantoïde et l'amnios, toutes entretenant des rapports avec le chorion, et participant à la formation et au fonctionnement du placenta (Figure 5).

- Le sac vitellin : formé dès le début de l'implantation, il est transitoire. Il contient un réseau vasculaire relié à l'embryon.
- L'allantoïde : il se développe durant la régression du sac vitellin. Il forme un sac à paroi mince et transparente qui s'étend d'une extrémité à l'autre du sac chorial. Il est uni à l'embryon à travers le cordon ombilical par le pédoncule allantoïdien. Son réseau vasculaire perfuse le placenta tout au long de la gestation.
- L'amnios : formé par des replis du trophoblaste. Il protège le fœtus en maintenant autour de lui un liquide amniotique.

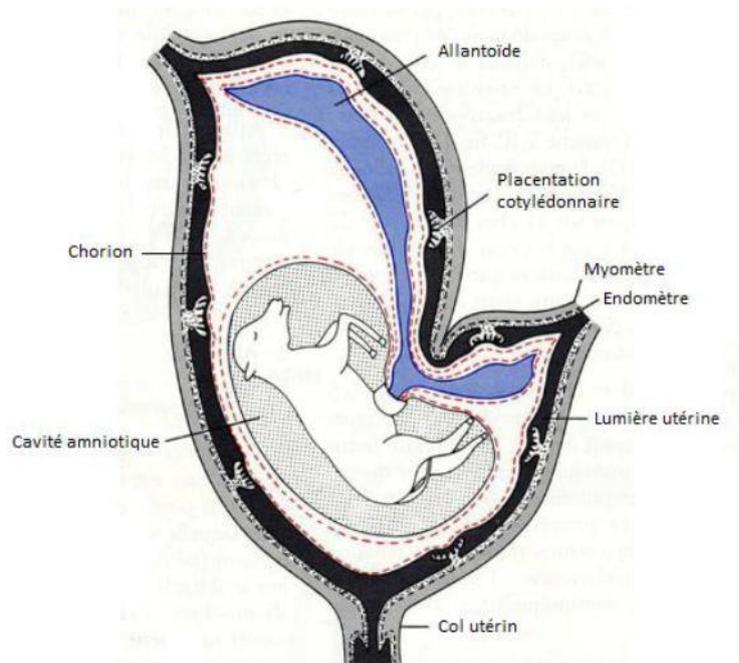


Figure 5 : Placentation et annexes extra-embryonnaires chez les bovins  
(D'après Signoret et al, 1991)

## C. Physiologie placentaire

Le placenta est un organe d'échange entre la mère et le fœtus qui assure la respiration, la nutrition du fœtus, ainsi que sa protection contre les bactéries et les substances toxiques. Il présente également une activité endocrine indispensable à l'initiation et au maintien de la gestation ainsi qu'à la croissance fœtale.

### 1. Fonction métabolique du placenta

Les échanges placentaires sont essentiels à la physiologie du fœtus. Le placenta est un filtre sélectif. Il permet le transport de nutriments : l'eau, l'oxygène, les minéraux et les matières organiques de la mère au fœtus et le transfert des déchets comme l'urée et le gaz carbonique du fœtus à la mère.

## 2. Fonction endocrine du placenta

Le placenta peut être considéré comme une volumineuse glande endocrine produisant des hormones stéroïdes et des hormones protéiques. Cette fonction endocrine est en grande partie assurée par les **cellules binucléées** (Figure 6).

Ces cellules binucléées dérivent des cellules uninucléées trophoblastiques. Ces cellules possédant un appareil de Golgi très développé sont capables de **migrer** à travers l'épithélium utérin et de relarguer directement dans la circulation maternelle les produits de synthèse stockés dans des granules denses.

De cette façon les cellules binucléées sont directement impliquées dans la production de progestérone, des prostaglandines, de l'hormone lactogène placentaire et des glycoprotéines associées à la gestation. Au cours de la gestation, les cellules binucléées représentent jusqu'à 20% des cellules du trophoctoderme (Ayad, et al., 2006).

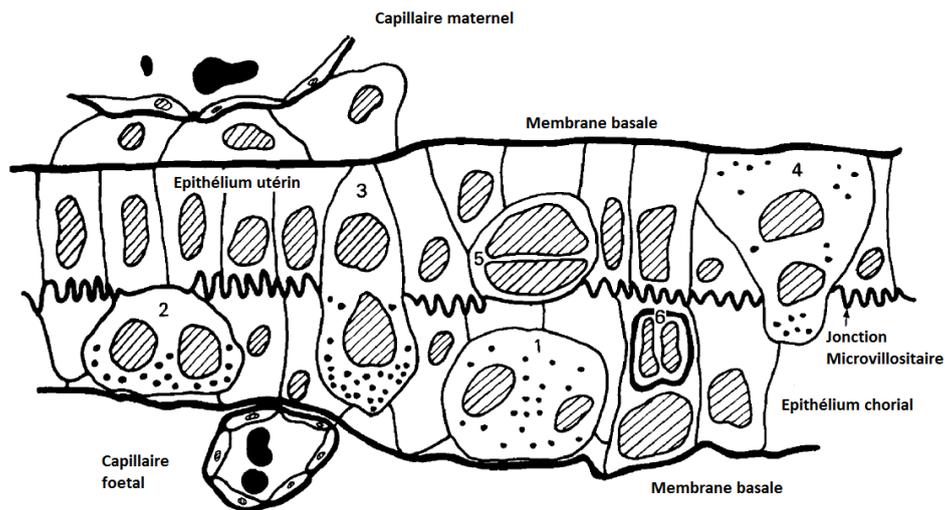


Figure 6 : Représentation schématique de la migration des cellules binucléées chez la vache (D'après Wooding, et al., 1980 ; modifié par Ayad et al., 2006)

1) cellules binucléées ; 2) contact avec les microvillosités ; 3) fusion avec les cellules maternelles et formation de cellules trinucléées à vie courte ; 4) exocytose des granules ; 5) cellules trinucléées présentant un cytoplasme réduit et un nucleus dense ; 6) cellule réabsorbée par le trophoctoderme

## D. Contrôle hormonal du début de la gestation

Pendant la gestation, les gonades et l'unité fœto-placentaire produisent diverses hormones et protéines : progestérone, œstrogènes, cortisol, prostaglandines, prolactine,

gonadotropine chorionique, hormone lactogène placentaire et une série d'autres hormones et facteurs de croissance. Parmi ces molécules, se retrouvent les protéines et glycoprotéines impliquées dans l'établissement de la gestation, le maintien du corps jaune, le métabolisme intermédiaire maternel, la croissance fœtale et mammaire et enfin l'immunotolérance du conceptus (Ayad, et al., 2006). Une chronologie parfaite est essentielle entre la production des facteurs maternels et embryonnaires.

## **1. Contrôle stéroïdien**

### ***a. Progestérone***

La progestérone exerce différents effets biologiques qui sont nécessaires à la mise en place et au maintien de la gestation. Tout au long de la gestation, le corps jaune en représente la source principale. Au fur et à mesure que progresse la gestation, la sécrétion progestéronique ovarienne est suppléée par le placenta mais la production de progestérone via les ovaires reste indispensable jusqu'au 200<sup>e</sup> jour de gestation.

Les effets biologiques de la progestérone au cours de la gestation sont les suivants :

- La sécrétion de progestérone est indispensable à la progression du zygote dans les trompes utérines et à sa descente dans l'utérus.
- La progestérone stimule les sécrétions utérines qui vont servir de nutriment pour le conceptus avant son implantation et permettre sa survie dans le tractus génital.
- La progestérone agit sur les cellules du myomètre pour inhiber leur activité contractile. L'inhibition des contractions utérines n'est cependant pas totale.
- Sous l'influence de la progestérone, le mucus cervical peu abondant change de consistance : il devient visqueux, opaque et épais, il forme un bouchon qui obstrue le canal cervical et protège le contenu utérin du milieu extérieur.
- La progestérone stimule la mammogénèse. La croissance et le développement des glandes mammaires permettent le démarrage de la lactation immédiatement après la parturition.

## ***b. Œstrogènes***

En milieu de gestation le placenta devient un vrai lieu de synthèse d'œstrogènes (Guilbault, et al., 1985).

L'**œstrone-3-sulfate** (principal œstrogène sécrété) commence à être détecté à un moment très variable selon les individus, allant du 70<sup>e</sup> au 100<sup>e</sup> jour de gestation. Sa concentration plasmatique maternelle augmente au cours de la gestation puis atteint un plateau autour de 15 à 30 ng/ml peu avant la mise bas (Constant, et al., 2006).

Le rôle des œstrogènes produits au cours de la gestation chez la vache n'est pas complètement élucidé. Aucun organe cible n'est clairement identifié.

Les œstrogènes d'origine trophoblastique favoriseraient la vascularisation locale au moment de l'implantation, ainsi que la synthèse des protéines œstrogène-dépendantes (Fleet, et al., 1982).

En concentration élevée, les œstrogènes auraient des propriétés immunosuppressives en supprimant l'activité des cellules NK (cellules « natural killer ») pendant la gestation (Gabrilovac, et al., 1988).

Le pic observé peu avant la parturition permettrait la maturation placentaire, la stimulation des contractions du myomètre et l'ouverture du col utérin.

## **1. Signaux embryonnaires et reconnaissance maternelle de la gestation**

Le développement, l'implantation et la survie embryonnaire à des stades précoces de la gestation sont dépendants d'une communication embryo-maternelle précise.

### ***c. Early pregnancy factor (EPF)***

La pénétration du spermatozoïde dans l'ovocyte donne lieu à la production d'une substance, la zygotine, qui, dans les premières heures du développement de l'œuf, stimulerait la production par l'ovaire porteur du corps jaune d'un facteur appelé Early Pregnancy Factor (EPF) (Cavanagh, et al., 1982).

Mais ce marqueur n'est pas spécifique de la gestation. L'EPF est sécrété par les cellules tumorales durant les phases de croissance et de division (Quinn, et al., 1990), également par les cellules normales prolifératives chez l'adulte (Quinn, et al., 1994) et par les plaquettes activées (Cavanagh, et al., 1991).

Jusqu'à présent, aucun test fiable basé sur la détection de l'EPF n'a permis d'identifier les femelles non gravides.

#### ***d. Interféron tau bovin (boIFN $\tau$ )***

L'interféron  $\tau$  bovin (boIFN $\tau$ ) est une des principales protéines sécrétées par le conceptus bovin 16 à 25 jours après la fécondation. L'interféron- $\tau$  est capable de bloquer, par inhibition des récepteurs à l'œstradiol et réduction consécutive des récepteurs à l'ocytocine, la sécrétion pulsatile de PGF $2\alpha$  maternelle, responsable de la régression cyclique du corps jaune (Martal, et al., 1979) (Asselin E, 2000). Le corps jaune ainsi maintenu, peut donc continuer à produire de la progestérone indispensable au développement du conceptus. **Il s'agit du principal mécanisme de reconnaissance maternelle de la gestation.**

L'IFN- $\tau$  a été identifié dans le liquide de lavage de la cavité utérine dès le 12<sup>e</sup> jour de gestation chez la vache (Humblot, et al., 1984). Cette molécule est synthétisée par des cellules mononucléées du trophoctoderme et exclusivement sécrétée dans la lymphe locale, où elle exerce son effet antilutéolytique (Roberts, et al., 1992). Dès J9-J10, on constate une augmentation de la concentration en interféron  $\tau$ , qui devient vraiment importante durant une période limitée entre J17 et J19 quand le conceptus subit une expansion rapide de sa forme (Kubisch, et al., 2001).

**Une très faible quantité d'IFN- $\tau$  passe dans le sang**, cette concentration extrêmement basse empêche la mise en place d'un test de diagnostic de gestation.

#### ***e. Hormone lactogène placentaire bovine (bPL)***

Plus tardivement au cours de la gestation, les cellules binucléées et trinucélées présentes au niveau de la jonction microvillositaire du placenta produisent localement une hormone lactogène placentaire bovine (bPL), connue également sous le nom d'hormone chorionique somato-mammotrope (Wooding, et al., 1987).

Cette glycoprotéine possède plusieurs isoformes de masses moléculaires différentes s'étalant de 30 à 34 kDa. Cette masse moléculaire élevée s'explique par la forte glycosylation de l'hormone lactogène placentaire bovine (Beckers, et al., 1980).

Le bPL paraît exercer une influence sur le développement de la glande mammaire et la lactogénèse.

Le bPL est dosable par radioimmunologie marquage (RIA) dans le sérum maternel à un moment **très variable** selon les individus allant du 26<sup>ème</sup> jour au 110<sup>ème</sup> jour après la fécondation. Les concentrations maternelles de bPL augmentent progressivement pour atteindre des concentrations de 1 à 2 ng/ml aux environs de la parturition.

A l'inverse de ces faibles concentrations mesurées dans le sang maternel, chez le fœtus la concentration en bPL peut atteindre 25 à 30 ng/mL au 90<sup>ème</sup> jour de gestation.

Cette apparition tardive de la bPL dans le sang maternel confère à ce dosage peu d'intérêt pour le diagnostic de gestation (Ayad, et al., 2006).

#### *f. Protéines associées à la gestation (PAG's)*

Les PAG's sont des glycoprotéines appartenant à une grande famille d'enzymes protéolytiques, les protéases aspartiques. Elles sont synthétisées dans les granules des cellules binucléées présentes dans les couches superficielles du trophectoderme. Chez la vache, de nombreuses protéines ont été décrites dès les années 80 sous diverses appellations : PSPB (Pregnancy specific protein B) (Butler, et al., 1982), PAG1 et 2 (Pregnancy associates glycoprotein 1 et 2) (Beckers, et al., 1988) (Zoli, et al., 1991)), PSP-60 (Pregnancy serum protein 60kDa) (Mialon, et al., 1993).

## **E. Mortalité embryonnaire**

La mortalité embryonnaire est définie comme la perte de l'embryon entre la fécondation et la fin de l'organogenèse vers le 42<sup>e</sup> jour de gestation, période au-delà de laquelle on parlera de mortalité ou de perte fœtale.

La mortalité embryonnaire peut être divisée en deux périodes : mortalité embryonnaire précoce qui se déroule avant la reconnaissance maternelle de la gestation qui a lieu vers le 15-17<sup>e</sup> jour de gestation (retour en chaleur non décalé) et mortalité embryonnaire tardive qui a lieu entre le début de la reconnaissance maternelle et le 42<sup>e</sup> jour de gestation (retour en chaleur décalé).

La période entre le 25<sup>e</sup> et le 42<sup>e</sup> est critique car il s'agit de la fixation des membranes embryonnaires à l'épithélium utérin. Cependant la majorité des mortalités embryonnaires surviennent avant le 25<sup>e</sup> jour (Descôteaux Luc, 2009).

Ces pertes sont très variables d'un élevage à l'autre (santé du troupeau, climat, alimentation,...).

### **III. Le diagnostic de gestation chez la vache**

Certains signes évoquent l'existence d'une gestation, notamment le non-retour en chaleur après la saillie ou l'insémination artificielle.

Cependant les chaleurs peuvent être frustrées ou réapparaître tardivement. A l'inverse, la vache peut présenter des fausses chaleurs, les faisant présumer vide à tort (Bencharif, et al., 2003).

Le non retour en chaleur à J21 n'est pas suffisant pour confirmer la gestation (Roelofs, et al., 2010).

#### **A. Intérêt du diagnostic de gestation précoce**

La réduction de l'intervalle vêlage-vêlage nécessite un diagnostic de gestation le plus précoce possible afin de détecter rapidement les femelles non gestantes qui n'ont pas été vues en chaleur entre le 18<sup>ème</sup> et le 24<sup>ème</sup> jour après l'insémination.

Dans une étude récente environ 19% des inséminations artificielles sont réalisées sur des vaches déjà gestantes. Au Pays-Bas, 4% des veaux ne sont pas issus de la dernière IA réalisée (Roelofs, et al., 2010).

Les méthodes précoces permettent, si la femelle est vide, une remise à la reproduction rapide évitant d'attendre un éventuel retour en chaleur.

#### **B. Qualité d'une méthode de diagnostic de gestation**

L'évaluation des différentes méthodes de diagnostic de gestation nécessite d'établir un ensemble de critères objectifs qui soient mesurables (Le Roux, 2009). Ces critères sont les suivants :

- la précocité : dans un but économique, pour détecter rapidement les animaux vides,
- la simplicité de mise en œuvre,
- la valeur prédictive positive (VPP). C'est la probabilité pour une vache

diagnostiquée gestante d'être effectivement gestante,

- la valeur prédictive négative (VPN). C'est la probabilité pour une vache diagnostiquée non gestante d'être effectivement non gestante,
- la sensibilité (Nombre de DG positifs exacts/Nombre de vaches réellement gestantes),
- la spécificité (Nombre de DG négatifs exacts / Nombre de vache réellement non gestantes),
- l'innocuité vis-à-vis de la gestation en cours,
- le coût.

## **C. Critères de choix d'une méthode**

Si l'objectif est d'identifier les femelles pleines, alors on choisit la méthode qui donne le moins de faux négatifs. On choisit une technique sensible.

Si l'objectif est d'identifier les femelles vides, alors on choisit la méthode qui donne le moins de faux positifs. On choisit une technique spécifique.

## **D. Méthodes diagnostiques utilisables**

### **1. Examens gynécologiques**

#### *a. Palpation transrectale*

Plusieurs structures doivent être systématiquement contrôlées : Le col utérin, l'utérus, le corps utérin, les artères utérines et éventuellement les ovaires. Il faut être très prudent dans l'examen et la manipulation des organes génitaux au cours de cette période.

#### *i. Principe*

*Ovaire :*

Tout au long de la gestation, un corps jaune est présent à la surface de l'un des deux ovaires. Cependant, à la palpation, rien ne le distingue d'un corps jaune cyclique. La vache continue de présenter des croissances folliculaires pendant la gestation, avec des follicules atteignant un diamètre pré-ovulatoire, qui régressent ensuite sans ovuler (Bencharif, et al., 2003).

*Col utérin, utérus, artères utérines (Bencharif, et al., 2003) :*

**A trois semaines** : Le diagnostic de gestation est impossible par palpation transrectal à ce stade. Le col n'est pas modifié. L'utérus reste flasque du fait de l'imprégnation progestéronique, son volume n'est pas modifié.

**A un mois** : L'embryon mesure 1 cm de long ; les cornes utérines, le col et les artères utérines, ne sont pas hypertrophiés.

**A deux mois** : Pour un manipulateur averti, un diagnostic précoce est possible à ce stade. Le fœtus mesure 5 cm. La corne gravide est hypertrophiée. Les enveloppes fœtales sont perceptibles en pinçant le corps utérin. On laisse échapper trois structures : les enveloppes fœtales, la paroi utérine, et la paroi rectale. Ce signe est dit «glissement de membrane ».

**A trois mois** : C'est à ce stade que le diagnostic est le plus simple. L'hypertrophie de la corne gravide est nette, elle est fluctuante à la palpation et les reliefs osseux du fœtus sont palpables.

**A quatre mois** : Le fœtus mesure 15cm. Le col s'hypertrophie et commence à plonger vers le bas. Au niveau de l'utérus on peut palper les placentomes.

**A six mois** : Le fœtus n'est plus palpable par voie transrectale, car il est descendu sur le plancher de l'abdomen. On peut donc faire un diagnostic de gestation faussement négatif si l'on ne recherche pas l'hypertrophie du col, la présence de cotylédons.

**A partir de sept mois** : Le fœtus est de nouveau palpable, on perçoit nettement la tête et les membres.

### *i. Qualité*

C'est une technique relativement **simple, peu coûteuse**, qui à l'avantage de fournir un **résultat immédiat** mais qui ne peut être mise en œuvre que relativement **tardivement**. Elle est réalisable dès le **30<sup>e</sup> jour** post-insémination pour un manipulateur très expérimenté mais un résultat fiable ne peut être donné avant le **35<sup>e</sup> jour** (Youngquist, 2007). Au cours de la gestation la sensibilité augmente pour atteindre 100% à partir de 90 jours de gestation.

Le risque d'avortement consécutif à une palpation transrectale reste un sujet controversé. Certaines études indiquent un risque pouvant atteindre 15% en cas de palpations trop brutales (Humblot, et al., 1984). Une étude plus récente indique que le diagnostic de gestation par palpation transrectale n'augmente pas le risque de mortalité embryonnaire (Romano, et al., 2011). Le risque semble dépendre uniquement des précautions du manipulateur.

## ***b. Echographie transrectale***

### ***i. Principe***

#### *Préparation :*

Le diagnostic de gestation par échographie est fondé sur la détection de la présence du conceptus. Pour réaliser cet examen, il faut commencer par vider le rectum, repérer l'utérus par palpation et le ramener au niveau du plancher du bassin. On peut alors introduire la sonde et la placer au dessus des cornes utérines.

#### *Images échographiques :*

Le diagnostic précoce de gestation par échographie se présente sous la forme d'une accumulation d'une quantité variable de liquide anéchogène du conceptus dans la lumière utérine (Stroud, 1994). Mais il a été constaté que des zones circulaires anéchogènes pouvaient être mise en évidence entre J10 et J14 aussi bien chez des vaches gestantes que non gestantes (Kastelic, et al., 1991). Au moment de la régression lutéale, les vésicules prennent une forme allongée, pouvant correspondre à l'accumulation de liquide utérin chez les vaches non gravides ou à l'élongation du blastocyste au cours de la gestation. A ce stade l'échographie n'a pas un degré d'exactitude suffisant pour être utilisé comme méthode de diagnostic de gestation.

A J20 l'embryon se présente sous la forme d'une ligne plus échogène, d'environ 4 mm de long. L'embryon peut alors être détecté, cependant sa visualisation est parfois difficile dans la faible quantité de liquide amniotique et allantoïdien. Ce jeune embryon se situe souvent contre la paroi utérine et peut être masqué par un repli de l'endomètre. La visualisation échographique est donc de meilleure valeur diagnostic à partir du **27<sup>e</sup> jour** de gestation. Entre J22 et J30, il présente une configuration dite en « C », due à la flexion des parties antérieures et postérieures du fœtus. Puis il se redresse et adopte une forme dite en « L ». Lorsque l'on passe au dessus de la vésicule embryonnaire, celle-ci apparaît plus grosse avec à l'intérieur un point blanc qui représente l'embryon, dont on peut percevoir les battements cardiaques à partir du 25<sup>e</sup> jour de gestation (Chavatte-Palmer, 2006). Les placentomes peuvent être identifiés à partir du 35<sup>e</sup> jour de gestation et sont visibles à proximité de l'embryon. Un autre signe important du développement normal de l'embryon ou du fœtus est la présence de l'attachement du cordon ombilical à l'utérus à partir du 40<sup>e</sup> jour de gestation et la visualisation de l'ossification des côtes du fœtus à partir de 50 jours (Descôteaux Luc, 2009).

## Diagnostic différentiel :

Tableau II : Diagnostic différentiel des images échographiques visibles en transrectale  
(D'après Grimard et al., 2003)

Situation	Caractéristiques de la lumière et particularités	Caractéristiques de la paroi
Gestation	Lumière anéchogène à peu près circulaire visualisation de l'embryon +/- cotylédons	Echogénicité tissulaire Epaisseur ≈ 5mm
Chaleurs	Lumière de faible épaisseur en forme d'étoile	Echogénicité tissulaire Epaisseur ≈ 5mm
Pyomètre	Contenu floconneux	Echogénicité tissulaire Epaisseur souvent augmentée
Vessie	Lumière piriforme	Paroi fine (2 à 3 mm) parfois multilamellaire
Vaisseaux utérins	Pouls visible et palpable Lumière prenant une forme allongée lorsqu'on change l'orientation de la sonde	Paroi < 5 mm Très échogène
Kyste folliculaire	Contours de l'ovaire visibles ; Parfois flocons grisâtres en suspension	Paroi 1 à 2 mm
Kyste luteal	Souvent travées conjonctives traversant la lumière	Paroi épaisse

### Autres informations intéressantes apportées par l'échographie :

Plusieurs appareils échographiques sont dotés d'un programme qui permet d'estimer l'âge de l'embryon à partir de mesures spécifiques. **La détermination de l'âge du fœtus** est particulièrement intéressante dans les élevages allaitant, pour compenser le manque d'information sur les saillies.

L'énorme avantage de l'échographe c'est qu'il est capable en temps réel d'évaluer la **viabilité de l'embryon** en portant une attention particulière à la présence de battements cardiaques. Ces derniers sont généralement visibles à partir du 25<sup>e</sup> jour de gestation. Dès le 45<sup>e</sup> jour, on peut également observer les premiers mouvements du fœtus. Enfin il est important d'observer la présence d'un liquide homogène, anéchogène, en quantité adéquate autour de l'embryon pour confirmer le développement normal du conceptus.

Les apparences échographiques d'une **mortalité embryonnaire** : sont la présence de nombreux débris échogènes à l'intérieur du liquide amniotique et allantoïdien ou une mauvaise définition des structures observées doivent faire suspecter une mortalité. Cela doit nous inciter à approfondir notre examen échographique. (Descôteaux Luc, 2009)

L'échographie permet de réaliser **un diagnostic du sexe**, possible entre le 55<sup>e</sup> et le 65<sup>e</sup> jour de gestation. Le sexage se fait par l'observation de la migration du tubercule génital vers le cordon ombilical chez le mâle et vers la queue chez la femelle. Après le 65<sup>e</sup> jour, le bourgeon génital s'organise et n'est plus visible à l'échographie.

### *i. Qualité*

Cette méthode est très appréciée en pratique des éleveurs qui peuvent suivre en même temps que le vétérinaire l'examen gynécologique et qui obtiennent ainsi une **réponse immédiate** au chevet de l'animal.

Cette méthode diagnostique est **très fiable** (maximum de sensibilité et meilleur valeur prédictive négative) à partir du **26<sup>e</sup> jour** chez la génisse et du **30<sup>e</sup> jour** chez la vache. Plus précocement les vétérinaires expérimentés seront capables de détecter la gestation mais la sensibilité et la VPN de l'échographie seront diminuées (Tableau III) (Silva, et al., 2007). La fiabilité de l'échographie dépend de l'expérience du praticien, de la date du diagnostic, de l'âge de l'animal et de la note d'état corporel de l'animal (Youngquist, 2007).

L'utilisation d'un échographe coûte entre **1000 et 2000 euros** par an (achat de l'échographe, maintenance) ce qui nécessite un nombre d'actes conséquent pour être rentable.

Tableau III : Performance de l'échographie transrectale en fonction de la date de l'examen (D'après Romano et al., 2006)

Date de l'échographie	J24	J25	J26	J27	J28	J29	J30
Nombre de vaches	150	155	162	153	157	151	151
Sensibilité	74.5%	90.5%	97.8%	93.8%	97.6%	100%	100%
Spécificité	90.3%	86.9%	97.4%	96.2%	95.6%	96.3%	97.4%
VPN	88.6%	93%	99.1%	97.1%	99.1%	100%	100%
VPP	77.8%	82.6%	93.6%	91.8%	89.1%	91.3%	91.9%

La méthode de référence utilisée étant une seconde échographie transrectale réalisée entre J31 et J38 (Tableau III).

## 2. Analyses de laboratoire

En laboratoire, le diagnostic de gestation chez la vache est réalisé à partir de dosage de différentes protéines et hormones plus ou moins spécifiques de la gestation et qui apparaissent dans le sang maternel au cours de celle-ci. Ici seront présentés par ordre de précocité les dosages de l'EPF, de la progestérone, de la PSPB, de la boPAG-1 et du sulfate d'œstrone.

### *a. Dosage de l'Early Pregnancy Factor (L'EPF)*

#### *i. Principe*

D'un point de vue historique, l'EPF a été mis en évidence par le test d'inhibition de rosettes. Les rosettes sont formées par la fixation d'au moins 4 hématies sur une cellule lymphoïde. Les lymphocytes ont la propriété de pouvoir fixer des hématies d'une autre espèce à leur surface. Lorsqu'on ajoute un immunosérum antilymphocytaire aux lymphocytes, on peut inhiber jusqu'à un certain titre de dilution, la formation de ces rosettes. Morton *et al.* (1974) ont remarqué qu'en ajoutant aux lymphocytes du sérum d'une souris gravide, l'inhibition de la formation de ces rosettes était accentuée. Ce facteur sérique capable d'inhiber la formation de rosettes a été baptisé **EPF (early pregnancy factor)**. Ce facteur est le signal de gestation le plus précoce connu jusqu'à présent. En effet il est détecté dans la circulation sanguine dès 24h post-insémination chez la vache (Nancarrow, et al., 1980).

En 1994 une technique ELISA permettant de détecter directement la présence de l'antigène EPF dans le sérum de vaches pour le diagnostic de gestation dès 24h post-insémination a été mise au point (Threlfall, 1994).

En 1998, chez les bovins, un test utilisant une méthode d'immunochromatographie sur membrane et recherchant une glycoprotéine immunosuppressive, dénommée l'Early Conception factor (ECF) a été mis sur le marché aux Etats-Unis : (ECF™) Dip Stick test. L'ECF serait apparenté à la famille moléculaire de l'EPF. Avant sa commercialisation aucune publication sur son efficacité n'était disponible.

#### *i. Qualité*

Cette méthode semble très intéressante puisqu'il s'agit d'une méthode **simple, peu coûteuse** et **précoce**. Malheureusement, les études les plus récentes font apparaître un manque flagrant de fiabilité de ce test chez les bovins (Tableau IV).

Tableau IV : Résultats de différentes études du Test ECF™ chez la vache

	(Descoteaux, et al., 2000)	(Cordoba, et al., 2001)	(Coombes, et al., 2003)
Nombre de vaches	139	35	159
Date des prélèvements	J11 à J15	J6	J7
Diagnostic de référence	Echographie entre J25 et J40 + PTR à partir de J40	Récolte d'embryons à J6	Echographie entre J28 et J35
Sensibilité	81%	86%	97%
Spécificité	26%	4%	3%
Fiabilité	46%	46%	44,6%

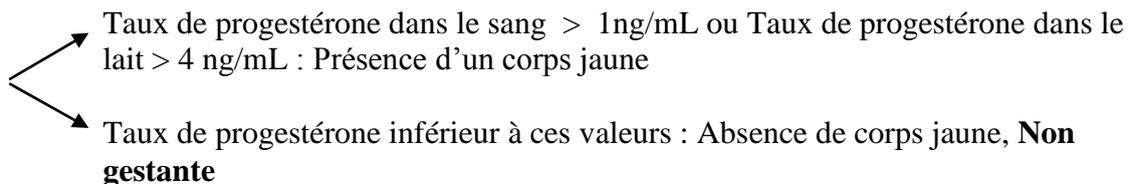
### *b. Dosage de la progestérone*

#### *i. Principe*

Après l'ovulation, la progestéronémie très faible est inférieure à 1 ng/mL. Le follicule se transforme en corps jaune, qui commence la sécrétion de progestérone quatre jours après sa formation pour atteindre un pic vers le 7<sup>ème</sup> jour du cycle. La sécrétion de progestérone se maintient ensuite en plateau jusqu'à la lutéolyse débutant le 17<sup>ème</sup> ou le 18<sup>ème</sup> jour du cycle, date à laquelle le taux diminue rapidement pour disparaître au 19<sup>ème</sup> jour du cycle (Bencharif, et al., 2004).

En revanche, si au cours de l'œstrus, la vache est fécondée, le maintien du corps jaune entraîne une progestéronémie élevée supérieure à 1ng/mL pendant toute la gestation pour s'effondrer à l'approche du part.

Le dosage de progestérone peut être effectué sur le sérum ou le lait maternel, **le 23<sup>ème</sup> ou le 24<sup>ème</sup> jour** post-insémination ou saillie (Bencharif, et al., 2004).



Le dosage de la progestérone peut être réalisé par radio-immunologie ou par méthode ELISA lente, procédé permettant de mesurer de très faibles concentrations de l'ordre du ng ou pg/mL.

Actuellement différents kit ELISA de dosage rapide de progestérone sont commercialisés, on peut citer comme exemple Ovucheck® et Ovulation Test®. La lecture se fait par un changement de coloration. Ces tests sont purement qualitatifs : soit le taux de progestérone est supérieur, soit il est inférieur au seuil fixé par le fabricant ; habituellement les seuils fixés sont 1 ng/mL dans le sang et 4 ng/mL dans le lait.

## *ii. Qualité*

En règle générale, les kits rapides donnent des résultats aussi fiables que la radio-immunologie ou l'ELISA classique en laboratoire (Bencharif, et al., 2004), ce qui permet de réduire considérablement le temps d'attente.

Ces kits ELISA offrent une méthode **simple, rapide** et **financièrement rentable** de diagnostic de gestation. La sensibilité et la valeur prédictive négative de ces tests sont relativement élevées, entre 90 et 93% (Seida, et al., 1990).

Malheureusement, lorsque le test est positif, en présence de progestérone, **l'exactitude du test n'est que de 56-79%** (Seida, et al., 1990). En effet, l'animal, présumé gestant, peut très bien présenter un cycle allongé du fait d'une résorption embryonnaire ou du fait d'un corps jaune persistant. Le diagnostic de gestation devra être confirmé. **Il s'agit donc d'un test de non-gestation.**

Cette méthode diagnostique est une méthode **simple, précoce, peu coûteuse** et **fiable** dès J27 chez la vache (Tableau V). Rappelons juste qu'il est nécessaire d'attendre 80 à 100 jours post-partum pour pouvoir utiliser ce test.

Tableau V : Résultats de différentes études du dosage de la PSPB chez la vache

	(Szenci, et al., 1998a)	(Howard, et al., 2007)	(Paré, et al., 2008)	(Romano, et al., 2010)	(Nakamura, et al., 2011)	(Piechotta, et al., 2011)
Test	PSPB-RIA	BioPRYN®	DG29™	PSPB ELISA	DG29™	BioPRYN®
Nombre de vaches	135	336	202	246	99	197
Date des prélèvements	J33-J34	J30-J36	J29-J36	J30	J29	J26-J58
Diagnostic de référence	Echographie à J53-J58	Echographie à J37-J47	Echographie à J29-J36	Echographie à J30	Echographie à J40	Echographie entre J26 et J58 et une Palpation à J120
Sensibilité	98.1	100%	99.4%	96%	100%	98%
Spécificité	86.6	87.8%	66.7%	93.9%	91.3%	97.1%
VPP	85.5	89.58%	92.6%	92.2%	97.4%	99.3%
VPN	98.4	100%	96.3%	96.8%	100%	91.9%
Fiabilité	93.93	94.05%	93.56%	94.8%	98%	97.8%

### *c. Dosage de la boPAG-1*

#### *i. Principe*

Le principe du dosage de la boPAG-1 a été présenté dans le chapitre 1, partie III, E, 1.

#### *ii. Qualité*

Les qualités sont très semblables à celles décrites pour le dosage de la PSPB. Il s'agit d'une méthode **simple, précoce, peu coûteuse** et **fiable** à partir de J27 chez la vache (Tableau VI).

Tableau VI : Résultats de différentes études du dosage de la boPAG-1 chez la vache

	(Zoli, et al., 1992)	(Chemli, et al., 1994)	(Szenci, et al., 1998a)	(Silva, et al., 2007)	(Piechotta, et al., 2011)
Test	bPAG-RIA	bPAG-RIA	bPAG-RIA	PAG ELISA	PAG ELISA
Nombre de vaches	430	41	135	1673	197
Date des prélèvements	J35	J21-J41	J33-J34	J27	J26-J58
Diagnostic de référence	Palpation rectale à J45	Palpation rectale à J45-J90	Echographie à J53-J58	Echographie à J27 et à J32	Echographie entre J26 et J58 et une Palpation à J120
Sensibilité	98.88	100	95	96.63	97.8%
Spécificité	87.5	68.42	77.3	94.17	91.2%
VPP	93.03	78.57	77	90.27	97.8%
VPN	97.79	100	95	98.03	91.2%
Fiabilité	94.75	85.37	85.18	95.13	96.4%

#### *d. Dosage du sulfate d'œstrone*

##### *i. Principe*

Le sulfate d'œstrone est la principale hormone œstrogène présente dans la circulation maternelle durant la gestation.

Le sulfate d'œstrone est détecté dans le plasma maternel à partir du 100<sup>e</sup> jour de gestation. Sa concentration dans le sang maternel augmente de façon linéaire dans le temps, pour atteindre un plateau dans les dix derniers jours avant la mise bas (Chavatte-Palmer, et al., 2006). Après le 120<sup>e</sup> jour, le taux plasmatique est de l'ordre de 250 pg/mL ; au 221<sup>e</sup> jour à 520 pg/mL et à la mise bas le taux est supérieur à 4000 pg/mL (Bencharif, et al., 2004). Les concentrations maternelles sont diminuées lors d'avortements ou de mortalité fœtale.

Le dosage est réalisé par une technique de radio-immunologie avec un seuil de 100 pg/mL à 120 jours.

##### *ii. Qualité*

Ce test est **fiable** à partir du 120<sup>e</sup> jour de gestation avec un taux d'exactitude de l'ordre de 96% à 97% (Bencharif, et al., 2004). Mais ce diagnostic de gestation par évaluation de la

concentration en œstrogènes est qualifié de **tardif**. De plus un résultat négatif peut aussi bien signifier un état non gestant qu'une gestation débutante. En conséquence cette méthode est peu utilisée. Ce type de dosage constitue toutefois un bon indicateur de la viabilité fœtale durant les deux derniers tiers de la gestation.

Tableau VII : Techniques usuelles pour le diagnostic de gestation chez la vache : avantages et inconvénients

Techniques	Facilité	Coût	Précocité	Fiabilité	Information(s)
Palpation transrectale	+	- Peu cher	± Dépend de l'expérience du vétérinaire	++ Très fiable à partir de J35	
Echographie transrectale	± Formation nécessaire	+++ Coût élevé de l'équipement	++ Dépend de l'expérience du vétérinaire	++ Très fiable à partir de J26	+++ Permet d'évaluer : le nombre de conceptus leur développement une éventuelle souffrance (+++ : fréquence cardiaque diminuée)
Dosage de L'EPF	+	- Peu cher	+++	-- Le moins fiable	
Dosage de la Progestérone	+	- Peu cher	+++	- Fiable en cas de diagnostic négatif Non fiable en cas de diagnostic positif	Test de non gestation
Dosage de la PSPB et de la boPAG-1	± Délai d'attente	- Peu cher	+ Obliger d'attendre 80 à 100 jours post partum	++ Très fiable à partir de J27	Détection de mortalité embryonnaire en association avec la progestéronémie
Dosage des PAG-4,-6,-9,-20,-21	± Délai d'attente	- Peu cher	++	++ Très fiable à partir de J25	Détection de mortalité embryonnaire en association avec la progestéronémie
Dosage du sulfate d'œstrone	+	-	- Le plus tardif	+ Fiable si test positif	Viabilité du fœtus en fin de gestation

# CONCLUSION

La gestation est une étape très importante dans n'importe quelle espèce, pour cela le constat de gestation doit pouvoir diagnostiquer celle-ci le plus rapidement possible avec une certaine sensibilité et spécificité ainsi que la valeur prédictive positive et négative.

Les constats de gestation sont très diversifiés allant du plus précoce au plus tardif, du Clinique au para-clinique, ainsi durant ce travail on a discuté la majorité des diagnostics de gestations possibles chez la vache en citant leurs avantages et inconvénients.

Chez la vache laitière et allaitante les tests les plus utilisés en pratique sont la palpation transrectale et l'échographie suivis d'une moindre utilisation des dosages hormonaux spécialement la progesterone et les PAG qui sont réservés pour les études expérimentales et de recherche.

# BIBLIOGRAPHIE

- Asselin E, Fortier, MA. 2000.** Detection and regulation of the messenger for a putative bovine endometrial 9-keto-prostaglandin E2 reductase: effect of oxytocin and interferon tau. *Biology of Reproduction*. 2000, Vol. 62, 125-131.
- Ayad, A, et al. 2006.** Endocrinologie de la gestation chez la vache: signaux embryonnaires, hormones et protéines placentaires. *Annale de médecine vétérinaire*. 2006, Vol. 150, p.212-226.
- Beckers, JF, et al. 1980.** Isolement d'une protéine placentaire présentant une activité analogue à la prolactine et à l'hormone de croissance. *Annales de médecine vétérinaire*. 1980, Vol. 124, 584-601.
- Bencharif, D et Tainturier, D. 2003.** Le diagnostic clinique de gestation chez la vache. *L'Action vétérinaire*. 2003, N° 1660, p.17-19.
- Bencharif, D et Tainturier, D . 2004.** Le diagnostic indirect de gestation chez la vache. *L'Action Vétérinaire*. 2004, N°1666, p.25-27.
- Butler, J.E et Hamilton, W.C, Sasser R.G. 1982.** Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biology of Reproduction*. 1982, Vol. 26, 925-933.
- Cavanagh, AC, et al. 1982.** Ovum factor: a first signal of pregnancy? *American journal of reproductive immunology*. 1982, Vol. 2, 97-101.
- Cavanagh, AC, et al. 1991.** Relationship between early pregnancy factor, mouse embryo-conditioned medium and platelet-activating factor. *Journal of reproduction & fertility*. 1991, Vol. 93, 355-365.
- Chavatte-Palmer, P. 2006.** Diagnostic de gestation et suivi du fœtus. *Le point vétérinaire*. 2006, 12-17.
- Chavatte-Palmer, P, et al. 2006.** Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. *Theriogenology*. 2006, Vol. 66, 829-840.
- Constant, F et Guillomot, M. 2006.** Formation et fonctionnement du placenta des bovidés. *Le point vétérinaire*. 2006, 6-11.
- Descôteaux Luc, Gnemmi Giovanni, Colloton Jill. 2009.** *Guide pratique d'échographie pour la reproduction des ruminants*. s.l. : Med'com, 2009.
- Ennuyer, M. 2000.** Les vagues folliculaires chez la vache: Applications pratiques à la maîtrise de la reproduction. *Le point vétérinaire*. 2000, Vol. 31, n°209.

- Gabrilovac, J, et al. 1988.** NK cell activity and estrogen hormone levels during normal human pregnancy. *Gynecologic and obstetrical investigation*. 1988, Vol. 25, 165-172.
- Green, J.A, et al. 2005.** The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *theriogenology*. 2005, Vol. 63, 1481-1503.
- Guilbault, LA, et al. 1985.** Periparturient endocrine changes of conceptus and maternal units in Holstein heifers bearing genetically different conceptus. *Journal of Animal Science*. 1985, Vol. 61, 1505-1515.
- Guillomot, M. 2001.** L'implantation du blastocyste. *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. 2e Ed, 2001, p 457-478.
- Hanzen, CH, Lourtie, O et Drion, P.V. 2000.** Le développement folliculaire chez la vache I. Aspects morphologiques et cinétiques. *Annales de médecine vétérinaire*. 2000, Vol. 144, 223-235.
- Humblot, P et Dalla Porta, MA. 1984.** Effect of conceptus removal and intrauterine administration of conceptus tissue on luteal in the cow. *Reproduction Nutrition Développement*. 1984, Vol. 24, 529-541.
- Inchaisri, C, et al. 2010.** Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology*. 2010, Vol. 74 issue 5, 835-846.
- Kastelic, J.P, Bergfelt, D.R et Ginther, O.J. 1991.** Ultrasonic detection of the conceptus and characterization of intrauterine fluid on days 10 to 22 heifers. *Theriogenology*. 1991, Vol. 35, 569-581.
- Kubisch, HM, et al. 2001.** Genetic and environmental determinants of interferon tau secretion by in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *Animal Reproduction Science*. 2001, Vol. 66, 1-13.
- Le Roux, K. 2009.** Devenir des génisses et vaches laitières après un diagnostic de gestation négatif. *Thèse pour le diplôme d'état de docteur vétérinaire*. 2009.
- Martal, J, et al. 1979.** Trophoblastin an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *Journal of reproduction & fertility*. 1979, Vol. 56, 63-73.
- Mialon, M.M, et al. 1993.** Peripheral concentrations of a 60kDa pregnancy serum protein during gestation and after calving and in relationship to embryonic mortality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*. 1993, Vol. 33, 269-282.
- Morton, H, Morton, DJ et Ellendorff, f. 1983.** The appearance and characteristics of early pregnancy factor in the pig. *Journal of reproduction & fertility*. 1983, Vol. 68, 437-446.

- Nancarrow, CD et Wallace, ALC. 1980.** Detection of fertilization in sheep and cattle; serological estimation and description of properties of an early pregnancy factor. *Proc. 9th Int. Congr. Anim. Reprod. & I.A.* 1980, Vol. 3.85, (abstract).
- Quinn, KA, et al. 1994.** Early pregnancy factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats: relationship with chaperonin 10. *Hepatology.* 20, 1994, 1294-1302.
- Quinn, KA, et al. 1990.** Monoclonal antibodies to early pregnancy factor perturb tumour cell growth. *Clinical & Experimental Immunology.* 1990, Vol. 80, 100-108.
- Rathbone, M, Kinder, J et Fike, K. 2001.** Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the oestrus cycle in cattle. *Advanced Drug Delivery reviews.* Elsevier, 2001, Vol. 50, 277-320.
- Roberts, RM, Cross, JC et Leaman, DW. 1992.** Interferons as hormones of pregnancy. *Endocrinology Review.* 1992, Vol. 13, 432-452.
- Roelofs, J, et al. 2010.** When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. *Theriogenology.* 2010, Vol. 74, p.327-344.
- Seida, AA, Bretzlaff, KN et Elmore, RG. 1990.** Pregnancy diagnosis by milk progesterone on days 18, 22, and 24 postbreeding in dairy cows. *Archiv fur experimentelle veterinarmedizin.* 1990, Vol. 44, 488-491.
- Silva, E, et al. 2007.** Accuracy of a pregnancy-Associated Glycoprotein ELISA to Determine Pregnancy Status of Lactating Dairy Cows Twenty-Seven Days After Timed Artificial Insemination. *Journal of Dairy Science.* 2007, Vol. 90, 4612-4622.
- Stevenson, Jeffrey. 2007.** Clinical reproductive physiology of the cow. 2007., 35, 258-270.
- Stroud, B.K. 1994.** Clinical applications of bovine reproductive ultrasonography. *Compendium Continuing education.* 1994, Vol. 16(8), 1085-1097.
- Threlfall, W.R. 1994.** immunosuppressive early pregnancy factor (ISEPF) determination for pregnancy diagnosis in dairy cows. *Theriogenology.* 1994, Vol. 41, 317.
- Wooding, FB et Beckers, JF. 1987.** Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placenta lactogen. *Cell and Tissue Research.* 1987, Vol. 247, 667-673.
- Youngquist, R.S. 2007.** *Pregnancy diagnosis in Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* s.l. : Elsevier Saunders, 2007.
- Zoli, A.P, et al. 1991.** Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoproteins. *Biology of Reproduction.* 1991, Vol. 45, 1-10.
- Zoli, A.P, et al. 1992.** Radioimmunoassay of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: Its application for pregnancy diagnosis. *Biology of reproduction.* 1992, Vol. 46, 83-92