ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Agriculture
Alimentation
Food
Biologie
Biology
Environnement
Environment
Santé
Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Science de la vie et Santé

présentée et soutenue publiquement par

Dorothée LEDOUX

le 8 juillet 2011

Echecs précoces de gestation chez la vache laitière de race Holstein : incidences, implication dans la baisse de fertilité et facteurs de risque

Directeur de thèse : **Bénédicte GRIMARD**

Jury

Mme Sylvie CHASTANT, Professeur, UMR 1198 INRA-ENVA, ENV, Toulouse	Président
M. Henri SEEGERS, Professeur, UMR 1300 ONIRIS-INRA, ONIRIS, Nantes	Rapporteur
Mme Catherine DISENHAUS, Professeur, UMR 1080 INRA-AO, Agrocampus-Ouest, Rennes	Rapporteur
M. Nicolas FRIGGENS, Directeur de Recherche, UMR INRA-AgroParisTech, Paris	Examinateur
M. Patrice HUMBLOT, Professeur, UNCEIA, Recherche et Développement, Maisons-Alfort Faculty of Veterinary Medecine and Animal Science, Uppsala, Suède	Examinateur
Mme Bénédicte GRIMARD, Professeur, UMR 1198 INRA-ENVA, ENV, Maisons-Alfort	Examinateur
Mme Claire Ponsart, PhD, UNCEIA, Recherche et Développement, Maisons-Alfort	Examinateur

AgroParisTech
Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort,
7 av du général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort cedex
UMR INRA 1198 Biologie du Développement et Reproduction,
Domaine de Vilvert, 78352 Jouy-en-Josas cedex

Remerciements

Aux membres de mon jury, Mesdames Sylvie Chastant, Catherine Disenhaus et Claire Ponsart, Messieurs Nicolas Friggens, Patrice Humblot et Henri Seegers. Veuillez croire en mes remerciements sincères.

A Bénédicte Grimard, mon directeur de thèse, qui m'a accompagnée avec ténacité dans cette expérience. Je la remercie de m'avoir transmis son expérience de recherche, de m'avoir soutenue, de m'avoir souvent recadrée, de m'avoir encouragée jusqu'à la fin.

Aux acteurs de l'unité de reproduction de l'ENVA. Je vous remercie pour les deux années passées à travailler dans la bonne humeur.

A Nadine Jeanguyot, Marie-Christine Deloche pour leur travail de dosage au laboratoire d'hormonologie de l'UNCEIA

Aux correspondants des centres d'insémination animale, aux inséminateurs et aux éleveurs

A Sylvie Canepa, Chantal Flon et Claudette Fagu pour les dosages de progestérone réalisés au laboratoire d'hormonologie de l'INRA Tour

A Olivier Dubois pour son aide dans la réalisation des PCR à l'UMR BDR de Jouy-en-Josas

A Andrew Ponter, Marie Saint-Dizier, Fabienne Nuttinck, Christine Ficheux pour leurs précieuses aides et enseignements.

Aux trois piliers de Bressonvilliers, Christophe Richard, Valérie Gélin et Laurent Delatouche, à Patrice Laigre pour les échographies

A Loic Desquilbet pour son aide dans le choix des modèles mixtes

A toute ma famille qui m'a permise matériellement de réaliser ce travail

A Pierre, à nos enfants nés et à venir

Echecs Précoces de Gestation chez la Vache Laitière de race Holstein : Incidences, Implication dans la baisse de fertilité et Facteurs de risque

Actuellement en France et aux Etats-Unis, seules 30 à 35 % des premières inséminations artificielles chez la vache Holstein aboutissent à un vêlage. Les échecs de gestation ont lieu le plus souvent au cours du développement embryonnaire (Non-Fécondation-Mortalité Embryonnaire Précoce (NF-MEP) entre 0 et 16 jours, Mortalité Embryonnaire Tardive (MET) entre 16 et 45 jours après insémination). Ces échecs précoces de gestation expliquent en grande partie les différences de fertilité observées en France entre la race Holstein et les autres races plus fertiles. Les facteurs de risque de l'interruption de la gestation sont multiples : liés à l'animal, à l'environnement et à la conduite de l'élevage. Trois facteurs cependant ont évolué au cours du temps pour les vaches Holstein : le potentiel génétique, les anomalies de reprise de la cyclicité après vêlage, le déficit énergétique en début de lactation. Notre objectif a été d'identifier l'influence de ces trois facteurs sur les échecs précoces de gestation après première insémination postpartum chez la vache de race Holstein. Le potentiel génétique a été associé à l'incidence de NF-MEP et de MET. Les phases lutéales prolongées sembleraient être à l'origine d'une augmentation d'incidence de MET. Le déficit énergétique a eu un effet sur la NF-MEP et sur la MET. L'effet du déficit énergétique postpartum sur la qualité des ovocytes au moment de la mise à la reproduction reste hypothétique. Notre travail sur les échecs précoces de gestation a permis de contribuer à fournir des outils d'amélioration de conduite d'élevage aux professionnels.

Mots-clés : vache laitière Holstein, mortalité embryonnaire, incidence, facteurs de risque, index génétique de fertilité, anomalies de reprise de cyclicité, déficit énergétique

Early Pregnancy Failures in Holstein Dairy Cows: Incidence, Role in the Decrease Fertility, Risk Factors

Currently, in France and the United States of America, only 30-35 % of first artificial inseminations in Holstein cows result in a calving. Pregnancy failure mainly occurs during embryonic development (fertilization failure - early embryonic mortality (FF-EEM) between D0 and D16 or late embryonic mortality (LEM) between D16 and D45 after insemination). Early pregnancy failure explains the majority of the differences in fertility between the Holstein breed and the other breeds in France, which are more fertile. There are numerous risk factors which cause pregnancy failure: animal, environmental and farm management factors. There are however, three factors which have been modified over time in Holstein cows: genetic merit, abnormal patterns of resumption of cyclicity and negative postpartum energy balance (NEB). Our objective was to identify the relationships between these three factors and early pregnancy failure after first postpartum insemination in Holstein dairy cows. Genetic merit was related to the incidence of FF-EEM and LEM. Prolonged luteal phases seemed to increase the incidence of LEM. The NEB was associated with FF-EEM and LEM. The impact of NEB on oocyte quality during the breeding period remains unclear. Our early pregnancy failure studies have helped to provide some tools to improve farm management.

Keywords: Holstein dairy cow, embryonic mortality, incidence, risk factors, genetic fertility index, abnormal resumption of cyclicity, negative energy balance

Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 av du général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort Cedex, France

UMR INRA 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

Table des matières

Liste des tableaux 8

Liste des figures..... 10

Liste des abréviations..... 14

Chapitre I. Introduction générale 18

Chapitre II. Etude bibliographique 24

I. Performances de reproduction des vaches laitières de race Holstein, mesures, évolution 24

I.1. Mesures des performances de reproduction en élevage bovin laitier 24

I.1.1 Notion de fertilité et de fécondité chez la vache laitière 24

I.1.2 Définitions des critères de mesure des performances de reproduction des vaches laitières 25

I.1.3 Choix d'un critère de mesure de la fertilité des vaches laitières 28

I.2. Evolution des performances de reproduction des vaches laitières de race Holstein 29

I.3. Cinétique de la dégradation des performances de reproduction 33

I.4. Le point sur les performances de reproduction des vaches Holstein en France 34

II. Caractérisation des échecs précoces de gestation 37

II.1. Rappel sur le développement du conceptus bovin 37

II.1.1 De la fécondation au fœtus : Aspect anatomique (pour revues : Picard-Hagen et al., 2001 ; Thibault, 2001 ; Ménézo et Renard, 1993 ; INRA-UNCEIA, 1990) 37

II.1.2 Effets de l'environnement de l'oviducte et de l'utérus sur le développement embryonnaire 39

II.1.3 Signaux embryonnaires et reconnaissance maternelle de la gestation (pour revues : Sousa et al., 2002 ; Ayad et al., 2006 ; Roberts et al., 2008 ; Farin et al., 2010) 40

II.2. Méthodes de mise en évidence des échecs précoces de gestation 44

II.2.1 Techniques expérimentales 47

II.2.2 Techniques utilisables en élevage 47

II.3. Quantification des mortalités embryonnaires et évolution 48

II.3.1 Absence de fécondation 48

II.3.2 Mortalité embryonnaire précoce 49

II.3.3 Mortalité embryonnaire tardive 50

II.3.4 Chronologie des échecs 51

III. Facteurs prédisposants et/ou explicatifs des échecs de gestation précoce 53

III.1. Synthèse des facteurs connus 53

III.2. Facteurs susceptibles d'expliquer l'évolution récente de la fertilité des vaches Holstein 58

III.2.1 Premier facteur : Implication de la génétique dans l'évolution de la fertilité des vaches laitières 58

III.2.2 Deuxième facteur : Anomalie de la reprise de la cyclicité postpartum 79

III.2.3 Troisième facteur : Déficit énergétique au cours du postpartum 107

IV. Conclusion l'étude bibliographique 125

Chapitre III. Hypothèses et méthodologies expérimentales 128

I. Contexte 128

I.1. Evolution de la chronologie des échecs de gestation dans les trois grandes races laitières françaises 128

I.2. Spécificités des vaches Holstein pouvant expliquer leur faible fertilité 131

I.2.1 Sélection génétique sur le potentiel laitier : une sélection plus importante en race Holstein que dans les autres races Françaises....131
I.2.2 Anomalies de la reprise de cyclicité postpartum : une fréquence élevée en race Holstein..132
I.2.3 Déficit énergétique en début de lactation : un déficit plus élevé en race Hosltein que dans les autres races....133
II. Objectif, hypothèses....134
II.1. Objectif....134
II.2. Hypothèses....134
II.3. Méthodologie expérimentale....135
II.3.1 Mesure de l'incidence des échecs précoces de gestation....135
II.3.2 Identification des facteurs de risque ou des associations entre facteurs et échecs précoces de gestation....136
II.3.3 Effet génétique sur les échecs précoces de gestation....137
II.3.4 Effet des anomalies de reprise de cyclicité postpartum sur les échecs précoces de gestation....137
II.3.5 Effet du déficit énergétique postpartum sur la qualité des complexes ovocytes-cumulus....138
Chapitre IV. Etudes Expérimentales....142
I. Publication et communication associées aux travaux....142
II. Etude expérimentale n°1 : Effet du potentiel génétique de « fertilité » sur les échecs précoces de gestation....144
II.1. Résumé....144
II.1.1 Dispositif expérimental....144
II.1.2 Principaux résultats....144
II.2. Article scientifique....144
II.3. Etude complémentaire....164
III. Etude expérimentale n°2 : Effet des anomalies de reprise de cyclicité postpartum sur les échecs précoces de gestation....166
III.1. Résumé....166
III.1.1 Dispositif expérimental....166
III.1.2 Principaux Résultats....166
III.2. Article scientifique....167
IV. Etude expérimentale n°3 : Effet du déficit énergétique postpartum sur la qualité des complexes ovocytes-cumulus....178
IV.1. Résumé....178
IV.1.1 Dispositif expérimental....178
IV.1.2 Principaux résultats....178
IV.2. Article....178
Chapitre V. Discussion générale et perspectives....198
I. Echecs précoces de gestation chez la vache de race Holstein....201
I.1. Méthodes utilisées pour préciser la chronologie des échecs de gestation....201
I.1.1 Estimation de la fréquence des inséminations en phase lutéale....201
I.1.2 Estimation de la non fécondation – mortalité embryonnaire précoce....201
I.1.3 Estimation de la mortalité embryonnaire tardive....203
I.1.4 Estimation de la mortalité fœtale....204
I.1.5 Difficultés rencontrées pour estimer la chronologie des échecs de gestation....205
I.2. Importance des échecs précoces de gestation....207

I.2.1 Comparaison de la chronologie des échecs de gestation de l'étude 1 avec les données bibliographiques 207
I.2.2 Importance des échecs précoces dans les élevages à faible fertilité 209
II. Facteurs de risques des échecs précoces de gestation : implication et perspectives d'évolution 210
II.1. Implication de la détection des chaleurs pour expliquer les échecs 210
II.2. Génétique 210
II.3. Anomalies de reprise de cyclicité après vêlage 213
II.3.1 Effet des anomalies sur les échecs précoces 213
II.3.2 Diagnostic précoce et traitement des anomalies de reprise de cyclicité 213
II.3.3 Lutte contre les facteurs de risque des anomalies de reprise de cyclicité 215
II.4. Déficit énergétique en début de lactation 217
II.4.1 Déficit énergétique vs déficit alimentaire global 217
II.4.2 Effet du déficit énergétique sur la qualité des ovocytes potentiellement fécondables au moment de la mise à la reproduction 218
II.4.3 Effet du déficit énergétique sur les échecs précoces de gestation 220
II.4.4 Stratégie de maîtrise du déficit énergétique postpartum chez la vache laitière 222
Chapitre VI. Conclusion 226
Chapitre VII. Références bibliographiques 230
Chapitre VIII. Annexe 262

Liste des tableaux

Tableau II-1 Méthodes de mise en évidence des échecs de gestation chez la vache 45

Tableau II-2 Taux de fécondation chez les vaches laitières..... 49

Tableau II-3 Fréquence de mortalité embryonnaire précoce chez les vaches laitières 50

Tableau II-4 Estimation des pertes au cours de la gestation chez la vache laitière Holstein en première insémination en France 52

Tableau II-5 Facteurs prédisposants de la mortalité embryonnaire chez la vache laitière: Facteurs intrinsèques..... 55

Tableau II-6 Facteurs prédisposants de la mortalité embryonnaire chez la vache laitière: Facteurs extrinsèques..... 57

Tableau II-7 Estimations des paramètres génétiques du taux de réussite à l'IA chez trois races de vaches laitières (d'après Boichard et al., 1998a)..... 61

Tableau II-8 Estimations des corrélations génétiques entre la production en 100 jours en 1ère lactation et la réussite à la première insémination chez trois races laitières (26 millions d'IA, Boichard, 2000)..... 61

Tableau II-9 Synthèse des QTL de fertilité localisés par cartographie d'intervalle sur le génome ou une partie du génome à partir d'un dispositif « petites-filles » relatifs à la fertilité des vaches laitières à l'aide d'un nombre limité de microsatellites..... 68

Tableau II-10 Recouvrement du génome par les marqueurs dans les études de primo-détection de QTL de fertilité..... 71

Tableau II-11 Synthèse des QTL relatifs à la fertilité des vaches laitières localisés par cartographie fine à partir d'un dispositif « petites-filles » et détectés par analyse de liaison 73

Tableau II-12 Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades de son développement (d'après Drion et al., 1996)..... 80

Tableau II-13 Méthodes de suivi des profils de reprise de l'activité sexuelle postpartum chez les vaches laitières 88

Tableau II-14 Classification des profils de reprise d'activité ovarienne postpartum (pp) chez la vache laitière selon 1 : Lamming et Darwash (1998) et 2 : Opsomer et al. (1998, 2000)..... 90

Tableau II-15 Avant 2000, définition et fréquence (%) des profils anormaux de reprise de cyclicité postpartum chez la vache laitière 93

Tableau II-16 Après 2000, définition et fréquence (%) des profils anormaux de reprise de cyclicité postpartum chez la vache laitière 94

Tableau II-17 Facteurs liés au troupeau et à la conduite d'élevage influençant la fréquence des anomalies de la reprise de la cyclicité postpartum 97

Tableau II-18 Facteurs relatifs à la fonction de reproduction de la vache influençant la fréquence des anomalies de reprise de la cyclicité postpartum 98

Tableau II-19 Fréquence des phases lutéales prolongées en fonction du rang du cycle après vêlage (3 dosages de progestérone par semaine, Royal et al., 2000)..... 99

Tableau II-20 Facteurs liés aux situations de déficit énergétique influençant la fréquence des anomalies de reprise de la cyclicité postpartum 99

Tableau II-21 Facteurs indicateurs du déficit énergétique influençant la fréquence des anomalies de reprise de la cyclicité postpartum..... 101

Tableau II-22 Métabolites témoins du déficit énergétique associés à la fréquence des anomalies de reprise de la cyclicité postpartum..... 102

Tableau II-23 Pourcentage de vaches à profil de cyclicité normal ou anormal traitées pour problème de fertilité et taux de réussite à la première IA (TRIA1)..... 105

Tableau II-24 Besoins énergétiques quotidiens d'une vache laitière de 600 kg en fonction de son stade physiologique (d'après INRA, 1988). 109

Tableau II-25 Effet du déficit énergétique sur l'intervalle vêlage première ovulation de vaches laitières de race Holstein 114

Tableau II-26 Effet du déficit énergétique sur la non fécondation et/ou mortalité embryonnaire précoce (NF-MEP), sur la mortalité embryonnaire tardive (MET) et la fusion de la MET et de la mortalité fœtale (MF) chez la vache laitière 117

Tableau III-1 Phénotype de fertilité 136

Tableau IV-1 Genetic index of postpartum fertility and number of female offspring followed, for the twelve sires included in the survey 149

Table IV-2 Phenotype of postpartum fertility according to the results of progesterone levels in the milk and the pregnancy diagnosis carried out between D0 and D90 after the first insemination 150

Table IV-3 Descriptive statistics of the 3508 Holstein cows retained in the survey 152

Table IV-4 Frequency and incidence of pregnancy failure between 0 and 90 days after the first insemination of the 3508 Holstein cows in the survey 153

Table IV-5 Effect of the paternal postpartum genetic fertility index of the bulls on failed fertilisation-early embryonic mortality (FF-EEM) measured between 0 and 18-25 days after the first insemination of their female offspring (n=3245 Holstein cows inseminated in the follicular phase, with full data) 155

Table IV-6 Effect of genetic postpartum fertility index of bulls on the incidence of late embryonic mortality (LEM) measured between 18-25 and 45 days after the first postpartum insemination in their female offspring (n=2114 Holstein cows pregnant at 18-25 days, with full data) 156

Tableau IV-7 Couples d'amorces utilisés pour la RT-PCR en temps réel 185

Tableau IV-8 Efficacité et reproductibilité du dosage des ADNc standards 185

Tableau IV-9 Moyennes (ajustées pour les données répétées) et erreur standard (SE) des critères zootechniques des vaches des deux lots expérimentaux 188

Tableau IV-10 Caractéristiques des follicules et des complexes ovocytes-cumulus (COC ; moyenne et erreur standard) récoltés par OPU (80,9 ± 0,75 jours postpartum) avant et après maturation, après un traitement de superovulation appliqué sur des vaches laitière Holstein recevant 100% (Témoins, n=11) et 80% des besoins alimentaires (Restreints, n=11) 190

Tableau V-1 Comparaison des incidences des échecs de gestation chez la vache Holstein entre les résultats de l'étude 1 et 2 et les données bibliographiques 207

Tableau V-2 Taux de gestation après utilisation de traitement d'induction des chaleurs à base de progestagènes chez les vaches laitières en anoestrus 214

Liste des figures

Figure II-1 Evolution du taux de réussite en première IA en Europe et aux Etat-Unis des vaches Holstein.. 29

Figure II-2 Evolution du rang de l'IA fécondante en Europe et aux Etats-Unis chez la vache Holstein30

Figure II-3 Evolution de l'intervalle entre le vêlage et la mise à la reproduction des vaches Holstein européennes et américaines..... 31

Figure II-4 Evolution de l'intervalle entre le vêlage et la fécondation de vaches Holstein européennes et américaines.. 31

Figure II-5 Evolution de l'intervalle entre deux vêlages consécutifs en France et aux Etats-Unis des vaches Holstein. 32

Figure II-6 Augmentation annuelle de l'intervalle vêlage-vêlage (IVV) selon des études européennes et américaines des vaches Holstein 32

Figure II-7 Cinétique d'évolution du taux de réussite en première IA chez les vaches laitières Holstein américaines (Norman et al., 2009, n=8 981 223 IA) et françaises (Barbat et al., 2005 et Le Mezec et al., 2010a, n=+35 000 000 IA). 33

Figure II-8 Cinétique d'évolution de l'intervalle vêlage insémination fécondante chez les vaches laitières Holstein américaines (Norman et al., 2009, n=8 981 223 IA) et françaises (Barbat et al., 2005 et Le Mezec et al., 2010a, n=+35 000 000 IA)..... 34

Figure II-9 Evolution du taux de réussite en 1ère insémination artificielle des génisses et des vaches en race Holstein française.. 35

Figure II-10 Stade du développement embryonnaire de la fécondation à l'élongation du blastocyste (Unceia Groupe Fertilité Femelle, 2006)..... 37

Figure II-11 Représentation schématique de la migration des cellules binuclées chez la vache (d'après Wooding et Wathes, 1980 ; modifié par Ayad et al., 2006). 39

Figure II-12 Evolution de la concentration en protéine spécifique de la gestation sanguine (PSPB) chez une vache gestante et une vache en mortalité embryonnaire tardive induite (d'après Humblot, 2001)..... 43

Figure II-14 Evolution de la fréquence de la non fécondation ou mortalité embryonnaire précoce (NF-MEP) et de la mortalité embryonnaire tardive (MET) en France chez la vache Holstein en élevage..... 51

Figure II-15 Taux de réussite à la première insémination artificielle en fonction de la production laitière de vaches laitières de types génétiques différents dans un même système de production (d'après Cutullic 2010). 62

Figure II-16 Principe de détection de QTL par analyse des effets de ségrégation d'un QTL à deux allèles chez un père hétérozygote sur la distribution des performances de sa descendance (d'après Gautier, 2003). 65

Figure II-17 Evolution (en % de réussite à l'IA des filles) de l'index moyens des taureaux d'IA Holstein par année de naissance pour les caractères de fertilité (d'après Barbat et al., 2007) 76

Figure II-18 Poids relatif accordé aux caractères de sélection, dont la fertilité en France et dans d'autres pays. Situation en 2007 (d'après Minery, 2007) 76

Figure II-19 Taux de réussites des inséminations artificielles totales (IAT) et niveau génétique des primipares de race Holstein par année de naissance, en écart à 1998 (d'après LeMézec et al.2010). 77

Figure II-20 Croissance folliculaire basale et terminale (d'après Webb et al., 2004)..... 79

Figure II-21 Evolution morphologique du follicule au sein du stroma ovarien (d'après Drion et al., 1996 ; modifié par Fréret, 2007) 80

Figure II-22 Photo d'un ovocyte (o) de vache entouré de son cumulus oophorus (co) (photo tirée de Marquant-Le Guienne, 1998) ; zp : zone pellucide..... 81

Figure II-23 Schématisation des vagues folliculaires au cours du cycle œstral (d'après UP de Reproduction ENVA) 82

Figure II-24 Schématisation de la communication intercellulaire entre les trois principales cellules du follicule ovarien et les facteurs responsables de la croissance folliculaire (d'après Knight et Glister, 2001) 83

Figure II-25 Schématisation de la stéroïdogenèse folliculaire (d'après Leymarie et Martal, 2001 ; d'après Robel 2001) 84

Figure II-26 Devenir du follicule dominant et rôle des facteurs de croissance et des gonadotropines (d'après Beam et Butler, 1999) 85

Figure II-27 Régulation neuro-endocrinienne de la vache lors de son cycle sexuel (d'après UNCEIA Groupe Fertilité Femelle, 2006) 86

Figure II-28 Schématisation de l'évolution de la concentration de progestérone dans le lait d'une vache après le vêlage et paramètres de reproduction définis à partir du profil de progestérone (d'après Horan et al., 2005) 89

Figure II-29 Schématisation des types d'anœstrus basés sur la physiologie de la dynamique folliculaire (d'après Peter et al., 2009) 91

Figure II-30 Evolution du pourcentage de vaches présentant soit un retard de cyclicité soit une phase lutéale prolongée évaluées à partir des profils de progestérone (d'après Grimard, communication personnelle, repris par Crowe, 2008) 95

Figure II-31 Effet des anomalies de la reprise d'activité ovarienne après vêlage sur l'intervalle vêlage-première insémination (IVIA1) chez la vache laitière..... 103

Figure II-32 Effet des anomalies de la reprise d'activité ovarienne après vêlage sur le taux de réussite en première insémination (TRIA1) chez la vache laitière 104

Figure II-33 Effet des anomalies de la reprise d'activité ovarienne après vêlage sur l'intervalle vêlage-insémination fécondante (IVIAf) chez la vache laitière. 106

Figure II-34 Evolution des apports énergétiques, du bilan énergétique et de la note d'état corporel au cours de la lactation chez la vache laitière (d'après Wattiaux, 1999, modifiée par Fréret, 2007) 107

Figure II-35 Evolution de l'ingestion, de la production laitière et des besoins énergétiques (UFL) et protéiques (PDI) en début de lactation (UNCEIA Groupe Fertilité Femelle, 2006) 108

Figure II-36 Métabolisme énergétique chez des vaches n'étant pas en lactation..... 110

Figure II-37 Perte embryonnaire chez des vaches laitières selon la perte, le maintien ou le gain d'état corporel entre le 28ème et le 56ème jour de gestation (d'après Silke et al., 2002) 118

Figure II-38 Schématisation de l'effet d'une faible concentration en IGF-1 plasmatique sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez la vache laitière au cours du postpartum..... 121

Figure II-39 Effets hypothétiques des métabolites modifiés pendant un déficit énergétique sur la croissance folliculaire et les qualités ovocytaires de vaches laitières hautes productrices (d'après Leroy et al., 2008a) 122

Figure III-1 Fréquence des retours après la première insémination artificielle (IA1) chez les vaches de race Holstein, Montbéliarde et Normande (toutes lactations confondues, campagne 2003 ; modifié de Barbat et al., 2005) 129

Figure III-2 Evolution de l'incidence des retours a) à 28 jours ; b) entre 28 et 56 jours et c) entre 56 et 90 jours après la première insémination chez les vaches Holstein, Montbéliardes et Normandes (toutes lactations, Modifié de Barbat et al., 2005)..... 130

Figure III-3 Schématisation des échecs de gestation chez la vache inséminée (modifiée d'après Saint-Dizier, 2007) 131

Figure III-4 Evolution du niveau génétique laitier des vaches de race Holstein, Montbéliarde et Normande en écart à 1989 (index de 2009/3, toutes lactations ; Le Mézec et al., 2010) .. 132

Figure III-5 Evolution de la production laitière des vaches de race Holstein, Montbéliarde et Normandes contrôlée en écart à 1989 (toutes lactations, Le Mézec, 2010) 133

Figure III-6 Protocoles de mesures de l'incidence des échecs précoces de gestation..... 136

Figure IV-1 Estimated incidences (%) of pregnancy failure between 0 and 90 days (Failure, n=3420, with complete data), between 0 and 18-25 days (FF-EEM, fertilisation failure-early embryonic mortality, n=3245, cows inseminated during the follicular phase, with complete data) and between 18-25 and 45 days (LEM, late embryonic mortality, n=2114, cows pregnant at 18-25 day, with complete data), after the first insemination of Holstein cows according to the paternal postpartum fertility index 154

Figure IV-2 Traitement d'induction des chaleurs de référence et de superovulation des vaches collectées (a) « avant maturation » et (b) « après maturation » 183

Figure IV-3 Evolution des paramètres plasmatiques..... 189

Figure IV-4 Expression des gènes PTGS2, IGF-1, IGFR-1, IGFBP-2, IGFBP-4 dans les complexes ovocytes-cumulus récoltés par OPU (80,9 ± 0,75 jours postpartum), après un traitement de superovulation appliqué sur des vaches Holstein témoins (100% des recommandations, n=11) et sur des vaches Holstein restreintes (80% des recommandations, n=11) 191

Liste des abréviations

AGNE : *Acide Gras Non Estérifié*

BHB : *β-hydroxybutyrate*

CJ : *Corps Jaune*

COC *: Complexe Ovocyte-Cumulus*

CVM : *Complex Vertebral Malformation*

E2: *Oestradiol 17-β*

EC : *Etat Corporel*

EPF : *Early Pregnancy Factor*

FSH : *Follicle Stimulating Hormone*

GH : *Growth Hormone*

IA : *Insémination Artificielle*

IA1 : *première Insémination Artificielle*

IAF : *Insémination Artificielle Fécondante*

IFN-τ : *Interferon tau*

IGF : *Insuline-like Growth Factor*

IGFBP : *Insulin Growth Factor Binding protein*

ISU : *Index Synthétique UPRA*

IVIA1 : *Intervalle Vêlage-1ère Insémination*

IVIAF ou IVIAf : *Intervalle Vêlage Insémination Fécondante*

IVV : *Intervalle entre Vêlages successifs*

LH : *Hormone Lutéinisante*

MEP : *Mortalité Embryonnaire Précoce*

MET : *Mortalité Embryonnaire Tardive*

MF : *Mortalité Fœtale*

NF : *Non Fécondation*

P4 : *Progestérone*

PAG : *Protéines Associées à la Gestation*

PLP: *Phase Lutéale Prolongée*

PSPB : *Pregnancy Specific Protein B*

QTL : *Quantitative Trait Loci*

RC : *Retard de Reprise de Cyclicité*

SAM : *Sélection Assistée par les Marqueurs*

SIG : *Système d'Information Génétique*

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

TB : *Taux Butyreux*

TNR *: Taux de Non Retour*

TP : *Taux Protéique*

TRIA1 : *Taux de Réussite en première Insémination*

UFL : *Unité Fourragère Lait*

Introduction générale

Chapitre I. Introduction générale

Au cours des années 1960-70, le contexte économique favorable à la production laitière a incité les éleveurs de vaches laitières françaises Frisonne Pie Noire à importer massivement des taureaux Holstein du Canada et des Etats-Unis pour améliorer la production laitière de leurs animaux. La « Holsteinisation » était lancée. La part de gènes issus des taureaux fondateurs nord-américains intégrés dans la population des vaches Frisonnes a crut fortement dans les années 1980. Elle a atteint 80% après 1990 (Mattalia et al., 2006), date à laquelle la Française Frisonne est devenue la Prim'Holstein[1]. La généralisation de l'insémination artificielle a entrainé l'utilisation d'une élite réduite de taureaux améliorateurs. Ainsi, sur 100 000 inséminations premières mises en place sur une année, 80 % étaient réalisées par des taureaux Holstein issus de 51 pères différents entre 1982 et 1985 contre 26 en 2001-2004. Au début des années 2000, le coefficient moyen de consanguinité[2] des vaches Holstein était compris entre 3 et 4 % avec un rythme annuel d'élévation de 0,20 (Mattalia et al., 2006). Hansen (1999) va jusqu'à prédire un coefficient de consanguinité de 9,7 % en 2020, au sein de la population Holstein des Etats-Unis. La « grande race Holstein » en termes d'effectif (69,0 % des 2 354 922 vaches laitières contrôlées en France en 2009 sont des vaches Holstein, 15,8 % des vaches de race Montbéliarde, 9,5 % de race Normande ; Institut de l'élevage, 2010) apparaît comme une « petite population » lorsque l'on procède à une analyse de la diversité de son patrimoine génétique, ceci ayant pour conséquence une uniformité mondiale des qualités de la race ainsi que de ses faiblesses. Les vaches Holstein en France et dans le monde, sont réputées pour leur capacité à produire du lait (lactation brute: 8 993 kg pour les vaches Holstein, 6 541 kg pour les vaches Montbéliarde et 6 201 kg pour les vaches Normande en France en 2009 ; Institut de l'élevage, 2010) et pour leur mauvaise fertilité[3] (pour revue : Rodriguez-Martinez et al., 2008 ; Norman et al., 2009 ; Le Mézec et al., 2010a,b).

En mai 2010, lors d'un sondage réalisé par ADquation et publié dans Agrodistribution, 88 % des agriculteurs français considéraient que leur trésorerie s'était dégradée en un an (Anonyme, 2010a). Les marchés agricoles sont confrontés à une mondialisation et à une financiarisation des prix qui interagissent sur leur fonctionnement. En Europe, la Politique Agricole Commune prévoit la suppression des quotas laitiers en 2015. La diminution des régulations sur le marché du lait renforce la volatilité du prix qui évolue en fonction de l'offre et de la demande. Le prix du lait de vache payé aux producteurs est passé de 30 centimes le litre en avril 2008 à 22 centimes en avril 2009 (Anonyme, 2010b).

[1] Nous utiliserons le terme de « Holstein » comme synonyme du terme spécifiquement français « Prim'Holstein », le reste du monde utilisant le terme Holstein

[2] Probabilité moyenne dans une population pour que les deux allèles que possède un individu en un locus donné soient identiques par descendance

[3] Les détails des performances de reproduction de la vache Holstein seront décrits dans la partie bibliographique

Dans ce contexte économique, pour assurer la viabilité de son exploitation, l'éleveur doit rentabiliser au mieux son outil de production. Une vache doit produire un maximum de lait, au moment opportun et à moindre coût. Pour cela, l'éleveur doit être assuré de la capacité reproductive de sa vache, la mise en place de la production laitière étant consécutive à la naissance d'un veau.

La fertlité des vaches Holstein, définie comme la capacité de la vache à être fécondée et à mener à terme une gestation, se dégrade depuis 20 à 30 ans au niveau mondial (pour revues : Lucy et al., 2001; Royal et al., 2000 ; Lopez-Gatius et al., 2003 ; Rajala-Schultz et Frazer, 2003 ; Rodriguez-Martinez et al., 2008 ; Norman et al., 2009 ; Barbat et al., 2010). C'est pourtant un enjeu majeur pour les exploitations laitières. Une mauvaise fertilité entraîne une augmentation des coûts directs, frais d'insémination, frais vétérinaires, ainsi que des coûts indirects liés notamment à la diminution de la longévité par la mise en réforme prématurée, à la diminution du nombre de veaux produits ou encore à la diminution de la capacité de sélection. Dans les élevages laitiers de la région Pays de la Loire, les pertes et les coûts de maîtrise relatifs aux troubles de la reproduction expliquent 18 % de l'impact économique total consécutif aux principaux troubles de santé. Ces troubles de la reproduction constituent le deuxième poste d'impact après les mammites (Fourichon et al., 2001). Vouloir améliorer la fertilité suppose d'en connaître les facteurs de risque, leurs mécanismes d'action, les moments où il convient de les maîtriser pour améliorer les résultats.

De nombreuses équipes de recherche travaillent sur la fertilité des vaches laitières dans le monde. En France, l'UNCEIA (Union Nationale des Coopératives d'Insémination Animale), l'Institut de l'Elevage et l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) organisés en Unités Mixtes de Recherche (UMR) avec les Ecoles Vétérinaires, les Ecoles Agronomiques et les Universités collaborent pour étudier la reproduction bovine. La réussite de la reproduction implique la succession d'étapes indispensables à la réussite globale : la vache doit être cyclée, exprimer des chaleurs, être détectée, être inséminée au bon moment, produire un ovocyte fécondable, l'oviducte doit permettre la fécondation, l'utérus doit pouvoir accueillir l'embryon, lui permettre de s'implanter et de survivre durant toute la gestation. Les données issues du terrain sont complémentaires de celles issues des expériences mises en place dans les stations de recherche. Les aspects épidémiologiques, physiologiques et génétiques du problème peuvent être explorés en parallèle. Plus particulièrement, l'UMR INRA-Agrocampus Ouest Production du lait à Rennes (Illes-et-Vilaine) et l'UMR INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux Physiologie de la reproduction et des comportements à Nouzilly (Indre-et-Loire) s'intéressent aux comportements de chaleurs et à la qualité des gamètes femelles. L'Unité Mixte Technologique Santé des Bovins de l'UMR ONIRIS-INRA Bio-agression, Epidémiologie et Analyse de Risque à Nantes (Loire-Atlantique) a une approche épidémiologique de la maîtrise des troubles de santé majeurs et de l'impact de la santé sur l'infécondité des troupeaux bovins. L'UMR INRA-ENVA Biologie du Développement et Reproduction à Jouy-en-Josas (Yvelines) au sein de laquelle a été réalisée cette thèse est compétente sur le développement de l'embryon depuis la formation de la cellule œuf, jusqu'à l'organogenèse fœtale.

En France, l'organisation de l'amélioration génétique et de l'insémination dans les années 60 a permis la mise en place d'un système original : les données d'insémination et les performances de production des animaux sont enregistrées dans une base de données nationales (SIG : Système d'Information Génétique), accessible aux organismes de recherche. Le critère le plus global pour estimer la fertilité des vaches est le taux de non retour à 282 jours après insémination équivalent au taux de vêlage (Barbat et al., 2005, 2010). Il est calculable pour toutes les vaches contrôlées grâce à l'enregistrement des dates d'insémination et de vêlages dans la base nationale d'enregistrement. L'uniformisation du système permet à ce critère d'être utilisable et comparable entre élevages. Cependant, il faut attendre le vêlage de la vache pour conclure qu'elle était gestante ou attendre l'enregistrement d'une nouvelle date d'insémination pour supposer que la vache n'était pas gestante à l'insémination précédente. Les délais de retours à l'insémination sont sous la dépendance de la détection par l'éleveur et de l'expression des chaleurs de la vache. Les vaches sorties de leur exploitation ont la plupart du temps un statut gestatif inconnu. Cette évaluation nationale de la fertilité est donc globale, tardive et biaisée, mais seule disponible à grande échelle. De plus, elle n'informe pas sur l'étape défaillante du cycle reproductif. Tous les événements expliquant les échecs de gestation sont confondus dans la composante taux de non retour à 282 jours alors que chaque étape peut être perturbée. Pour analyser plus finement les causes des échecs, il convient de préciser les étapes les plus dégradées au cours de la gestation.

Des outils de diagnostic de gestation[4] utilisés aux différentes étapes du développement du conceptus permettent de préciser la chronologie des échecs après l'insémination. L'échec le plus précoce est la non fécondation (NF). Viennent ensuite la mortalité embryonnaire précoce (MEP ; < 16 jours après insémination), la mortalité embryonnaire tardive (MET ; entre 16 et 42-45 jours), la mortalité fœtale (MF ; > 42-45 jours), et enfin l'avortement (> 100 jours ; Humblot, 2001 ; Santos et al., 2004). Les échecs de gestation[5] sont essentiellement des échecs précoces (avant 45 jours de gestation ; Humblot, 2001 ; Santos et al., 2004 ; Diskin et Morris, 2008).

De nombreux facteurs[6] sont associés à une dégradation globale des performances de reproduction (sélection génétique, modification des systèmes de production, production laitière, déficit énergétique…). Cependant, leur action sur l'une ou l'autre des étapes de la gestation n'est pas toujours connue. Pourtant, cela permettrait de préciser leur mécanisme d'action, ciblerait les périodes à risque et orienterait les stratégies de maîtrise.

Les objectifs de notre travail ont donc été d'explorer les effets de facteurs de risque de la mauvaise fertilité connus sur les échecs précoces de gestation, essentiellement entre le jour de l'insémination (J0) et la fin de l'organogenèse (J42-45). Ce travail n'a concerné que les vaches en postpartum, les génisses nullipares étant peu concernées par la baisse de la fertilité.

[4] Ces outils seront décrits dans la partie bibliographique

[5] La quantification des échecs sera précisée dans l'étude bibliographique

[6] Ces facteurs seront précisés dans la partie bibliographique

La première étape de notre travail a consisté en une étude bibliographique qui fait le point sur la dégradation des performances de reproduction des vaches laitières de race Holstein en France et à travers le monde. Les échecs de gestation ont ensuite été caractérisés, leurs facteurs prédisposants connus détaillés.

Nous avons choisi ensuite d'explorer les effets de trois facteurs de risque connus de mauvaise fertilité : le potentiel génétique mesuré par l'index de fertilité, le profil de reprise de cyclicité après vêlage et le déficit énergétique en postpartum. Nous avons utilisé trois types d'approche pour analyser ces effets : une étude épidémiologique en ferme pour l'effet génétique, une étude d'observation en station pour l'effet du profil de reprise de cyclicité après vêlage et une expérimentation en station pour les effets du déficit énergétique postpartum. Les hypothèses et les méthodologies expérimentales sont présentées dans une deuxième partie. Les résultats sont ensuite détaillés autour de 3 articles scientifiques. Dans une dernière partie, nous avons discuté des résultats, de leur intérêt, de leurs limites et des perspectives qui s'ouvrent à l'issue de ce travail.

Etude Bibliographique

Chapitre II. Etude bibliographique

I. Performances de reproduction des vaches laitières de race Holstein, mesures, évolution

I.1. Mesures des performances de reproduction en élevage bovin laitier

I.1.1 Notion de fertilité et de fécondité chez la vache laitière

La fertilité, *sensu stricto*, est définie comme l'aptitude d'un animal à procréer. Chez le taureau laitier, elle correspond à la capacité de produire du sperme fécondant et congelable. Chez la vache laitière, la fertilité est la capacité de produire des ovocytes fécondables.

Nous nous intéressons à la fertilité de la vache laitière ayant déjà vêlé en condition d'élevage. Des variantes plus opérationnelles de la définition de la fertilité *sensu stricto* sont proposées ci-dessous.

Les performances de reproduction à l'échelle de la vache ou à l'échelle du troupeau bovin femelle s'apprécient par l'évaluation de deux critères, la fertilité et la fécondité. La fertilité de la femelle est la capacité à être fécondée et de mener à terme une gestation. La fécondité est l'aptitude pour une femelle à mener à terme sa gestation dans les délais requis. La fécondité englobe alors la fertilité. La distinction entre fécondité et fertilité, retrouvée dans la littérature vétérinaire francophone, est absente dans la littérature anglo-saxonne, tous les paramètres permettant d'évaluer les performances de reproduction se traduisant par une estimation de la «fertility».

En élevage, la fertilité de la vache laitière est conditionnée par la capacité de la femelle à initier une gestation puis à la mener à son terme au moment où l'éleveur a décidé de la mettre à la reproduction et qu'il a détecté les chaleurs. Cette capacité ne peut se mesurer qu'en inséminant une femelle puis en constatant la gestation par la suite. La fertilité comprend alors des qualités propres à la femelle telles que l'expression des chaleurs, la production d'ovocytes fécondables, l'aptitude du tractus génital à accueillir les spermatozoïdes et le conceptus. Le critère qui permet de la mesurer dépendra aussi de la qualité de la détection des chaleurs, de la qualité de la semence utilisée, de l'intervalle entre la détection des chaleurs et l'IA, de la technique d'insémination, de la technique utilisée pour objectiver la gestation. Dans l'absolu, la mise en évidence du résultat de la fécondation la plus concrète pour l'éleveur est le vêlage. Des techniques de mise en évidence de la gestation plus précoces sont utilisables en élevage. Ces techniques sont accompagnées de certaines imprécisions, on préfèrera celles qui mettent en évidence directement l'embryon, le fœtus ou les annexes (dosage de Protéine Associée ou spécifique de la gestation, échographie, palpation transrectale…) à celles qui font appel à la détection des chaleurs par exemple (non retour en chaleurs ou absence d'IA x jours après la première insémination).

Le cycle reproducteur d'une vache se déroule sur une année. Après le vêlage, la période du postpartum pendant laquelle la vache n'est pas inséminée dure entre 45 et 90 jours, elle est nécessaire à l'involution utérine et à la reprise de la cyclicité ovarienne. Puis la vache est de nouveau mise à la reproduction. Après la fécondation, la gestation (280 jours en moyenne en race Holstein) s'étend sur le reste de l'année. Théoriquement un an s'est écoulé entre deux vêlages. Les paramètres de reproduction décrivant la fertilité et la fécondité seront donc calculés sur une campagne de reproduction correspondant généralement à une année.

I.1.2 Définitions des critères de mesure des performances de reproduction des vaches laitières

Les performances de reproduction des vaches laitières sont généralement calculées à l'échelle d'une population. Cette population peut être un troupeau, des animaux inséminés par une même coopérative de mise en place, l'effectif d'une race à l'échelle nationale. Les performances y sont fournies sous forme de ratios ou de moyenne associée à un intervalle.

❖ **Mesure de la fertilité des vaches laitières *sensu stricto***

La mesure de la fertilité des vaches laitières *sensu stricto* est possible. Elle consisterait à mesurer l'aptitude à la fécondation *in vitro* des ovocytes prélevés sur des vaches non superovulées dans des conditions standards de maturation et de fécondation, avec l'utilisation de spermatozoïdes issus du même taureau, voire du même éjaculat. Ceci ne peut être réalisé que sur de petits échantillons et demande des ponctions répétées afin de prélever un nombre suffisamment important et représentatif d'ovocytes pour estimer des taux de fécondation et de développement par animal.

❖ **Les critères exprimés sous forme de ratios**

Les principaux paramètres exprimés sous forme de ratios décrivent la fertilité. La fertilité est très rarement estimée par la mesure de la capacité à produire des ovocytes fécondables citée dans la définition rapportée au paragraphe I.1.1. Elle est mesurée par la capacité à commencer, voire à mener à son terme, une gestation. Ces critères mesurent donc en réalité une aptitude plus globale que la fertilité *sensu stricto* évoquée ci-dessus.

- Le taux de réussite en première insémination (TRIA1), « conception rate », « fertility rate » en anglais

C'est un critère très intéressant pour évaluer la fertilité à l'échelle de la population. Il doit être interprété en fonction de l'intervalle vêlage première insémination, les inséminations précoces ayant un taux de réussite moins élevé. Ce critère de mesure peut être accompagné des taux de réussite aux inséminations suivantes: TRIA2, TRIA3, etc. Il se calcule en divisant le nombre de vaches considérées gestantes, à un moment donné, après la 1ère, 2ème ou 3ème IA par le nombre de vaches mises à la reproduction (vaches inséminées au moins une fois au cours de la campagne de reproduction). Il nécessite la mise en œuvre de diagnostics de gestation précoce sur l'ensemble du troupeau. Si ce type de suivi n'est pas réalisé, on parle de taux de non-retour x jours après la

première IA qui mesure le pourcentage de vaches ne présentant pas de nouvelle insémination à cette date et donc supposées pleines.

- Le taux de vêlage à l'IA1

Ce critère se calcule en divisant le nombre de vêlages obtenus dans une durée compatible avec la durée de gestation après IA1 par le nombre d'IA1. Ce critère est biaisé par le nombre de vaches sorties de l'exploitation ou de l'échantillon après une seule IA (morte, vendue, réformée) sans évaluation de leur état de gestation.

- Le taux de gestation ou taux de vêlage global

Ce critère se calcule en divisant le nombre de vêlages obtenus au cours de la campagne de reproduction par le nombre de vaches mises à la reproduction. Ce critère est biaisé par le nombre de vaches sorties de l'exploitation ou de l'échantillon (morte, vendue, réformée) sans évaluation de leur état de gestation.

- Le pourcentage de vaches inséminées trois fois et plus (% 3IA+)

Ce critère est représentatif de l'effort nécessaire pour féconder une vache, mais il est à interpréter en fonction de la conduite d'élevage. En effet, selon le type de gestion de l'élevage (pratiques de réforme en particulier), il peut être sous-estimé. En règle générale, on pourra inclure dans son calcul les vaches qui ont déjà été inséminées deux fois mais qui sont diagnostiquées non-gestantes et celles qui ont été réformées après la deuxième IA. Il s'agira donc dans ce cas d'un pourcentage de vaches non gestantes après les deux premières IA.

- Le nombre d'insémination(s) par conception (NIA/F) ou indice de fertilité

Ce critère s'obtient en divisant, au niveau de la population, le nombre total d'IA par le nombre de vêlages ou par le nombre d'IA fécondantes. Le nombre total d'IA est la somme des IA réalisées sur les vaches fécondées, non fécondées ou réformées sans que l'on puisse déterminer avec certitude si elles sont gestantes ou non. Ce critère reflète le nombre d'inséminations nécessaires au niveau d'une population pour obtenir un vêlage.

- Coefficient d'utilisation de paillettes (CUP)

Ce coefficient est une variante du nombre d'insémination par conception. Il est plus représentatif de la fertilité, car d'un calcul plus précoce, il ne nécessite pas de confirmation de la gestation après insémination. C'est un critère utilisé à l'échelle du troupeau ou d'une coopérative de mise en place. Il s'obtient en divisant le nombre total d'IA réalisées dans l'élevage (ou la population) par le nombre de vaches mises à la reproduction (vaches inséminées au moins une fois au cours de la campagne de reproduction).

❖ **Les critères exprimés sous forme d'intervalle.**

Les principaux paramètres dérivés d'intervalles décrivent la fécondité. Ils sont exprimés en moyenne de valeurs relevées pour l'ensemble des vaches.

- L'intervalle vêlage première ovulation

Ce critère nécessite une mesure « objective » de la première ovulation. Il peut être calculé dans les études où la production de progestérone par le corps jaune est mesurée dans le sang ou dans le lait.

- L'intervalle vêlage-1ères chaleurs (IVC1)

C'est un critère précoce et intéressant pour sa signification étiologique, mais rarement disponible car il nécessite un enregistrement fiable des chaleurs par l'éleveur.

- L'intervalle vêlage-1ère insémination (IVIA1)

L'intervalle vêlage 1ère insémination est, assez logiquement, responsable de la majorité des variations de l'IVIAF (intervalle vêlage insémination fécondante) dans la plupart des troupeaux français. Il concerne toutes les vaches inséminées, qu'elles aient ou non produit un veau par la suite. Il reflète à la fois la reprise de cyclicité mais aussi la qualité de la détection des chaleurs et la décision de l'éleveur d'inséminer ou non. Il conviendra donc d'être attentif aux reports volontaires des IA, utilisés dans certains troupeaux pour éviter les vêlages certains mois de l'année ou pour favoriser la fertilité des fortes productrices et/ou des primipares, qui peuvent biaiser les résultats.

- L'intervalle 1ère insémination-insémination fécondante (IIA1IAF)

Cet intervalle peut être assimilé à la période de reproduction. Il ne peut être calculé que sur les vaches dont la gestation a été confirmée.

- L'intervalle vêlage-insémination fécondante (IVIAF), « Days open » ou « interval between calving to conception » en anglais

Sans diagnostic de gestation systématique et précoce, l'insémination fécondante est validée par le vêlage qui suit. En cas de diagnostic de gestation systématique, ou encore en présumant fécondantes les IA non suivies de retour en chaleurs, il est possible d'exprimer l'IVIAF moins tardivement que l'intervalle entre deux vêlages successifs

- L'intervalle entre vêlages successifs (IVV)

C'est un critère facile à calculer, très global et qui possède une forte signification économique. Il représente le temps nécessaire pour féconder une vache et combine le temps de reprise de la cyclicité après le vêlage avec le nombre d'IA nécessaires pour obtenir une fécondation et la durée de gestation. Il n'a donc pas de signification étiologique particulière et n'est connu que tardivement. De plus, il est biaisé du fait qu'il ne considère que les vaches finalement fécondées. Il ne prend donc pas en compte tous les animaux du troupeau (vaches réformées ou n'ayant pas vêlé à nouveau).

I.1.3 Choix d'un critère de mesure de la fertilité des vaches laitières

Le critère qui permet le mieux d'estimer la fertilité telle que nous l'avons définie au paragraphe I.1.1 est le taux de vêlage après IA1. Comme il est dépendant de la qualité de la détection des chaleurs il sera nécessaire de l'évaluer pour moduler l'interprétation du critère. Un dosage de progestérone au moment de l'IA permettra de vérifier que les inséminations se font bien en phase folliculaire et il sera possible par exemple de ne travailler que sur les IA réalisées au « bon moment ». Le critère est dépendant de la technique d'IA et des conditions de sa réalisation (IA par un ou plusieurs techniciens, IA par l'éleveur, rythme de passage des inséminateurs…). Il conviendra que ces conditions soient les plus homogènes possibles pour des comparaisons. Enfin ce critère dépend de la qualité de la semence. Les effets mâles sur le pouvoir fécondant de la semence sont connus mais rarement disponibles sur les taureaux commerciaux. Les vaches aux plus forts potentiels génétiques sont inséminées avec les meilleurs taureaux qui sont aussi les plus demandés ce qui doit influencer les rythme de collecte des mâles et le nombre de spermatozoïdes par dose. Il convient de ne pas l'oublier à défaut de pouvoir le mesurer pour ne pas affecter aux femelles des effets qui ne dépendent pas d'elles.

Estimé plus précocement mais avec les même biais que le taux de vêlage, le taux de réussite en première insémination (TRIA1) peut être estimé si la gestation est objectivée dans les premières semaines ou les premiers mois comme cela sera détaillé dans le paragraphe II.

Enfin, le taux de non retour après IA1 est une estimation de la fertilité qui est fortement dépendante de la qualité de la détection des chaleurs mais il est disponible dans tous les élevages laitiers au contrôle des performances grâce à l'enregistrement de toutes les dates d'IA et les dates de vêlage par les entreprises de mises en place dans le SIG (Système d'Information Génétique).

Les critères de fécondité ne mesurent pas uniquement la fertilité des vaches. Ils dépendent aussi de facteurs extrinsèques aux animaux. Par exemple, l'évolution de la structure des troupeaux, du logement des animaux, de la main d'œuvre consacrée aux bovins a pu avoir des effets importants sur la qualité de la détection des chaleurs. L'évolution de la technique d'insémination (dilution de la semence, qualité des dilueurs, rythme de collecte des taureaux, formation des inséminateurs…), et des conditions de mise en place (rythme des tournées d'IA, absence d'IA le dimanche…) a pu aussi avoir un effet non négligeable mais difficile à quantifier sur l'évolution des critères de mesure des performances de reproduction. Enfin, l'évolution des pratiques et de la conduite d'élevage (politique de renouvellement, âge au premier vêlage, période d'attente avant IA1, utilisation des traitement de synchronisation des chaleurs, utilisation de la monte naturelle après échec des inséminations, politique de réforme…) peuvent avoir eu elles aussi des effets sur les critères mesurés. Ainsi les comparaisons entre années, entre pays, entre races sont elles parfois hasardeuses. Néanmoins, les critères de fécondité dépendent de la fertilité. Leurs variations au cours du temps sont un témoin de la dégradation de la fertilité des vaches laitières.

I.2. Evolution des performances de reproduction des vaches laitières de race Holstein

Les performances de reproduction des vaches laitières sont évaluées à l'échelle d'une région ou d'un pays grâce aux critères de reproduction définis aux paragraphes ci-dessus. L'évolution de ces critères donne une approche globale du bilan phénotypique de la fertilité à l'IA des animaux. La synthèse qui suit présente les résultats de performances de reproduction des vaches de race Holstein ou croisées Holstein européennes et américaines.

Dans les années 50, Murray (1959) rapportait une dégradation de la fertilité des vaches laitières sur les vingt-cinq années précédentes. Aujourd'hui, une littérature abondante révèle toujours à l'échelle mondiale une tendance à la diminution de la fertilité des vaches laitières, particulièrement en race Holstein.

Chez la vache Holstein, le taux de réussite en première insémination (TRIA1) s'est dégradé au cours des dernières années (Figure II-1). Le taux de non retour à l'IA ou le TRIA1 a diminué de près de 1% par an en Europe depuis les années 80 et de plus de 0,5% par an aux Etats-Unis (EU) des années 50 au milieu des années 90.

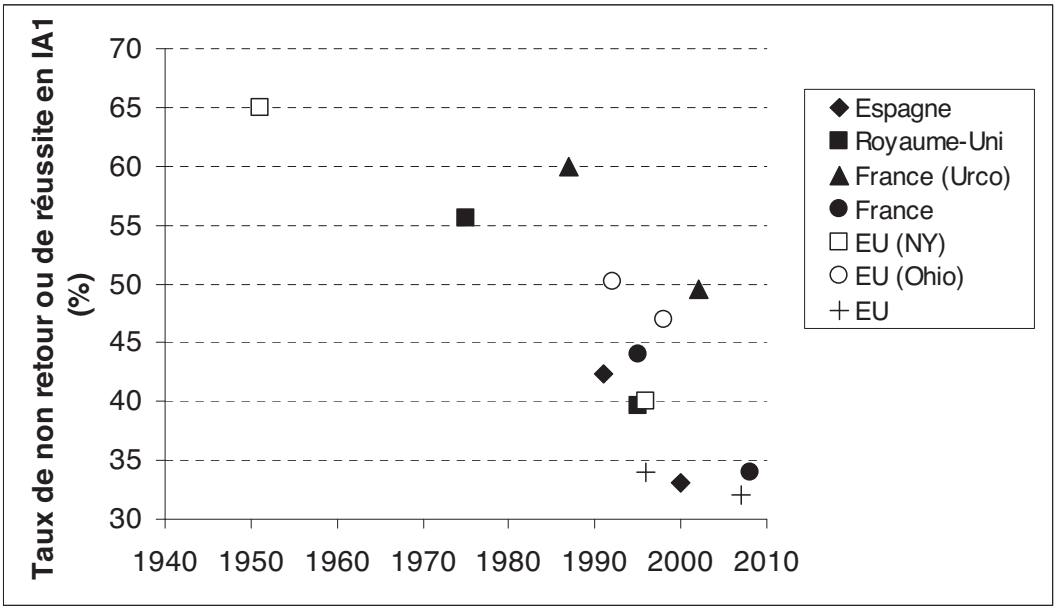


Figure II-1 Evolution du taux de réussite en première IA en Europe et aux Etat-Unis des vaches Holstein. EU : Etats-Unis ; Urco : Unité Régionale des Coopératives d'IA de l'Ouest ; NY, Etat de New-York ; Espagne : Lopez-Gatius et al., 2003 ; Royaume-Uni : Royal et al. 2000 ; France (Urco) : Chevallier et Humblot 1998, Fréret et Chevallier 2002 ; France : Boichard et al. 2002, Barbat et al. 2005 ; Le Mezec et al., 2010a ; EU (NY) : Butler 1998 ; EU (Ohio) : Rajala-Schultz et Frazer 2003 ; EU : Norman et al. 2009.

Depuis les années 70, la fécondation des vaches mises à la reproduction nécessite un nombre d'inséminations croissant (Figure II-2). Cette augmentation a été plus sévère aux Etats Unis qu'en Europe (plus 0,75 IA aux Etats-Unis et plus 0,5 IA en France sur 10 ans).

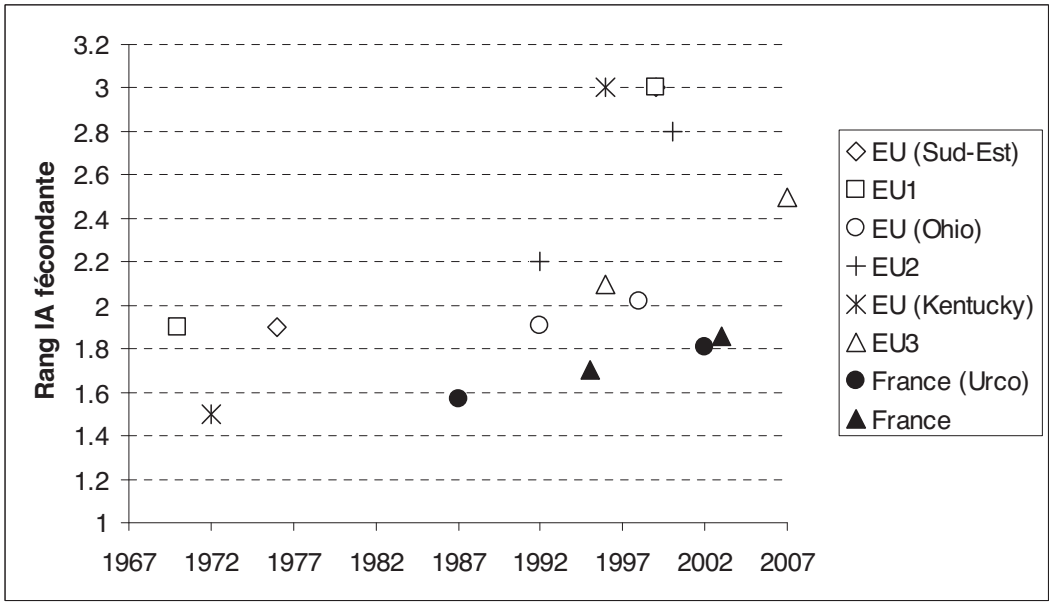


Figure II-2 Evolution du rang de l'IA fécondante en Europe et aux Etats-Unis chez la vache Holstein

IA : Insémination Artificielle ; EU : Etats-Unis ; EU (Sud-Est) : Washburn et al. 2002a ; EU1 : Lucy 2001 ; EU (Ohio) : Rajala-Schultz et Frazer 2003 ; EU2 : Jordan et Fourdraine 1993 ; Kellogg et al. 2001 ; EU3 : Norman et al. 2009 ;France (Urco) : Chevallier et Humblot 1998, Fréret et Chevallier 2002 ; France : Boichard et al. 2002, Barbat et al. 2005.

Si la durée de gestation de la vache laitière reste stable, la dégradation de l'intervalle entre deux vêlages aux Etats-Unis et en Europe est expliquée par deux composantes : l'augmentation de l'intervalle entre le vêlage et la mise à la reproduction (IVIA1) et la diminution de la fertilité (Intervalle entre IA1 et IAF ou VIAF).

L'intervalle VIA1 augmente depuis les années 80 en Europe et aux Etats-Unis (Figure II-3). En France sur les 15 dernières années, le nombre de vaches mises à la reproduction après 90 jours a augmenté de 13% alors que le nombre de vaches mises à la reproduction avant 50 jours a diminué de 10% (Fréret et Chevallier, 2002).

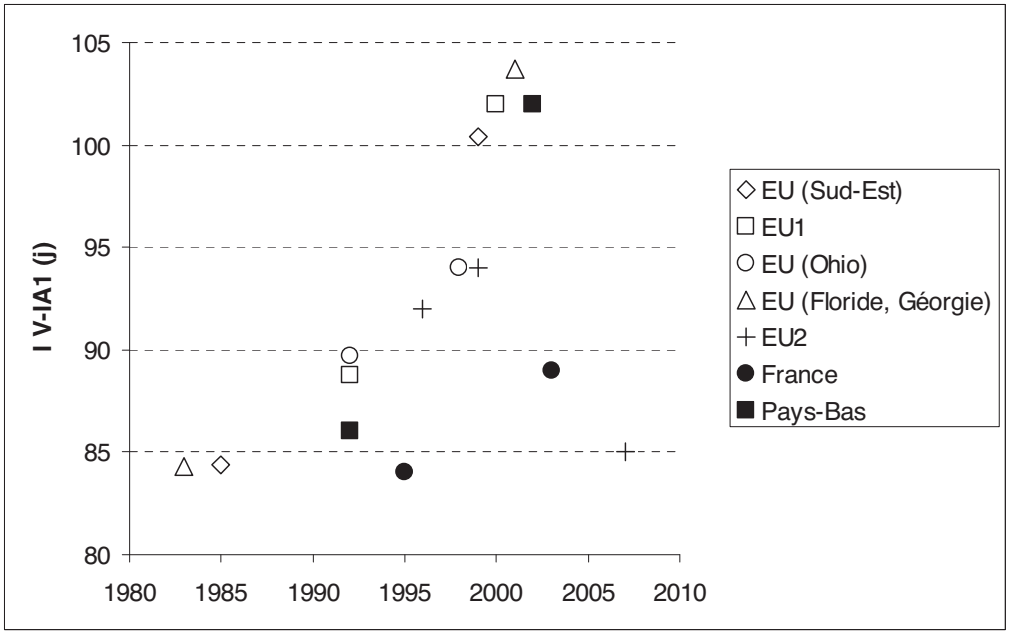


Figure II-3 Evolution de l'intervalle entre le vêlage et la mise à la reproduction des vaches Holstein européennes et américaines. IV-IA1 : Intervalle vêlage-première insémination artificielle en jour ; EU : Etats-Unis ; EU (Sud-Est) : Washburn et al. 2002a ; EU1 : Jordan et Fourdraine 1993 ; Kellogg et al. 2001 ; EU (Ohio) : Rajala-Schultz et Frazer 2003 ; EU (Floride et Géorgie) : De Vries 2004 et De Vries et Risco 2005 ; France : Boichard et al. 2002, Barbat et al. 2005 ; Hollande : Van Knegsel et al. 2005.

L'intervalle entre le vêlage et la fécondation (IVIAf) augmente plus que l'intervalle IVIA1 en conséquence de l'altération de la fertilité (Figure II-4).

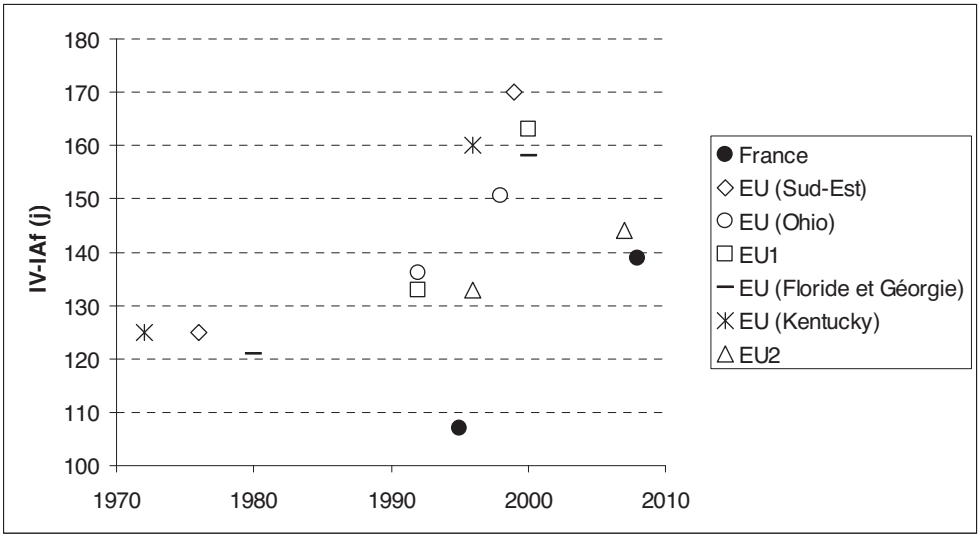


Figure II-4 Evolution de l'intervalle entre le vêlage et la fécondation de vaches Holstein européennes et américaines. IVIAf (j) : Intervalle vêlage-IA fécondante en jour ; EU :Etats-Unis ; France : Barbat et al. 2005 et Le Mezec et al. 2010a ; EU (Sud-Est) : Washburn et al. 2002a ; EU (Ohio) : Rajala-Schultz et Frazer 2003 ; EU1 : Jordan et Fourdraine 1993 ; Kellogg et al. 2001 ; EU (Floride et Géorgie) : de Vries 2004 et de Vries et Risco 2005; EU (Kentucky) : Silvia 1998 ; EU2 :Norman et al. 2009.

Les évolutions de l'intervalle vêlage première insémination et de la fertilité ont pour conséquence un allongement de l'intervalle entre deux vêlages consécutifs chez la vache laitière. Des études à long terme montrent une augmentation de 1,8 jour par an depuis les années 70 en Europe et de 2,3 jours par an depuis les années 60 aux Etats-Unis (Figure II-5 et Figure II-6).

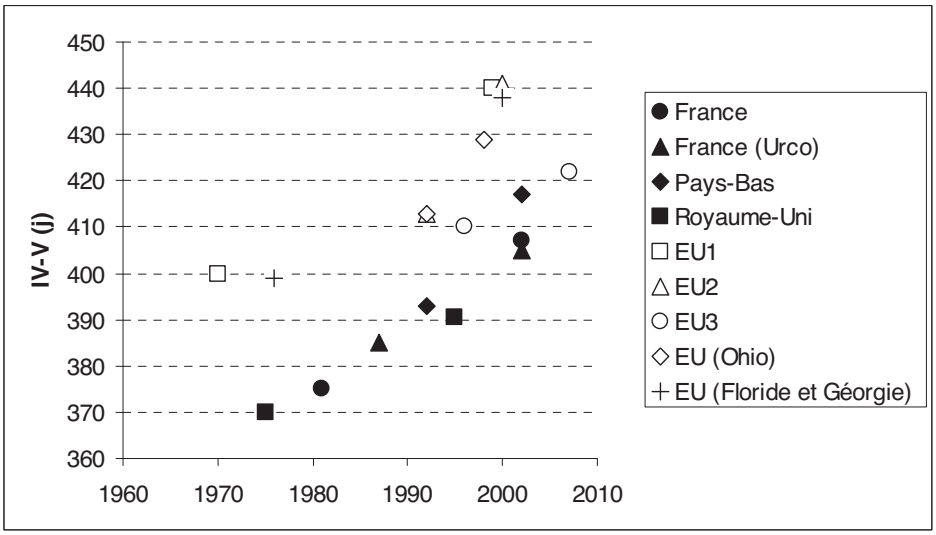


Figure II-5 Evolution de l'intervalle entre deux vêlages consécutifs en France et aux Etats-Unis des vaches Holstein. IV-V (j) : intervalle vêlage- vêlage en jour; EU : Etats-Unis ; France : Boichard et al. 2002, Barbat et al. 2005 ; France (Urco) : Chevallier et Humblot 1998, Fréret et Chevallier 2002 ; Hollande : Van Knegsel et al. 2005 ; Royaume-Uni : Royal et al. 2000 ; EU1 : Lucy 2001 ; EU2 : Jordan et Fourdraine 1993 ; Kellogg et al. 2001 ; EU (Ohio) : Rajala-Schultz et Frazer 2003 ; EU (Floride et Géorgie) : de Vries 2004 et de Vries et Risco 2005 ; EU3 : Norman et al. 2009 .

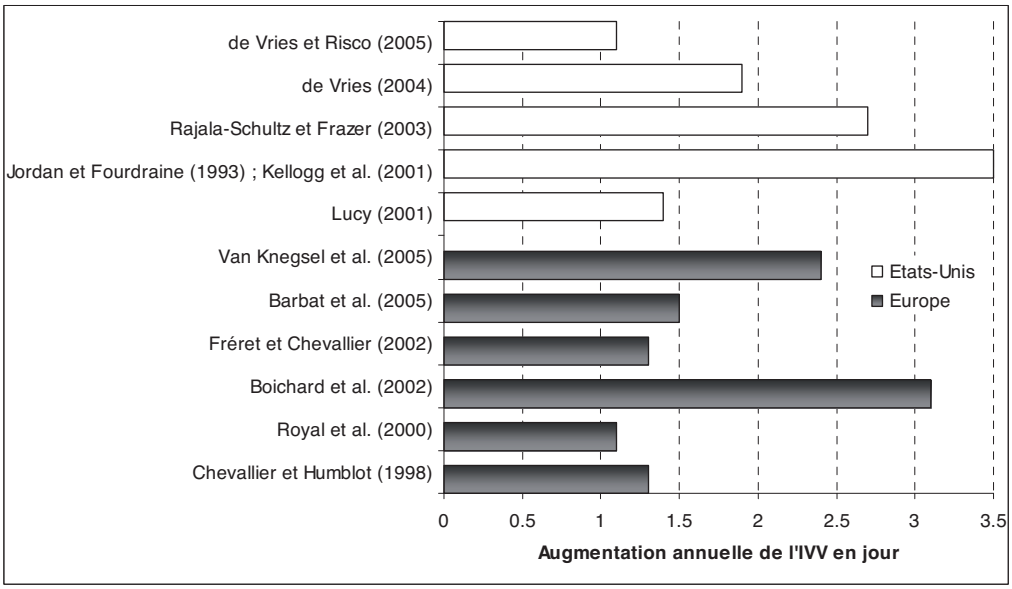


Figure II-6 Augmentation annuelle de l'intervalle vêlage-vêlage (IVV) selon des études européennes et américaines des vaches Holstein

La dégradation de la fertilité semble être plus particulièrement associée à la race Holstein. En effet, le bilan phénotypique de la fertilité à l'IA dans les trois principales races laitières françaises révèle une

quasi-stabilité sur 8 ans du TRIA1 pour les races Normande et Montbéliarde (diminution de 0,25% et 0,13% du TRIA1 respectivement par an entre 1995 et 2002 *versus* diminution 1% par an chez la vache Holstein). De même, l'accroissement de l'IVV entre 1981 et 2003 est beaucoup moins marqué en race Normande (+10 jours) et Montbéliarde (+3 jours) qu'en race Holstein (+32 jours). En race Montbéliarde, une diminution de cet intervalle est même constatée au cours des années 80 (Barbat et al. 2005). D'autres races sont cependant touchées, c'est le cas de la race Jersiaise, présente principalement aux Etats-Unis qui présentait une dégradation de la fertilité comparable à celle de la vache Holstein entre 1976 et 2007 (Washburn et al., 2002b ; Norman et al., 2009).

I.3. Cinétique de la dégradation des performances de reproduction

Après une dégradation continue, le TRIA1 se stabilise entre 30-35 % (Figure II-7), dès 2002 aux Etats-Unis et à partir de 2004 en France.

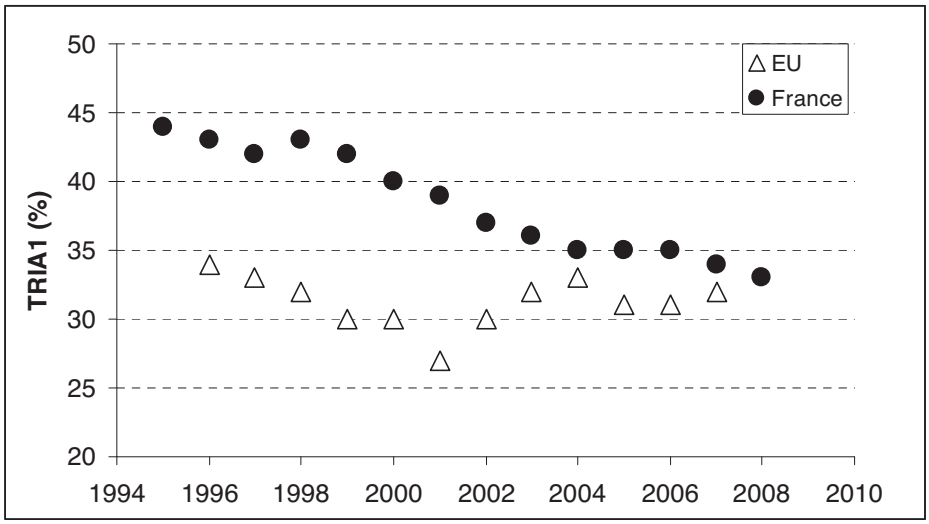


Figure II-7 Cinétique d'évolution du taux de réussite en première IA chez les vaches laitières Holstein américaines (Norman et al., 2009, n=8 981 223 IA) et françaises (Barbat et al., 2005 et Le Mezec et al., 2010a, n=+35 000 000 IA). TRIA1 : taux de réussite à l'IA1 ; EU : Etats-Unis

En conséquence (Figure II-8), l'intervalle vêlage insémination fécondante après sa rapide augmentation se stabilise autour de 145 jours chez les vaches américaines et 139 jours chez les Holstein françaises dès le début des années 2000.

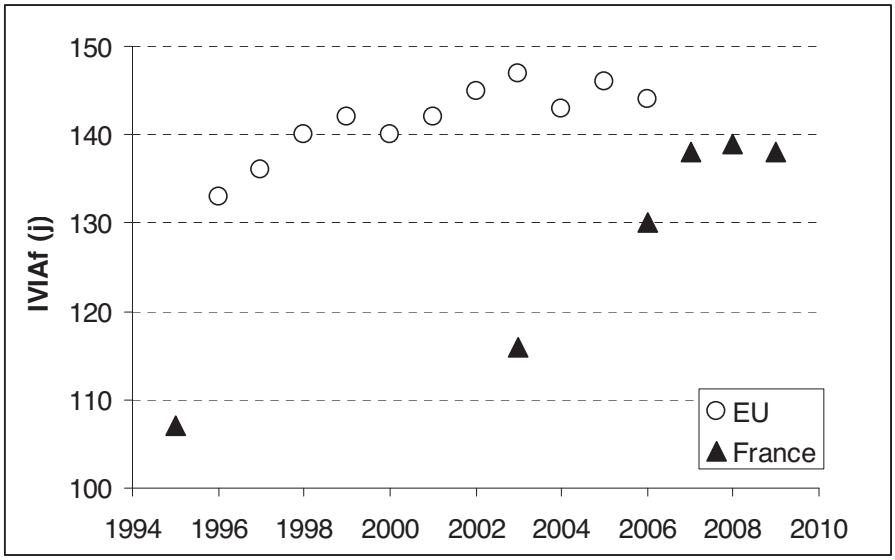


Figure II-8 Cinétique d'évolution de l'intervalle vêlage insémination fécondante chez les vaches laitières Holstein américaines (Norman et al., 2009, n=8 981 223 IA) et françaises (Barbat et al., 2005 et Le Mezec et al., 2010a, n=+35 000 000 IA). IVIAF (j) : intervalle vêlage insémination fécondante en jour ; EU : Etats-Unis

I.4. Le point sur les performances de reproduction des vaches Holstein en France

Etudiée sur des périodes plus courtes, avec des méthodes de mesures homogènes, l'évolution de la fertilité des vaches laitières est alarmante comme c'est le cas sur la population de vaches Holstein en France.

Le bilan réalisé par l'INRA (Barbat et al., 2005) et complété par Le Mézec et Barbat (2007) et Le Mézec et al. (2010a et b) fait le point sur la situation de la reproduction des femelles de race Holstein. Les données utilisées pour établir le bilan de la fertilité concernent les IA réalisées au cours des campagnes 1995 à 2008, pour lesquelles le résultat est définitif, c'est à dire établi avec un recul suffisant pour constater un éventuel vêlage. Au total, ce sont les résultats de plus de 37 millions d'inséminations qui ont été analysées.

La Figure II-9 reprend l'évolution du TRIA1 entre 1995 et 2008 des génisses et des vaches en première, deuxième et troisième lactation. Alors que le TRIA1 des génisses est relativement stable se situant autour de 55-60 %, il s'est sévèrement dégradé entre 1995 et 2008 pour les vaches ayant déjà vêlé. Entre 1995 et 2004, le TRIA1 a diminué de 10 points. Il faut cependant noter que, depuis 2004, une pause dans la baisse du TRIA1 est visible. La réussite à l'IA1 a cessé de se dégrader et se stabilise autour de 35 % pour les vaches de première, deuxième et troisième lactation.

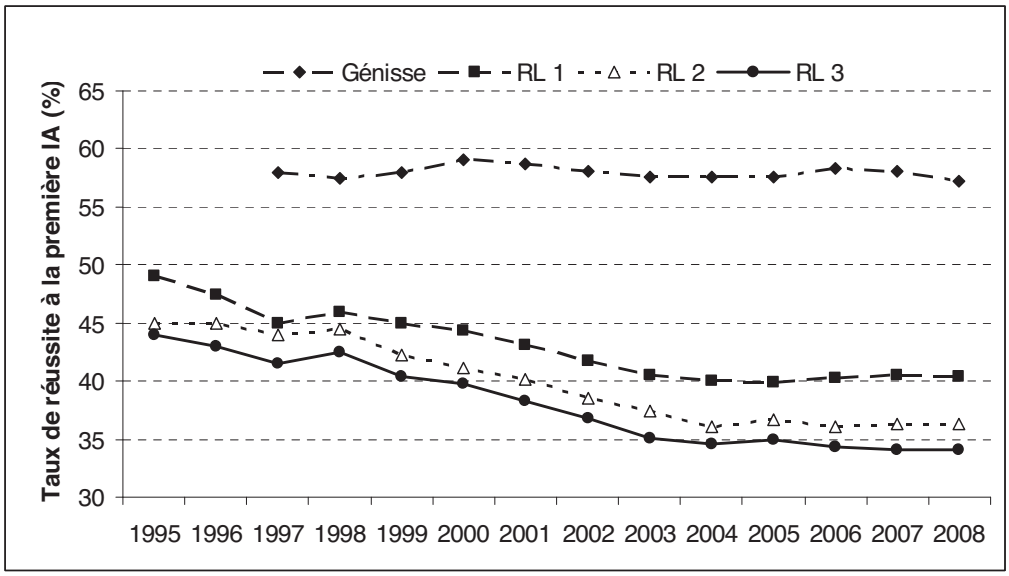


Figure II-9 Evolution du taux de réussite en 1ère insémination artificielle des génisses et des vaches en race Holstein française. RL 1 : Holstein en première lactation ; RL 2 : Holstein en deuxième lactation ; RL 3 : Holstein en troisième lactation (d'après Barbat et al., 2005 ; Le Mézec et Barbat, 2007 ; Le Mézec et al., 2010a, b).

En conséquence de l'évolution défavorable de la fertilité, l'intervalle entre le vêlage et l'IA fécondante se dégrade. En 2005, il faut attendre 128 jours pour qu'une IA soit fécondante, contre 13 jours de moins 9 ans auparavant, alors que le délai moyen entre le vêlage et l'IA première n'a pas beaucoup varié au cours des 10 dernières campagnes d'IA. Il est passé de 84 jours à 88 jours en race Holstein.

Confirmée par de nombreuses revues de littérature portant sur la fertilité des vaches laitières, les vaches de race Holstein ont subit une dégradation rapide et sévère des performances de reproduction depuis les 30 dernières années (Lucy, 2001 ; Bousquet et al., 2004 ; Dobson et al., 2007 ; Sorensen et al., 2007 ; de Vries, 2008 ; Rodriguez-Martinez et al., 2008).

Les critères globaux de reproduction permettent d'évaluer les performances de reproduction des vaches laitières. L'étude de leur évolution permet d'évaluer la dégradation des performances, telles que la baisse du TRIA1 et du taux de non retour après IA, l'augmentation du nombre d'IA par fécondation, l'augmentation de la durée de l'IVIA1, de l'IVIAf et de l'IVV. Ces critères chiffrés issus de l'enregistrement national des données de terrain ne sont cependant qu'une approximation des performances réelles des vaches actuelles. En effet, seules les IA suivies d'un événement tel qu'un vêlage ou une deuxième insémination peuvent être étudiées. Les vaches inséminées et réformées n'apparaissent pas dans ces calculs car leur statut (gestante ou non) est inconnu à leur sortie. Lors de l'utilisation des critères de taux de non retour, intervalle de temps choisi après l'IA et la qualité de la détection des chaleurs influencent la précision du paramètre mesuré. De plus ces critères prennent en compte des effets biologiques (augmentation du délai de reprise de l'activité sexuelle cyclique après vêlage, baisse réelle de la fertilité des animaux, augmentation de la mortalité embryonnaire et fœtale…) mais aussi des effets dus à la conduite du troupeau (détection des chaleurs, choix des délais de mise à la reproduction après vêlage, politique de réforme…).

Actuellement, avec les critères disponibles, il n'est pas possible de caractériser précisément les causes de la baisse de fertilité (absence de fécondation, mortalité embryonnaire précoce ou tardive, mortalité fœtale). L'identification de ces périodes va nécessiter des méthodes de mesure permettant de préciser le statut des vaches après l'insémination à des intervalles clefs.

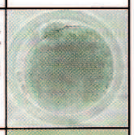
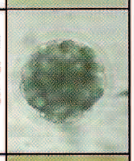
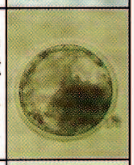
II. Caractérisation des échecs précoces de gestation

II.1. Rappel sur le développement du conceptus bovin

Les rappels anatomiques et physiologiques du déroulement de la gestation chez la vache sont présentés ci-dessous en précisant plus particulièrement les périodes et mécanismes sous-jacents de la mortalité embryonnaire.

II.1.1 De la fécondation au fœtus : Aspect anatomique (pour revues : Picard-Hagen et al., 2001 ; Thibault, 2001 ; Ménézo et Renard, 1993 ; INRA-UNCEIA, 1990)

La fécondation a lieu dans l'ampoule de l'oviducte et se caractérise par la fusion des pronucléi des gamètes mâle (spermatozoïde) et femelle (ovocyte). L'ovocyte bloqué en métaphase II lors de l'ovulation, reprend sa division cellulaire. Puis, débute la période embryonnaire caractérisée par une succession de mitoses et l'apparition des premières différenciations qui vont conduire au stade blastocyste

Jour *	Etape	Lieu	Description	
1	Fécondation	OVIDUCTE	La fécondation marque le début de la période embryonnaire. C'est l'ensemble des transformations qui se produisent dans l'œuf, suite à l'interaction et à la fusion des gamètes.	
2 - 4	Segmentation		La première étape du développement de l'œuf fécondé ou zygote est appelée segmentation et correspond à des divisions répétées, qui aboutissent à la formation de cellules semblables de plus en plus petites ou blastomères.	
5	Morula (150 µm)	UTERUS	L'étape de compaction, c'est-à-dire liaison intime entre les cellules, survient au stade morula (32-64 cellules), environ 5 jours après les chaleurs. Pendant la compaction, la morphologie des blastomères évolue de façon différenciée pour aboutir à la formation du blastocyste.	
7-8	Blastocyste (150-350 µm)		Le blastocyste est défini par la présence d'une cavité centrale, le blastocœle, entouré par une couche de cellules, appelée trophoblaste (futur placenta) et par un petit groupe de cellules formant le bouton embryonnaire (futur veau). Il est entouré de la zone pellucide, qui joue le rôle de barrière protectrice.	
9-10	Eclosion (400 µm -> 2 cm)		L'éclosion correspond à la perte de la zone pellucide par le blastocyste. Celle-ci s'amincit puis se rompt suite à l'expansion du blastocœle de l'embryon.	
11	Elongation		A partir du 11ème jour, le blastocyste perd sa forme sphérique et s'allonge très rapidement : c'est l'élongation. Pendant cette période, il envahit progressivement la cavité utérine, qu'il occupe en totalité vers le 18ème jour. Il atteint alors 40 cm.	

* par rapport aux chaleurs

(Source : images 1 à 5, UNCEIA et image 6, INRA)

Figure II-10 Stade du développement embryonnaire de la fécondation à l'élongation du blastocyste (Unceia Groupe Fertilité Femelle, 2006)

Pendant cette étape de segmentation de l'œuf (ou zygote), les mitoses répétées aboutissent à la formation des blastomères, cellules semblables et de plus en plus petites jusqu'au stade morula. La

mise en route du génome embryonnaire se produit à un moment précis du développement embryonnaire, au stade 8-16 cellules. Tout retard à la mise en route de la lecture du génome embryonnaire met l'embryon en danger. Le zygote arrive à la jonction utéro-tubaire 24-48 heures après la fécondation, il est généralement au stade 8 cellules. L'entrée dans l'utérus se fait au stade 16-32 cellules, 5-6 jours après la fécondation. Le phénomène de compaction qui a lieu 6-7 jours après la fécondation (au stade 64 cellules) aboutit à la formation d'une cavité blastocoelique et à l'expansion du blastocyste. Le blastocyste de 7-10 jours est sphérique avec une cavité centrale, le blastocœle, complètement entouré par une assise cellulaire appelé trophectoderme ou trophoblaste et par un petit groupe de cellule situé sous le trophectoderme, la masse cellulaire interne ou disque embryonnaire. Le trophoblaste formé d'une seule couche de cellules minces et à noyaux petits est étroitement appliqué contre la membrane vitelline et la zone pellucide commence à s'amincir. L'expansion du blastocyste suite à une accumulation de liquide provoque une augmentation de son diamètre. L'éclosion (sortie de la zone pellucide), étape cruciale du développement, se produit alors vers 9 à 10 jours après la fécondation. Dès lors la croissance est rapide, les parties extra-embryonnaires s'allongent en envahissant la cavité utérine. Le blastocyste s'allonge de 0,40 mm de long sur 0,25 mm de large à plus d'un mètre 4 semaines plus tard, c'est la phase de l'élongation.

L'embryon se délimite vers 18 jours et les premiers somites se forment vers le 19ème jour. A cette date l'embryon est long de 3-4 mm, la fermeture du tube neural est déjà commencée. Le cœur commence à battre. L'organogenèse de l'embryon continue et s'achève vers 42 jours de gestation (Anonyme, 1972).

L'implantation dans l'utérus se produit vers le 19ème jour chez la vache (Guillomot, 2001 pour revue) et aboutit à la mise en place des structures placentaires. Après l'orientation du blastocyste, il y a apposition entre le trophectoderme et l'épithélium utérin. Cette phase s'accompagne d'une réduction des microvillosités de la membrane des cellules trophoblastiques contribuant à un rapprochement étroit des deux tissus. Un système d'interpénétration des microvillosités utérines et de la membrane plasmique du trophoblaste se met en place. Le trophoblaste s'insère entre les cellules épithéliales sans les lyser, assurant l'ancrage du blastocyste à l'endomètre. L'invasion par intrusion est limitée à un nombre restreint de cellules particulières, les cellules binucléées du trophoblaste qui fusionnent avec les cellules de l'endomètre formant ainsi un syncytium alternant avec un épithélium simple (Wooding et Wathes, 1980 ; Figure II-11). Cela aboutit à la mise en place d'un placenta épithéliochorial (cellules trophoblastiques au contact des cellules épithéliales utérines) et partiellement syndesmo-chorial. L'implantation implique une synchronisation précise entre le stade de développement du blastocyste et la réceptivité utérine au début du processus. Après son bon établissement, la nutrition de l'embryon et sa protection sont assurées au travers de la placentation.

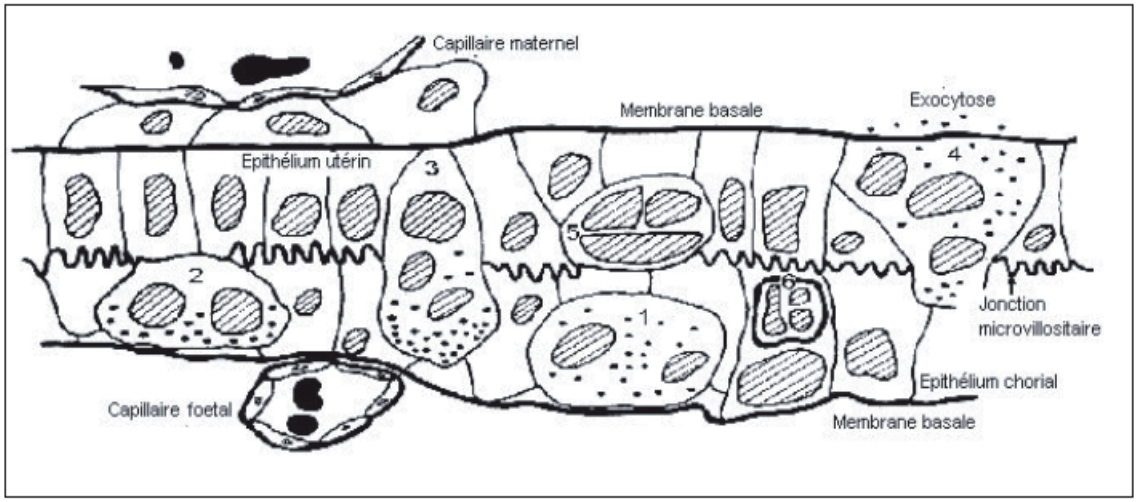


Figure II-11 Représentation schématique de la migration des cellules binuclées chez la vache (d'après Wooding et Wathes, 1980 ; modifié par Ayad et al., 2006). 1. cellule binuclées ; 2. contact avec les microvillosités ; 3. fusion avec les cellules maternelles et formation de cellules trinuclées à vie courte, 4. exocytose des granules ; 5. cellules trinuclées présentant un cytoplasme réduit et un nucleus dense ; 6. cellule réabsorbée par le trophoctoderme

II.1.2 Effets de l'environnement de l'oviducte et de l'utérus sur le développement embryonnaire

Lors de sa descente vers l'utérus, l'embryon utilise la sécrétion tubaire comme source de nutriment. Elle permet le développement de l'œuf. Ce milieu est cependant peu favorable au développement prolongé de l'embryon puisque, si les œufs sont maintenus dans l'oviducte, ils dégénèrent (Picard-Hagen et al., 2001).

Pendant cette phase de vie libre, un grand nombre de facteurs régulent le développement de l'embryon : des chemokines, des cytokines, des facteurs de croissance, des facteurs angiogéniques et des facteurs régulant l'apoptose (pour revue, Kölle et al., 2010). Ils jouent un rôle essentiel dans le contrôle du développement embryonnaire. Parmi les facteurs de croissances, peuvent être cités les IGF 1 et 2 (Insuline-like Growth Factor), l'EGF (Epidermal Growth Factor), les TGFs (Transforming Growth Factors alpha et béta), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et les FGF (Fibroblast Growth Factors acide et basique ; pour revues : Kaye, 1997 ; Sousa et al., 2002). Les concentrations en glucose, acides aminés, cations divalents et d'autres métabolites augmentent aussi dans la lumière utérine au cours de la gestation précoce (Bazer et al., 2008 ; Gao et al., 2009).

L'implantation dépend d'une séquence hormonale de base : une vague d'oestrogènes provenant des follicules ovariens en croissance qui joue un rôle préparatoire de la maturation endométriale, une production de quantités croissantes de progestérone par le corps jaune et éventuellement aussi d'oestrogènes, contemporaine de la nidation (Picard-Hagen et al., 2001). Les modifications histologiques de l'implantation impliquent une augmentation de la synthèse de phosphatase alcaline et de glycogène, et l'expression de protéines comme les intégrines, les glycoprotéines membranaires, la plasmine, les métalloprotéinases et les cytokines (Colony Stimulating Factors CSF, interleukines, interférons embryonnaires IFN et le Leukemia Inhibitory Factor LIF ; Guillomot, 2001). Les cellules

binuclées sont directement impliquées dans la production de la progestérone (Wango et al., 1992 ; Wooding et al., 1996), des prostaglandines, de l'hormone lactogène placentaire (Verstegen et al., 1985 ; Wooding, 1992) et des glycoprotéines associées à (ou spécifique de) la gestation (Zoli et al., 1992a ; Atkinson et al., 1993). Ces produits de synthèse sont stockés dans des granules denses et relargués directement dans la circulation maternelle après migration des cellules binucléés (Wooding, 1984). Ceci confère au placenta le rôle d'une glande endocrine produisant diverses molécules (pour revue, Ayad et al., 2006).

II.1.3 Signaux embryonnaires et reconnaissance maternelle de la gestation (pour revues : Sousa et al., 2002 ; Ayad et al., 2006 ; Roberts et al., 2008 ; Farin et al., 2010)

L'intégrité du développement embryonnaire et le maintien de la gestation précoce sont sous la dépendance stricte de la qualité de la communication embryo-maternelle. A ce jour, le fonctionnement de cette communication est encore peu élucidé (Wolf et al., 2003). Cependant, l'apport de la génomique et de la protéomique a eu un impact positif sur la compréhension de divers aspects de la communication entre la mère et les gamètes et la mère et l'embryon (pour revue, Fazeli, 2008). Nous retiendrons la multiplicité des signaux embryonnaires, leur spécificité et le caractère local et temporel de leur expression (pour revue, Ayad et al., 2006). Nous présentons ci-dessous les facteurs qui, pour nous, pourraient avoir un intérêt dans le diagnostic de la gestation précoce dans le but de détecter les mortalités embryonnaires.

❖ **Early Pregnancy Factor**

L'EPF est le facteur le plus précoce de la gestation détecté pour la première fois chez la souris gestante (Morton et al., 1974) et chez la vache (Enomoto et al., 1993 ; Sakonju et al., 1993). Il a été identifié dans le sang maternel de la souris 24h après la fécondation (Morton et al., 1974) et de la chèvre 72h après la saillie (Morton et al., 1979). L'EPF est en relation étroite avec la gestation (Athanasas-Platsis et al., 1991). Les embryons immunisés contre l'EPF ne dépasseraient pas le stade de 4-8 cellules. Ces auteurs ont suggéré que l'effet des anticorps anti-EPF pourrait être dû à une immunosuppression maternelle. Cette protéine, synthétisée par les lymphocytes, interviendrait aussi en tant que facteur de croissance (Morton et al., 1992). Malgré l'intérêt considérable d'un diagnostic de gestation précoce chez les mammifères domestiques, selon la littérature récente (Cordoba et al., 2001 ; Gandy et al., 2001), la faible fiabilité de ces tests de diagnostic est un argument contre leur utilisation dans la pratique. Cependant, Ghaffari Laleh et al. (2008) concluent à une utilisation possible du test d'inhibition de formation de rosette pour distinguer les vaches gestantes des non gestantes dans la première semaine après l'insémination (23 vaches inséminées vs 18 vaches contrôles).

❖ **Interferon tau (IFN-τ)**

La fécondation, suivie de la gestation, a pour effet de transformer le corps jaune cyclique en corps jaune gestatif et dès lors d'interrompre le déroulement du cycle sexuel de la vache. La régularisation du cycle reproductif dépend de l'intervention d'une substance lutéolytique d'origine utérine, la prostaglandine F2α. S'il y a conception, l'action lutéolytique de la PGF2α est inhibée, et le maintien de

la sécrétion de progestérone par le corps jaune est assuré. L'existence d'un facteur anti-lutéolytique produit par le conceptus ovin a été observée dès 1966 par Moor et Rowson. En 1979, Martal et al. ont montré que l'administration d'homogénats de trophoblastes âgés de 14 à 16 jours maintenaient le corps jaune pendant plusieurs mois chez des brebis non gestantes. En revanche, des homogénats de trophoblastes âgés de 21-23 jours ne le maintenaient pas. Ils en ont conclu que l'embryon émettait un signal temporaire qui permettait le maintien du corps jaune, appelé initialement trophoblastine ou protéine trophoblastique. Puis, la détermination de la séquence d'acides aminés de cette protéine a révélé une grande analogie avec les interférons (Charpigny et al., 1988). En plus de sa fonction anti-lutéolytique en tant qu'interféron, cette molécule exercerait aussi un rôle antiviral, anti-prolifératif et immunosuppressif. Cela a justifié la nouvelle appellation d'interféron tau (IFN-τ). Humblot et Dalla-Porta (1984) ont identifié dans le liquide de lavage de la cavité utérine dès le 12ème jour de gestation chez la vache la trophoblastine ou IFN-τ. Bien qu'une augmentation de la concentration en ARNm d'IFN-τ bovin puisse être détectée dès le 9ème à 10ème de gestation (Kubish et al., 2001), sa production à grande échelle est limitée aux jours 17 à 19 (Farin et al., 1990), quand le blastocyste subit l'élongation rapide. Synthétisé par les cellules mononuclées du trophectoderme (Morgan et al., 1993), l'IFN-τ est sécrété dans la cavité utérine. Son mécanisme d'action inclut l'inhibition des récepteurs à l'œstradiol, la réduction conséquente des récepteurs à l'ocytocine (Asselin et Fortier, 2000), l'activation d'un inhibiteur de la cyclo-oxygénase et la synthèse préférentielle de PGE2 au dépend de la PGF2α (Hansen et al., 1999). A notre connaissance, cette protéine, pourtant essentielle à l'établissement de la gestation chez la vache n'a jamais été détectée dans la circulation sanguine maternelle, empêchant la mise en place d'un test de diagnostic qui permettrait de différencier les mortalités embryonnaires tardives des phases lutéales prolongées.

❖ **Protéines associées à (ou spécifiques de) la gestation**

Les PAGs (Protéines associées à la gestation) sont des glycoprotéines appartenant à une grande famille d'enzymes protéolytiques, les protéases aspartiques, dont le pepsinogène fait partie. Elles sont synthétisées dans les granules des cellules binucléés présentes dans les couches superficielles du trophectoderme (Zoli et al., 1992a). 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 associated glycoprotein 1 et 2 ; Beckers et al., 1988 ; Zoli et al., 1991 ; Xie et al., 1994) PSP-60 (Pregnancy serum protein 60kDa ; Mialon et al., 1994). Aujourd'hui, dans les banques génomiques, la bPAG-1 et la PSPB sont considérées comme ayant la même séquence en acides aminés (Ayad et al., 2006). Plusieurs auteurs ont cherché des relations entre ces molécules et une fonction immunologique locale ou systémique (Moreira da Silva et al., 1997 ; Austin et al., 1999 ; Dosogne et al., 2000), sans pour autant conclure à une intervention déterminante des PAG sur l'état immunitaire de la mère même au moment où les concentrations sont les plus élevées. La PSPB pourrait avoir un rôle dans le maintien de l'activité du corps jaune au cours de la gestation. En effet, le traitement par la PSPB a augmenté la production lutéale de la progestérone (Del Vecchio et al., 1996). In vitro, le traitement avec de la PSPB de tissu lutéal provenant de corps jaune gestationnel de brebis a régulé la sécrétion de progestérone au travers la sécrétion de PGE (Weems et al., 2007).

Chez la vache gestante, les concentrations en PAG peuvent être détectées au plus tôt à partir des 19-22ème jour après conception (Pérényi et al., 2002). Pendant la gestation, les concentrations de PAG augmentent d'abord progressivement entre la 6ème et la 35ème semaine, pour ensuite s'élever plus rapidement entre la 35ème et le terme. Après vêlage, les concentrations décroissent progressivement et reviennent au dessous du seuil de détection (<0,2 ng/mL) entre le 80ème et le 120ème jour postpartum (Zoli et al., 1992b). Le profil de sécrétion de la PSPB et de la PAG1 est similaire (Zoli et al., 1992b ; Humblot, 2001). En pratique cela signifie que cette protéine est détectable dans la circulation périphérique maternelle chez 98 - 99% des vaches gestantes à partir du 30ème jour après insémination et à condition que l'intervalle vêlage insémination soit supérieur à 70 jours (Zoli et al., 1992b ; Lopez-Gatius et al., 2007). A l'inverse des deux molécules décrites ci-dessus (EPF, IFNτ), le dosage des PAG est utilisé pour le diagnostic de gestation des bovins. Les systèmes RIA homologues (RIA-PAG, -PSPB, -PSP60) ont été les premiers à avoir été utilisés pour le dosage des protéines associées à la gestation chez la vache dans le sang ou le serum. Ils ont été développés à partir de l'utilisation d'une même molécule pour l'immunisation, le radio marquage et la préparation de standard (Sasser et al., 1986 ; Humblot et al., 1988b ; Zoli et al., 1991 ; Mialon et al., 1994). Actuellement, des tests ELISA ont prouvé leur efficacité pour le dosage des PAG dans le sang ou le lait maternel et sont utilisés dans le cadre des diagnostics de gestation chez la vache (UNCEIA, communication personnelle ; Friedrich et Holtz ; 2010 ; Green et al., 2009 ; Silva et al., 2007 ;Green and Roberts, 2006). Les dosages de PAG permettent de diagnostiquer les altérations trophoblastiques consécutives aux mortalités embryonnaires et fœtales survenant au cours de la gestation. L'induction expérimentale de la mortalité embryonnaire par l'infection avec *Actinomyces pyogenes* (Semanbo et al., 1992) ou par l'administration de prostaglandine 40 jours après l'insémination (Humblot et al., 1988a ; Humblot, 1991 ; Figure II-12) ont montré que les concentrations en PSPB atteignaient des niveaux indétectables dans les 15 jours après la mort de l'embryon ou du fœtus.

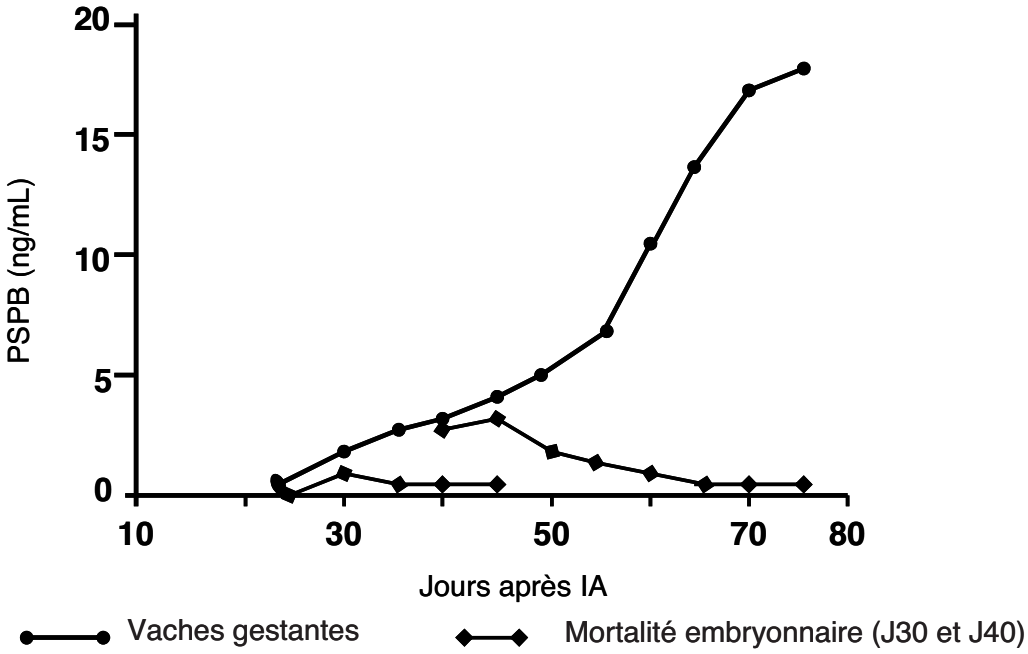


Figure II-12 Evolution de la concentration en protéine spécifique de la gestation sanguine (PSPB) chez une vache gestante et une vache en mortalité embryonnaire tardive induite (d'après Humblot, 2001)

De la fécondation à la fin de l'organogenèse 42 jours plus tard, le développement du conceptus bovin franchit des étapes indispensables à sa survie : pénétration du pronucléus mâle dans l'ovocyte dans l'ampoule oviductale, mise en route dans l'oviducte du génome embryonnaire 24-48h après la fécondation, passage dans l'utérus au 5ème jour, éclosion du blastocyste vers le 9ème - 10ème jour, implantation au 19ème jour et mise en place du placenta, différenciation cellulaire. La survie embryonnaire est sous la dépendance stricte d'une communication embryo-maternelle de qualité faisant intervenir de nombreux facteurs (facteurs de croissance, facteurs angiogéniques, régulation de l'apoptose, immunosuppresseurs, nutriments, hormones, signaux embryonnaires…).

II.2. Méthodes de mise en évidence des échecs précoces de gestation

Au cours d'une gestation, la phase embryonnaire se définit par convention comme la période comprise entre la fécondation et la fin de l'organogenèse. Elle prend donc fin au 42ème jour de gestation chez les bovins (Anonyme, 1972). La période fœtale couvre le reste de la gestation jusqu'au vêlage. Deux sources d'échecs de gestation coexistent après la mise à la reproduction :

- l'absence de fécondation du fait, d'une part d'une mauvaise synchronisation entre l'ovulation et l'insémination et d'autre part de l'échec de la fusion des gamètes mâle et femelle,
- l'arrêt de la gestation qui peut avoir lieu lors du développement embryonnaire ou lors de la vie fœtale. *Sensu stricto*, on distingue la mortalité embryonnaire précoce (MEP, avant le 16ème jour de gestation) et la mortalité embryonnaire tardive (MET) survenant après cette date (Humblot et Dalla Porta, 1984 ; Northey et French, 1980). La mortalité fœtale (MF) interviendra enfin après l'organogenèse, à partir du 42ème jour de gestation

Pour quantifier les échecs précoces de gestation et leur importance selon la période de la gestation explorée (Tableau II-1 et Figure I-13), des méthodes très différentes peuvent être employées.

Tableau II-1 Méthodes de mise en évidence des échecs de gestation chez la vache

		Chronologie des échecs de gestation après mise à la reproduction					
	Méthodes	NF	MEP	MET	MF	Remarques	Références
Abattage	Lavage oviducte	Oui de 2 à 5j	Non	Non		technique expérimentale définitive et coûteuse	Maurer et Chenault, 1983
	Lavage corne utérine	Oui à partir de 6j	Oui de 6 à 14j				
Chirurgie	Lavage oviducte	Oui de 2 à 5j	Non			technique expérimentale invasive mais non définitive	Breuel et al., 1993
	Lavage corne utérine	Oui de 6j à 8j	Oui de 6 à 14j				Dunne et al., 2000
Non chirurgical	Lavage corne utérine		Oui de 6 à 18j			technique expérimentale non invasive (cathétérisme cervical)	Sartori et al., 2002
En élevage	Observation des chaleurs	Non	Oui mais inclus la NF	Oui		peu fiable, relatif à la longueur de l'intervalle inter-œstrus, à la sensibilité et à la spécificité de la détection des chaleurs	Seegers et al., 2001 ; Picard-Hagen et al., 2001
	Progestérone			Oui	Non	permet de préciser si la vache est mise à la reproduction au bon moment	Fournier et Humblot, 1989
	Progestérone et PSPB			Oui		PSPB possible à partir de 100j post-partum	Humblot, 2001 ;Grimard et al., 2006
	Echographie transrectale		Non	Oui mais après 30j	Oui	met en évidence la présence d'un conceptus vivant à partir de 30 jours	Szenci et al., 1998
	Palpation transrectale			Non	Oui	diagnostic tardif dépendant de l'expérience du manipulateur	Lopez-Gatius et al., 2002

NF : Non fécondation ; MEP : Mortalité Embryonnaire Précoce ; MET : Mortalité Embryonnaire Tardive ; MEF : Mortalité Fœtale ; j :jour après insémination ; PSPB : Pregnancy Specific Protein B

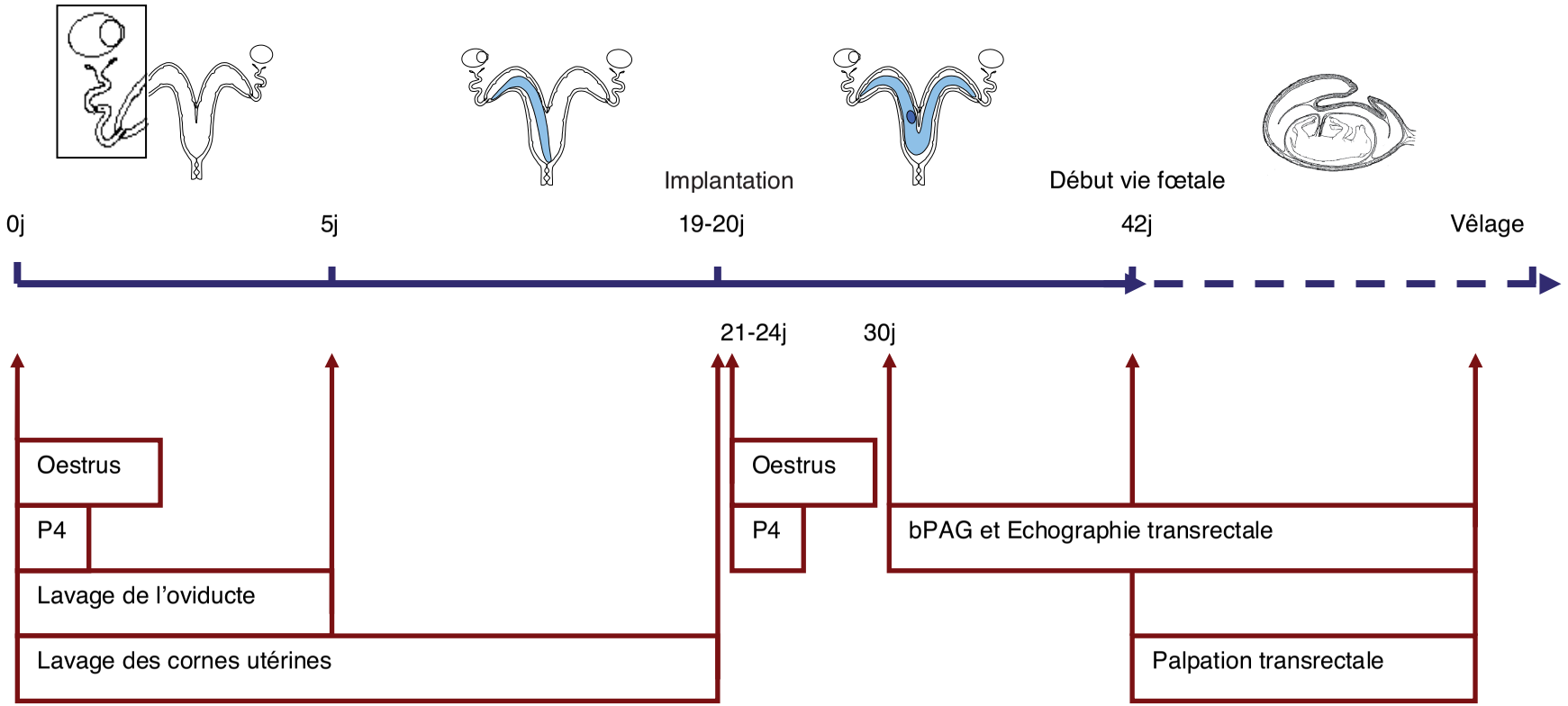


Figure II-13 Utilisation des outils diagnostiques au cours de la gestation. P4 : taux de progestérone du sang ou du lait ; bPAG : taux sanguin de Protéines associées à la gestation

II.2.1 Techniques expérimentales

L'abattage de la femelle permet de récupérer dans les premiers jours suivant la fécondation l'ovocyte ou le jeune embryon par perfusion de l'oviducte. La perfusion de l'oviducte est aussi possible par voie chirurgicale, mais la technique est invasive et moins sûre. La vache étant une espèce mono ovulante, ceci limite énormément l'utilisation de ces techniques expérimentales. L'abattage ou la perfusion de l'oviducte, bien que lourdes, sont les seules méthodes qui permettent de différencier la non fécondation de la mortalité embryonnaire précoce lors d'intervention dès le 3ème jour après la mise à la reproduction (collecte respectivement dans l'oviducte d'un ovocyte non fécondé ou d'un embryon). Après le passage de l'embryon dans l'utérus (vers J5-6 après fécondation), il est possible de récupérer l'embryon pendant sa vie libre par lavage de l'utérus par voie cervicale (jusqu'à J20 pour les équipes expérimentées).
Ces techniques précoces permettent non seulement de quantifier dès les premiers jours de gestation la mortalité embryonnaire mais également de réaliser des analyses complémentaires sur le conceptus récolté (évaluation morphologique, quantification de l'expression de gènes ou d'activité de synthèse).

II.2.2 Techniques utilisables en élevage

Dans un contexte d'élevage, plus l'échec de gestation sera mis en évidence précocement, moins la fécondité sera dégradée puisque l'éleveur peut alors rapidement prendre la décision de remettre la femelle à la reproduction.
L'observation des chaleurs après insémination est l'outil le plus couramment utilisé pour suspecter une mortalité embryonnaire ou fœtale. Au niveau du troupeau, le critère global analysé est le taux de retour en chaleurs régulier (vers trois semaines) ou irrégulier (Seegers et al., 2001). Cependant, un intervalle inter-chaleurs non modifié (18 à 24 jours) ne permet pas de différencier la non fécondation de la mortalité embryonnaire précoce alors que l'allongement de cet intervalle révèle une mortalité embryonnaire tardive (MET) ou fœtale (MF). En effet, si la lutéolyse intervient dans les 24 jours après la mise à la reproduction, elle peut être associée à un défaut de fécondation ou à une mortalité embryonnaire précoce tandis que la lyse du corps jaune au-delà de 24 jours est à relier à une mortalité embryonnaire tardive ou fœtale (Humblot, 2001). L'embryon a alors eu le temps d'émettre un signal de maintien du corps jaune, dû à l'action antilutéolytique de l'interféron tau, ce qui entraîne un allongement du cycle sexuel. On considère donc que la perte de l'embryon avant 16 jours de gestation n'entraîne pas d'allongement du cycle (MEP) alors que si elle a lieu plus tardivement, l'intervalle entre deux chaleurs sera allongé (MET ou MF) (Humblot et Porta, 1984 ; Northey et French, 1980). L'observation des retours en chaleurs donne une forte présomption de la mortalité embryonnaire précoce ou tardive mais nécessite une bonne sensibilité et spécificité de la détection des chaleurs et sous-entend que la vache ait été inséminée en période d'œstrus (Picard-Hagen et al., 2001). Si la spécificité de la détection des retours est élevée en moyenne (90 à 95%) dans les élevages, de grands écarts existent d'une exploitation à l'autre. De plus, la sensibilité de la détection des retours est très faible, de l'ordre de 55% en moyenne avec de grands écarts entre élevages

(Grimard et al., 2004a, 2005). Il est donc difficile de prendre ces données comme base d'étude sauf sur de très grands effectifs.

Les dosages de la progestérone associés à l'observation des chaleurs, réalisés sur des échantillons de lait ou de plasma sanguin, apportent complément et précision sur le diagnostic de la mortalité embryonnaire. Le principe de cette méthode est fondé sur la détection ou non d'un corps jaune fonctionnel. Analysé tout d'abord au moment de la mise à la reproduction, le résultat du dosage de la progestérone donne des informations sur la phase du cycle à laquelle se trouve la femelle inséminée, soit en phase folliculaire donc possiblement en chaleurs, la quantité de P4 est inférieure au seuil de détection dans le plasma ou dans le lait, soit en phase lutéale donc non en chaleurs, la quantité de P4 est supérieure au seuil de détection dans le plasma ou dans le lait. Lors de l'analyse à 21-24 jours après l'insémination, un niveau bas de progestérone indique un retour en phase folliculaire/œstrale donc l'absence de gestation. Combiner ces deux périodes d'analyse, à l'insémination puis 21-24 jours plus tard, limite l'incidence de faux-positifs (Grimard et al., 2006) en excluant les vaches en phase lutéale à l'insémination.

Enfin, le dosage des glycoprotéines spécifiques de la gestation (PSPB, Sasser et al., 1986 ; PAG, Zoli et al., 1991 ; et PSP60, Mialon et al., 1994) et l'échographie par voie transrectale permettent un diagnostic direct de la présence du conceptus après 30 jours. En pratique, le dosage de la PSPB est effectué à partir d'échantillons de sang prélevés sur des vaches à plus de 100 jours post-partum et à plus de 30 jours après insémination (Humblot et al., 1988a). Après 45 jours, la palpation transrectale permet de suivre la gestation. Elle sera éventuellement complétée d'une échographie si l'on souhaite connaître l'état de vitalité du fœtus. Ces techniques, utilisées plus tardivement dans la gestation, permettent la mise en évidence de mortalité embryonnaire ou fœtale survenant sur des vaches préalablement diagnostiquées gravides (Szenci et al., 1998).

II.3. Quantification des mortalités embryonnaires et évolution

Les études synthétisées ci-après présentent les résultats pour des vaches en production laitière sans anomalie susceptible de modifier les résultats individuels de reproduction et n'étant pas soumises à un traitement de superovulation. Nous étudierons successivement les périodes au cours desquelles ont lieu les échecs : la fécondation, la mortalité embryonnaire précoce puis la mortalité embryonnaire tardive.

II.3.1 Absence de fécondation

L'asynchronisme entre le moment de l'ovulation et l'insémination limite les chances de fécondation en raison du vieillissement rapide des gamètes dans le tractus génital (environ 24 heures pour les spermatozoïdes et moins de 6 heures pour l'ovocyte). L'insémination des vaches au mauvais moment, (phase lutéale), concerne en moyenne 4 à 5 % des vaches laitières mises à la reproduction (Michel et al., 2003 ; Fréret et al., 2005 ; Ledoux et al., 2006) mais cette fréquence est très variable entre élevages (Fréret et al., 2005).

Lorsque la vache est inséminée au bon moment (en phase folliculaire en fin de chaleurs), le taux de fécondation des vaches laitières approcherait les 95 % en 1980 (Sreenan et al. 2001 ; Walsh et al.,

2011). A l'issue d'une compilation de 4 études concernant 165 embryons/ovocytes retrouvés après lavage des cornes utérines chez des vaches laitières américaines, Santos et al. (2004) ont rapporté un taux de fécondation moyen de 76,2 % (55,3 à 87,8 %). Dans le Tableau II-2, les taux de fécondation chez la vache laitière publiés depuis 1978 montrent qu'ils sont globalement constants : 83 % pour Ayalon, 1978, 83 % d'après une compilation de 7 études pour Sartori et al. (2010). Cependant, ces chiffres doivent être relativisés car ils ont été compilés à partir de conduite alimentaire (Sartori et al. 2010) et de saison tout à fait différents (hiver versus été ; Sartori et al., 2010 ; Santos et al., 2004) et ne sont issus que de l'analyse d'un nombre limité de vaches. Sartori et al. (2002) a rapporté un impact néfaste de la température extérieure sur la fécondation (55,3 % de taux de fécondation en été, contre 87,8 % en hiver).

A notre connaissance aucune étude n'a cherché à évaluer la réussite à la fécondation des vaches laitières des élevages français. Le taux de fécondation des vaches laitières hautes productrices demeure incertain et très variable selon les études. D'autres études comparables entre elles sont nécessaires afin d'estimer l'impact de la non fécondation sur les échecs précoces de gestation et sur la dégradation de la fertilité.

Tableau II-2 Taux de fécondation chez les vaches laitières

Année	Pays	Types de vache	Nb de vaches collectées	Fréquence (%)	Références
1978	Israël	VL	12	83	Ayalon, 1978
1980	Irlande	VL production moyenne	183*	85-100*	Sreenan et al., 2001
1992	Virginie (EU)	Holstein	22**	75.5**	de Jarnette et al., 1992
1988-2009	EU	VL haute productrice	732***	83***	Sartori et al, 2010

* : moyenne sur 2 études ; ** : moyenne sur 4 études ; ***moyenne sur 7 études; VL : Vache Laitière ; EU : Etats-Unis

II.3.2 Mortalité embryonnaire précoce

Dans les études répertoriées dans le Tableau II-3, la fréquence de la mortalité embryonnaire précoce est très variable. Elle vaut en moyenne 32 % (de 11 à 47,3 %), tous pays et toutes races confondus (Tableau II-3). Cette large fourchette peut être expliquée notamment par les différences de méthodologies utilisées (technique expérimentale ou suivi hormonale) et par des conditions d'échantillonnage propres à chaque étude réalisée dans des pays différents, pour des races, des saisons et des systèmes d'élevage différents. En France, la fréquence de la mortalité embryonnaire précoce varierait entre 25 et 45 % pour les vaches laitières de race Holstein. Dans la plupart des études, elle ne peut être différenciée de la non fécondation, il s'agit donc d'une fréquence cumulée NF + MEP. Une légère augmentation de cette mortalité est perceptible au cours des 20 dernières années (+ 4 points ; Figure II-14). Quand les pertes très précoces sont cumulées (non-fécondation et mortalité embryonnaire précoce), elles apparaissent quantitativement plus importantes que les mortalités embryonnaires tardives et concernent le plus souvent plus d'un tiers des échecs après insémination.

Tableau II-3 Fréquence de mortalité embryonnaire précoce chez les vaches laitières

Année	Pays	Types de vache	Méthodes	Effectifs	Fréquence (%)	Références
1978	Israël	VL	Abattage entre 11 et 19 jours après IA	18	11	Ayalon, 1978
				20	20	
				21	43	
1986	France	PH	Observation des chaleurs et dosages hormonaux	1063	25,8*	Humblot, 1986 ; Humblot, 2000
		Normande		1001	20,5*	
		Montbéliarde		622	25,5*	
1989		PH		753	43,6*	Fournier et Humblot, 1989 ; Humblot, 2000
1991				177	35,6*	Humblot, 1991, 2000
		Normande		119	37*	
2000		PH		1395	31,6*	Humblot, 2001 ; Pinto et al., 2000
2001	France (Réunion)			847	36,8*	Tillard et al., 2001
2002	France	Normande / PH		882	37,76*	Michel et al., 2003
2002-2003	Irlande	Holstein américaine		78	43*	Horan et al., 2005
		Holstein NZ		78	32*	
2004	France	PH		269	37,2*	Fréret et al., 2005
2004-2005				234	45,3*	Ledoux et al., 2006
				4581	37,2*	Fréret et al., 2006
2002	Wisconsin (EU)	Holstein	Lavage utérin 6 jours après IA	38	44,7[a]	Sartori et al., 2002
				41	12,2[b]	

* % englobant non-fécondation et MEP ; VL : Vache Laitière ; EU : Etats-Unis ; PH : Prim'Holstein ; NZ : Nouvelle Zélandaise ; IA : Insémination Artificielle ; [a] expérience réalisée en été ; [b] : expérience réalisée en hiver

Chez les génisses, la fréquence des pertes cumulées NF-MEP serait moins importante que chez les vaches laitières multipares. Ceci pourrait entre autre, s'expliquer par le taux de fécondation restant proche de 100 % pour cette tranche d'âge (Sartori et al., 2002).

II.3.3 Mortalité embryonnaire tardive

Lorsqu'elle est mesurée en élevage et en France, la fréquence des mortalités embryonnaires tardives paraît moins élevée que celle de l'ensemble NF-MEP (Figure II-14). Elle concerne environ 15% des inséminations et représente 30 % du total des pertes embryonnaires. L'incidence de ces pertes est néanmoins élevée (nombre de mortalités après 21 jours/vaches gestantes à 21 jours). Pour Grimard et al. (2006), 25 % des vaches Holstein perdent leur embryon/fœtus entre 21 et 80-100 jours. En revanche, Silke et al. (2002) rapportent une faible incidence de pertes embryonnaires tardives entre 28 et 42 jours chez les vaches laitières en système de pâturage (3,2 %).

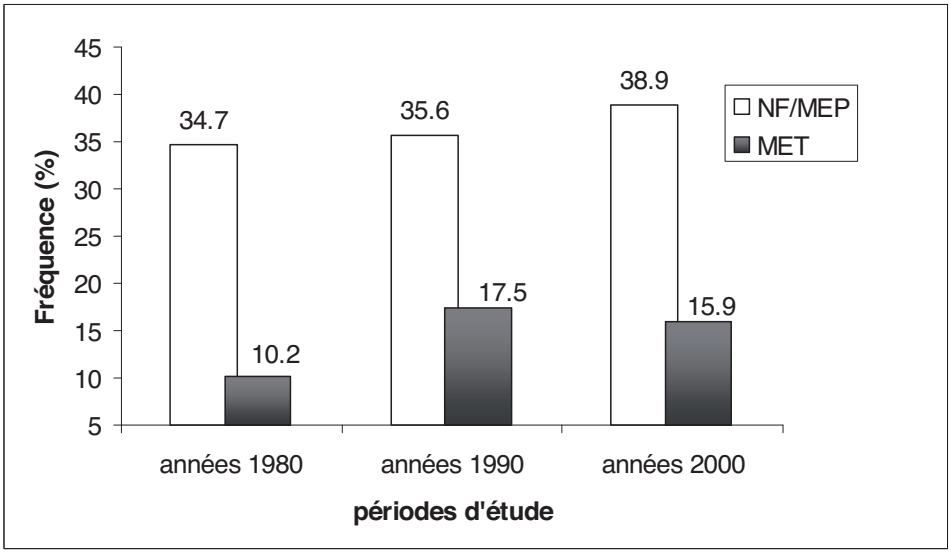


Figure II-14 Evolution de la fréquence de la non fécondation ou mortalité embryonnaire précoce (NF-MEP) et de la mortalité embryonnaire tardive (MET) en France chez la vache Holstein en élevage d'après Humblot, 1986, 1991, 2001 ; Fournier et Humblot, 1989 ; Michel et al., 2003 ; Fréret et al., 2005, 2006 ; Grimard et al., 2006 ; Ledoux et al., 2006 . IA : Insémination Artificielle

II.3.4 Chronologie des échecs

Pour bilan, un schéma de la chronologie des pertes au cours de la gestation des vaches laitières de race Holstein en France est proposé dans le Tableau II-4. Il a été construit à partir des références citées ci-dessus. Pour 100 vaches en première insémination, il permet de donner une prévision de la période la plus à risque en terme de fréquence ou d'incidence de pertes. Par manque de données françaises et pour pouvoir, malgré tout, estimer la non fécondation séparément de la mortalité embryonnaire précoce, on a supposé que le taux de fécondation des vaches françaises était proche de celui des vaches hautes productrices américaines (76 % Santos et al., 2004). Ce taux de fécondation a probablement été sous-estimé compte tenu du niveau de fertilité américain inférieur avant 2004 à celui de la France (cf Figure II-7). Ce Tableau II-4 montre que 52 % des premières tentatives de mise à la reproduction des vaches aboutiraient à un échec entre l'insémination et la fin du développement embryonnaire ; les pertes les plus nombreuses survenant lors des trois premières semaines après l'insémination (Walsh et al., 2011). Ces pertes se répartiraient en 37 échecs pour 100 vaches inséminées de la fécondation au 16ème jour (NF-MEP) et 15 mortalités embryonnaires tardives entre le 16ème et le 42ème jour. Pour Diskin et al. (2006), 60 % des premières inséminations des vaches Holstein conduits au pâturage aboutiraient à un échec lors du développement embryonnaire, répartis en 10 % d'échec à la fécondation, 43 % de mortalité embryonnaire précoce et 7 % de mortalité embryonnaire tardive. Les pertes fœtales après 80-90 jours étant relativement faibles en pourcentage, l'évaluation du taux de gestation 90 jours post-IA donnera une estimation correcte du taux de vêlage à l'IA. Ce paramètre peut être utilisé en élevage pour mesurer la fertilité.

Tableau II-4 Estimation des pertes au cours de la gestation chez la vache laitière Holstein en première insémination en France

Jour de gestation	Effectifs	Fréquence estimées des pertes (sur 100 vaches inséminées)	Incidence estimée des pertes (nombre d'échec au moment considéré sur le nombre de vaches encore gestantes au stade précédent)
J0	100 vaches inséminées		
		24 %	24 %
J2	76[1] ovocytes fécondés		
		13 %	17,1 %
J16	63[2] embryons viables		
		15 %	23,8 %
J42	48[2] vaches gestantes		
		6 %	12,5 %
J80-100	42[1,2] vaches gestantes		
		6 %	14,3 %
Terme	36[3] vêlages		

[1] : d'après Santos et al., 2004 ; [2] : Humblot, 1991, 2000, 2001 ; Michel et al., 2003 ; Fréret et al., 2005 ; Grimard et al., 2006; [3] : d'après Barbat et al., 2005

Chez les vaches laitières hautes productrices, les échecs de gestation les plus fréquents ont lieu lors des trois premières semaines post-insémination. Ils sont responsables de la mauvaise fertilité décrite dans le paragraphe I (associés aux difficultés d'expression et/ou détection des chaleurs et de la qualité et la mise en place de la semence mâle). Les pertes lors de la fécondation ne peuvent pas être estimées en élevage, leur impact sur les échecs précoces décrit comme important reste hypothétique. En condition d'élevage, la non fécondation-mortalité embryonnaire précoce est quantitativement plus importante que la mortalité embryonnaire tardive. Cependant, 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.

La clé du succès d'une gestation menée à terme est donc fortement dépendante du taux de fécondation d'une part et de la survie embryonnaire d'autre part. En élevage, une des stratégies ayant pour objectif de limiter les pertes consiste à agir sur les facteurs prédisposants à la non fécondation et à la mortalité embryonnaire.

Après 80-100 jours de gestation la fréquence et l'incidence des pertes fœtales sont faibles. Evaluer le taux de gestation vers 80-100 jours donnera une estimation assez bonne du taux de vêlage. Cette estimation a lieu en général pendant la lactation quelle que soit la date de la première IA et évitera d'avoir trop de « perdus de vue » dans les échantillons, les réformes au moment du tarissement ayant eu un statut évalué avant leur sortie.

III. Facteurs prédisposants et/ou explicatifs des échecs de gestation précoce

III.1. Synthèse des facteurs connus

Les situations qui compromettent le synchronisme observé entre d'une part le gamète mâle et le gamète femelle ou d'autre part entre la vésicule embryonnaire et l'ensemble utéro-ovarien de la mère sont susceptibles d'entraîner l'absence de fécondation ou l'arrêt de la gestation. Le Tableau II-5 et le Tableau II-6 présentent les principaux facteurs de risque des échecs précoces en fonction de leur chronologie. La prédisposition à la mortalité embryonnaire est multifactorielle. Nous précisons ci-dessous quelques facteurs reconnus comme influençant les échecs précoces de gestation.

Dans la plupart des études, l'alimentation, la production laitière, l'état corporel des animaux, l'âge, le potentiel génétique, l'état sanitaire et la saison de reproduction ont influencé la mortalité embryonnaire. Certaines études, combinant enregistrement des données de non-retour et dosages hormonaux, montrent que les facteurs influençant les NF-MEP et MET sont différents (Humblot et al., 2001 ; Michel et al., 2003). Toutefois, il n'est pas possible à partir de telles études épidémiologiques et des données collectées en ferme de distinguer les rôles respectifs des facteurs sur l'absence de fécondation ou la MEP puisqu'aucun test biologique ne permet de les distinguer.

L'analyse simultanée des effets génétiques et des effets phénotypiques sur la reproduction permet d'observer qu'un fort potentiel génétique laitier aggraverait de manière plus importante la NF-MEP tandis que la MET serait associée à la production laitière des vaches (Pinto et al., 2000 ; Humblot, 2001).

L'état corporel des animaux est aussi un facteur souvent étudié. Plusieurs études ont montré que l'amaigrissement entre le vêlage et les premiers mois avant la mise à la reproduction a des effets détériorateurs sur la fertilité (Lopez-Gatius et al., 2002 ; Fréret et al., 2005). Plus précisément, Lopez-Gatius et al. (2002) indiquent que la chute d'un point de la note d'état pendant le premier mois de lactation multiplie par 2,4 le risque de mortalité embryonnaire tardive. Des données similaires montrant des effets défavorables de l'amaigrissement prononcé ont été obtenues chez des vaches laitières hautes productrices dans les conditions subtropicales (Tillard et al., 2003). Un bilan énergétique négatif révélé par les variations d'état corporel affecte donc la survie embryonnaire. Mais une note d'état corporel trop élevée au vêlage et à l'insémination suivante serait aussi défavorable à la MET (Fournier et Humblot, 1989 ; Grimard et al., 2006), particulièrement chez la vache haute productrice (Humblot, 2001).

Michel et al. (2003) rapportent un écart de fertilité entre races Holstein et Normande : la NF-MEP serait plus importante en race Holstein qu'en race Normande. La production laitière plus importante chez les vaches Holstein n'expliquerait pas totalement cet écart de fertilité. Cette différence inter-raciale pourrait s'expliquer par l'existence de facteurs génétiques ou par un bilan énergétique différent entre les deux races en début de lactation, influençant la fréquence des mortalités embryonnaires à différents stades de gestation.

Le stress thermique est aussi connu comme une cause d'altération de la qualité des ovocytes (Sartori et al., 2002). L'augmentation de la température favoriserait l'absence de fécondation et/ou la mortalité

embryonnaire précoce par défaut de développement embryonnaire (Wolfenson et al., 2000). *A contrario*, deux études ont montré que la fréquence de MET diminuait en été par rapport à l'hiver (Fournier et Humblot, 1989 ; Grimard et al., 2006). Du fait de l'hyperthermie associée, un processus infectieux (Maillard et Chastant-Maillard, 2002) et/ou inflammatoire (Fournier et Humblot, 1989 ; Hanzen, 2001) favorise aussi l'arrêt de la gestation à tous les stades (indépendamment de l'embryotoxicité propre de l'agent pathogène).

Les anomalies génétiques touchant la structure ou le nombre des chromosomes (King, 1990) ou affectant un gène en particulier (exemple de l'anomalie CVM, Complex Vertebral Malformation ; Nielsen et al., 2003 ; Malher et al., 2006) affectent directement la survie embryonnaire et fœtale.

D'autres facteurs sont moins systématiquement recherchés. Il s'agit par exemple de la présence de corps jaunes additionnels qui diminueraient le risque de mortalité embryonnaire par le maintien d'un taux élevé de progestérone. Cette augmentation du nombre de corps jaunes pourrait représenter une adaptation à la chaleur pour certaines races et cet effet protecteur pourrait être plus prononcé dans les conditions subtropicales (Lopez-Gatius et al., 2002) et/ou au moment de fortes chaleurs.

Pour d'autres facteurs (profils de reprise de cyclicité, rang d'IA, âge, rang de lactation, production laitière, taux…) les résultats sont contradictoires.

Tableau II-5 Facteurs prédisposants de la mortalité embryonnaire chez la vache laitière: Facteurs intrinsèques

Facteurs intrinsèques	Modalités	NF	MEP	MET	Références
Qualité des gamètes femelles	diminuée	+			Sartori et al., 2002
Qualité des gamètes mâles	diminuée	+			de Jarnette et al., 1992
	entre taureaux			+	Lopez-Gatius et al., 2002
Environnement ovaro-utérin	dysfonctionnement des régulations génétiques		+		Robinson et al., 2001
	dysfonctionnement des régulations génétiques		+		Thatcher et al., 2001
Profil de cyclicité	inactivité ovarienne et corps jaune persistant			+	Fréret et al., 2005
	interruption de cyclicité	+			Fréret et al., 2005
	anormal *vs* normal	NS			Ledoux et al., 2006
	anormal *vs* normal			NS	Santos et al., 2009
Chaleurs	Irrégulières *vs* régulières	+			Fréret et al., 2005
Jumeaux	Présence *vs* absence			+	Lopez-Gatius et al., 2002
Corps jaune additionnel	Présence *vs* absence			-	Lopez-Gatius et al., 2002
Races	Blanc bleue Belge *vs* Pie noire ou Pie rouge	+			Hanzen, 2001
	Prim'Holstein *vs* Normande	+			Michel et al., 2003
Rang d'IA	augmentation			-	Fournier et Humblot, 1989
	augmentation	NS			Michel et al., 2003
	Vache repeat-breeding	+			Hanzen, 2001
Age, rang de lactation, parité	augmentation			+	Fournier et Humblot, 1989
	augmentation			+	Labernia et al., 1996
	augmentation	+			Pinto et al., 2000
	augmentation	+			Humblot, 2001
	augmentation	+			Hanzen, 2001
	augmentation			NS	Silke et al., 2002
	augmentation	+			Sartori et al., 2002
	augmentation			NS	Lopez-Gatius et al., 2002
	augmentation	NS			Michel et al., 2003
	augmentation			+	Santos et al., 2009
Production laitière	forte production			NS	Fournier et Humblot, 1989
	forte production		+		Pinto et al., 2000
	forte production			NS	Silke et al., 2002
	forte production			+	Grimard et al., 2006
	forte production à l'IA			NS	Lopez-Gatius et al., 2002
	forte production à l'IA	+			Michel et al., 2003
	Forte production à 90 jours postpartum			NS	Santos et al., 2009
Taux protéique	élevé	-		NS	Pinto et al., 2000
	élevé	-		NS	Humblot, 2001
Taux butyreux	élevé			NS	Silke et al., 2002

NF : Non-fécondation ; MEP : Mortalité embryonnaire précoce ;MET : Mortalité embryonnaire tardive ; NS : Non significatif ; S : Significatif ; IA : Insémination Artificielle ; + : augmentation significative ; - : diminution significative

Tableau II-5 (suite)

Facteurs intrinsèques	Modalités	NF	MEP	MET	Références
Potentiel génétique	élevé	+		NS	Pinto et al., 2000
					Humblot, 2001
					Silke et al., 2002
					Grimard et al., 2006
Etat corporel	note élevée au vêlage			+	Fournier et Humblot, 1989
				NS	Lopez-Gatius et al., 2002
		NS			Fréret et al., 2005
				-	Santos et al., 2009
	note à 28j post-partum			NS	Silke et al., 2002
	dégradation de la note un mois post-partum			+	Lopez-Gatius et al., 2002
	dégradation de la note entre 28 et 56j				Silke et al., 2002
	dégradation de la note deux mois post-partum	+		NS	Fréret et al., 2005
				+	Santos et al., 2009
	note élevée à l'IA			NS	Lopez-Gatius et al., 2002
		NS			Michel et al., 2003
				+	Grimard et al., 2006
				-	Santos et al., 2009
	note élevée à l'IA chez les VLHP	NS		+	Humblot, 2001
	dégradation de la note du vêlage au DG			NS	Lopez-Gatius et al., 2002
Anomalie génétique	CVM			+	Nielsen et al., 2003 ; Malher et al., 2006
	Anomalie chromosomique	+		+	King, 1990
QTL de fertilité	présence	?			Tableau II-9 ; Tableau II-11

NF : Non-fécondation ; MEP : Mortalité embryonnaire précoce ;MET : Mortalité embryonnaire tardive ; NS : Non significatif ; S : Significatif ; IA : Insémination Artificielle ; + : augmentation significative ; - : diminution significative ; CVM : Complex Vertebral Malformation ; QTL : Quantitative Trait Loci

Tableau II-6 Facteurs prédisposants de la mortalité embryonnaire chez la vache laitière: Facteurs extrinsèques

Facteurs extrinsèques	modalités	NF	MEP	MET	Références
Alimentation	excès de protéines	+			Ponter et al., 2005
	apport de lipide	-			
	apport d'énergie et de protéine	-			Armstrong et al., 2001
	excès ou carence en micronutriment	+			Ashworth et Antipastis, 2001
Intervalle vêlage insémination	augmentation	NS		-	Pinto et al., 2000
				-	Humblot, 2001
IA par rapport aux chaleurs	entre 6 et 20h	-			Michel et al., 2003
Condition de vêlage		NS			
	aide et césarienne	+			Hanzen, 2001
Saison	été vs hiver			-	Fournier et Humblot, 1989
	Saison				Grimard et al., 2006
				NS	Santos et al., 2009
		NS			Hanzen, 2001
	VLHP en été	+			Sartori et al., 2002
	Hiver, printemps, été *vs* automne			+	Labernia et al., 1996
Troupeau				S	Labernia et al., 1996
					Santos et al., 2009
		S			Humblot, 2001
Conduite des vaches taries	réduction de la période sèche des VL à fort potentiel génétique	+			
	réduction de la période sèche	+			Michel et al., 2003
Méthode d'IA	synchronisation des chaleurs			+	Cartmill et al., 2001
				NS	Lopez-Gatius et al., 2002
					Chebel et al., 2004
					Santos et al., 2009
Méthode de diagnostic de gestation	tardive			-	Labernia et al., 1996
	Palpation transrectale, glissement des membranes			+	Hanzen, 2001
Maladie	Métrite			NS	Fournier et Humblot, 1989
	Mammites			+	
		+			Hanzen, 2001
					Hansen et al., 2004
	Kystes			+	Fournier et Humblot, 1989
	maladie clinique			NS	Lopez-Gatius et al., 2002
	BVD/MD	+			Maillard et Chastant-Maillard, 2002
	BoHV1 (IBR)	+			

NF : Non-fécondation ; MEP : Mortalité embryonnaire précoce ; MET : Mortalité embryonnaire tardive ; NS : Non significatif ; S : Significatif ; IA : Insémination Artificielle ; + : augmentation significative ; - : diminution significative

Hiérarchiser les facteurs influençant la mortalité embryonnaire et fœtale et identifier leur impact sur les échecs de gestation aux différents stades nécessitent des études épidémiologiques à grande échelle. Cependant, ce type d'études fondées 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 aucune étude à ce jour à notre connaissance n'a permis de mettre en évidence un ou plusieurs facteurs comme ayant un impact dominant sur les pertes précoces.

III.2. Facteurs susceptibles d'expliquer l'évolution récente de la fertilité des vaches Holstein

Trois facteurs de risque des échecs précoces de gestation sont ou ont été en augmentation dans les troupeaux de vaches Holstein contemporains. Ils sont donc susceptibles d'expliquer l'évolution récente de la fertilité. Ce sont la sélection génétique sur la production laitière, les anomalies de la reprise de la cyclicité post-partum (fréquence en augmentation depuis le début des années 80) et le déficit énergétique du fait de l'augmentation de la productivité des animaux. Nous avons choisi de nous intéresser plus particulièrement à ces trois facteurs de risque.

III.2.1 Premier facteur : Implication de la génétique dans l'évolution de la fertilité des vaches laitières

III.2.1.1 Anomalies génétiques

La mortalité embryonnaire peut résulter d'une particularité du génome de l'embryon, susceptible d'empêcher son développement. Environ 400 anomalies d'origine génétique ont été caractérisées chez les bovins mais la plupart restent probablement à découvrir (Huston, 1993 ; Ducos et al., 2002). Quand elles sont susceptibles de se transmettre de génération en génération, on les qualifie d'héréditaires. Leur prévalence globale au sein de la population bovine parait relativement faible, de l'ordre de quelques pour mille selon Huston (1993). Leur coût économique dans cette proportion reste limité. Ce coût devient plus important (mais reste difficile à quantifier) lorsqu'une anomalie particulière voit sa fréquence augmenter jusqu'à des valeurs pouvant atteindre de un à quelques pour cent. Chez les bovins laitiers, l'évolution de la consanguinité moyenne est relativement importante de l'ordre de +1 % par génération (Boichard et al., 1996). En 2001-2004, les taureaux Holstein utilisés pour les inséminations premières réalisées sur une année, sont issus de 26 pères différents contre 51 en 1982-1984 (Mattalia et al., 2006). En effet, du fait de la banalisation de l'insémination artificielle, le nombre de pères est restreint. La base génétique des populations est réduite. Les accouplements consanguins deviennent inévitables et la fréquence d'apparition des anomalies ne peut qu'augmenter. On distingue les affections chromosomiques des affections géniques, toutes sont dites génétiques.

❖ **Affections chromosomiques**

Ces anomalies du caryotype ont un impact majeur sur la survie embryonnaire et fœtale et pourraient être responsable d'environ 20 % des pertes embryonnaires et fœtales chez les espèces domestiques (King, 1990).

- ✓ Il peut s'agir d'une anomalie du nombre de chromosomes (hétéroploïdie). Le caryotype est anormal et présente n, 3n ou 4n chromosomes au lieu de 2n (diploïdie). Ceci peut toucher l'ensemble des cellules germinales, la survie de l'embryon ne dépasse alors généralement pas le troisième cycle de division cellulaire, soit n'être observé que sur une certaine lignée cellulaire. Des lignées seront à 2n chromosomes et d'autres à n chromosomes. Selon la lignée cellulaire anormale, cette anomalie entraîne plus ou moins de mortalité embryonnaire. L'hétéroploïdie peut aussi se caractériser par l'absence ou l'excès d'un chromosome à une paire particulière. D'une façon générale, elle se solde dans les espèces d'élevage par une mortalité embryonnaire, sauf quand l'anomalie touche les chromosomes sexuels, elle est alors mieux toléré mais entraîne une stérilité.

- ✓ Il peut s'agir d'une anomalie de structure. C'est l'exemple de la translocation Robertsonienne. Des chromosomes de deux paires différentes s'accrochent ensemble lors de la méiose. L'exemple de la translocation Robertsonienne 1/29 est la plus connue en France chez la race Blonde d'Aquitaine (Ducos et al., 2000).

❖ **Affections géniques**

Lors de la formation des gamètes, si une mutation défavorable modifie un allèle, elle entraîne une anomalie génétique. L'expression d'une mutation génique se fait le plus souvent selon un déterminisme autosomal récessif (60 %) ou dominant (20 %) (Huston, 1993). En cas de déterminisme récessif, un individu est affecté s'il a reçu l'allèle portant la mutation en deux exemplaires, l'un de son père et l'autre de sa mère.

Pour illustrer ces anomalies géniques, nous prendrons comme exemple, l'affection CVM responsable de malformations et de soudures des vertèbres en race Holstein sur des veaux mort-nés et probablement de mortalités embryonnaires et/ou fœtales non identifiées. Cette affection à déterminisme monogénique récessive a été décrite comme en pleine phase de diffusion sur les dernières années du 20ème siècle et ce début du 21ème (Agerholm et al., 2001). Elle a été caractérisée par Ducos et al. (2002) dans la population Holstein française. En 2006, Thomsen et al. identifient et localisent la mutation causale du CVM portée par le gène *SLC35A3*. Un taureau de race Holstein américaine (Carlin M Ivanhoe Bell) porteur de la mutation serait à l'origine de la diffusion dans la population Holstein française (Ducos, 2001). De nombreux taureaux de service descendants de Bell se sont également avérés porteurs de la mutation.

D'après une étude à grande échelle réalisée sur les vaches inséminées de trois départements bretons entre 1998 et 2001, le taux de porteur de l'anomalie se situerait entre 10 et 12 % (Malher et al., 2006). Les quelques études qui se sont intéressées à décrire les effets associées aux accouplements à

risque de CVM sur les performances de reproduction s'entendent pour conclure que le développement d'un embryon homozygote peut aboutir à la naissance d'un veau anormal mais que le plus souvent il y a arrêt de la gestation au stade embryonnaire tardif ou fœtal, qui se solde par un retour en chaleur de la vache (Nielsen et al., 2003 ; Malher et al., 2006). Les accouplements à risque (entre un taureau porteur et une vache avec un père ou un grand-père porteur) augmentent le risque pour la vache de revenir en chaleurs, et particulièrement tardivement, ce qui suggère un impact tardif de cette anomalie sur le développement du conceptus (Malher et al., 2006).

En France, depuis 2002, des mesures de contrôle et d'éradication de l'anomalie ont été prises par l'ancien comité Bovin de la CNAG (Commission Nationale pour l'Amélioration Génétique, actuellement composante de France Génétique d'Elevage), grâce au typage génétique des reproducteurs (Ducos et al., 2002). En conséquence, dans le but d'éradiquer cette malformation, les taureaux nés après le 1er janvier 2003, c'est-à-dire mis en testage à partir du 1er janvier 2004 et indexés en 2007/2008, doivent être totalement indemnes de l'anomalie CVM. Pour les autres, leur statut CVM obtenu par typage ADN (ou typage ADN des deux parents) doit obligatoirement être connu de l'utilisateur afin d'éviter les accouplements à risque, c'est-à-dire entre deux porteurs hétérozygotes ou à risque d'hétérozygotie pour l'anomalie.

Même rare, du fait de la diminution continue de la taille génétique des populations sélectionnées (Boichard et al., 1996), des pressions de sélection appliquées et de la diffusion importante de certains reproducteurs par la voie de l'insémination artificielle, l'incidence d'anomalies génétiques particulières peut s'accroître très rapidement. Les principales conséquences sont des pertes économiques, une baisse de l'efficacité des programmes de sélection et une dégradation de l'image des activités de sélection. La mise en place de programme de surveillance et de gestion des anomalies génétiques doit permettre d'anticiper ce type de problèmes (Ducos, 2001).

III.2.1.2 Paramètres génétiques de la fertilité

Avant l'inclusion en 2001 du caractère de fertilité dans l'index synthétique, la sélection génétique des bovins laitiers a porté principalement sur la production, puis sur la composition du lait ainsi que sur l'amélioration des caractères de morphologie, en particulier la morphologie de la mamelle (Barbat et al., 2007).

Le caractère de fertilité sélectionné a été choisi sur des critères biologiques et génétiques. Il doit être disponible pour tous les animaux, non dépendant de la politique de l'éleveur et du potentiel laitier des vaches. Le taux de réussite à l'IA chez la femelle en postpartum a été choisi comme caractère de fertilité femelle.

❖ Héritabilité

L'héritabilité du caractère taux de réussite à l'IA est très faible (1 à 2 %, Tableau II-7), ce qui rend le caractère difficile à sélectionner directement. Cependant, la variabilité génétique est élevée. L'écart-type génétique est d'environ 7 points de réussite à l'IA, ce qui offre des possibilités d'amélioration, comme de dégradation des résultats de reproduction.

Tableau II-7 Estimations des paramètres génétiques du taux de réussite à l'IA chez trois races de vaches laitières (d'après Boichard et al., 1998a)

	Holstein	Normande	Montbéliarde
Nombre de pères	1910	433	385
Nombre de vaches	69 1947	95 028	78 880
h² vache	0.013	0.012	0.011

h² héritabilité

❖ Corrélations génétiques

L'effet de la production laitière sur la fertilité est la conséquence de deux effets combinés : génétique et nutritionnel. La lactation associée au déficit énergétique et à la mobilisation des réserves corporelles perturbe la reprise de cyclicité d'abord, puis la fertilité ensuite. Cette opposition entre production laitière et fertilité est aussi d'origine génétique.

- ✓ Le niveau de fertilité d'une race diminue lorsque sa production laitière augmente (Barbat et al., 2005). Les corrélations génétiques entre le niveau de production de début de lactation et la réussite à l'insémination sont négatives (Tableau II-8). Cet antagonisme semble assez consensuel dans la littérature (Berger et al., 1981 ; Janson et Andreasson, 1981 ; Hansen et al., 1983 ; Van Arendonk et al, 1989 ; Boichard et Manfredi, 1994).
- ✓ Intra-race, la corrélation génétique entre fertilité chez la génisse et fertilité chez la vache est d'autant plus faible que le potentiel laitier augmente : elle n'est que de 0,5 en race Holstein alors qu'elle vaut 0,8 en race Normande et 0,6 en race Montbéliarde (Boichard, 2000).

Tableau II-8 Estimations des corrélations génétiques entre la production en 100 jours en 1ère lactation et la réussite à la première insémination chez trois races laitières (26 millions d'IA, Boichard, 2000)

Race	Quantité de lait	Quantité de matière grasse	Quantité de matière protéique
Montbéliarde	-0.32	-0.35	-0.35
Normande	-0.10	-0.07	-0.09
Prim'Holstein	-0.31	-0.25	-0.23

Sur la base des estimations des corrélations génétiques, l'opposition entre production et fertilité se traduirait par une dégradation d'environ -0,3 à -0,5 point de réussite à l'insémination chaque année dans la race Holstein (Boichard et al. 1998a).

❖ Association entre le potentiel de production laitière et la fertilité

La relation négative entre production laitière et fertilité a été rapportée dans de nombreuses études (pour revues : Dillon et al., 2006 ; Dobson et al., 2007 ; Rodriguez-Martinez et al., 2008). L'opposition génétique (corrélation négative) entre la production et la fertilité se vérifie sur le terrain. Grimard et al. (2006) montrent qu'ajusté des variables d'environnement, l'index économique laitier est lié négativement à la fertilité des vaches Holstein de 44 élevages. Pour s'abstraire de l'influence environnementale et ne laisser paraître que l'effet génétique, Cutullic (2010) modélise le taux de réussite après insémination en fonction de la production de vaches laitières de cinq études conduites dans des systèmes d'élevages similaires (pâturage et vêlages groupés) mais de potentiels génétiques laitiers différents (Fulkerson et al., 2001 ; Washburn et al., 2002a ; Kennedy et al., 2003 ; Horan et al., 2005 ; Pollot and Coffey, 2008). Il en déduit que l'augmentation de 1 kg de lait diminue le taux de réussite d'environ 2 % pour des vaches produisant entre 25 et 35 kg de lait par jour (entre 1,9 et 2,3 %[7] ; Figure II-15).

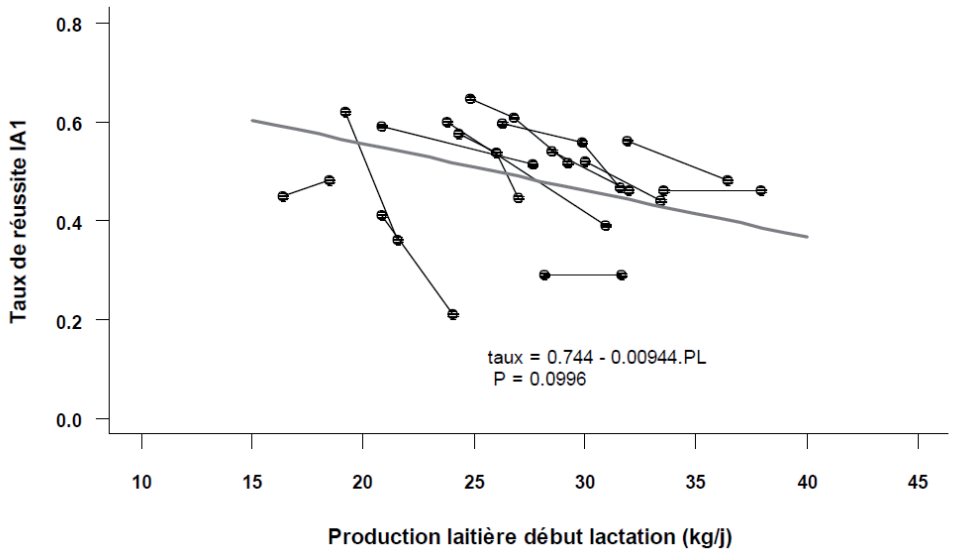


Figure II-15 Taux de réussite à la première insémination artificielle en fonction de la production laitière de vaches laitières de types génétiques différents dans un même système de production (d'après Cutullic 2010). La droite de régression est issue d'un modèle mixte incluant la production laitière du début de lactation en effet fixe, le système de production et l'interaction avec la production en effets aléatoires

Les corrélations génétiques entre quantité de lait, quantité de matière utile et fertilité sont négatives. Une sélection sur le niveau de production entraînera donc une diminution de la fertilité.

[7] la droite de régression issue du modèle mixte de Cutullic (2010) donne pour 1 kg de lait produit supplémentaire la relation suivante : % de l'écart de taux pour 1 kg de lait= - (0,944/[0,744-(0,00944xPL)] avec PL : production laitière.

III.2.1.3 Déterminisme génétique de la fertilité

Depuis le début des années 2000, des travaux de recherche sont conduits pour identifier les gènes pouvant contrôler la fertilité dans l'espèce bovine, l'objectif ultime étant de décrypter les mécanismes moléculaires sous-jacents qui interviennent dans la variabilité de la réponse à l'insémination.
La faible héritabilité de la fertilité exprimée à partir des taux de réussite après IA fait supposer un déterminisme polygénique de la fertilité. La fertilité est gouvernée par la combinaison de l'action de plusieurs gènes dits « quantitatifs », c'est-à-dire que le caractère présente une distribution continue, dans laquelle il n'est pas possible de distinguer un nombre fini de génotypes. Ceci s'explique par le fait que ce caractère est soumis à des effets de milieu, aux effets de plusieurs gènes, et éventuellement à leurs interactions. Les régions chromosomiques impliquées dans ces caractères quantitatifs sont appelées QTL pour Quantitative Trait Loci ou loci d'intérêt quantitatif. Ils sont caractérisés par deux paramètres : leur effet sur le caractère cible et leur position sur le génome.

❖ **Principe général de cartographie de QTL**

La détection de QTL à l'aide de marqueurs génétiques repose sur la recherche d'une association statistique entre la transmission d'un allèle du marqueur et le niveau de performance des animaux ou phénotypes des animaux.
Les paragraphes explicatifs du principe de l'identification des QTL ont été rédigés en se référant à plusieurs synthèses portant sur l'utilisation des marqueurs pour la localisation des QTL chez les animaux d'élevage (Boichard et al., 1998b ; Le Roy et Elsen, 2000 ; Khatkar et al., 2004 ; Ytournel et al., 2008 ; BenJemaa, 2009).

- Propriétés des marqueurs moléculaires

Un marqueur d'un gène est un segment d'ADN proche de ce gène et dont la séquence des nucléotides peut varier d'un individu à l'autre. Pour être utilisables par les généticiens, ces marqueurs doivent être polymorphes (plusieurs variants alléliques), couvrir de manière homogène l'ensemble du génome, être co-dominants afin de permettre l'identification des génotypes homozygotes et hétérozygotes. Enfin, les marqueurs doivent être informatifs et ainsi permettre de distinguer l'origine paternelle et l'origine maternelle des allèles des descendants.
Les marqueurs les plus utilisés dans la détection des QTL actuellement sont les microsatellites et les SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

- ✓ Les microsatellites sont des répétitions d'un nombre variable de di, tri ou tétranucléotides, très polymorphes, co-dominants et répartis de façon homogène dans le génome, tous les 100 Kb en moyenne. Ils possèdent toutes les propriétés requises pour être un marqueur de choix mais leur typage est peu automatisable.
- ✓ Les marqueurs SNP, variations nucléotidiques d'une seule paire de base du génome, sont très polymorphes et ont l'avantage d'être bien adaptés aux procédures de typage automatisées par séquenceurs automatiques.

- Dispositifs familiaux

Afin de suivre les allèles des marqueurs et d'identifier les QTL, des dispositifs familiaux doivent être mis en place. La recherche de QTL chez les bovins laitiers utilise les dispositifs familiaux préexistants. Grâce à la diffusion massive de l'IA et au testage sur descendance, les bovins laitiers ont une structure familiale constituée de grandes familles de demi-frères de père dont leurs descendants sont testés sur leur performance. Deux types de structures familiales préexistantes sont ainsi décrits et fréquemment utilisés pour la détection de QTL (BenJemaa, 2009).

- ✓ Le protocole « filles » (ou « daughter design »), constitué de familles de demi-sœurs. Les filles sont génotypées et évaluées sur leurs performances. Il s'agit d'un dispositif sur deux générations.
- ✓ Le protocole « petite fille » (ou « grand daughter design »), constitué par des familles de taureaux demi-frère (fils) issus du même taureau d'IA (père). Les fils sont génotypés et leur phénotype correspond à leur valeur génétique évaluée sur la base des performances de leurs filles. C'est un dispositif effectué sur trois générations.

- Principe de détection de QTL chez les bovins laitiers par analyse de liaison

Le principe est celui de suivre entre génération d'individus, la transmission d'un marqueur identifiable mais ne s'exprimant pas, supposé lié à un QTL invisible mais qui s'exprime. Prenons l'exemple d'un QTL à deux allèles chez un père hétérozygote :

Pour un marqueur donné, le principe est d'observer, dans la descendance d'un parent hétérozygote M1/M2, s'il existe une différence de performance moyenne selon l'allèle marqueur, M1 ou M2, transmis. L'allèle reçu M1 ou M2 permet de discriminer deux groupes dans la population : P1 et P2. Si la différence de performance existe entre ces deux groupes, elle s'explique par la ségrégation des allèles, Q ou q, en un QTL génétiquement lié au marqueur. On en déduit l'effet du QTL à partir des moyennes de performances des deux groupes (Figure II-16). Ainsi :

Soit θ le taux de recombinaison entre marqueur et le QTL.
Soit α l'effet de substitution d'un allèle du QTL par l'autre, l'effet d'un allèle au QTL vaut μ_Q = ½α et l'autre μ_q = - ½α .
La moyenne des performances des deux populations P1 et P2 est la moyenne des performances des individus portant le marqueur M1 pour P1 ou portant le marqueur M2 pour P2. Chaque population est constituée d'une probabilité θ d'avoir des individus recombinants et d'une probabilité 1 – θ d'individus non recombinant, ce qui donne :
Moyenne des performances de la population P1, μ_{p1} = ½α (1 - θ) + (- ½αθ)= ½α (1-2θ)
Moyenne des performances de la population P2, μ_{p2} = ½αθ + (- ½α (1 - θ)) = - ½α (1-2θ)
On en déduit, l'effet apparent du marqueur correspondant à l'écart des performances de la population P1 portant un allèle du QTL et de la population P2 portant l'autre allèle, soit :

Effet apparent, $\delta = \mu_{p1} - \mu_{p2} = \alpha\ (1 - 2\theta)$. (1)

D'après (1), plus le marqueur est loin du QTL et plus le nombre de recombinaisons augmente ($\theta \geq ½$) et par conséquent plus l'effet apparent du marqueur sera faible. *A contrario*, si le marqueur est complètement génétiquement lié au QTL ($\theta = 0$), l'effet apparent du marqueur correspond à celui du QTL ($\delta = \alpha$). Au final, avec un seul marqueur, il est impossible de distinguer un QTL à effet fort éloigné du marqueur d'un QTL à effet réduit proche du marqueur. Les deux scenarii conférant au marqueur le même effet apparent $\delta=\alpha(1-2\theta)$.

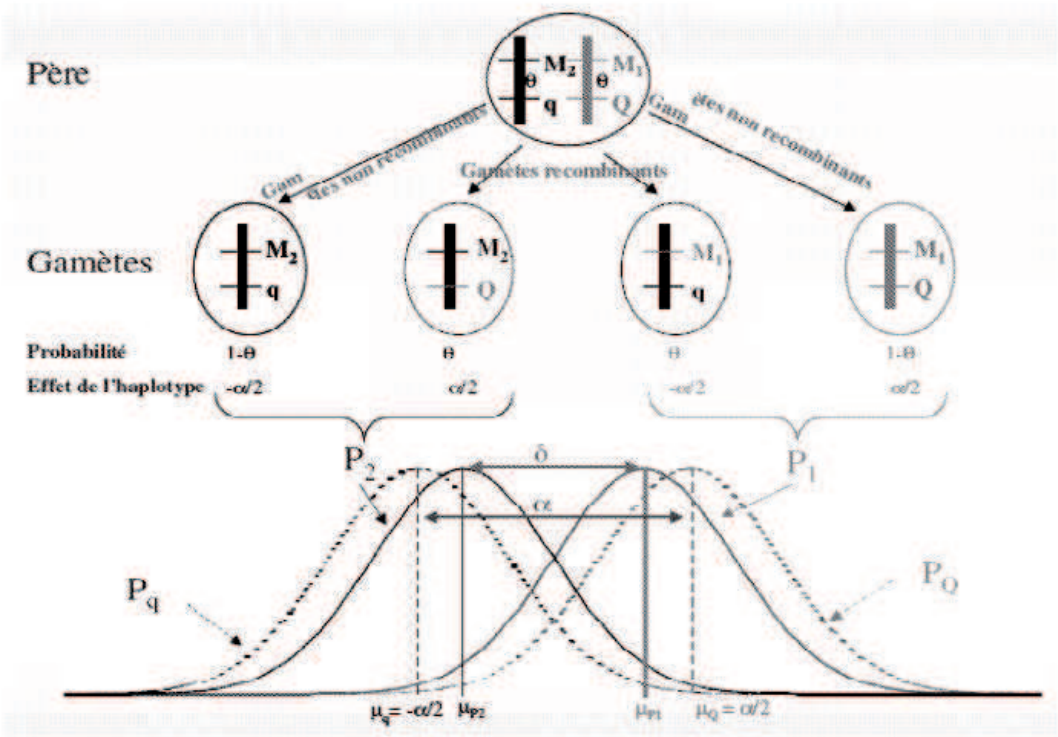


Figure II-16 Principe de détection de QTL par analyse des effets de ségrégation d'un QTL à deux allèles chez un père hétérozygote sur la distribution des performances de sa descendance (d'après Gautier, 2003). Les distributions en pointillés présentent l'effet réel du QTL alors que celles en ligne continue présentent l'effet apparent du marqueur lié.

L'utilisation de l'information apportée par deux marqueurs informatifs encadrant la position supposée d'un QTL permet d'augmenter la puissance de détection mais surtout d'estimer à la fois l'effet et la position du QTL : c'est la cartographie d'intervalle (Lander et Botstein, 1989). Le principe étant de tester l'hypothèse qu'il existe un QTL dans l'intervalle entre deux marqueurs. Cette hypothèse est exprimée en termes de probabilité. L'effet du QTL supposé entre les deux marqueurs est ensuite estimé par le coefficient de régression linéaire de la performance des individus ayant reçu en probabilité l'un ou l'autre allèle au QTL.

A l'issu de cette localisation, on dispose seulement d'une localisation plus ou moins fine d'une région chromosomique, dite QTL contenant un ou plusieurs de ces gènes, ainsi qu'une estimation de leur effet. L'identification de QTL se traduit par des intervalles de localisation de l'ordre de plusieurs

dizaine de centiMorgan. Ces intervalles correspondent à plusieurs dizaines de millions de bases et à plusieurs centaines de gènes, rendant aléatoire l'identification de gènes candidats fonctionnels. Des étapes de cartographie fine de QTL et de séquençage des gènes seront nécessaires pour la recherche de gènes candidats expliquant leurs effets.

- Raffinement de la localisation du QTL

La cartographie fine correspond à une étape de réduction de la taille de l'intervalle de localisation du QTL.

Une approche complémentaire à la cartographie par l'analyse de liaison est celle par étude d'association. Alors que l'analyse de liaison ne s'intéressait qu'aux recombinaisons intra-famille, l'étude d'association exploite l'association permanente existant entre le QTL et un certain nombre de marqueurs à l'intérieur de la population de bovins laitiers. Elle se fonde sur la présence de petits fragments chromosomiques non recombinants identiques dans toute la population et issus d'un ancêtre commun. Si ces régions chromosomiques contiennent un QTL, les allèles de ce QTL seront associés en permanence avec le même haplotype formé par les marqueurs. L'association permanente entre allèles du QTL et ceux du marqueur est connue sous le nom de déséquilibre de liaison entre marqueurs et QTL. Les études d'associations donnent des estimations plus précises des intervalles de confiance des localisations des QTL, mais engendrent un grand nombre de QTL faux positifs en raison de la multiplicité des tests réalisés, égale au nombre de position testées sur le génome. Combiner l'analyse de liaison et les études d'association (Linkage Analysis – Linkage Disequilibrium) est une approche intermédiaire pour affiner la cartographie des QTL. Pour ces méthodes de localisation, la résolution est maximale lorsque chaque événement de recombinaison est localisé exactement. Ceci peut être obtenu en saturant le génome, ou tout au moins la région considérée par des marqueurs génétiques informatifs nombreux.

Un autre facteur jouant sur la résolution est la capacité à prédire le génotype au QTL à partir du phénotype observé. Lorsque le génotype est prédit par le phénotype sans incertitude, la précision est maximale. Au contraire, lorsque les distributions des phénotypes selon le génotype se superposent, le génotype n'est déduit du phénotype qu'en probabilité, ce qui induit une importante perte de précision sur la localisation du QTL (Ytournel et al., 2008). Actuellement, le génome bovin étant séquencé (The bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium et al., 2009) la réalisation d'un grand nombre de génotypages n'est plus le facteur limitant, en raison de la disponibilité de panels de SNP constitués de plusieurs dizaines de milliers de SNP réparti sur le génome bovin (pour revue, Goddard et Hayes, 2009). Aujourd'hui les puces ont un maillage de 54 000 SNP et plus et permettent d'encadrer des régions contenant en moyenne deux gènes. Les travaux de cartographie fine de QTL nécessitent désormais une collecte importante et précise de phénotypes. Le phénotype le plus complet et le plus fin possible des animaux deviendra donc très rapidement le facteur limitant dans les études de liaison du phénotype avec le génotype (Monget et Le Bail, 2009).

❖ QTL de fertilité femelle actuellement localisé chez les bovins

- Primo-localisation des QTL de fertilité

Depuis le début des années 2000, de nombreuses localisations de QTL de fertilité sont publiées par des équipes américaines, du nord et du centre de l'Europe (Tableau II-9).

Au départ les outils de marquages utilisés ne comptaient que quelques dizaines à quelques centaines de marqueurs par chromosomes bovins (études publiée entre 2000 et 2009 synthétisées au Tableau II-9). Sur les 30 paires de chromosomes bovins, 28 seraient susceptible de porter un QTL de fertilité. Seuls les chromosomes de la paire 8 et 23 n'en présenteraient pas d'après les études publiées. Même la région pseudo-autosomale des chromosomes sexuels porterait un QTL lié aux taux de non retour en chaleurs des vaches Holstein allemandes (Kühn et al., 2003). Les chromosomes 1 et 14 sont les plus souvent cités comme étant porteur de QTL de fertilité, tandis que la présence de QTL de fertilité de douze chromosomes n'ont été rapportés qu'une seule fois. De nombreux critères de fertilité distincts entre les études, pour les génisses et pour les vaches, de race laitères différentes ont été utilisés pour identifier ces QTL (Tableau II-9). Certains QTL ont une action sur les TNR à 56 jours, 60 jours et 90 jours, le taux de gestation, d'autres sur l'IVIA1, l'IVIAf, le rang de l'IAf, les traitements utilisés selon le rang de lactation, les index génétique de fertilité.

Le caractère polygénique des performances de fertilité chez la vache laitière se confirme bien au niveau du génome.

Tableau II-9 Synthèse des QTL de fertilité localisés par cartographie d'intervalle sur le génome ou une partie du génome à partir d'un dispositif « petites-filles » relatifs à la fertilité des vaches laitières à l'aide d'un nombre limité de microsatellites

Etudes	Pays	Race	BTA	Caractère	Familles informatives	Individus génotypés	Nombre de marqueurs	Position (cM)	Intervalles (longueur)	Valeur de p
Boichard et al., 2003	France	PH MO NO	1	Succès/échec après IA	3	1554	10 microsatellites	62	49-100	0.005
Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	Suède	SR, SH		TNR_v 56	2	417	8 microsatellites	-	ILSTS104-BM6506	<0.05
				TT infertilité	3				TGLA49	<0.01
Schulman et al., 2008	Finlande	FA		IVIAf	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	146	-	
				TT infertilité				151		<0.05
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		IVIA1	36	2182	23 microsatellites	132.6	BMS918-BMS4043	0.002
								140.8		0.022
Schrooten et al., 2000	Pays-Bas	H	2	TNR 56	20	833	10 microsatellites	139	BM2113	0.0339
Schulman et al., 2008	Finlande	FA		IVIAf	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	2	-	<0.01
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		TNR_v 56	21	2182	10 microsatellites	3.9	TGLA44	0.003
Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	Suède	SR, SH	3	Nb IA_v	2	417	11 microsatellites	-	INRA197	<0.05
				TT infertilité	1				BM2924	<0.01
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH	4	$IIA1IAf_v$	21	2182	8 microsatellites	43.2	BMS2646	0.028
Schulman et al., 2008	Finlande	FA	5	IVIAf	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	-	-	<0.01
				TT infertilité				113		
Schrooten et al., 2000	Pays-Bas	H	6	IVIA1	20	833	29 microsatellites	107	BP7-BM2320	0.0062
Ashwell et al., 2004	EU			taux de gestation*	1	-	12,5 microsatellites en moyenne	122	(0.27)	<0.01
Boichard et al., 2003	France	PH MO NO	7	Succès/échec après IA		1554	5 microsatellites	120	116-122	0.0037
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		Nb IA_g	36	2182	22 microsatellites	111.6	DIK2895-MB057	0.035
Schrooten et al., 2000	Pays-Bas	H	9	TNR 56	20	833	6 microsatellites	79		0.0115
Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	Suède	SR, SH		TNR_g 56	5	417	8 microsatellites	-	TGLA73	<0.001
				Nb IA_g	2					<0.05
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		$IIA1IAf_v$	36	2182	26 microsatellites	50	UWCA9-DIK4912	0.001
				$IIA1IAf_g$				4.9	BMS2151	0.018
Kühn et al., 2003	Allemagne	GH	10	TNR_p 90	16	872	8 marqueurs	48	TGLA378-TGLA102	0.041
Schulman et al., 2008	Finlande	FA		TT infertilité	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	145	-	<0.05
				TNR_p 60				68		
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		TT infertilité	36	2182	17 microsatellites	11.1	CSSM38-BMS528	0.027
				$IIA1IAf_v$				90.8	BMS2641-BMS614	0.026

Tableau II-9 (suite)

Etudes	Pays	Race	BTA	Caractère	familles informatives	Individus génotypés	Marqueurs	Position (cM)	Intervalles (longueur)	valeur de p
Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	Suède	SR, SH	11	TNR_v 56	4	417	10 microsatellites	-	INRA177	<0.001
				Nb IA_v	5				ILSTS036	
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		IVIA1	36	2182	14 microsatellites	92.5	HUJV174-TGLA436	0.045
Schulman et al., 2008	Finlande	FA	12	IVIAf	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	47	-	<0.05
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		TNR_v 56	21	2182	6 microsatelllites	40.6	BM6108-BM860	0.018
			13	IVIA1				89.7	BL1071-AGLA232	0.024
Ashwell et al., 2004	EU	H	14	taux de gestation*	1	-	12,5 microsatellites en moyenne	11	(0.27)	<0.01
Schnabel et al., 2005					2		8 microsatellites	60	44-62	<0.05
Schulman et al., 2008	Finlande	FA		TT infertilité	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	67	-	<0.01
				TNR_p 60				29		<0.05
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		TT infertilité	26	2182	10 microsatellites	33.3	RM180	0.035
Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	Suède	SR, SH	15	TNR_v 56	4	417	5 microsatellites	-	NCAM	<0.001
				Nb IA_v	2					
Schulman et al., 2008	Finlande	FA		TT infertilité	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	1	-	<0.05
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH			36	2182	17 microsatellites	98.3	BMS820-BMS927	0.023
Ashwell et al., 2004	EU	H	16	taux de gestation*	1	-	12,5 microsatellites en moyenne	81	(0.21)	<0.01
Schrooten et al., 2000	Pays-Bas		17	IVIA1	20	833	6 microsatellites	0	OARVH98	0.0224
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		TT infertilité	22	2182	11 microsatellites	86.3	BM1862-BM1233	0.007
Kühn et al., 2003	Allemagne	GH	18	TNR_v 90	16	872	7 marqueurs	111	BM2078-TGLA227	0.009
				TNR_p 90				117	TGLA227	0.034
Ashwell et al., 2004	EU	H		taux de gestation*	1	150	12,5 microsatellites en moyenne	54	(0.15)	<0.01
						-		14	(0.21)	
Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	Suède	SR, SH		TNR_v 56	4	417	8 microsatellites	-	BMS2339	<0.001
Schulman et al., 2008	Finlande	FA	19	TT infertilité	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	1	-	<0.05
Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	Suède	SR, SH	20	TNR_v 56	6	417	7 microsatellites	-	BMS1282	<0.001
Schulman et al., 2008	Finlande	FA		IVIAf	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	20	-	<0.05
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		TT infertilité	21	2182	10 microsatellites	64.3	BMS703-BM5004	0.046
Boichard et al., 2003	France	PH MO NO	21	Succès/échec après IA	3	1554	6 microsatellites	56	ILSTS103	0.014

Tableau II-9 (suite)

Etudes	Pays	Race	BTA	Caractère	familles informatives	Individus génotypés	Marqueurs	Position (cM)	Intervalles (longueur)	valeur de p
Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	Suède	SR, SH	22	TT infertilité	3	417	6 microsatellites	-	BM4102	<0.05
								82.9		0.002
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		TNR_g 56	21	2182		43.5	BM1558-BM3628	0.034
			24	Nb IA_v			14 microsatellites	6.2	BMS917	0.016
				IVIA1				30.4	ILSTS065-BMS1862	0.001
Schulman et al., 2008	Finlande	FA	25	IVIAf	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	47	-	<0.01
				TT infertilité				54		
Höglund et al., 2009	Danemark	DH, SH		TNR_g 56	21	2182	6 microsatellites	17.3	ILSTS102-BMS2843	0.012
			26	TT infertilité	36		10 microsatellites	31.7	BMS332-RM026	0.023
				$IIA1IAf_v$				53.7	BMS882-BM804	0.038
				TNR_g 56				45.7	RME40-ODVGA-59	0.041
Ashwell et al., 2004	EU	H	27	taux de gestation*	1	-	12,5 microsatellites en moyenne	62	(0.33)	<0.01
			28					48	(0.16)	
Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	Suède	SR, SH	29	TNR_v 56	2	417	4 microsatellites	-	BMS1600-ILSTS81	<0.001
				Nb IA_v	3				BMS1244-BMC8012	<0.01
Schulman et al., 2008	Finlande	FA		IVIAf	12	493	entre 2 et 14 microsatellites ou SNP	4	-	<0.05
Kühn et al., 2003	Allemagne	GH	X/Y_{ps}	TNR_v 90	16	872	2 marqueurs	5	MAF45-INRA030	0.005

BTA : *Bos Taurus autosome ;* EU : Etats-Unis d'Amérique ; SR : Swedish Red ; SH : Swedish Holstein ; DH : Danish Holstein ; FA : Finnish Ayrshire ; H : Holstein ; GH : German Holstein ; MO : Montbéliarde ; NO : Normande ; PH : Prim'Holstein ; TNR x : taux de non retour suivi du délai d'observation en jour ; Nb IA : nombre d'insémination artificielle ; IVIAf : Intervalle vêlage insémination fécondante ; IVIA1 : intervalle vêlage première insémination ; TT : Traitement ; IIA1IAf : intervalle IA1 insémination fécondante ; indice $_v$: relatif à la vache ; indice $_g$: relatif à al génisse ; indice $_p$: effet paternel ;X/Y_{ps} : relatif à la partie pseudo-autosomal des chromosomes sexuels, * taux de gestation américain correspond au pourcentage de vaches non gestante qui deviennent gestantes tous les 21 jours

Au bilan, les nombreux QTL publiés ne sont généralement pas comparables entre les études. En effet :

- ✓ La faible héritabilité de la fertilité nécessite des tests statistiques à forte puissance pour éviter les faux positifs. Entre deux études et deux méthodes statistiques, la probabilité de détecter le même QTL est faible.
- ✓ Les définitions des caractères, des populations d'animaux et les stratégies d'évaluation des phénotypes varient entre les pays et même parfois entre les études d'un même pays. Ben Jemaa et al. (2008) utilisent dans leur modèle de détection des QTL, des dérivés de valeurs génétiques calculés sur la base des résultats (réussite/échec) à l'IA et corrigés pour les effets environnementaux (Daughters Yield Deviation, DYD) alors que Gautier et al. (2003) et Guillaume et al. (2007) se contentent des performances des individus. Le choix du critère à utiliser lors de la détection de QTL influence le résultat obtenu. Si l'effet du QTL ne correspond pas au caractère utilisé pour la détection, il existe un risque de ne pas le détecter.
- ✓ Le recouvrement du génome et le nombre de marqueurs utilisés varient selon les études. Seules 4 études sur les 8 répertoriées dans le Tableau II-10, couvrent plus de 3 000 cM du génome ce qui correspond à la taille du génome bovin (Schrooten et al., 2000 ; Boichard et al., 2003 ; Kühn et al., 2003 ; Höglund et al., 2009). Les autres ne couvrent pas la totalité du génome bovin. Seules deux études (Ashwell et al., 2004 ; Höglund et al., 2009) ont un espace entre deux marqueurs inférieur à 10 cM : intervalles correspondant encore à plusieurs dizaines de millions de bases et à plusieurs centaines de gènes candidats fonctionnels.

Tableau II-10 Recouvrement du génome par les marqueurs dans les études de primo-détection de QTL de fertilité

Etudes	Couverture du génome en cM	Nb de marqueurs	Espace moyen entre marqueur	Nb moyen de marqueurs par chromosome autosomes)
Ashwell et al., 2004	2713.5	367	7.4	12.7
Höglund et al., 2009	3179	416	7.6	14.3
Schnabel et al., 2005	2291.2	221	10.4	7.6
Schrooten et al., 2000	3179	277	11.5	9.6
Kühn et al., 2003	3132	263	11.9	8.8*
Schulman et al., 2008	2618	171	15.3	5.9
Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	2408	145	16.6	5.0
Boichard et al., 2003	3353	169	19.8	5.8

* le nombre de marqueurs est divisé par 30 car le chromosome sexuel dans sa partie pseudo-autosomale est aussi inclus dans la répartition des marqueurs ; cM : centiMorgan

- ✓ De plus, les QTL de fertilité génisses et vaches pourraient être en partie différents. En effet, les régions chromosomiques détectées comme ayant une influence sur le taux de non retour à 56 jours des vaches et des génisses sont localisées sur des chromosomes différents (tableau 2 ; BTA01, 2, 11, 12, 15, 18, 20, 29 pour les vaches versus BTA09, 22, 25 et 26 pour les génisses ; Holmberg et Andersson-Eklund, 2006 ; Höglund et al., 2009). A la reprise de la lactation, les vaches hautes productrices subissent un déficit énergétique lié aux déséquilibres entre les besoins et les capacités de prise alimentaire que ne connaissent pas les génisses au

moment de la mise à la reproduction. La mobilisation des réserves corporelles maintient la production laitière mais nuit à la fertilité des vaches.

- QTL raffinés publiés

A notre connaissance, seulement 6 chromosomes sur les 28 susceptibles de porter un QTL de fertilité en primo-localisation ont fait l'objet d'une recherche affinée de leur QTL (Tableau II-11). Les études de cartographies fines ont consisté à augmenter le nombre d'individus génotypés en ajoutant des familles informatives, à saturer le génome en marqueur, voire à utiliser des marqueurs SNP très informatifs (Druet et al., 2008) et à utiliser des méthodes de détection du type de l'analyse de liaison complétée d'une étude d'association (LDLA). Les chromosomes 1, 2, 3, 7, 9, 18 ont ainsi été confirmés comme étant porteurs de(s) QTL influençant la fertilité mesurée par le taux de non retour.

En France, le BTA03 a été plus particulièrement cartographié que les autres chromosomes puisque qu'il a été le support de recherche affinée dans trois études françaises (Guillaume et al., 2007 ; Druet et al., 2008 ; Ben Jemaa et al., 2008). En effet, dans leur article, Druet et al. (2008) complètent leur premier raffinement du BTA03 effectué par analyse de liaison, par une analyse LDLA qui montre huit localisations significatives de QTL qui s'étendent sur la région comprise entre 11,5 et 35 cM associée au taux de non retour à 90 jours. Quatre de ces localisations situées à 11,68, 16,87, 23,12 et 25,55 cM seraient les plus intéressantes. Sahana et al. (2010) n'ont pas retrouvé de QTL lié à la fertilité sur cet intervalle génétique du chromosome 3 mais plus loin à 81,3 Mb dans une population de vaches Holstein danoises et suédoises.
Plus récemment, grâce à la commercialisation de la puce comprenant 54 000 SNP répartis sur le génome bovin (BovineSNP50 genotyping BeadChip®, Illumina Inc, San Diego, USA), l'UMR Génétique Animale et Biologie Intégrative de l'INRA a détecté à partir d'un dispositif composé de 1800 taureaux d'IA Holstein des pics significatifs localisant des QTL, sur les chromosomes 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 14, 15, 18, 19 et 28 avec l'index fertilité « vache » et sur les chromosomes 2, 5, 7, 9, 10, 12, 14 et 22 avec l'index fertilité « génisse » (projet CartoFine financé par l'ANR et l'APIS-GENE ; d'après Ben Jemaa, 2009). L''équipe danoise (Sahana et al., 2010) publient dans Animals Genetics leur résultat de l'association entre la localisation des SNP de la puce BovineSNP50 genotyping BeadChip® avec 11 caractères de fertilité femelle. Au total, 36 387 SNP répartis sur les 29 autosomes bovins ont été utilisés. Une forte association ($p<10^{-5}$) entre 5 caractères de fertilité (index de fertilité, IV-IA1, IIA1-IAf, rang d'IAf, traitement pour infertilité) et 24 régions QTL situées sur 13 chromosomes (1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 20, 21, 24, 26) a été identifiée dans une population de vaches Holstein danoises et suédoises.

Tableau II-11 Synthèse des QTL relatifs à la fertilité des vaches laitières localisés par cartographie fine à partir d'un dispositif « petites-filles » et détectés par analyse de liaison

Etudes	Etude de primo-localisation	Pays	Race	BTA	Caractère	Familles informatives	Individus génotypés	Nombre de marqueurs	Position (cM)	Intervalles	valeur de p
Ben Jemaa et al., 2008 et Ben Jemaa, 2009	Boichard et al., 2003	France	PH	1	TNR 90	5	2033	13 microsatellites	97	71-122	<0.009
					TNR 281	4			95.5	DIK4587-BMS4028	<0.019
				2	TNR 56	6	2051		70	DIK2496-BM2113	<0.047
					TNR 90	4			115	DIK4972-IDVGA-2	<0.048
					TNR 281				87		<0.034
Guillaume et al., 2006 et Guillaume et al., 2005	-[a]			3	TNR 56	26	2103	16 microsatellites	26	13-28 cM	<0.05
					TNR 90					-	<0.01
					TNR 282						
Ben Jemaa et al., 2008 et Ben Jemaa, 2009					TNR 90	5	1854	26 microsatellites	25	0-58 cM	<0.015
					TNR 281	-				-	<0.057
Druet et al., 2008					TNR 90	17	926	437 SNP	19.03	15.85-24.82	<0.001
Gautier et al., 2003	Boichard et al., 2003			7	performances de fertilité	29	1554	27 marqueurs	120	ILSTS006-INRA053	<0.05
Guillaume et al., 2006					TNR 282	21	1785	29 microsatellites	107	-	0.05
Holmberg et al., 2007	Holmberg et Andersson-Eklund, 2006	Suède	SH	9	TNR_g 56	5	139	25 microsatellites	-	BMS1724-BM7209	-
Muncie et al., 2006	Ashwell et al., 2004	EU	H	18	taux de gestation*	13	940	12 microsatellites	45	8-74 cM	<0.01

- : non renseigné ; [a]ou issu d'un programme SAM français (Fritz et al., 2003) ; EU : Etats-Unis d'Amérique ; BTA : *Bos Taurus autosome ;* PH : Prim'Holstein ; SH ; Swedish Holstein ; H : Holstein ; TNR x : taux de non retour suivi du délai d'observation en jour ; indice $_g$: relatif à la génisse ; * taux de gestation américain correspond au pourcentage de vaches non gestante qui deviennent gestantes tous les 21 jours

A notre connaissance, encore aucun gène candidat identifié à partir des QTL affinés n'a fait l'objet d'une publication. Les intervalles de localisation des QTL restent encore trop larges pour les caractères à faible héritabilité. Ils contiennent encore des centaines de gènes. Le raffinement des QTL de fertilité reste encore d'actualité. Malgré l'utilisation d'outils génétiques similaires et la saturation du génome avec la puce 54K SNP, les QTL identifiés entre les équipes sont encore différents. En plus des animaux, les critères phénotypiques utilisés varient entre pays. La précision des phénotypes et leur pertinence biologique pourrait être la clé de l'identification des gènes responsables de la fertilité femelle. Les seules données de non retour en chaleurs à différents intervalles restent grossières pour affiner la définition de la fertilité car elles recouvrent des événements physiologiques très différents du développement du conceptus (fécondation, vie embryonnaire, vie fœtale). Actuellement tous ces évènements sont confondus dans la composante fertilité estimée à partir de la seule analyse des taux de non retour. Associer les données de non retour avec des analyses hormonales à des moments opportuns, permettrait de distinguer l'apparition des échecs de la gestation lors de périodes stratégiques.

Une composante génétique module la fertilité des vaches laitières :

- directement, via les accidents caryotypiques létales pour l'embryon, ou la transmission d'un génotype favorable ou défavorable (QTL de fertilité)
- Indirectement par la sélection des animaux sur le potentiel laitier antagoniste avec les performances de reproduction.

III.2.1.4 Stratégie de maîtrise

❖ **Prise en compte de la fertilité dans les objectifs actuels de sélection en France (et en Europe)**

- Modèle d'évaluation génétique en France

La création d'index génétique nécessite de définir le ou les caractère(s) à sélectionner. Le taux de réussite à l'IA chez la femelle en postpartum a été choisi comme caractère de fertilité femelle à inclure dans les objectifs de sélection (Boichard et al., 1998b). A partir des dates d'IA et de vêlage, il est possible de déterminer pour chaque IA son résultat : fécondante ou non fécondante. Depuis juin 2010, de nouveaux critères sont utilisés pour les taureaux des races Montbéliarde, Normande et Holstein, il s'agit du taux de réussite à l'IA des génisses et de l'intervalle vêlage-première IA (Institut de l'Elevage et INRA, 2010b).

Depuis juin 2007, le modèle d'évaluation génétique utilisé en France est un modèle animal dans lequel les valeurs génétiques des mâles et des femelles sont estimées simultanément en prenant en

compte l'ensemble des apparentés. L'évaluation génétique de la fertilité est réalisée en plusieurs étapes (Barbat et al., 2008) :

L'évaluation génétique mono-caractère :

Il s'agit de l'analyse des résultats de chaque IA séparément pour les génisses et pour les vaches enrichie d'effets aléatoires (effets génétiques de chaque femelle, environnement, interaction taureau d'insémination x année) et d'effets fixes avec de nombreuses interactions (troupeau x année, inséminateur x année, mois x région x année, jour de la semaine x région x année, âge à l'IA pour les génisses, intervalle vêlage insémination x rang de vêlage, race du taureau, rang du vêlage précédent l'IA et % de consanguinité de la vache et du veau à naître). Les index élémentaires « fertilité génisse » et « fertilité vache » sont obtenus à l'issu de ce modèle.

L'évaluation génétique multi-caractère :

Cette évaluation permet de combiner les informations concernant la fertilité des génisses, la fertilité des vaches et les informations sur des caractères supplémentaires utilisés comme prédicteurs : les cellules, la longévité fonctionnelle, la vitesse de traite et six postes de morphologie propre à la race. La production laitière est aussi intégrée du fait de sa corrélation négative avec la fertilité. Cette prise en compte dans l'évaluation de l'index limite ainsi un biais sur les index de fertilité. Au final, c'est l'index « Fertilité Combinée Vache » issu de cette deuxième étape qui est diffusé officiellement en France.

Cet index est exprimé en unités d'écart-type génétique. Sa variabilité génétique est de 7 % de taux de réussite à l'IA, un écart d'un point d'index entre deux taureaux correspond à une différence espérée de 3,5 % de taux de réussite de leurs filles.

- Objectifs de sélection en France et aperçu en Europe

L'évolution des index génétiques moyens des taureaux d'IA pour les caractères de fertilité génisse combinée et de fertilité vache combinée en race Holstein, illustre la dégradation génétique du taux de réussite à l'IA (Figure II-17). Ces index n'ont cessé de diminuer de 1990 jusqu'à 2000. Jusque dans les années 90, la sélection s'est surtout concentrée sur l'augmentation des quantités de lait et de matière utile. Il faut attendre juin 1998 pour que la « contre-sélection » génétique sur la fertilité soit prise en compte grâce à la publication des index génétiques de fertilité des taureaux (Boichard et al., 1998b). En répercussion, les index mâles des animaux nés à partir de 2000 sont meilleurs que ceux de leurs parents. Il a été et il est nécessaire de prendre en compte de façon importante le caractère de fertilité dans les objectifs de sélection.

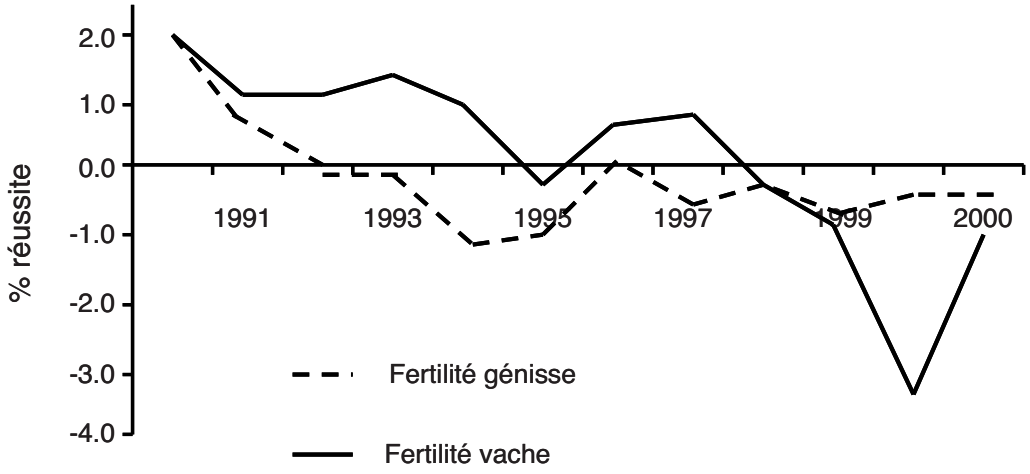


Figure II-17 Evolution (en % de réussite à l'IA des filles) de l'index moyens des taureaux d'IA Holstein par année de naissance pour les caractères de fertilité (d'après Barbat et al., 2007)

Dès 2000 pour le Danemark et l'Allemagne, la France en 2001, (IE et INRA, 2001) et les autres pays ont commencé à intégrer dans l'index de mérite global (IMG) ou ISU (index Synthétique UPRA) en France les caractères de fertilité (Figure II-18). La France arrive en deuxième position des pays européens avec un poids de la fertilité accordé dans l'ISU de 12,5 %. Les Pays-Bas arrivent en tête avec une pondération de fertilité égale à 16 %. L'IMG est le reflet des principaux objectifs de sélection d'une race dans un pays.

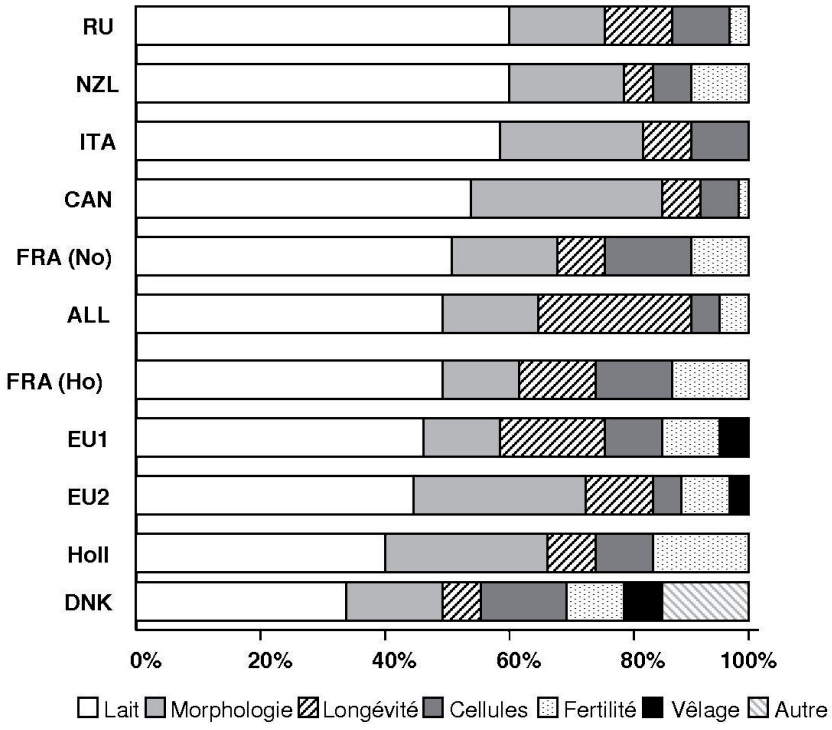


Figure II-18 Poids relatif accordé aux caractères de sélection, dont la fertilité en France et dans d'autres pays. Situation en 2007 (d'après Minery, 2007)

La prise en compte de façon importante du caractère de fertilité dans les objectifs de sélection laisse entrevoir déjà des améliorations (Figure II-19). A partir de 2004, la réussite à l'IA1 des vaches Holstein a cessé de se dégrader (Figure II-9 ; Le Mézec et al., 2010a), conséquence, en partie, de l'amélioration de la valeur génétique des animaux.

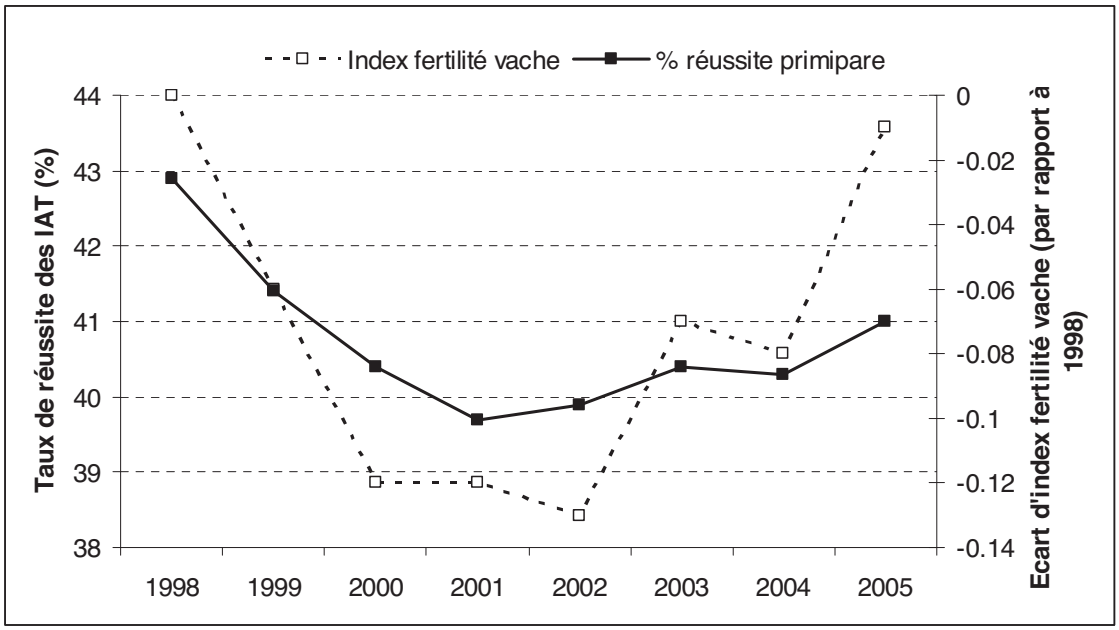


Figure II-19 Taux de réussites des inséminations artificielles totales (IAT) et niveau génétique des primipares de race Holstein par année de naissance, en écart à 1998 (d'après LeMézec et al., 2010b)

La France n'a pour l'instant intégré dans l'ISU que l'index de fertilité combiné basé sur le taux de réussite à l'IA des génisses et des vaches. Or, le TRIA n'est pas le seul critère à prendre en compte dans la recherche de l'amélioration de la fertilité des vaches laitières. En particulier, les difficultés de reprise de la cyclicité ou des modifications des manifestations des chaleurs interviennent dans la dégradation de la fertilité. Aujourd'hui, un index intégrant l'intervalle vêlage première insémination est publié (Institut de l'Elevage et INRA, 2010b).

- Application de la cartographie de QTL : la sélection assistée par marqueur et sélection génomique

Bien que la localisation des QTL ne permet pas de déterminer la nature du gène responsable ni son mode d'action, elle présente divers avantages décisifs : elle facilite considérablement la recherche ultérieure d'un gène candidat et même si le gène impliqué reste inconnu, sa localisation par marqueurs permet son utilisation en sélection.

La Sélection Assistée par les Marqueurs (SAM) est la méthode génomique de sélection des taureaux développée depuis 10 ans, destinée à remplacer la sélection classique par testage sur descendance. Elle s'est appuyée sur la détection, dans le génome, des régions QTL des caractères à sélectionner. La valeur génétique d'un reproducteur est alors estimée selon une méthodologie permettant d'évaluer conjointement l'effet de la composante génomique (égale à la somme des effets des haplotypes des

différents QTL) et l'effet de la composante polygénique restante. Ainsi, il est possible d'estimer une valeur génétique pour un animal (Anonyme, 2009) :

- dès sa naissance (voire au stade embryon),
- pour un caractère qui ne s'exprime pas forcément chez lui (production de lait pour un mâle, fertilité pour une nullipare),
- avec une précision bien meilleure que celle obtenue en utilisant les autres informations disponibles (performances et généalogies) au même âge

Très rapidement et grâce à l'explosion des progrès réalisés sur les outils à disposition des généticiens, les QTL à caractère fort ne sont plus seulement pris en compte mais l'ensemble de la variabilité génétique y compris celle due aux petits QTL, il s'agit de la sélection génomique (Guillaume et al., 2009 ; Fritz et al., 2010). Le gain en efficacité pour les programmes de sélection est lié d'une part à un raccourcissement de l'intervalle entre générations (utilisation précoce des meilleurs jeunes comme pères ou mères à taureaux) et d'autre part au considérable gain de précision des valeurs génétiques estimées pour les femelles (ouverture de la sélection génomique aux femelles courant 2011), qui n'était pas possible sur une génération en testage classique, la fertilité étant un caractère qui s'exprime tardivement dans la vie d'une femelle, à faible héritabilité et très influencée par l'environnement.

La composante génétique relative à la réussite après insémination expliquerait 35 à 40 % de la dégradation de la fertilité des vaches Holstein observée phénotypiquement (Barbat et al., 2010). Les outils génétiques de maîtrise tels que la sélection classique sur descendance et la sélection à l'aide des marqueurs génétiques (SAM et sélection génomique) tendent aujourd'hui à corriger la dégradation de la fertilité des vaches laitières. L'intégration dans l'ISU des caractères de fertilité laisse entrevoir des améliorations que l'on espère confirmées dans un futur proche. Du fait de leur faible héritabilité, les caractères de fertilité sont difficiles à améliorer par le biais de la sélection classique. Le recours à l'information génomique ouvre alors de nouvelles perspectives. Les effets attendus de la sélection sur les caractères de reproduction à l'aide de marqueurs génétiques de plus en plus précis et performants seront notoires et pérennes dès l'intégration en routine dans les schémas de sélection. La SAM est déjà valorisée avantageusement pour les caractères laitiers. La sélection génomique pour les index mâles est maintenant à la disposition des éleveurs et des professionnels. Cependant, la faible héritabilité du caractère fertilité souligne l'importance de la maîtrise des facteurs d'environnement et de la conduite des élevages pour un meilleur contrôle de la reproduction.

III.2.2 Deuxième facteur : Anomalie de la reprise de la cyclicité postpartum

III.2.2.1 Physiologie de la reprise de la cyclicité ovarienne après vêlage

Entre le 45ème et le 150ème jour de vie fœtale de la future génisse, les ovocytes I bloqués en prophase I de méiose issus des ovogonies (ou cellule germinale femelle) sont entourés de quelques cellules folliculaires et forment ainsi les follicules primordiaux. A la naissance de la génisse, ce stock de follicules primordiaux, 235 000 en moyenne, représente plus de 95 % de la population folliculaire ovarienne (Driancourt, 2001).

❖ **Activité ovarienne basale et cyclique**

Chaque jour, environ 80 follicules primordiaux débutent leur croissance par la multiplication des cellules folliculaires et le développement de l'ovocyte (Mialot et al., 2001). Plus de 99 % des follicules primordiaux subiront l'atrésie (Driancourt et al., 2001), c'est à dire la régression jusqu'à la disparition complète dans le stroma ovarien.

Cette croissance folliculaire se déroule en deux périodes (Figure II-20): la phase de croissance continue, dite croissance basale est suivie d'une phase de croissance cyclique, dite croissance terminale.

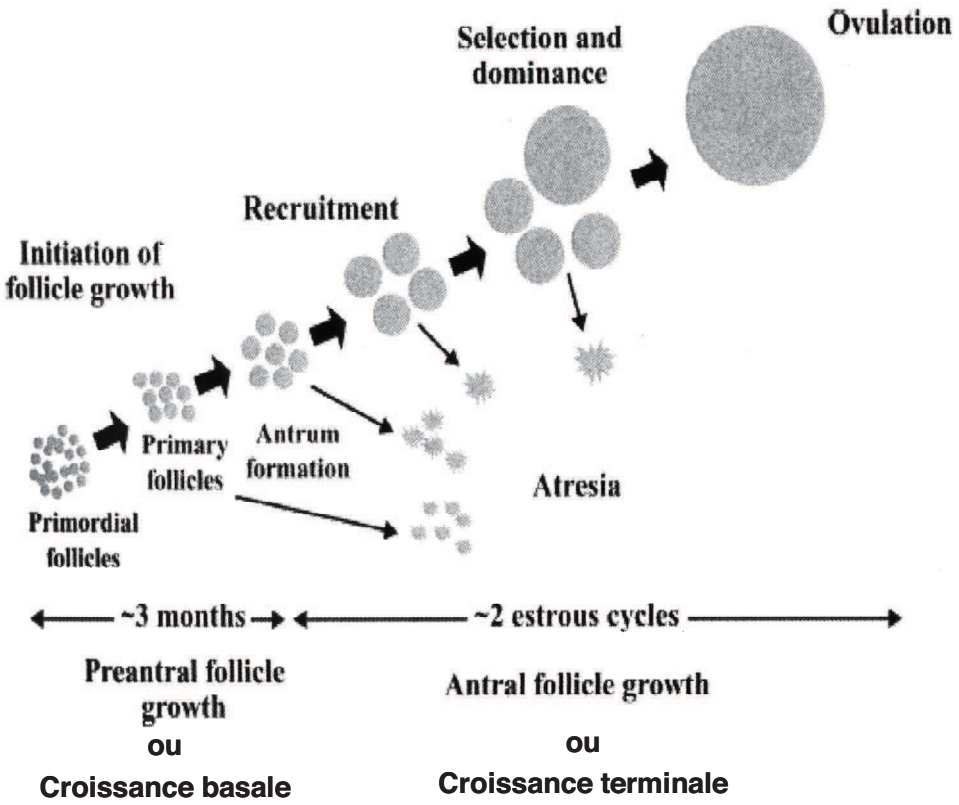


Figure II-20 Croissance folliculaire basale et terminale (d'après Webb et al., 2004)

- Phase de croissance basale (pour revue Fortune, 2003)

Cette période s'étend sur 2 à 5 mois depuis le développement du follicule primordial jusqu'au stade préantral (follicule secondaire ; Drion et al., 1996 ; Webb et al., 2004). Le follicule primordial au repos est formé d'un ovocyte entouré d'une seule couche de 4 à 8 cellules et d'une lame basale (Figure II-21 et Tableau II-12). L'activation de la croissance folliculaire est caractérisée par l'acquisition d'une couche complète de cellules cuboïdales autour de l'ovocyte : c'est le follicule primaire. Le follicule secondaire préantral est caractérisé par une 2ème couche de cellules de granulosa et la formation de la zone pellucide et des thèques. Pendant cette période l'ovocyte augmente de taille, parallèlement à la croissance folliculaire.

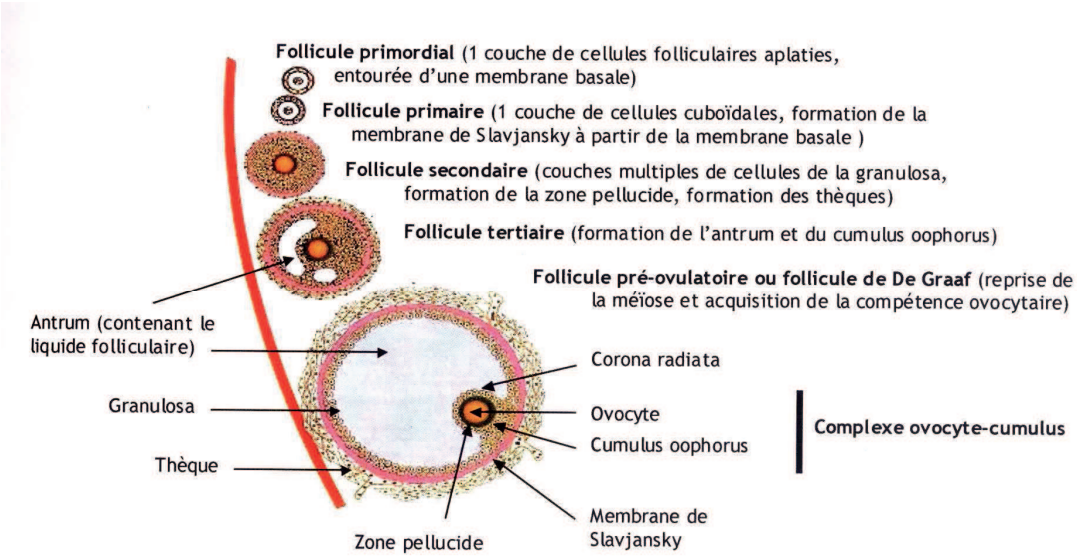


Figure II-21 Evolution morphologique du follicule au sein du stroma ovarien (d'après Drion et al., 1996 ; modifié par Fréret, 2007)

Tableau II-12 Principales caractéristiques du follicule bovin aux différents stades de son développement (d'après Drion et al., 1996)

stade folliculaire	nombre de cellules folliculaires	structures en formation	diamètre folliculaire (µm)	diamètre ovocytaire (µm)
• primordial	• 30 cellules aplaties	• membrane basale	30-50	20-35
• primaire	• une couche de cellules (27-58) cuboïdales	• membrane de Slavjanski	40-60	30-40
• secondaire	• couches multiples de cellules	• zone pellucide, • thèques	200-300	60
• tertiaire	• couches multiples de cellules	• *Cumulus oophorus*		100-130
• stade préovulatoire ou de "de Graaf"	• couches multiples de cellules • différenciation des cellules folliculaires en cellules de granulosa et *cumulus*	• acquisition de la compétence ovocytaire, • reprise de la méiose	2.10^4	150

- Phase de croissance terminale (pour revue : Chastant-Maillard et al., 2005 ; Mihm et al., 2002)

La phase de croissance terminale qui conduit le follicule secondaire ou préantral jusqu'à l'ovulation est plus courte et ne dure que quelques jours.

Le passage au follicule tertiaire est caractérisé par la prolifération des cellules et la différenciation des thèques interne et externe, de la lame basale et par la formation de la cavité antrale contenant le liquide folliculaire. Dans ces follicules antraux qui atteignent 3 mm de diamètre, l'ovocyte arrête sa croissance, il est alors enfermé dans le cumulus-oophorus qui le relie à la granulosa (Figure II-21, Tableau II-12, Figure II-22).

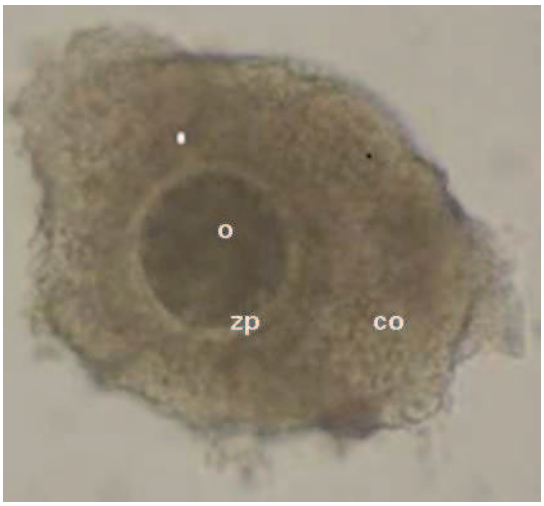


Figure II-22 Photo d'un ovocyte (o) de vache entouré de son cumulus oophorus (co) (photo tirée de Marquant-Le Guienne, 1998) ; zp : zone pellucide

La croissance s'accélère pour le follicule antral. Cette croissance finale s'effectue sous forme de vagues d'une durée 4 à 5 jours chez la vache, dont l'existence n'a été démontrée que relativement récemment grâce à l'échographie (Ireland et al., 2000 ; Mihm et al. 2002 ; Evans, 2003). Chaque vague commence par trois phases : recrutement, sélection et dominance (Figure II-23). Un groupe d'une quinzaine de follicules est recruté à partir d'un groupe de follicules tertiaires d'une taille d'environ 2 à 3 mm. Deux ou 3 follicules sont alors sélectionnés à partir de la cohorte initiale. Puis, seul un follicule dit ''dominant'' atteindra 15 à 20 mm et sera susceptible d'ovuler ou de s'atrésier. Son devenir dépend de la présence d'un corps jaune issu de la lutéinisation des cellules d'un follicule dominant qui a ovulé lors d'une vague précédente.

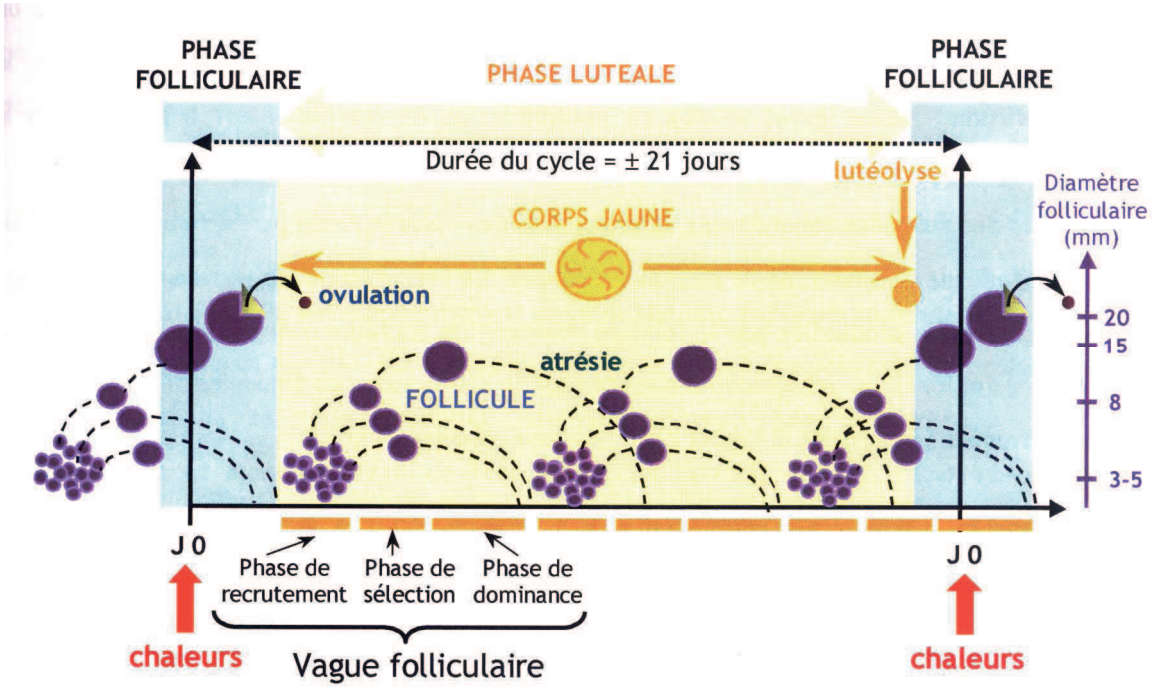


Figure II-23 Schématisation des vagues folliculaires au cours du cycle œstral (d'après UP de Reproduction ENVA)

- Le cycle œstral

Le cycle œstral est défini comme étant l'ensemble des modifications comportementales, anatomiques et physiologiques traduisant les modifications cycliques de l'ovaire. Il dure en moyenne 21 jours (de 18 à 25 jours) et comporte une alternance d'une phase folliculaire de 4 jours (de 2 à 7 jours), correspondant à la dernière vague folliculaire aboutissant à l'ovulation du follicule dominant et d'une phase lutéale de 17 jours (13 à 19 jours) (Royal et al., 2000 ; Driancourt et Levasseur, 2001 ; Figure II-23), qui empêche toute ovulation du follicule dominant issu des vagues folliculaires qui persistent pendant cette phase lutéale. Par convention, le cycle œstral débute au moment du comportement de chaleurs (ou œstrus) de la vache, période d'acceptation de la saillie, c'est à dire juste avant l'ovulation qui a lieu en moyenne 24 à 27 heures après la détection des chaleurs de la vache (Saint-Dizier, 2005).

❖ **Régulation hormonale du cycle sexuel (pour revue : Webb et al., 2004)**

Les facteurs de croissance semblent être indispensables pour l'initiation et la croissance folliculaire, tandis que les gonadotropines sont essentielles au cours du stade terminal de la croissance folliculaire. Bien que secondaire, les uns et les autres jouent aussi un rôle pendant toute la période de croissance folliculaire.

- La phase de croissance basale est non gonado-dépendante

La croissance folliculaire dépend fort probablement des interactions cellulaires entre l'ovocyte et les cellules de la granulosa et de la sécrétion des facteurs locaux (exemples chez la vaches et la brebis :

les membres du systèmes IGF, IGF-1, IGF-2 et les IGFBP (Binding proteins), le TGFβ (Transforming growth factor β), l'inhibine, l'activine, la follistine, l'EGF (Epidermal growth factor) ou les FGFs (Fibroblast growth factors)…(McNatty et al, 2003 ; Knight and Glister, 2001 ; Armstrong et al., 2002 ; Smitz et Cortvindt, 2002 ; Webb et al., 2004 ; Figure II-24). Pour exemple de l'action des facteurs de croissance, *in vitro*, l'IGF-1 et l'EGF stimuleraient la croissance des follicules préantraux (Gutierrez et al., 2000 ; Saha et al. 2000) alors que le rôle des IGFBP serait de maintenir un taux optimum d'IGF-1 pour la croissance du follicule et de l'ovocyte sans pour autant initier cette croissance (Webb et al., 2004).

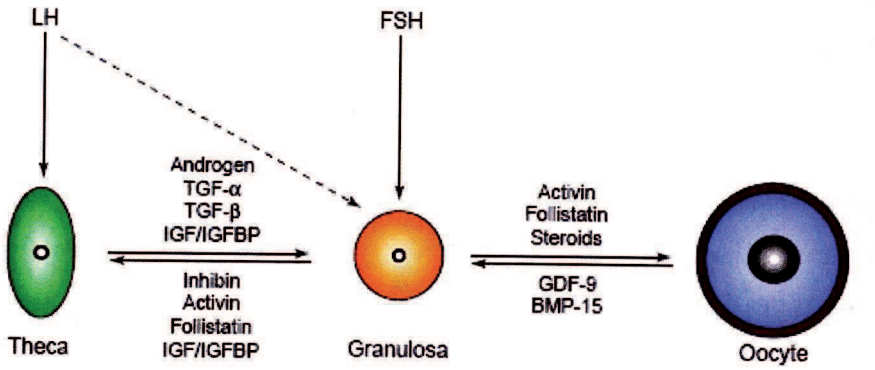


Figure II-24 Schématisation de la communication intercellulaire entre les trois principales cellules du follicule ovarien et les facteurs responsables de la croissance folliculaire (d'après Knight et Glister, 2001) ; BMP-15: bone morphogenetic protein 15; GDF-9: growth and differentiation factor 9; IGF: insulin-like growth factor; IGFBP: insulin-like growth factor-binding proteins

Les gonadotropines ne seraient probablement pas essentielles à l'initiation de la croissance folliculaire mais la FSH pourrait cependant accélérer le rendement de développement des follicules préantraux (Campbell et al., 2000).

- La phase de croissance terminale est gonado-dépendante (pour revue : Lucy, 2007)

Les follicules antraux d'au moins 2 à 3 mm de diamètre sont sous le contrôle des hormones gonadotropines (Campbell et al., 1995) et sont susceptibles d'être recrutés pour débuter une vague folliculaire. Le recrutement est précédé d'une montée transitoire de la FSH pendant 1 à 2 jours (Mihm et al., 2002). La FSH va induire l'apparition de l'activité aromatase des cellules de la granulosa, permettant la synthèse d'œstradiol à partir des androgènes de la thèque (Figure II-25).

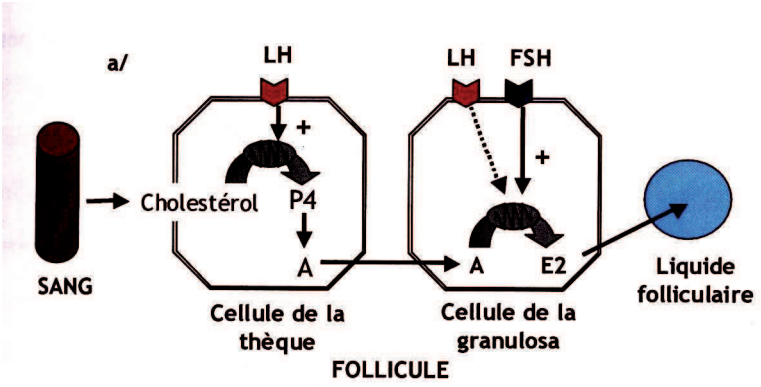


Figure II-25 Schématisation de la stéroïdogenèse folliculaire (d'après Leymarie et Martal, 2001 ; d'après Robel 2001) A= androgènes ; E2= œstradiol

L'œstradiol exerce tout d'abord un rétrocontrôle positif sur la production de GnRH. Puis, alors que l'augmentation de la fréquence des pulses de LH accélère la sécrétion d'œstradiol et d'inhibine, ces derniers vont exercer un rétrocontrôle négatif sur les pulses de GnRH, et diminuent la sécrétion de FSH sans modifier la fréquence des pulses de LH. La sécrétion de FSH baisse donc, jusqu'à des niveaux inférieurs aux besoins des follicules. L'IGF-1 agit en synergie avec la FSH pour stimuler l'activité aromatase (Driancourt, 2001) et la croissance folliculaire.

Tandis que ces follicules qui ont participé au recrutement sont FSH-dépendant, le follicule dominant sélectionné (diamètre > 8 mm) acquiert des récepteurs à la LH sur ses cellules de la granulosa et des thèques ce qui le rend spécifiquement dépendant à la LH qui va se subsister à la FSH pour assurer la croissance terminale. Il continue sous l'effet de la LH à croître, et à produire en quantité de l'œstradiol et de l'inhibine, qui maintiennent des concentrations basses en FSH et empêche la croissance des follicules subordonnés qui s'atrésient. Simultanément à l'apparition des récepteurs à la LH, les concentrations d'IGF-1 augmentent dans le liquide folliculaire, probablement en synergie avec la dégradation des IGFBP (Beg et Ginther, 2006). Par exemple, les concentrations en IGFBP-2 et IGFBP-4 diminuent dans le liquide folliculaire pendant la croissance folliculaire et augmentent pendant l'atrésie, permettant respectivement une augmentation ou une diminution de la biodisponibilité de l'IGF-1 dans le follicule (Mazerbourg et al., 2003).

Une fois que le follicule dominant LH-dépendant atteint 15 à 20 mm de diamètre, soit il ovulera soit il s'atrésiera pour laisser place à une nouvelle vague folliculaire (Figure II-26). Durant cette période, les facteurs de croissance (IGF-1) et la décharge ovulatoire (augmentation de la fréquence et de l'amplitude de la LH) empêchent l'apoptose des cellules de la granulosa du follicule dominant (Quirk et al., 2004). Le follicule pourra alors libérer l'ovocyte suite à la décharge gonadotrope ovulante (pic de LH). L'ovocyte compétent reprend alors sa méïose jusqu'à la métaphase II (pour revue : Mermillod, 2001).

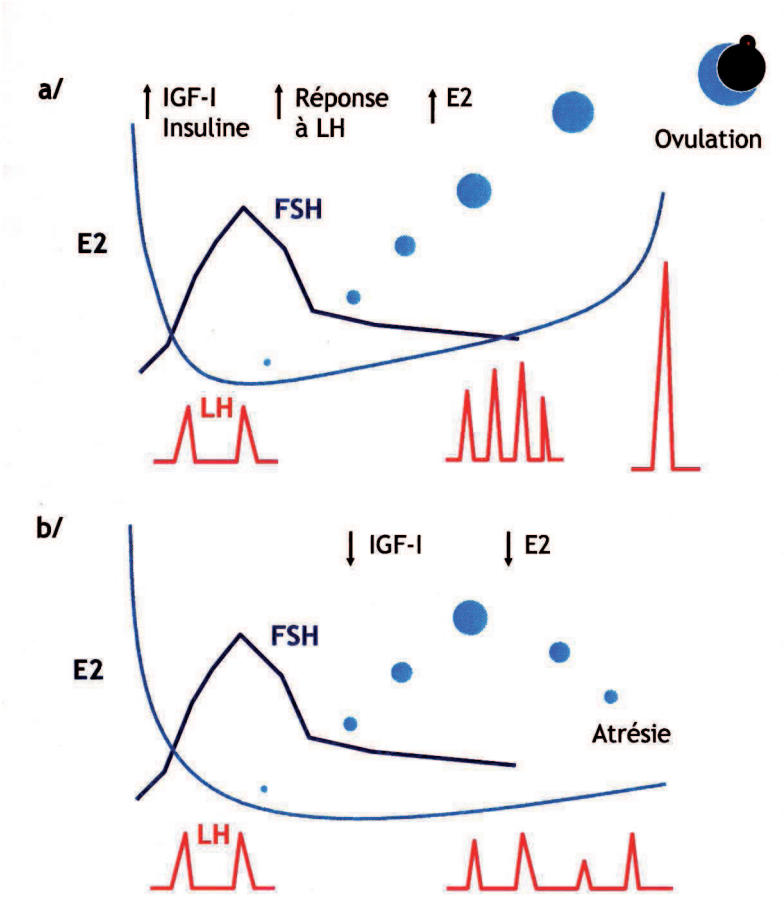


Figure II-26 Devenir du follicule dominant et rôle des facteurs de croissance et des gonadotropines (d'après Beam et Butler, 1999) ; a/ lors de l'ovulation et b/ lors de l'atrésie folliculaire

- Bilan des régulations hormonales au cours du cycle œstral

La vache se trouve en permanence en phase de croissance folliculaire, soit sous l'influence de la progestérone sécrétée par le corps jaune, c'est la phase lutéale du cycle œstral, soit libérée de cette influence, c'est la phase folliculaire qui se termine par l'ovulation du follicule dominant et sa lutéinisation.

La régulation hormonale du cycle œstral met en jeu l'axe hypothalamo-hypophysaire et l'appareil génital (ovaire et utérus). Les régulations hormonales de la phase folliculaire ont particulièrement été décrites dans le paragraphe ci-dessus. Nous nous intéresserons maintenant aux régulations lors de la phase lutéale, c'est à dire lors de la présence du corps jaune sécrétant la progestérone.

Le corps jaune (CJ) issu de la lutéinisation du follicule dominant est constitué de grandes cellules issues de la granulosa et des petites provenant de la thèque interne. Il se développe sous l'influence trophique de la LH et de la prolactine d'origine hypophysaire. Il sécrète essentiellement de la progestérone, mais aussi des œstrogènes, de la relaxine et de l'ocytocine (Mialot et al., 2001). La formation du CJ sécrétant la progestérone marque le début de la phase lutéale. La progestérone exerce un rétrocontrôle négatif sur la pulsatilité de LH qui est faible. L'évolution du CJ chez la vache

se réalise en trois temps : une période de croissance de 4 à 5 jours, au cours de laquelle il est insensible aux prostaglandines F2α ; un temps de maintien de l'activité pendant 8 à 10 jours ; enfin, en l'absence de fécondation, une période de lutéolyse, vers le 17ème 18ème jour du cycle aboutissant à un reliquat ovarien. L'endomètre utérin secrète la PGF2α qui va induire la régression du CJ et provoquer la chute de la progestérone. En 24 heures, les concentrations en progestérone plasmatique deviennent inférieures au seuil d'inhibition des pulses de LH, le rétrocontrôle négatif est levé progressivement, le follicule dominant de la vague folliculaire en cours peut ovuler (Figure II-27).

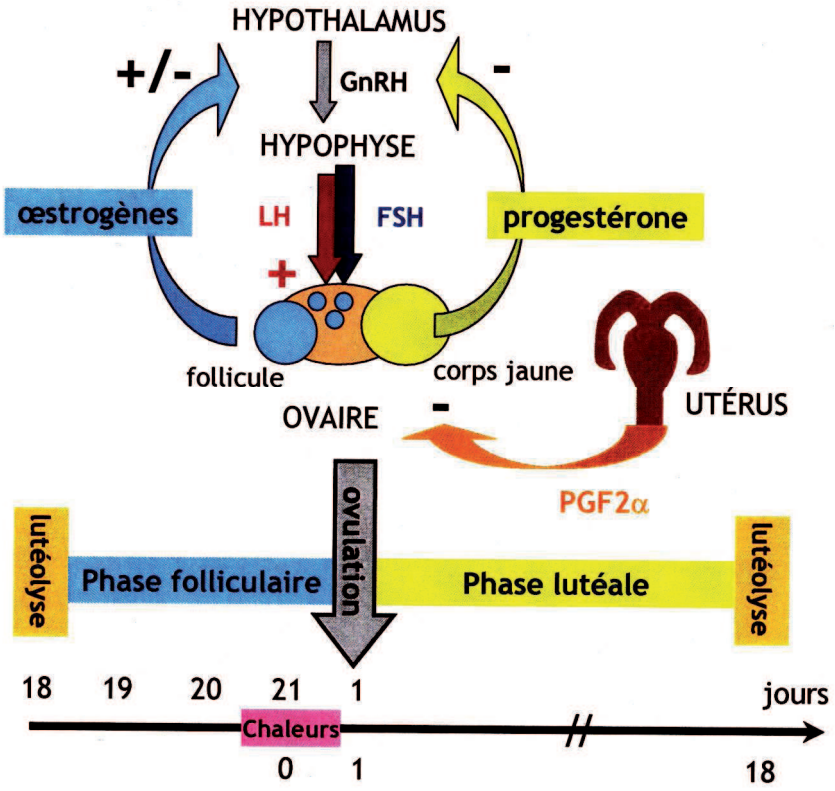


Figure II-27 Régulation neuro-endocrinienne de la vache lors de son cycle sexuel (d'après UNCEIA Groupe Fertilité Femelle, 2006)

❖ **Reprise de l'activité sexuelle après le vêlage (Short et al., 1990 ; Roche et Diskin, 2001 ; Rhodes et al., 2003 ; Grimard et al., 2005)**

En fin de gestation les concentrations en gonadotropines sont très basses, du fait du rétrocontrôle négatif des fortes concentrations en progestérone. Après le vêlage, la progestéronémie chute ce qui lève le rétrocontrôle sur les gonadotropines. Les concentrations en FSH sont les premières à augmenter rapidement en 5 à 10 jours. Les vagues de croissance folliculaire recommencent alors. Il n'est d'ailleurs pas certain qu'elles s'arrêtent totalement au cours de la gestation (Ginther et al., 1989 ; Taylor et Rajamahendran, 1991). La LH commence à augmenter 10 à 20 jours après le vêlage. Les premiers pulses de LH sont généralement détectés dans cet intervalle chez la vache laitière. Un premier follicule de plus de 10 mm de diamètre peut être détecté dès la première semaine après vêlage (entre 5 et 39 jours, 11,6 ± 8,9 jours en moyenne n=19, Savio et al., 1990). Ce premier follicule

dominant peut ovuler, devenir atrésique pour laisser la place à une nouvelle vague de croissance folliculaire, ou devenir kystique (Savio et al., 1990).
La première ovulation a lieu chez la vache laitière au cours des premières semaines suivant le vêlage, entre 15 et 42 jours (pour revue : Butler et Smith, 1989 ; Royal et al., 2000), ou autour du 15ème jour pour des vaches laitière sans stress alimentaire (Crowe, 2008). Des études récentes montrent que 85 à 90 % des vaches ont ovulé dans les cinquante jours qui suivent le vêlage (Lopez-Gatius et al., 2002 ; Disenhaus et al., 2003).

III.2.2.2 Caractérisation des anomalies de reprise de cyclicité

❖ **Définitions**

Après le vêlage, dans des conditions optimales, lors de la croissance folliculaire, la sélection puis la dominance d'un follicule ovarien s'achève par l'ovulation de l'ovocyte mature. La lutéinisation du follicule puis la lutéolyse permettent une nouvelle ovulation, bouclant le cycle de rétablissement de l'activité ovarienne postpartum. Si ce cycle est perturbé la reprise de l'activité ovarienne est modifiée. La période d'inactivité ovarienne ou anœstrus postpartum se définit comme l'intervalle entre le vêlage et la première ovulation. Ce moment peut être estimé par l'augmentation de la concentration en progestérone qui correspond à l'apparition du corps jaune sécrétant.

La réalisation de dosages fréquents de progestérone dans le lait ou le plasma sanguin, deux ou trois fois par semaine, permet de suivre le profil de rétablissement de l'activité sexuelle cyclique après vêlage (Tableau II-13).

Tableau II-13 Méthodes de suivi des profils de reprise de l'activité sexuelle postpartum chez les vaches laitières

Etudes	Fréquence de prélèvement	Techniques	Type de prélèvement	Seuil de positivité	Définition du début de la phase lutéale
Fréret et al., 2005	Une fois par semaine	ELISA	lait	>3,5ng/mL	Nr
Lamming et Bulman, 1976	Deux fois par semaine	RIA		nr	
Bulman et Lamming, 1978				>3ng/mL	
Bulman et Wood, 1980					
Opsomer et al., 1998 ; 2000			crème	>15ng/mL	
Fahey et al., 2005			plasma	>1,0ng/mL	au moins 2 prélèvements consécutifs ≥ seuil
Konigsson et al., 2008				≥1nmol/L	au moins 3 prélèvements consécutifs > seuil
Fagan et Roche, 1986		EIA	lait	>5ng/mL	au moins 2 prélèvements consécutifs > seuil
Huszenicza et al., 1988				>1,6nmol/mL	Nr
Shrestha et al., 2004a ; 2004b ; 2005		ELISA		≥1ng/mL	au moins 2 prélèvements consécutifs ≥ seuil
Petersson et al., 2006		3 tests		3 seuils	1er prélèvement > seuil
Taylor et al., 2003	Trois fois par semaine	RIA		>3ng/ml	
Pushpakumara et al., 2003					
Lamming et Darwash, 1998					au moins 2 prélèvements consécutifs > seuil
Nakao et al., 1991		EIA		>1,0ng/mL	au moins 5 j consécutifs > seuil
El-Din Zain et al., 1995					
Hommeida et al., 2005				0,5ng/mL	au moins 3 prélèvements consécutifs > seuil
Horan et al., 2005				≥3ng/mL	au moins 2 prélèvements consécutifs ≥ seuil
Samarutel et al., 2008				>5ng/mL	1er prélèvement > seuil
Kerbrat et Disenhaus, 2000		ELISA			
Disenhaus et al., 2002					
Royal et al., 2000				>3ng/ml	au moins 2 prélèvements consécutifs ≥ seuil

RIA : RadioImmunoAssay ; EIA : EnzymoImmunologiqueAssay ; ELISA : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay ; nr : non renseigné

Une phase lutéale correspond à la période où la concentration en progestérone dans le plasma ou le lait, est supérieure à une valeur seuil, préalablement définie. Le début et la fin d'une phase lutéale définis à partir des données de progestérone dépendent de la fréquence de prélèvements réalisés, de la valeur seuil de l'analyse de progestérone, de la définition d'un prélèvement positif ; ce qui fait varier artificiellement la durée de la phase lutéale en fonction des études. Cette définition n'est d'ailleurs pas clairement énoncée par tous les auteurs. Les paramètres de reproduction mesurés en utilisant les profils de progestérone permettent de définir les anomalies de cyclicité. Ces paramètres sont des intervalles définis par la Figure II-28 (adaptée d'Horan et al., 2005).

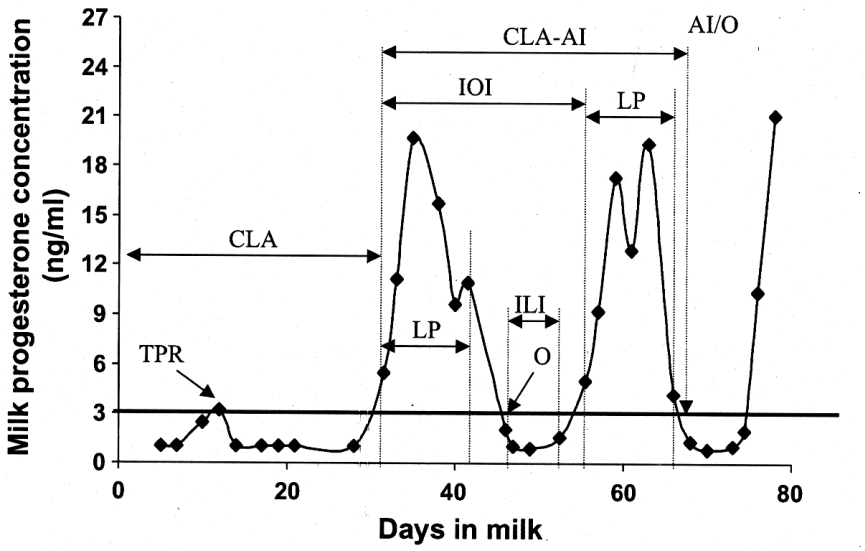


Figure II-28 Schématisation de l'évolution de la concentration de progestérone dans le lait d'une vache après le vêlage et paramètres de reproduction définis à partir du profil de progestérone (d'après Horan et al., 2005) ; CLA :commencement of luteal activity; TPR :transient progesterone rate; AI :artificial insemination; LP :luteal phase; IOI : inter-ovulatory interval; ILI : inter-luteal interval ; O : œstrus

CLA ou 'commencement of luteal activity' correspond à l'intervalle entre le vêlage et la première apparition significative de progestérone, c'est la période qui précède la reprise de l'activité lutéale. Cet intervalle permet de déterminer s'il y a un retard de reprise de cyclicité.

LP ou 'luteal phase' correspond à l'intervalle entre le début de la mise en évidence de la progestérone secrétée par le corps jaune et la fin. Cette période permet de déterminer si la longueur de la phase lutéale est modifiée.

IOI ou 'inter-ovulatory interval' correspond à l'intervalle entre deux augmentations de progestérone. Il permet de déterminer la durée du cycle, s'il y a ou non une interruption de cyclicité.

La majorité des auteurs ont adapté les critères de Lamming et Darwash (1998) ou d'Opsomer et al. (1998, 2000) pour classer les profils de progestérones en normaux ou anormaux. Ces critères sont présentés dans le Tableau II-14.

Tableau II-14 Classification des profils de reprise d'activité ovarienne postpartum (pp) chez la vache laitière selon 1 : Lamming et Darwash (1998) et 2 : Opsomer et al. (1998, 2000)

Catégories d'activité ovarienne	Définition selon 1	Définition selon 2
Activité normale	Un cylcle dure 20,94±3,48 jours, avec une phase lutéale de 13,4 jours et une phase folliculaire de 7,54 jours	Première augmentation de la concentration en P4 avant 50 jours pp, suivi de cycles réguliers
Retard de cyclicité	Niveau de P4 < seuil pendant au moins 45 jours	P4 basse sans interruption pendant les 50 premiers jours pp
Phase lutéale prolongée	Niveau de P4 > seuil pendant au moins 19 jours après la première ovulation	Le niveau de P4 reste élevé pendant plus de 20 jours sans insémination
Après le premier cycle		
Après le deuxième cycle et suivants	Niveau de P4 > seuil pendant au moins 19 jours après la deuxième ou les ovulations suivantes	
Phase lutéale courte	NR	Phase lutéale d'une durée inférieure à 10 jours (en excluant la première phase lutéale)
Interruption de cyclicité	Niveau de P4 < seuil pendant au moins 12 jours entre deux phases lutéales	Cyclicité normale interrompue par au moins 14 jours d'une P4 basse en continu
Profils irréguliers	NR	Profils montrant des irrégularités ne pouvant pas être classés dans une ou l'autre des définitions ci-dessus

P4 : progestérone ; seuil : seuil pour lequel la concentration de progestérone définie le début d'une phase lutéale ; NR : Non renseignée

Les différentes anomalies de reprise de cyclicité postpartum sont reprises ci-dessous, leurs définitions générales sont rappelées.

Reprise d'activité différée ou retard de cyclicité : le premier signe d'activité lutéale est postérieur à 45 ou 50 jours selon les auteurs.

Phase lutéale prolongée ou corps jaune persistant : le cycle sexuel s'est déroulé au moins une fois, on suppose que la vache a présenté des chaleurs normales, a ovulé. Puis un corps jaune s'est formé. Cependant, ce corps jaune persiste sur l'ovaire plus longuement que lors de la phase lutéale normale. La sécrétion de progestérone dure pendant plus de 19 à 28 jours selon les auteurs. La lutéolyse est retardée, la vache ne revient pas en chaleurs. Certains auteurs distinguent le corps jaune persistant après la première ovulation du corps jaune persistant après le deuxième cycle et suivants.

Phase lutéale courte : après l'ovulation et la lutéinisation du follicule, la sécrétion de progestérone dure moins de 10 jours. Ceci peut être considérée comme normal quand la phase lutéale courte intervient après la première ovulation ou avant 45-50 jours postpartum.

Interruption de cyclicité ou cessation d'activité après une première ovulation : la sécrétion de progestérone s'interrompt pendant 12 à 14 jours selon les auteurs.

Profils irréguliers : ces profils sont non classables dans les catégories précédentes.

Plus récemment, l'évaluation échographique de la croissance folliculaire ovarienne associée aux mesures des concentrations des hormones sexuelles a permis de classer de manière physiologique 4 types d'anomalies du postpartum de cyclicité ovarienne responsable d'anœstrus chez la vache (Peter et al., 2009, Figure II-29).

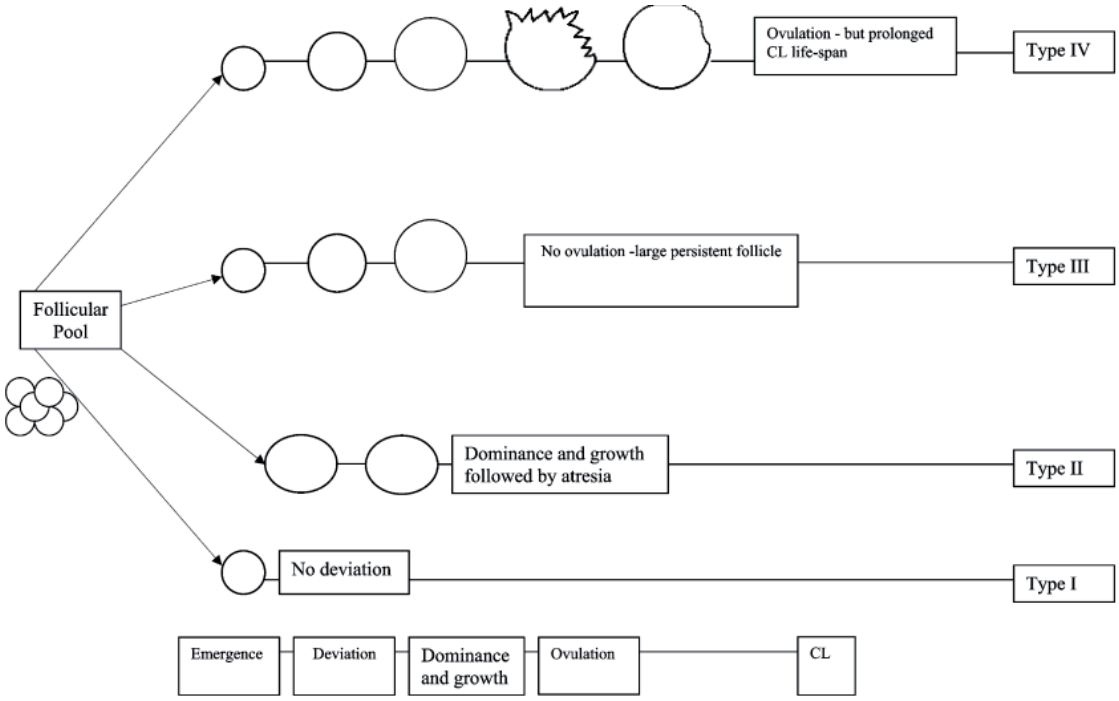


Figure II-29 Schématisation des types d'anœstrus basés sur la physiologie de la dynamique folliculaire (d'après Peter et al., 2009) ; CL : corpus luteum, voire le texte pour les explications des types

Anœstrus de type I : la croissance folliculaire s'arrête à la phase de recrutement, il n'y a pas de sélection de follicules. Les ovaires sont caractérisés comme inactifs, et ne sont porteurs ni de corps jaune ni de kyste folliculaire. Deux examens échographiques espacés d'une semaine ne révèlent aucun changement dans la structure folliculaire (Markusfeld, 1987).

Anœstrus de type II : la croissance folliculaire se prolonge jusqu'à la phase de sélection des follicules ou jusqu'à la dominance pour certain. Puis le follicule régresse et laisse émerger une nouvelle vague folliculaire. Ces follicules dominants produisent une quantité faible d'œstradiol qui n'exerce pas son rétrocontrôle négatif sur la production de FSH. Après la régression de ce follicule, les concentrations en FSH maintenant la croissance des follicules subordonnés permet l'émergence d'une nouvelle vague. De nombreuses vagues de croissance folliculaire (jusqu'à 9, Peter, 2004) peuvent se dérouler avant d'observer la première ovulation.

Anœstrus de type III : le follicule dominant sélectionné n'ovule pas, il se transforme en une structure persistante. Un follicule unique d'un diamètre > 8 mm est observé lors des deux examens échographiques réalisés à une semaine d'intervalle, en l'absence d'un corps jaune ou d'un kyste (Markusfeld, 1987 ; Lopez-Gatius et al., 2001). Ce follicule persistant évolue en kyste folliculaire ou lutéal. Les vagues folliculaires sont alors soit supprimées soit maintenues pendant une durée variable (Sakaguchi et al., 2006).

Anœstrus de type IV : après une ovulation le corps jaune persiste, la phase lutéale se prolonge.

L'anœstrus de type I, II et III définis par Peter et al. (2009) existent physiologiquement pendant le retard de cyclicité définis via les profils de progestérone. L'anoestrus de type IV correspond à la phase lutéale prolongée définie ci-dessus.

❖ **Fréquences des anomalies de reprise de cyclicité postpartum**

Le Tableau II-15 et le Tableau II-16 présentent les fréquences des anomalies de reprise de cyclicité postpartum classées avant 2000 et après 2000 pour 25 études menées au travers du monde sur des vaches laitières de race Holstein ou croisées Holstein. Les deux anomalies les plus fréquemment rencontrées sont les phases lutéales prolongées (entre 7 et 35 % pour les persistances de corps jaune ≥19 jours) et le retard de cyclicité (entre 5 et 30 % pour une inactivité ovarienne ≥45 jours). Lorsque les études décomptent les retards de cyclicité à partir de 30 jours postpartum, les fréquences de l'inactivité ovarienne dépassent les 30 % (Fagan et Roche, 1986 ; Huszenicza et al., 1988 ; El-Din Zain et al., 1995). La fréquence de l'interruption de cyclicité est plus faible (toujours <10 % pour une interruption ≥14 jours). Quand elle est recensée, la fréquence des phases lutéales courtes est rare (le plus souvent ≤5 %). Elles sont la plupart du temps jugées comme normales quand elles interviennent après la première ovulation.

Tableau II-15 Avant 2000, définition et fréquence (%) des profils anormaux de reprise de cyclicité postpartum chez la vache laitière

Etudes	Année	Pays	VL	Elevage	Niveau de production	Profil normal	Retard de cyclicité		Phase lutéale prolongée		Phase lutéale courte		Interruption de cyclicité		Cycle irrégulier	Autres	
						Fréq	Déf	Fréq	Déf	Fréq	Déf	Fréq	Déf	Fréq	Fréq	Déf	Fréq
Lamming et Bulman, 1976		Angleterre	300	3			>50 j	7,0	>30 j	2,0						chaleurs silencieuses	7,0
Bulman et Lamming, 1978	1976-1977		535	4				5,2					>14 j	5,2			
Bulman et Wood, 1980			533			88,1		4,9	>30 j	1,9				5,1		chaleurs silencieuses	10,7
Fagan et Roche, 1986		Irlande	463	5			>30 j >50 j	31,0 7,0	≥20 j	3,0	<10 j	4,0		3,0		kyste	2,0
Huszenicza et al., 1988		Hongrie	66	2		39,0	>35 j	42,0	>22 j	1,5				6,0	17,0		13,0
Nakao et al., 1991	1986-1988	Japon	126 97	2 4	HP MP	63,4 63,9	>50 j	25,2 22,7		0,8 3,1				10,6 10,3			
El-Din Zain et al., 1995	1991-1992		72	1	8500 kg	69,4	≥31 j	30,6									
Lamming et Darwash, 1998	1975-1982	Angleterre	2503	20	6500 kg	68,3	≥45 j	10,9	≥19 j	7,3[1] 6,4[2]			≥12 j	12,9		une ou plusieurs anomalies	31,7
Opsomer et al., 1998	1990-1994	Belgique	448	6	8000 kg	53,5	≥50 j	20,5	≥20 j	20,0	<10 j	0,5	≥14 j	3,0	2,5		
Kerbrat et Disenhaus, 2000	1997-2000	France	168	2		65,7		10,8	>28 j	10,8[1] 4,9[3]				6,8	1,0		
Opsomer et al., 2000	1990-1994	Belgique	334	6	8000 kg	51,0		21,5	≥20 j	21,5	<10 j	0,5		4,0	1,5		
Royal et al., 2000	1995-1998	Angleterre	714	7		56,3	≥45 j	12,9	≥19 j	18,2[1] 16,8[2]			≥12 j	10,6		une ou plusieurs anomalies	43,7

* nombre de lactations ; [1] après le premier cycle ; [2] après le deuxième cycle et suivant ; [3] après le second cycle ; j : jour ; VL : nombre de vache laitières ; Déf : définition ; Fréq : Fréquence ; HP : Haute productrice ; MP : moyenne productrice

Tableau II-16 Après 2000, définition et fréquence (%) des profils anormaux de reprise de cyclicité postpartum chez la vache laitière

Etudes	Année	Pays	VL	Elevage	Niveau de production	Profil normal	Retard de cyclicité		Phase lutéale prolongée		Phase lutéale courte		Interruption de cyclicité		Cycle irrégulier	Autres	
						Fréq	Déf	Fréq	Déf	Fréq	Déf	Fréq	Déf	Fréq	Fréq	Déf	Fréq
Disenhaus et al., 2002		France	64			54,7	>50 j	21.9								anormale	23,4
Taylor et al., 2003		Angleterre	38	1	4600-9500 kg	45,0	≥45 j	24,0	≥19 j	16,0[1] 11,0[2]			≥12 j			plusieurs anomalies	29,0
Pushpakumara et al., 2003			40		5000-10000 kg	67,5	>40 j	7,5		17,5			>9 j	7,5			
Shrestha et al., 2004a	2001-2002	Japon	54	3	10000 kg	37,0	>45 j	24,1	>20 j	31,5	<10 j	3,7	≥14 j	3,7			
Shrestha et al., 2004b	2001-2002		91	1		42,9		13,2		35,2		5,5		3,3			
Shrestha et al., 2005	2001-2003		110		10400 kg	44,5		12,7		33,6		4,6		4,6			
Fréret et al., 2005	2004	France	275	10	7500 kg	73,5	entre 30 et 50j ou 80j	7,3	>28j	9,5				4,0	5,8		
Fahey et al., 2005		Irlande	58	1		71,0	≥45 j	20,7	≥19 j	5,2				3,4			
Hommeida et al., 2005	2002-2004	Japon	21			42,9	>50 j	33,3	≥20 j	28,3							
Horan et al., 2005	2002-2003	Irlande	186			61,8	≥45 j		≥19 j				≥12 j				
Petersson et al., 2006	1987-2002	Suède	1049 *		8500 -9800 kg	70,4	≥56 j	15,6	>20 j	7,3			≥14 j	6,6			
Samarutel et al., 2008	1999-2002	Estonie	71		5800-13000 kg	55,0	≥50 j	25,3		15,5				4,2			

* nombre de lactations ; [1] après le premier cycle ; [2] après le deuxième cycle et suivant ; [3] après le second cycle ; j : jour ; VL : nombre de vache laitières ; Déf : définition ; Fréq : Fréquence

Pour les 12 études réalisées avant 2000, la moyenne des vaches ne présentant pas d'anomalies de cyclicité postpartum se situe autour de 60 % (de 88,1 % à 39,0 %). Après 2000, cette moyenne diminue de 5 points et serait plus proche des 55 % (avec une variation de 73,5 % à 37 %). Le nombre des anomalies de reprise de cyclicité aurait donc augmenté. Il apparaît que c'est principalement l'augmentation du nombre de phases lutéales prolongées qui pourrait expliquer l'augmentation de ces anomalies (Figure II-30).

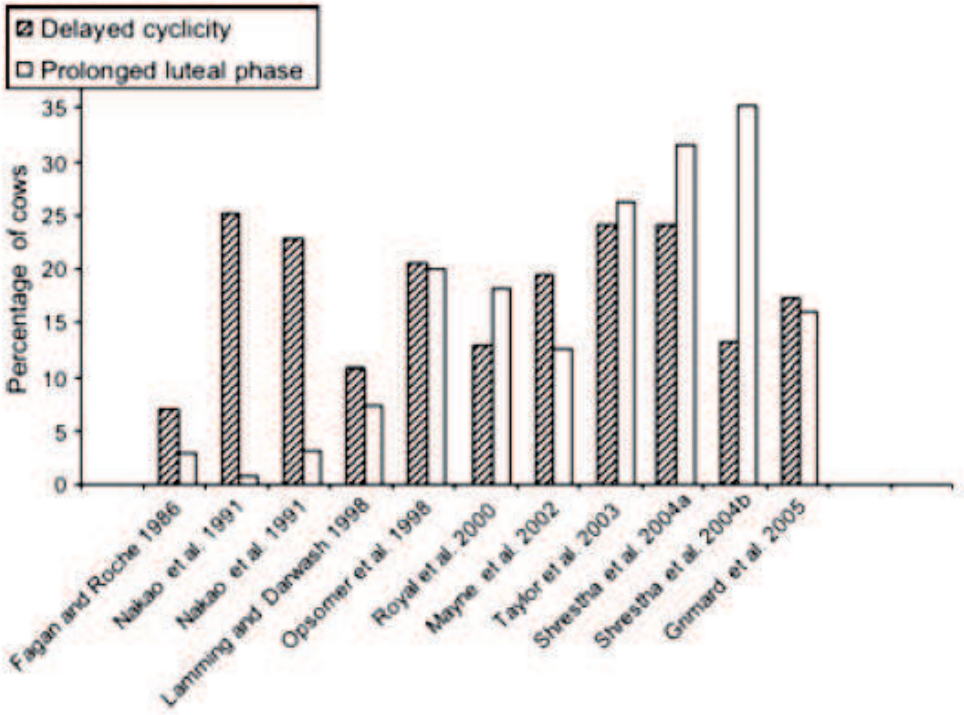


Figure II-30 Evolution du pourcentage de vaches présentant soit un retard de cyclicité soit une phase lutéale prolongée évaluées à partir des profils de progestérone (d'après Grimard, communication personnelle, repris par Crowe, 2008)

Néanmoins, les comparaisons *sensu stricto* entre les études des fréquences d'anomalies doivent être faites avec prudence puisque les auteurs utilisent des définitions des profils de progestérone différentes pour distinguer ce qui est normal de ce qui est anormal et que la plupart des études présentées dans ces tableaux sont réalisées sur un petit nombre de troupeaux (surtout après 2000) alors que les variations de fréquence entre les troupeaux sont élevées (Opsomer et al., 1998 ; Nakao et al., 1992 ; Kerbrat et Disenhaus, 2000 ; Mayne et al., 2001 ; Disenhaus, 2004 ; Santos et al., 2009). De grandes tendances d'évolution des profils de cyclicité sur les dernières années peuvent être identifiées notamment grâce à l'étude de Royal et al. (2000) qui compare les données de reproduction de deux populations de vaches prises à 20 ans d'intervalle, dans des conditions d'allotement et de zone géographique similaires et pour des définitions de profils de progestérone semblables. Royal et al. (2000) reprennent les données des profils de progestérone post-vêlage de Lamming et Darwash (1998) récoltées entre 1975 et 1982 et les comparent à leur étude réalisée entre 1995 et 1998. Ils identifient clairement une augmentation de 32% à 44%, sur 20 ans, de la fréquence des profils de

cyclicité anormaux. Cette augmentation étant particulièrement le fait de l'augmentation des phases lutéales prolongées après le premier cycle et aux cycles suivants (respectivement, augmentation de 7,3 à 18,2% et de 6,4 à 16,8%).

Actuellement, près de la moitié des vaches Holstein ayant vêlé présentent une anomalie de reprise de cyclicité postpartum. Les deux anomalies les plus répertoriées sont le retard de cyclicité et les phases lutéales prolongées. Ces dernières auraient tendance à augmenter lors de ces dernières années.

III.2.2.3 Facteurs de risque des anomalies de reprise d'activité sexuelle cyclique après vêlage

Les Tableau II-17, Tableau II-18, Tableau II-20, Tableau II-21 et Tableau II-22 synthétisent l'impact des facteurs influençant la fréquence d'apparition des anomalies de reprise de cyclicité postpartum. Les facteurs de risques du retard de cyclicité et des phases lutéales prolongées sont les plus étudiées du fait de la fréquence élevée de ces anomalies. Quelques études ont pu identifier des facteurs de risque des interruptions de cyclicité, tandis que les facteurs influençant les phases lutéales courtes sont inexistants dans la bibliographie ; cette anomalie étant rarement mise en évidence (≤ 5 %). Sans être totalement propre à l'une ou l'autre des anomalies, certains facteurs influencent davantage le retard de cyclicité ou les phases lutéales prolongées. En axant notre description par thème, nous décrirons successivement le poids de chaque facteur vis à vis de ces deux anomalies les plus couramment retrouvées.

❖ **Facteurs liés au troupeau et à la conduite d'élevage**

Globalement la fréquence des retards de cyclicité est la plus modifiée par cette classe de facteurs (Tableau II-17). Le troupeau, la parité de la vache, le type de logement, la saison de vêlage et la durée du tarissement influencent l'apparition du retard de cyclicité chez la vache laitière (El-Din Zain et al., 1995 ; Opsomer et al., 2000 ; Petersson et al., 2006; Santos et al., 2009).

Les vaches les plus jeunes présenteraient davantage de retard de cyclicité que les vaches à rang de lactation plus élevé (Petersson et al., 2006 ; Santos et al., 2009). Cependant, El-Din Zain et al. (1995) ne trouvent pas de relation significative entre l'âge de la vache et l'intervalle vêlage-première ovulation.

L'effet saison est identifié mais controversé. Petersson et al. (2006) et Opsomer et al. (2000) montrent qu'après les vêlages d'hiver les retours de cyclicité tardifs augmentent alors que pour d'autres c'est après des vêlages de printemps que les retards de cyclicité seraient les plus fréquents (Claus et al., 1983; Santos et al., 2009). Ce facteur saison englobe l'effet température et/ou photopériode propres de la saison et un effet alimentation qui concorderait avec la mise à l'herbe des vaches au printemps et la stabulation hivernale, d'où probablement les incohérences entre les études. Certaines traitent de vaches en stabulation à l'année, pour celles-ci il n'y a pas de confusion avec un effet alimentation

(Santos et al., 2009), tandis que d'autres étudient des vaches mises à l'herbe au printemps (Opsomer et al., 2000 ; Petersson et al., 2006).

La durée de tarissement précédente pourrait influencer la fréquence des retards de cyclicité (Opsomer et al., 2000 ; Petersson et al., 2006). Un tarissement prolongé augmenterait la fréquence des retards de cyclicité.

Le niveau génétique (production laitière) de la vache ou de son père n'ont pas eu d'influence sur le retard de cyclicité et la phase lutéale prolongée (Windig et al., 2008).

Enfin, des conditions de vêlages difficiles augmenteraient aussi bien la fréquence des retards de cyclicité que des phases lutéales prolongées (Opsomer et al., 2000).

Tableau II-17 Facteurs liés au troupeau et à la conduite d'élevage influençant la fréquence des anomalies de la reprise de la cyclicité postpartum

Facteurs	Modalités	RC	PLP	Interruption de cyclicité	Références
Race		NS	+	NS	Petersson et al., 2006
Troupeau		S			Santos et al., 2009
Index génétique laitier	De la vache	NS			Windig et al., 2008
Age au vêlage		NS			El-Din Zain et al., 1995
Parité	Rang 2 vs 1		NS		Petersson et al., 2006
	Rang 3 vs 1	-			
	>4		+		Opsomer et al., 2000
		NS			El-Din Zain et al., 1995
	Primipare	+			Santos et al., 2009
Logement	A l'attache vs libre		NS		Petersson et al., 2006
Saison de vêlage	Hiver vs été		NS	+	Petersson et al., 2006; El-Din Zain et al., 1995 ; Santos et al., 2009
	Printemps vs été				Santos et al., 2009
	En étable vs pâture				Opsomer et al., 2000
Durée du tarissement	Longue	+	NS		Petersson et al., 2006
					Opsomer et al., 2000
Conditions de vêlage	Vêlage difficile	+			Opsomer et al., 2000

RC : Retard de cyclicité ; PLP : Phase lutéale prolongée ; NS : effet non significatif du facteur, S : effet significatif du facteur ; + : le facteur augmente significativement l'anomalie ; - : le facteur diminue significativement l'anomalie ND : Non défini

❖ Facteurs relatifs à la fonction de reproduction de la vache

Les facteurs liés à la fonction de reproduction de la vache influenceraient davantage les phases lutéales prolongées que les retards de cyclicité (Tableau II-18).

Tableau II-18 Facteurs relatifs à la fonction de reproduction de la vache influençant la fréquence des anomalies de reprise de la cyclicité postpartum

Facteurs	Modalités	RC	PLP	Interruption de cyclicité	Références
Intervalle entre les deux derniers vêlages	15 mois vs 12 mois	+	NS	+	Petersson et al., 2006
Rang du cycle après vêlage	1er ou 2ème vs 3ème ou 4ème		+		Royal et al., 2000
Reprise de la cyclicité	Précoce				Opsomer et al., 2000 ; Pushpakumara et al., 2003 ; Windig et al., 2008
	Tardive		NS		Opsomer et al., 2000
Reprise de cyclicité à la lactation précédente	Retardée	+		+	Petersson et al., 2006
	Interrompue	NS			
	PLP				
Anœstrus	Non traité	+	NS	+	Petersson et al., 2006
	Traité				
Kyste	Non traité	NS			
	Traité	+	NS	+	
Pathologies utérines	Métrite non traitée	NS			
	Métrite traitée	+			
	Métrites ou écoulements anormaux	NS	+		Shrestha et al., 2004a
		+			Opsomer et al., 2000
	Involution utérine retardée	NS	+		Hommeida et al., 2005 ;Shrestha et al., 2004a ; Taylor et al., 2003 ; Opsomer et al., 2000 ; El-Din Zain et al., 1995
		+			El-Din Zain et al., 1995

RC : Retard de cyclicité ; PLP : Phase lutéale prolongée ; NS : effet non significatif du facteur; + : le facteur augmente significativement l'anomalie ; - : le facteur diminue significativement l'anomalie ; T+ : le facteur augmente en tendance l'anomalie

En effet, pour de nombreux auteurs, les pathologies utérines (rétentions placentaires, métrites, écoulements vulvaires anormaux, mauvaise involution utérine) seraient les facteurs de risque les plus importants pour l'augmentation de la fréquence des phases lutéales prolongées. La relation principale étant expliquée par un défaut de sécrétion de prostaglandines. Comme le suggèrent Olson et al. (1984) et Opsomer et al. (2000), la sécrétion de PGF2α et son action seraient compromises par l'inflammation de l'endomètre et empêcheraient la lutéolyse du corps jaune. L'utérus est alors sous l'influence prolongée de la progestérone, ce qui favorise la croissance bactérienne et la présence d'endotoxine (Harris et al., 2000). Les auteurs sont aussi en accord sur le fait qu'une ovulation précoce augmenterait la fréquence des phases lutéales prolongées (Opsomer et al., 2000 ; Pushpakumara et al., 2003 ; Windig et al., 2008). Les corps jaunes persistants suivraient davantage les deux premiers cycles après vêlage que les cycles suivants (Tableau II-19 ; Royal et al., 2000). Les pathologies touchant l'ovaire (anœstrus ou kyste) influencent, quant à elles, davantage le retard de

cyclicité que les phases lutéales prolongées (Petersson et al., 2006). La reprise de cyclicité retardée pourrait aussi être répétable d'une année sur l'autre pour la même vache (Petersson et al., 2006) ce qui est en faveur d'un effet génétique sur ce paramètre.

Tableau II-19 Fréquence des phases lutéales prolongées en fonction du rang du cycle après vêlage (3 dosages de progestérone par semaine, Royal et al., 2000)

Rang du cycle après vêlage	n	Fréquence des intervalles entre ovulations ≥ 25 j
1	645	25.4[a]
2	490	21.6[a]
3	266	15.0[b]
4	89	15.0[b]

a vs b, $p < 0.05$

❖ **Facteurs liés au déficit énergétique**

La production laitière, la fréquence de traite et le niveau alimentaire sont des facteurs modulant le bilan énergétique des vaches. Ils ont des effets essentiellement sur la fréquence des retards de reprise de cyclicité (Tableau II-20).

Tableau II-20 Facteurs liés aux situations de déficit énergétique influençant la fréquence des anomalies de reprise de la cyclicité postpartum

Facteurs	Modalités	RC	PLP	Références
Production laitière	>39,1 kg au 3ème mois pp	-		Santos et al., 2009
	305 j		NS	Shrestha et al., 2004a, Kerbrat et Disenhaus, 2000
Taux protéique	Diminué	+	NS ; +[1]	Taylor et al., 2003
		NS		Kerbrat et Disenhaus, 2000 ; Konigsson et al., 2008
	Faible au 2ème mois pp	+		Opsomer et al., 2000
Taux butyreux	Augmenté	+		Taylor et al., 2003
		NS		Kerbrat et Disenhaus, 2000 ; Opsomer et al., 2000
Fréquence de traite	2 traites vs 3 traites	NS		Windig et al., 2008
Alimentation	Diminution de la matière sèche ingérée	+	NS	Taylor et al., 2003
	Niveau énergétique élevé de la ration	NS		Windig et al., 2008

RC : Retard de cyclicité ; PLP : Phase lutéale prolongée ; NS : effet non significatif du facteur; + : le facteur augmente significativement l'anomalie ; - : le facteur diminue significativement l'anomalie ; IA1 : première insémination artificielle ; pp : postpartum ; [1] pour une phase lutéale prolongée au deuxième ou aux cycles suivants

L'effet de la production est assez paradoxal entre les études. Certains auteurs n'identifient aucune association significative entre la production laitière et les anomalies de reprise de cyclicité (Opsomer et al., 2000; Kerbrat et Disenhaus, 2000; Pushpakumara et al., 2003). D'autres trouvent une relation

négative entre la production laitière en début de lactation et l'intervalle entre le vêlage et la première ovulation (Gröhn et Rajala-Schultz, 2000; Grimard et Disenhaus, 2005 pour revue). Enfin, Santos et al. (2009) montrent que le risque de présenter un retard de cyclicité ou une phase lutéale prolongée est réduit chez les vaches à forte production laitière au 3ème mois postpartum ou au moment de l'IA1. Les vaches avec anomalies produiraient moins de lait à l'instar des vaches présentant un état sanitaire ou un état pathologique dégradé (Houben et al., 1993; Fourichon et al., 1999 pour revue; Opsomer et al., 2000).

Taylor et al., (2003) montrent que les retards de cyclicité augmentent chez les vaches dont la capacité d'ingestion diminue après le vêlage. Elles souffrent de déficit énergétique dû à leur capacité de production plus élevée que leur capacité à ingérer. En revanche, un régime alimentaire haut en énergie n'a pas influencé significativement le nombre d'anomalies de reprise de cyclicité (Windig et al., 2008). De même, l'augmentation de la fréquence de traite joue sur l'état énergétique de la vache. Les vaches traites trois fois par jour ont un bilan énergétique plus négatif que les vaches traites deux fois (Disenhaus et al., 2002 ; Patton et al., 2006). L'étude de Windig et al. (2008) n'identifient cependant pas de relation entre fréquence de traite et retards de cyclicité.

Les situations aggravant le déficit énergétique (production laitière élevée, alimentation, fréquence de traite augmentée) chez la vache n'ont pas montré un impact très franc sur les anomalies de cyclicité. En revanche, les conséquences du déficit énergétique (modification de l'état corporel, du poids, de la qualité du lait, de l'état sanitaire et des métabolites énergétiques) sont davantage liées aux variations de fréquences des anomalies, et plus particulièrement aux retards de cyclicité.

Les pertes d'état corporel et de poids au cours des premiers mois après vêlage augmentent le risque de présenter un retard de cyclicité (Opsomer et al. 2000 ; Taylor et al., 2003 ; Shrestha et al., 2004a ; Horan et al., 2005 ; Petersson et al., 2006 ; Santos et al., 2009). Une maladie au cours du premier mois augmente la fréquence des phases lutéales prolongées et le retard de cyclicité (Opsomer et al., 2000). Plus spécifiquement, les boiteries ou une cétose sont associées au risque de présenter un retard de cyclicité (Opsomer et al., 2000 ; Petersson et al., 2006).

Tableau II-21 Facteurs indicateurs du déficit énergétique influençant la fréquence des anomalies de reprise de la cyclicité postpartum

Facteurs	Modalités	RC	PLP	Interruption de cyclicité	Références
Etat corporel	Avant vêlage	NS			Shrestha et al., 2004a
	Après vêlage		NS		
	>3 au vêlage	-			Santos et al., 2009
	>3 à l'IA1				
	Perte de plus d'1 point du vêlage à l'IA1	+			Santos et al., 2009
	Diminution du vêlage au 1er mois				Opsomer et al., 2000
	Diminution du vêlage au 2ème mois				Cutullic et al., 2011
Poids	Avant vêlage	T-	NS		Shrestha et al., 2004a
	5 semaines pp	-			
	A l'IA1	T-			Horan et al., 2005
Perte de poids	≥50 kg après 8 semaines pp	+	NS		Petersson et al., 2006
	Augmentation	+	NS		Taylor et al., 2003
	Au cours des 7 premières semaines pp	NS			Konigsson et al., 2008
Boiterie	Boiterie traitée	+	NS		Petersson et al., 2006
Maladie	Au cours du 1er mois	+	+		Opsomer et al., 2000
	Cétose	+			

RC : Retard de cyclicité ; PLP : Phase lutéale prolongée ; NS : effet non significatif du facteur; + : le facteur augmente significativement l'anomalie ; - : le facteur diminue significativement l'anomalie ; T- : le facteur diminue en tendance l'anomalie ; IA1 : première insémination artificielle ; pp : postpartum

Enfin, les concentrations plasmatiques de certains métabolites témoins du déficit énergétique sont, eux aussi, liés à l'apparition d'anomalies (Tableau II-22). Le plus communément mis en évidence est l'IGF-1 en début de lactation dont la diminution est associée à l'augmentation de la fréquence des retards de cyclicité et des phases lutéales prolongées (Taylor et al., 2003 ; Konigsson et al., 2008). L'augmentation des concentrations plasmatiques de béta-hydroxybutyrate serait liée à l'augmentation de la fréquence des phases lutéales prolongées et en tendance aux retards de cyclicité (Pushpakumara et al., 2003 ; Taylor et al., 2003). L'augmentation du taux d'urée dans le sang serait associée à une augmentation du nombre et de la fréquence des phases lutéales prolongées.

Tableau II-22 Métabolites témoins du déficit énergétique associés à la fréquence des anomalies de reprise de la cyclicité postpartum

Facteurs	Modalités	RC	PLP	Interruption de cyclicité	Références
AGNE	Dosage hebdomadaire pendant 7 semaines pp	NS		NS	Pushpakumara et al., 2003 ; Taylor et al., 2003
					Konigsson et al., 2008
BHB		T+	+	T+	Pushpakumara et al., 2003 ; Taylor et al., 2003
Insuline		NS		NS	Pushpakumara et al., 2003
Leptine					Konigsson et al., 2008
Glucose			+	NS	Pushpakumara et al., 2003 ; Taylor et al., 2003
IGF-1		+ pour semaine 1 et 2 pp			Konigsson et al., 2008
	Diminution	+	+[1]		Taylor et al., 2003
Urée	Augmentation		+		

RC : Retard de cyclicité ; PLP : Phase lutéale prolongée ; NS : effet non significatif du facteur ; + : le facteur augmente significativement l'anomalie ; - : le facteur diminue significativement l'anomalie ; T+ : le facteur augmente en tendance l'anomalie ; pp : postpartum ; [1] pour une phase lutéale prolongée au deuxième ou aux cycles suivants ; AGNE : Acide gras non estérifié ; BHB : Béta-hydroxybutyrate

Le principal facteur influençant le risque de retard de reprise de cyclicité après vêlage est le déficit énergétique et ses conséquences (maladies, modification des métabolites). D'un point de vue physiopathologique, les effets du déficit énergétique sur la pulsatilité de la LH peuvent expliquer le retard de la première ovulation après le vêlage. L'effet saison semble aussi être important sur le retard de reprise de cyclicité. La grande majorité des facteurs expliquant les retards de cyclicité expliquent aussi parfois les interruptions de cyclicité. Le déficit énergétique, classiquement associé à l'inactivité prolongée, est logiquement mis en cause dans le cas des interruptions de cyclicité.

Les principaux facteurs de risque des phases lutéales prolongées sont les ovulations précoces et les pathologies utérines dans le mois qui suivent le vêlage. L'association avec un bilan énergétique négatif n'est pas toujours retrouvée, mais elle est cependant citée par des études qui ont suivi des paramètres métaboliques témoins du métabolisme énergétique pendant les toutes premières semaines de lactation.

III.2.2.4 Effet sur les performances de reproduction

Les anomalies avant la mise à la reproduction sont associées à une dégradation des performances de reproduction.

L'intervalle vêlage-première insémination (IVIA1) est généralement augmenté chez les vaches avec anomalies par rapport aux vaches sans anomalies (Lamming et Darwash, 1998 ; Kerbrat et Disenhaus, 2000 ; Royal et al., 2000 ; Fréret et al., 2005 ; Horan et al., 2005 ; Petersson et al., 2006). La Figure II-31 compare la durée de l'IVIA1 des vaches à anomalies à celles sans anomalies. Les points situés au-dessus de la bissectrice traduisent une durée plus élevée de l'IVIA1 chez les vaches à profil anormal que chez les vaches à profil normal. Cela concerne indistinctement et pour des durées d'intervalles similaires les 3 anomalies les plus souvent identifiées : le retard de cyclicité (85,5 ± 10,0 jours), la phase lutéale prolongée (84,4 ± 10,1 jours) et l'interruption de cyclicité (83,2 ± 17,6 jours) par rapport aux vaches normales (71,5 ± 5,7 jours) (moyenne ± σ des études suivantes; Nakao et al., 1992 ; Lamming et Darwash, 1998 ; Kerbrat et Disenhaus, 2000 ; Royal et al., 2000 ; Pushpakumara et al., 2003 ; Shrestha et al., 2004b ; Fréret et al., 2005 ; Hommeida et al., 2005 ; Horan et al., 2005 ; Petersson et al., 2006 ; Samarutel et al., 2008). Ce retard d'insémination première peut s'expliquer par l'absence de détection des chaleurs en début de période de mise à la reproduction pour les vaches qui présentent une reprise d'activité différée ou un corps jaune persistant.

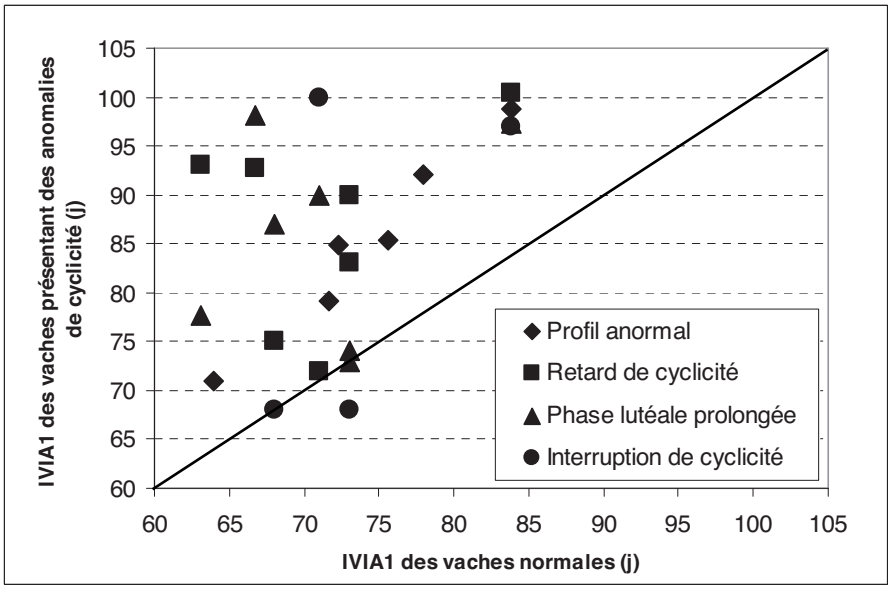


Figure II-31 Effet des anomalies de la reprise d'activité ovarienne après vêlage sur l'intervalle vêlage-première insémination (IVIA1) chez la vache laitière. Les points situés au-dessus de la bissectrice traduisent une durée plus élevée chez les vaches à profil anormal que chez les vaches à profil normal, (modifié de Grimard et Disenhaus, 2005 ; d'après Nakao et al., 1991 ; Lamming et Darwash, 1998 ; Kerbrat et Disenhaus, 2000 ; Royal et al., 2000 ; Pushpakumara et al., 2003 ; Shrestha et al., 2004b ; Fréret et al., 2005 ; Hommeida et al., 2005 ; Horan et al., 2005 ; Petersson et al., 2006 ; Samarutel et al., 2008)

La fertilité, mesurée par le taux de réussite en première insémination (TRIA1), est généralement plus faible chez les vaches présentant un profil anormal que chez les vaches normales (Lamming et Darwash, 1998 ; Kerbrat et Disenhaus, 2000 ; Royal et al., 2000 ; Fréret et al., 2005 ; Petersson et al., 2006). La Figure II-32 compare les TRIA1 des vaches avec anomalies par rapport à celles sans anomalie. Les points situés en dessous de la bissectrice traduisent une fertilité plus faible chez les vaches à profil anormal que chez les vaches à profil normal. L'impact des anomalies sur la fertilité ultérieure semble cependant controversé au regard des résultats des études. Si les vaches présentant des phases lutéales prolongées ont systématiquement un TRIA1 inférieur à celui de leurs congénères à profil normal (Nakao et al., 1992 ; Lamming et Darwash, 1998 ; Shrestha et al., 2004b ; Petersson et al., 2006 ; Samarutel et al., 2008), la fertilité des vaches présentant un retard de cyclicité n'est pas systématiquement dégradée ou peu, par rapport aux vaches normales (Royal et al., 2000 ; Samarutel et al., 2008). Pour Samarutel et al. (2008), celles-ci ont même une fertilité meilleure (64,7 % de TRIA1) que les vaches à profil normal (48,6 %).

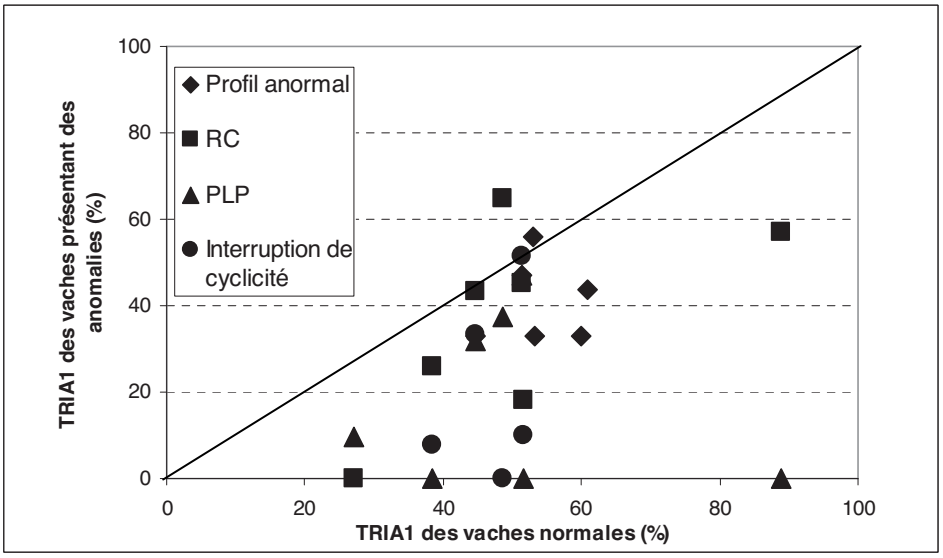


Figure II-32 Effet des anomalies de la reprise d'activité ovarienne après vêlage sur le taux de réussite en première insémination (TRIA1) chez la vache laitière ; Les points situés en-dessous de la bissectrice traduisent une fertilité plus faible chez les vaches à profil anormal que chez les vaches à profil normal, (modifié de Grimard et Disenhaus, 2005 ; d'après Nakao et al., 1992 ; Lamming et Darwash, 1998 ; Kerbrat et Disenhaus, 2000 ; Royal et al., 2000 ; Shrestha et al., 2004b ; Fréret et al., 2005 ; Hommeida et al., 2005 ; Horan et al., 2005 ; Petersson et al., 2006 ; Samarutel et al., 2008) ;RC : Retard de cyclicité ; PLP : Phase lutéale prolongée

Différentes situations peuvent expliquer cette diminution de la fertilité chez les vaches en cas d'anomalie de cyclicité :

La durée du cycle qui précède l'insémination a un effet sur la fertilité à l'IA1 ; une baisse de fertilité est observée lorsque le cycle précédant l'IA est court ou long par rapport à la durée jugée normale (Royal et al., 2000).

Le rang d'ovulation au moment de la première insémination est plus élevé chez les vaches normales que chez les vaches qui ont présenté une anomalie. Or plus le rang du cycle après vêlage est élevé au moment de l'IA plus le taux de réussite est élevé (Thatcher et Wilcox, 1973 ; Butler, 2003).

Friggens et Labouriau (2010) ont précisé qu'il suffisait d'au moins deux cycles pour optimiser la fertilité.
La mortalité embryonnaire tardive serait plus élevée après une phase lutéale prolongée qu'après un cycle normal (Lamming et Darwash, 1998).

Le nombre de traitements hormonaux effectués pour des problèmes de fertilité au moment de la mise à la reproduction est plus élevé pour les vaches présentant des anomalies de reprise de cyclicité que pour des vaches sans anomalies (Lamming et Darwash, 1998 ; Royal et al., 2000 ; Shrestha et al., 2004a ; Tableau II-23).

Tableau II-23 Pourcentage de vaches à profil de cyclicité normal ou anormal traitées pour problème de fertilité et taux de réussite à la première IA (TRIA1)

		Profil normal		Profil anormal		Retard de cyclicité		Phase lutéale prolongée	
Références	n	%TT	TRIA1	%TT	TRIA1	%TT	TRIA1	%TT	TRIA1
Lamming et Darwash, 1998	2503	13,3[a]	60,9[c]	40,4[b]	43, 7[d]				
Royal et al., 2000	714	2,1[a]	44,7[c]	12,8[b]	33,0[d]		43,5		31,8
Shrestha et al., 2004a	54	30,0				53,0		38,0	

%TT : pourcentage de traitement hormonaux pour divers problèmes de fertilité, pas de traitements effectués avant la mise à la reproduction ; a vs b et c vs d entre deux colonnes diffèrent significativement

Dans les études de Lamming et Darwash, (1998) et de Royal et al. (2000) les différences de TRIA1 entre les vaches normales et les vaches anormales sont significatives. Cependant, il convient de prendre des précautions dans l'interprétation des résultats de fertilité lorsque l'on ne connaît pas le nombre et les modalités des traitements hormonaux réalisés sur les vaches normales ou avec anomalies.

L'allongement du délai de mise à la reproduction (IVIA1) ainsi que l'altération de la fertilité induite par ces anomalies de la cyclicité entraînent un allongement de l'intervalle vêlage-insémination fécondante (IVIAf) et par conséquent de l'intervalle vêlage-vêlage (IVV). La Figure II-33 compare l'IVIAf des vaches avec anomalies à celui des vaches sans anomalies. Les points situés au-dessus de la bissectrice traduisent une durée plus élevée de l'IVIAf chez les vaches à profil anormal que chez les vaches à profil normal.

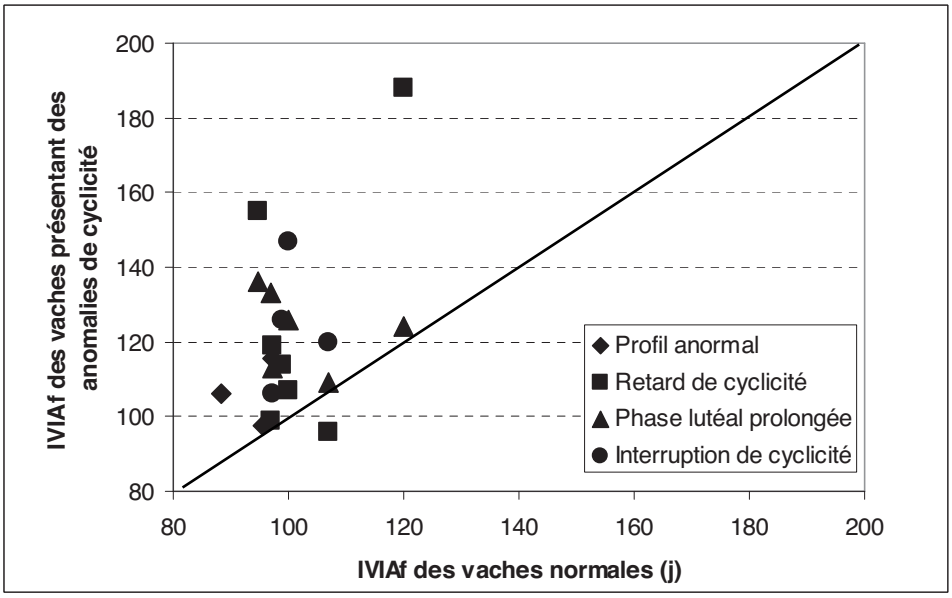


Figure II-33 Effet des anomalies de la reprise d'activité ovarienne après vêlage sur l'intervalle vêlage-insémination fécondante (IVIAf) chez la vache laitière. Les points situés au-dessus de la bissectrice traduisent une durée plus élevées de l'IVIAf chez les vaches à profil anormal que chez les vaches à profil normal. (modifié de Grimard et Disenhaus, 2005 ; d'après Nakao et al., 1991 ; Lamming et Darwash, 1998 ; Taylor et al., 2003 ; Shrestha et al., 2004b ; Horan et al., 2005 ; Petersson et al., 2006 ; Samarutel et al., 2008)

Les anomalies de reprise de l'activité cyclique après vêlage peuvent donc expliquer une partie des troubles de fertilité. Il est possible que l'augmentation de la fréquence de ces anomalies explique partiellement la baisse de fertilité observée depuis quelques décennies en élevage. En effet si la fréquence de l'inactivité prolongée a peu évolué ces dernières décennies, celles des phases lutéales prolongées a fortement augmenté.

III.2.3 Troisième facteur : Déficit énergétique au cours du postpartum

III.2.3.1 Appréciation du déficit énergétique

Chez la vache laitière, quand l'énergie requise pour combler ses besoins d'entretien et de production laitière dépasse ce qu'elle est en mesure d'ingérer, elle est en déficit énergétique (Jorritsma et al., 2003 ; Figure II-34).

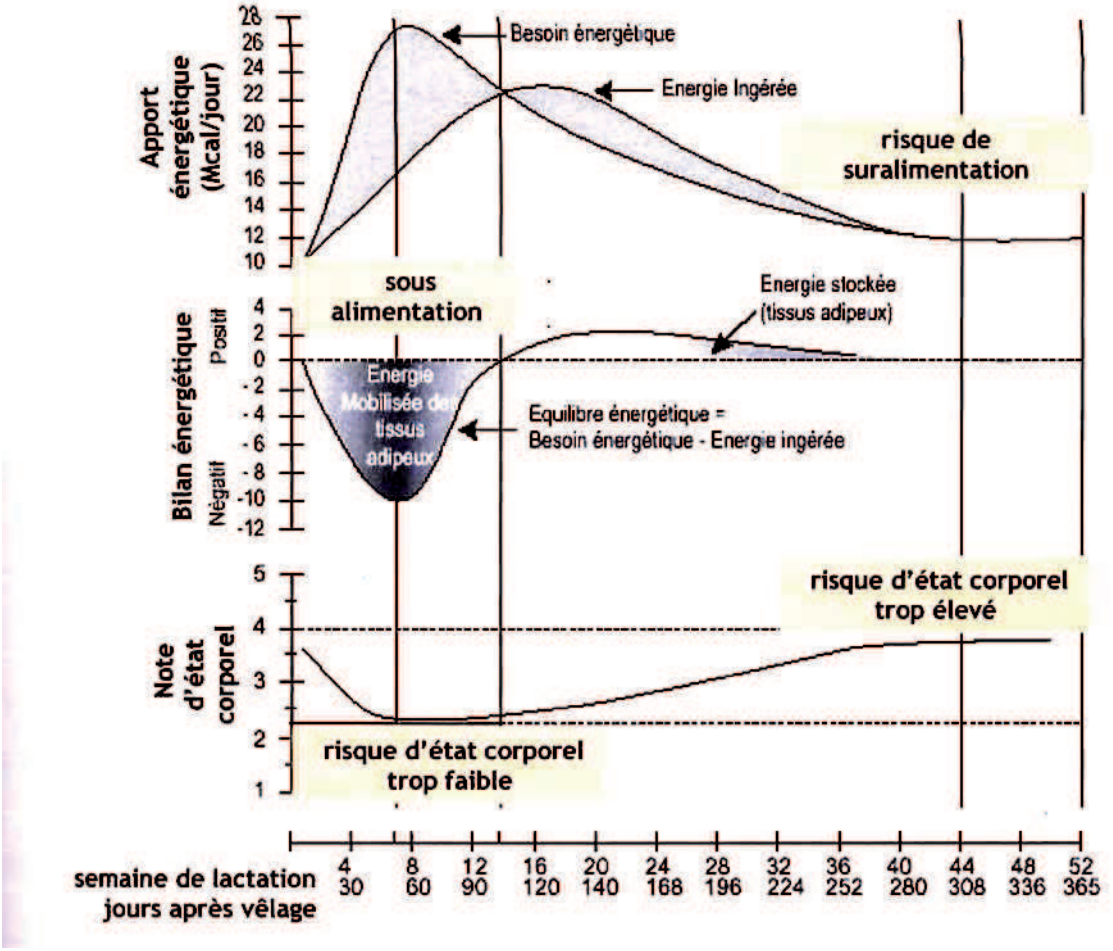


Figure II-34 Evolution des apports énergétiques, du bilan énergétique et de la note d'état corporel au cours de la lactation chez la vache laitière (d'après Wattiaux, 1999, modifiée par Fréret, 2007)

Chez les vaches hautes productrices (vaches laitières ayant une production de plus de 8 000 kg de lait en 305 j), ce déficit énergétique est quasiment toujours identifiable après le vêlage. Il commence quelques jours après le vêlage et atteint son maximum en moyenne deux semaines plus tard (Butler et Smith, 1989 ; Bell, 1995). La couverture des besoins énergétiques chez les vaches laitières à fort potentiel s'avère impossible en début de lactation. A la suite du vêlage, la vache débute fortement sa production laitière tandis que l'augmentation de sa capacité d'ingestion est insuffisante pour assurer la couverture des besoins de début de lactation (Villa-Godoy et al., 1988 ; Zurek et al., 1995), du fait, entre autre, de l'encombrement de l'utérus gravide dans la cavité abdominale en fin de gestation et au tout début de lactation ou de maladie métabolique anorexigène liée à la forte production laitière (Figure II-35).

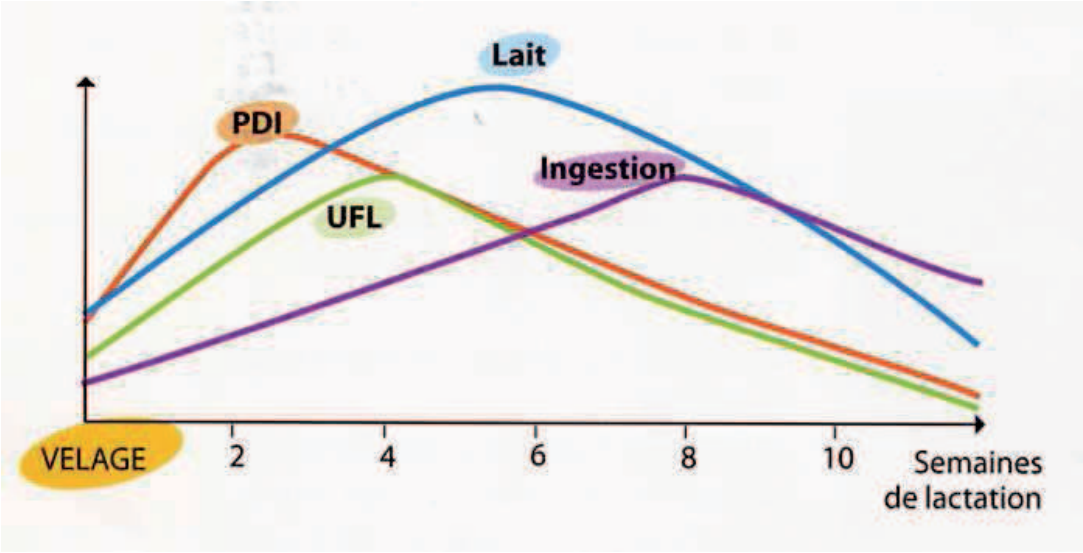


Figure II-35 Evolution de l'ingestion, de la production laitière et des besoins énergétiques (UFL) et protéiques (PDI) en début de lactation (UNCEIA Groupe Fertilité Femelle, 2006)

Pour pallier ce déficit en énergie, ces vaches mobilisent leurs réserves et maigrissent (Wright et Russel, 1984 ; Komaragiri Madhav et al., 1998 ; Figure II-34). Une telle situation de déficit énergétique est normale après la mise-bas, la vache pour assurer sa production laitière détient une forte capacité d'adaptation de son métabolisme au détriment de ses autres fonctions et principalement la reproduction. Il faut savoir reconnaître les excès pour éviter les effets pénalisants sur la conduite de la reproduction.

❖ **Calcul du déficit énergétique**

La méthode la plus directe pour estimer le déficit énergétique d'une vache est de calculer l'énergie nette nécessaire au besoin d'entretien relatif au poids de l'animal et au besoin de production, en appliquant une concentration connue de la composition du lait, et de les comparer aux apports énergétiques des aliments ingérés. En France, le système UFL (Unité Fourragère Lait) utilise ce principe de calcul (Vermorel, 1978). Ce système permet de calculer le niveau énergétique d'une vache moyenne du troupeau en se fondant sur des hypothèses d'ingestion alimentaire, de digestibilité, de composition du lait, (qui peuvent être parfois éloignées des besoins réels des vaches du troupeau à évaluer). Ce niveau énergétique peut être ensuite comparé aux valeurs recommandées dépendantes de l'état physiologique de l'animal (Tableau II-24).

Tableau II-24 Besoins énergétiques quotidiens d'une vache laitière de 600 kg en fonction de son stade physiologique (d'après INRA, 1988). Un Kg de lait standard contient 40 g/kg de taux butyreux (TB), 31 g/Kg de taux protéique (TP) et 48 g/kg de lactose pour une valeur énergétique de 740 kcal/kg. Quantité de lait standard (kg) = Quantité de lait produit (kg) x (0,4 + 0,15TB (%))

ENTRETIEN	TARISSEMENT	PRODUCTION
5 - 5,6 UFL / jour	7ème mois de gestation : + 0,9 UFL / j 8ème mois de gestation : + 1,6 UFL / j 9ème mois de gestation : + 2,6 UFL /j	+ 0,44 UFL par kg de lait standard

D'autres méthodes d'appréciation du déficit énergétique se fondent sur les adaptations physiologiques associées à ce déficit, comme les modifications métaboliques et hormonales (modification de la composition du lait et des paramètres biochimiques) et les modifications physiques (variation de poids et de l'état corporel).

Le calcul du niveau énergétique de la vache laitière en utilisant des méthodes standardisées permet d'évaluer le déficit énergétique postpartum. Il est estimé individuellement. Cette méthode est réservée aux stations expérimentales équipées pour mesurer les intrants (l'ingéré), sortants (production, variation de poids et d'état corporel), et refus.

❖ **Critères métaboliques et hormonaux**

Les critères métaboliques utilisés pour la détection du déficit énergétique postpartum sont issus du métabolisme énergétique des vaches en début de lactation. En comparaison avec les vaches hors lactation, les vaches en début de lactation ont une capacité d'ingestion restreinte, et sont en déficit énergétique (Van Knegsel et al., 2005).

En nous basant sur la Figure II-36, nous résumons le métabolisme d'adaptation des vaches en lactation et en déficit énergétique. Ces vaches mobilisent leurs réserves et principalement leurs réserves graisseuses. D'une part, la mobilisation des graisses engendre une élévation de la concentration sanguine en acide gras non estérifiés (AGNE), lesquels sont soit oxydés en acétyl-CoA soit stockés par le foie sous forme de triglycérides. D'autre part, la production d'acétyl-CoA à partir de l'acétate et du butyrate (issu de la digestion des nutriments dans le rumen) et des acides gras (issus des réserves corporelles) est élevée alors que dans le même temps la production d'oxalo-acétate est réduite du fait de la déviation des composés en C3 issus de la dégradation du glucose et des précurseurs de la glycogenèse vers la production de lactose. En effet, la forte production lactée de début de lactation nécessite une importante production de lactose engendrant une diminution de la concentration sanguine de glucose et d'insuline.

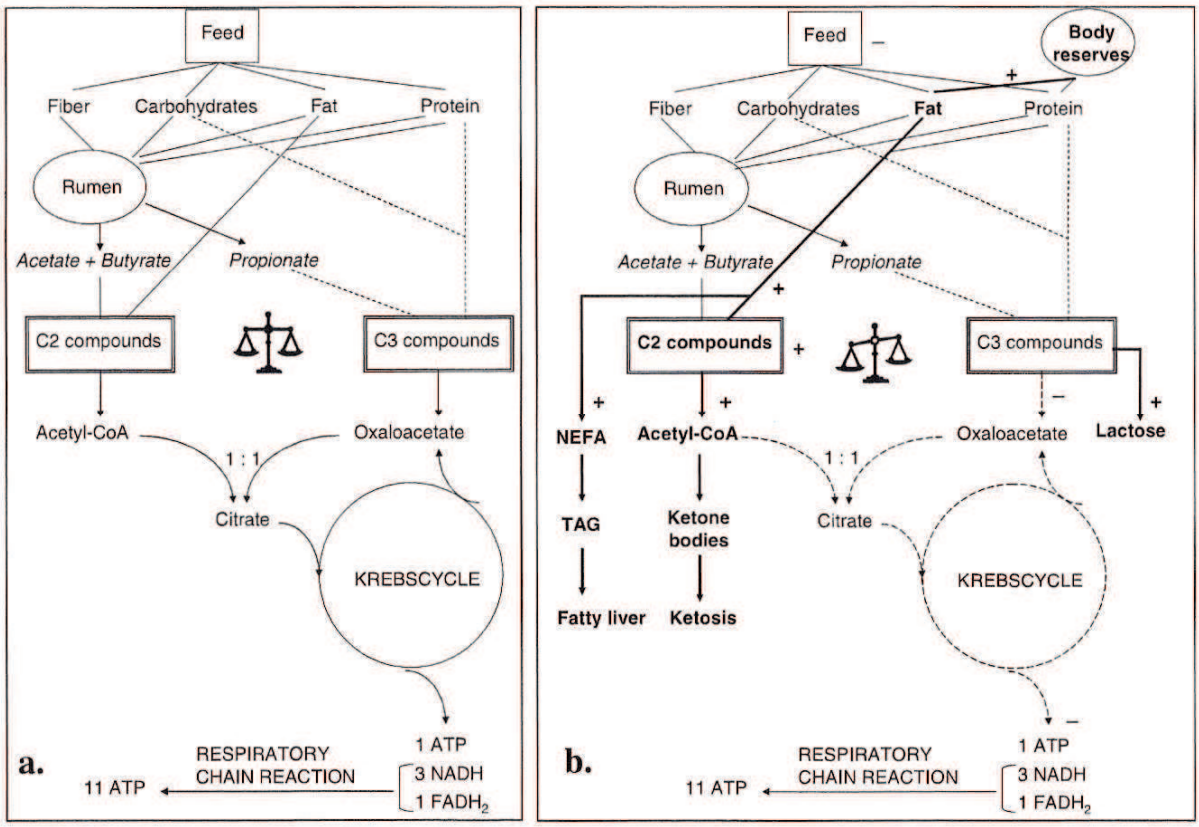


Figure II-36 Métabolisme énergétique chez des vaches n'étant pas en lactation (a.) et chez des vaches en lactation (b.) avec un bilan énergétique négatif entraînant une mobilisation des réserves corporelles (van Knegsel et al., 2005). NEFA = non-esterified fatty acids (→ AGNE), TAG = triacyglycerids (→ triglycérides, forme de stockage des acides gras), VDL = very low density lipoproteins (forme de transport des acides gras)

En conséquence, le ratio oxalo-acétate / acétyl-CoA est déséquilibré en faveur de l'acétyl-CoA. La disponibilité en citrate (produit de l'oxydation d'un acétyl-CoA avec un oxalo-acétate) à l'origine de la formation d'ATP du cycle de Krebs diminue. L'excédent d'acétyl-CoA est détourné pour la production de corps cétoniques (acétone, acéto-acétate et β-hydroxybutyrate : BHB ; Butler et Smith, 1989 ; Chilliard, 1993 ; Beam et Butler, 1999).

En début de lactation les vaches mobilisent d'abord leurs réserves graisseuses, puis une part des réserves musculaires peut être mobilisée (chez les vaches les plus maigres) ce qui a pour conséquence d'élever la concentration en urée plasmatique. 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. L'accumulation en triglycérides dans le foie (conséquence de la mobilisation des réserves graisseuses) entraîne l'augmentation de la concentration en ammoniac du sang du fait de l'inhibition de la transformation en l'urée (Zhu et al., 2000). L'ammoniac est probablement le toxique qui a le plus de conséquences sur l'infertilité en élevage mais il est rarement mesuré dans les études expérimentales (Wathes et al., 2007b).

La production principalement par le foie, d'IGF-1 est aussi modifiée en cas de variation du bilan énergétique. Sa concentration plasmatique diminue chez des animaux en déficit énergétique (Spicer et al., 1990 ; Lucy et al., 1992 ; Zurek et al., 1995). La sécrétion de l'hormone de croissance (GH) est

augmentée en début de lactation, elle a un effet positif sur la production laitière. Au même moment, il existe un découplage entre la sécrétion de GH et d'IGFs par le foie (GH stimule dans les conditions normales la production d'IGF-I par le foie) : les concentrations plasmatiques d'IGFs restent faibles malgré les forts taux de GH circulante (Lucy et al., 2001 ; Butler et al., 2003).

Enfin, la leptine, hormone essentiellement sécrétée par le tissu adipeux, joue un rôle ''d'adipostat'', signal envoyé à l'hypothalamus pour que ce dernier adapte le comportement alimentaire en fonction des réserves adipeuses et du bilan énergétique de l'organisme (Monget et al., 2004). En cas de déficit énergétique les concentrations en leptine sont diminuées. Chez les multipares, les concentrations en leptine avant vêlage sont corrélées positivement avec l'état corporel (Ehrhardt et al., 2000 ; Wathes et al., 2007a), ce qui pourrait correspondre à une quantité de tissus adipeux disponible pour la lactation qui fait suite au vêlage. Il est aussi envisagé que les concentrations élevées en leptine avant le vêlage réduiraient l'appétit et contribueraient à diminuer la prise alimentaire juste après le vêlage et donc à augmenter la perte d'état corporel et le déficit énergétique (Blache et al., 2000, Nachtomi et al., 1986 ; Zulu et al., 2002).

Au bilan, le déficit énergétique de début de lactation chez la vache laitière diminue les concentrations en glucose, en insuline, en IGF-1 et en leptine plasmatiques et augmente les concentrations plasmatiques en AGNE, BHB, acétone, acéto-acétate, triglycérides et urée. Ces critères métaboliques et hormonaux sont mesurables sur des prélèvements sanguins et/ou de lait.

La décision de classer une vache en déficit énergétique suivant ses analyses biochimiques doit être modulée en fonction de sa production laitière et de son état corporel. Par exemple, la concentration plasmatique en AGNE n'est un bon indicateur que chez les vaches dont les réserves en tissu adipeux ne sont pas limitantes. La concentration d'AGNE serait un bon indicateur du déficit pour des vaches notées à plus de 3 d'état corporel au vêlage et donc susceptibles de mobiliser largement leurs réserves adipeuses mais pas pour des vaches maigres pour lesquelles la lipolyse est limitée et qui doivent mobiliser leurs réserves protéiques pour combler leur déficit. Ainsi, Staples et al., (1990) concluent que la concentration plasmatique en AGNE dans leur étude n'est pas un bon indicateur du déficit énergétique. De même Wylie et al. (2008) observent une corrélation entre bilan énergétique et concentration en leptine, urée et glucose préprandiale chez des vaches primipares mais pas avec les métabolites des acides gras (AGNE, corps cétonique). Les AGNE varient de plus fortement autour du repas et sont sensibles au stress que peut provoquer le prélèvement par prise de sang.

❖ Evaluation de l'état corporel

Le suivi de l'état corporel durant la période entourant le vêlage est un outil intéressant pour évaluer le bilan énergétique d'une vache en début de lactation (Edmonson et al., 1989 ; Veerkamp, 1998). La note d'état permet d'estimer les réserves adipeuses dont dispose une vache pour faire face à ses besoins lorsqu'ils sont supérieurs aux apports de la ration alimentaire. Elle permet de déterminer si l'amaigrissement des vaches en début de lactation est excessif, signe d'un déficit énergétique sévère.

La notation des vaches est conseillée au moment du tarissement, au moment du vêlage, à 30 jours de lactation puis au moment de la mise à la reproduction. Le suivi peut être individuel, on s'intéressera alors à l'évolution de l'état corporel au cours du temps. Il peut être collectif et concernera 20 % des vaches du lot à évaluer, 10 au minimum, choisies au hasard pour analyser une période alimentaire particulière (UNCEIA Groupe Fertilité Femelle, 2006). Dans la notation visuelle française, l'échelle de notes varie de 0 (vache très maigre) à 5 (vache très grasse) avec des quarts ou des moitiés de points autorisés selon l'échelle utilisée (Bazin, 1984). Elle s'obtient en faisant la moyenne d'une note arrière et d'une note latérale issues des observations de différentes zones morphologiques de l'animal en comparaison à une grille standard. Les trois grandes races laitières, Holstein, Montbéliarde et Normande possèdent une grille de notation spécifique.

Malgré les grilles de notations standardisées, l'utilisation de cette méthode est dépendante de la subjectivité du pointeur. Pour, Heuer et al. (2000), la notation de l'état corporel standardisé n'a détecté que 25 % des vaches en déficit énergétique sévère. Les variations subtiles d'état corporel ne sont pas repérables aussi facilement que les variations calculées d'un déficit énergétique. La sensibilité de cette méthode est cependant facilement améliorable en multipliant le nombre de pointeurs et en établissant une moyenne par vache des notes attribuées. Enfin, les notes sont toujours attribuées à titre individuel, alors que l'estimation calculée du bilan vaut pour une vache moyenne, sans qu'elle tienne compte des différences individuelles de rendement d'utilisation des nutriments. En effet, il est possible que pour une même production lactée et à niveau énergétique utilisable équivalent, les bilans énergétiques des vaches soient différents. Elles utilisent leurs ressources selon leur besoin individuel d'entretien, leur besoin pour la fonction production, de reproduction ou l'immunité. Ces variations de répartition énergétique ne sont pas seulement d'ordre génétique, elles reflèteraient aussi les capacités d'adaptation des vaches aux modifications physiologiques de début de lactation (Veerkamp et Emmans, 1995).

L'état corporel est un indicateur du déficit énergétique. La variation de poids vif de l'animal fonctionne comme un critère supplémentaire de suivi de l'adaptation physique au déficit énergétique de début de lactation. Cependant, il apparaîtrait que pour des poids similaires, l'énergie disponible peut varier de 40 % en plus ou en moins selon la composition corporelle (Gibb et al., 1992 ; Andrew et al., 1994). De plus, les modifications de poids vif liées à l'involution utérine et aux modifications du tractus gastro-intestinal masquerait des pertes de poids de carcasse (Andrew et al .,1994).

La notation subjective de l'état corporel est recommandée dans les élevages laitiers (MacDonald et Roche, 2004), elle permet d'estimer les pertes de tissus adipeux.

❖ **Composition du lait**

Un autre moyen de repérer le déficit énergétique des vaches laitières en élevage est le suivi de la composition du lait. Pour de Vries et Veerkamp (2000) les variations du taux de matière grasse du lait au cours de la première semaine de lactation seraient un bon indicateur du déficit énergétique. A notre connaissance, ce critère est peu utilisé dans les études cherchant à mettre en relation déficit

énergétique et fertilité. En revanche, celles-ci utilisent principalement comme indicateur de déficit énergétique le taux protéique du lait et ses variations ou le ratio taux butyreux sur le taux protéique ou inversement (Heuer et al., 2000, Seegers et al., 2001). Friggens et al. (2007) ont proposé de mesurer le bilan énergétique en fonction des modifications de la composition du lait. Ainsi une équation unique estime le niveau énergétique en fonction de la quantité de lait produit, de la quantité de matière grasse et protéine mesurée et du nombre de jour en lactation.

En élevage, le déficit énergétique de la vache laitière est estimé par les variations d'état corporel, de taux protéique et butyreux du lait entre le vêlage et la mise à la reproduction. Le ratio taux butyreux/taux protéique est plus sensible que les taux utilisés séparément (augmentation du TB et diminution du TP en cas de déficit). Expérimentalement, le bilan énergétique individuel peut être calculé si l'on dispose d'une estimation précise de l'ingéré. Les paramètres biochimiques du métabolisme énergétique peuvent être estimés dans le sang (plasma) de façon hebdomadaire, le matin avant la distribution de la nourriture.

III.2.3.2 Influence du déficit énergétique sur la reprise de l'activité sexuelle postpartum

Une particularité de la vache est d'être mise à la reproduction quelques semaines après le vêlage, pendant le pic de lactation. Or la période du postpartum correspond à une très forte augmentation des besoins énergétiques liés au démarrage de la lactation. D'un point de vue biochimique, cette période d'intense activité métabolique est caractérisée par un bilan énergétique négatif. L'effet préjudiciable sur les performances de reproduction de ce déficit énergétique en début de lactation est bien connu et très documenté (Butler et Smith, 1989 ; Van Knegsel et al., 2005 ; Chagas et al., 2007 ; Wathes et al., 2007b).

- **Effet sur la reprise de l'activité ovarienne**

La capacité d'une vache laitière à être fécondée dans le temps désiré est sous la dépendance d'une reprise précoce de la cyclicité permettant le déroulement de plusieurs cycles sexuels avant la mise à la reproduction (Thatcher et Wilcox, 1973). Or, dans des conditions de déficit énergétique cette reprise de cyclicité est retardée.

L'intervalle vêlage première ovulation augmente avec la production laitière (Butler et al., 1981 ; Nebel et MacGilliard, 1993 ; Zurek et al., 1995 ; Wathes et al., 2007b). Ici, la production laitière est un indicateur indirect du bilan énergétique. Cette relation n'est pas toujours retrouvée quand la production laitière n'est pas proportionnelle au déficit énergétique. C'est ce qu'ont observés Pedernera et al. (2008) qui n'identifient aucune relation entre les performances de reproduction et la quantité de lait produit. Dans leur étude, un niveau élevé de production laitière n'est pas associé au déficit énergétique puisque ce sont les vaches avec la production laitière la plus basse (6000 L par

lactation) qui présentent les plus basses concentrations en IGF-1 et les plus hautes en AGNE en comparaison avec les vaches qui produisent 9000 L de lait par lactation.

Des indicateurs directs du bilan énergétique (estimation du déficit par le calcul, concentration des métabolites énergétiques et l'état corporel) ont un effet assez clair sur la reprise d'activité ovarienne du postpartum (Tableau II-25).

Tableau II-25 Effet du déficit énergétique sur l'intervalle vêlage première ovulation de vaches laitières de race Holstein

			Effet sur la reprise de l'ovulation	
Etudes	Région	Indicateur du déficit énergétique	IVOv1 ou anœstrus	IVCh1
Butler et al., 1981	New-york (EU)	Estimation arithmétique	S ;↑ IVOv1	
Butler et Smith, 1989	New-york (EU)	Perte d'état corporel >1 point		S ;↑
Spicer et al., 1990	EU	Estimation arithmétique	NS	
Zurek et al., 1995	Canada		S ;↑ IVOv1	
de Vries et al., 1999	Pays-Bas			S ;↑
Zulu et al., 2002	Japon	Perte d'état corporel >0.75 point	S ;↑ IVOv1	
		Quantité d'IGF-1	T, ↓ IGF-1 si anœstrus	
		Quantité d'AGNE	NS, ↑ AGNE si anœstrus	

IVOv1 intervalle entre le vêlage et la première ovulation mesurée par plusieurs dosage de progestérone réalisé à intervalle régulier ; IVCh1 intervalle entre le vêlage et les 1ères chaleurs détectées ; EU : Etats-Unis ; AGNE : Acide Gras non Estérifié
S : relation significative, NS : relation non significative ; T : tendance ;↑ : augmentation ; ↓ : diminution

L'estimation arithmétique du bilan énergétique permet généralement de mettre en évidence une relation entre déficit et durée de l'intervalle vêlage première ovulation (Butler et al., 1981 ; Zurek et al., 1995 ; de Vries et al., 1999). Par exemple, des vaches primipares ovulant pour la première fois tardivement, à plus de 45 jours après le vêlage, présentent un bilan énergétique dégradé par rapport à celle des primipares ovulant avant 45 jours (Taylor et al., 2003). Si les auteurs sont en accord sur une relation entre bilan énergétique et retard de la première ovulation, il reste des contradictions quant aux paramètres à utiliser pour mettre en évidence cette relation. Quand Butler et al. (1981) affirment que ce n'est pas le bilan instantané calculé au moment de l'ovulation qui explique le retard mais plutôt le déficit cumulé pendant les premières semaines postpartum, Zurek et al. (1995) observent l'inverse.

Les pertes d'état d'au moins 0,75 point après le vêlage retardent aussi la reprise de la cyclicité (Butler et Smith, 1989 ; Zulu et al., 2002). Si l'état corporel est trop bas au vêlage, la durée de l'anœstrus postpartum est augmentée (Disenhaus et al., 2005 ; Wathes et al., 2007b). Si l'état corporel de la vache est trop important au vêlage (principalement chez la primipare), il risque de diminuer sa capacité d'ingestion après le vêlage et prédispose à la perte d'état et aussi au retard de reprise de cyclicité (Zulu et al., 2002). Il existe donc un état optimum au vêlage, dépendant de la production

laitière en début de lactation et les variations au dessus ou en dessous de cet état seront préjudiciables à une reprise précoce de cyclicité en postpartum.

Une concentration basse en IGF-1 pendant plus de deux semaines après le vêlage est associée à une reprise tardive de la cyclicité (Zulu et al., 2002), fort probablement à cause de l'absence d'ovulation du follicule dominant (Beam et Butler, 1999 ; Wathes et al., 2003 ; Kawashima et al., 2007). En amont de la sélection du follicule dominant, le nombre de follicules primaires disponibles seraient sous l'influence du déficit énergétique de début de lactation. Walters et al. (2002a) observent de plus en plus de follicules lorsqu'ils s'éloignent du vêlage. Ils suggèrent alors que la folliculogenèse est plus active chez les vaches qui ont recouvré un bilan énergétique positif précocement. Lucy et al. (1992) précisent l'action du bilan énergétique sur la population et le nombre de follicules par vache : plus l'énergie disponible augmente plus le nombre de petits et moyens follicules diminue alors que le nombre de grand follicules (>10mm) augmente, suggérant que la vitesse de croissance des follicules augmente avec l'énergie disponible.

❖ **Effet sur l'expression des chaleurs**

La première ovulation chez la vache laitière est le plus souvent silencieuse, c'est à dire non associée à un comportement de chaleurs observé par l'éleveur (Crowe, 2008). Cela pourrait être lié au bilan énergétique après vêlage. En effet, Spicer et al. (1990) montrent que 60 % des vaches expriment des chaleurs en cas de bilan énergétique positif contre moins de 17 % lors de déficit énergétique (observation sur un petit nombre d'animaux). De même, les vaches présentant une concentration élevée en leptine (indicateur de réserves adipeuses élevées) ont une meilleure expression de leurs chaleurs que les vaches présentant des concentrations de leptine basses (Liefers et al., 2003). Pour Disenhaus (2004), les paramètres du bilan énergétique pourraient expliquer environ 15% de la variabilité d'intensité et de durée des chaleurs. L'intensité des chaleurs est négativement corrélée à l'efficacité alimentaire, c'est à dire au rapport entre le lait produit et les UFL ingérées au cours des 6 premières semaines de lactation. Les vaches « efficaces » qui produisent beaucoup au regard de leur ingestion, ont exprimé moins intensément des chaleurs mais les bilans énergétiques individuels n'ont pas été calculés dans leur étude.

Quelle que soit la manière d'évaluer le déficit énergétique au cours du postpartum, il est admis aujourd'hui qu'il a un effet sur la reprise de cyclicité après vêlage. L'action sur la sécrétion de LH, la croissance folliculaire et la maturation du follicule dominant expliquent les effets néfastes du déficit sur l'intervalle vêlage-première ovulation. Un effet sur l'expression des chaleurs explique aussi un effet sur l'intervalle vêlage-premières chaleurs détectées.

III.2.3.3 Influence du déficit énergétique sur la mortalité embryonnaire

Lors de la mise à la reproduction (entre 45 et 90 jours postpartum), la vache est inséminée sur les chaleurs détectées par l'éleveur ou à la suite d'un traitement hormonal déclenchant l'ovulation. En cas de fécondation, la sécrétion de progestérone par le corps jaune permet le maintien de la gestation (Stronge et al., 2005).

De nombreuses études indiquent que le statut énergétique de la vache en début de lactation influence la réussite de la fécondation et le maintien de la gestation.
En 1983, Butler et Smith (1989) identifient une sévère dégradation de la réussite à la première insémination des vaches hautes productrices comparées entre elles sur leur perte d'état. Seules 17% des vaches perdant plus d'un point d'état en 5 semaines sont gestantes après la première insémination contre 65 % des vaches qui perdent moins de 0,5 point d'état corporel. De plus, l'impact du déficit énergétique, mesuré par une perte d'état corporel supérieur à 0,8 point au cours du premier mois de lactation sur la fertilité à la première insémination, est plus fort chez les vaches multipares étudiées par Domecq et al. (1997), que l'impact de maladies ou la forte production laitière. Cependant, Grimard et al. (2006) n'identifient pas de relation entre l'état corporel au moment de l'IA1 et le taux de gestation.

Lopez-Gatius et al., (2003) indiquent, dans leur méta-analyse sur l'effet de l'état corporel sur le taux de gestation après l'IA1, que ces relations sont très hétérogènes entre études, mais que leur lien est plus clair si les critères d'état utilisés sont l'état corporel au vêlage ou les variations d'état entre le vêlage et la mise à la reproduction.

S'il y a échec après l'IA1, il y a entre 50 et 60 % de chance que l'arrêt de la gestation ait eu lieu au cours du premier mois (Ledoux et al., 2006 ; Santos et al., 2004). L'effet du déficit énergétique peut donc s'exercer sur la qualité des gamètes femelles, les conditions de la fécondation dans l'oviducte, la survie de l'embryon pendant sa vie libre ou au début de l'implantation dans l'utérus.

Pour étudier plus précisément la relation bilan énergétique-échecs précoces de gestation, nous limitons maintenant le moment des échecs aux pertes embryonnaires déterminées précisément à l'aide de critères moins globaux que le TRIA1. Le Tableau II-26 reprend les résultats des études qui s'intéressent à la relation entre déficit énergétique et mortalité embryonnaire.

Tableau II-26 Effet du déficit énergétique sur la non fécondation et/ou mortalité embryonnaire précoce (NF-MEP), sur la mortalité embryonnaire tardive (MET) et la fusion de la MET et de la mortalité fœtale (MF) chez la vache laitière

Etudes	Pays-Région	Indicateur du déficit énergétique	NF-MEP	MET	MET-MF
Fournier et Humblot, 1989	France	EC au vêlage		S, ↑ avec ↑ de l'EC	
Humblot, 2001		TP minimum des 3 premiers mois	S, ↓ avec ↑ du TP	NS	
Lopez-Gatius et al., 2002	Espagne	EC au vêlage			NS
		Perte d'EC entre le vêlage et un mois après			S, ↑ avec ↑ des pertes d'EC
Silke et al., 2002	Irlande	EC un mois après IA			NS
		Perte d'EC entre 28 et 56 jours			S, ↑ avec ↑ des pertes d'EC
Michel et al., 2003	France	EC à l'IA	NS		NS
Starbuck et al., 2004	Virginie (EU)	EC un mois après IA			S, ↑ pour EC faible ou élevé vs intermédiaire
Fréret et al., 2005	France	Perte d'EC >1point entre le vêlage et 60 jours pp	S, ↑		
Grimard et al., 2006		EC à l'IA			S, ↑ avec ↑ de l'EC
Cutullic et al., 2011		EC minimum pp	S, ↑	NS	

EC : Etat corporel ; EU : Etats-Unis ; TP : Taux protéique du lait ; IA : insémination Artificielle; pp ; postpartum
S : relation significative, NS : relation non significative ; ↑ : augmentation ; ↓ : diminution

Peu d'étude ont cherché à mettre en relation le niveau énergétique et la mortalité embryonnaire précoce chez la vache. Si Humblot (2001) et Fréret et al. (2005), Cutullic et al. (2011) rapportent une relation entre pertes précoces et le déficit énergétique significative, Michel et al. (2003) n'en identifient pas. En revanche, la relation entre les pertes plus tardives (embryonnaire et/ou fœtale) est mieux documentée mais plus controversées.

Lopez-Gatius et al. (2002), Silke et al. (2002), Starbuck et al. (2004) et Grimard et al. (2006) englobent dans leur étude, mortalité embryonnaire tardive et mortalité fœtale (MET-MF). Pour Starbuck et al. (2004) et Grimard et al. (2006), les vaches qui présentent le meilleur état corporel à l'IA1 ou un mois après cette IA, voient les taux de mortalité embryonnaire tardive et/ou fœtale, augmentées. En 1989, Fournier et Humblot avaient déjà observé une telle relation entre les vaches en bon état et les échecs de gestation. Les vaches de leur étude dites « grasses » subissaient davantage de MET que les vaches « normales ». Mais il s'agissait de vaches « grasses » au vêlage, ce qui n'excluaient pas qu'elles maigrissent après et soient alors en déficit énergétique au moment de la mise à la reproduction. Les vaches à tendance « grasses » au tarissement ou au vêlage perdent davantage de poids après le vêlage que les vaches en état corporel idéal (Zulu et al., 2002). Si on considère que les vaches en meilleur état au moment de l'IA ont eu une prise alimentaire augmentée par rapport aux vaches plus maigres, leur métabolisme est plus actif ce qui diminuerait les concentrations en

progestérone plasmatique et dégraderait le maintien de la gestation (Rabiee et al., 2002 ; Sangsritavong et al., 2002 ; Vasconcelos et al., 2003).

Les vaches maigres de l'étude de Starbuck et al. (2004) subissent, elles aussi, davantage de mortalités embryonnaires tardives que les vaches en état intermédiaire. Cependant, Lopez-Gatius et al. (2002) et Silke et al. (2002) n'identifient aucune relation entre l'état corporel mesuré à un instant donné (au vêlage ou un mois après IA) et l'échec de gestation.

En revanche, dans ces deux dernières études, les changements d'état pendant le début de gestation, corrélés aux variations du bilan énergétique, sont fortement liées aux mortalités embryonnaires. Pour les vaches qui perdent un quart de point d'état entre 28 et 56 jours de gestation, la probabilité qu'elles perdent leur embryon/fœtus est deux fois supérieurs comparées aux vaches qui gagnent un quart de point d'état (Silke et al., 2002). Plus les pertes d'état sont importantes plus le risque d'arrêt de la gestation est élevé (Figure II-37).

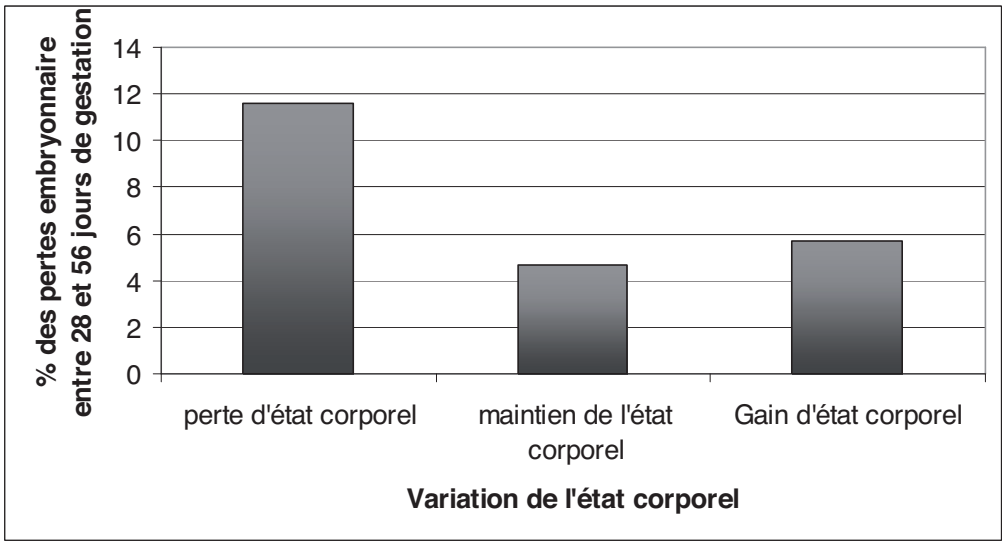


Figure II-37 Perte embryonnaire chez des vaches laitières selon la perte, le maintien ou le gain d'état corporel entre le 28ème et le 56ème jour de gestation (d'après Silke et al., 2002)

Ces deux études montrent clairement l'effet néfaste du déficit énergétique, mis en évidence par les pertes d'état corporel, sur la bonne évolution de la gestation après le début de la reconnaissance maternelle ; c'est à dire lors du développement embryonnaire tardif et le début du développement fœtal. Ces périodes correspondent au développement des placentomes, organes de relation nutritionnelle entre la mère et le conceptus (Curran et al., 1986). Le déficit énergétique pourrait nuire à l'installation de la relation foeto-maternelle, qui est indispensable à la survie de l'embryon puis du fœtus après l'implantation. Récemment, Cutullic et al. (2011) n'ont pas identifié de relation entre perte d'état et MET. En revanche, la MET dans leur étude a augmenté avec le pic de lactation pour des vaches en état corporel satisfaisant. Les effets d'une surexposition de la vache laitière au métabolisme de lactation et aux hormones galactopoiétiques lors du pic devraient être envisagés afin de comprendre la part du déficit énergétique et de la production laitière dans l'incidence de MET.

Très peu d'études ont exploré la relation entre le bilan énergétique et la mortalité embryonnaire précoce, c'est à dire avant la reconnaissance du conceptus par l'organisme maternel. Il est donc difficile de conclure à un effet du déficit énergétique sur cette période où la fréquence des échecs est très importante. En revanche, principalement au travers de l'évaluation des pertes d'état corporel prises comme critères de mesure du statut énergétique de la vache en début de la lactation, l'impact du déficit énergétique sur la mortalité embryonnaire tardive et fœtale est bien démontré. Les variations de bilan énergétique en début de gestation semblent aussi avoir un impact sur la survie embryonnaire mais, là encore, les relations sont peu explorées chez la vache. Cependant, la MET est aussi rapportée lors de forte production laitière souvent couplée à des pertes d'état corporel. L'effet du déficit énergétique séparément du métabolisme de lactation et de l'imprégnation des hormones galactopoétiques sur la MET constituerait une piste de recherche innovante.

III.2.3.4 Mécanismes d'action du déficit énergétique sur l'infertilité

Les facteurs endocriniens et métaboliques préalablement cités comme indicateurs du déficit énergétique sont autant de candidats susceptibles de jouer un rôle déterminant dans l'influence du métabolisme sur la fonction de reproduction. D'une façon générale, ces facteurs agissent au niveau central, c'est à dire sur l'axe hypothalamo-hypophysaire, ou au niveau gonadique et utérin (pour revue, Leroy et al., 2008a).

❖ Action sur la croissance folliculaire et la maturation ovocytaire

L'effet préjudiciable du niveau alimentaire et particulièrement du déficit énergétique sur la fertilité des vaches laitières hautes productrices est souvent rapporté (Wathes et al., 2007b, Leroy et al., 2008a ; Leroy et al., 2008b).

Britt en 1992 (cité par Leroy et al., 2008a) est le premier à avoir émis l'hypothèse que le déficit énergétique pendant la phase de croissance de l'ovocyte expulsé lors de l'ovulation à l'IA1 pouvait avoir un effet sur la qualité du gamète émis et sur celle du corps jaune qui se forme après l'ovulation.

Certains auteurs identifient une dégradation de la qualité des ovocytes des vaches présentant un déficit énergétique (début de lactation) par rapport à celles qui ont un bilan énergétique positif (milieu de lactation, Walters et al., 2002a), ou en comparant le développement *in vitro* de vaches à haut potentiel génétique vs potentiel moyen (Snijders et al., 2000). D'autres, n'ont pas montré cette relation (Argov et al., 2004), voire mesurent un effet positif du déficit énergétique sur la qualité des ovocytes (Kendrick et al., 1999). La fertilité au sens « capacité à produire des gamètes fécondables » modulée par le bilan énergétique semble controversée.

- Facteurs endocriniens

Les concentrations basses en insuline, IGF-1, et, probablement, en leptine sont les principaux facteurs endocriniens agissant sur le développement folliculaire, soit en agissant directement sur la

capacité du follicule à répondre à l'action des gonadotrophines (LH et FSH), soit en agissant indirectement sur la diminution des concentrations et des pulses de LH hypophysaire (Lucy, 2003 ; Wathes et al., 2003 ; Webb et al., 2004).

La perturbation des fréquences et des amplitudes de décharge pré-ovulatoire de l'hormone lutéinisante (LH) est un des principaux effet du déficit énergétique sur les facteurs hormonaux (Lucy, 2003 ; Webb et al., 2004). Grimard et al. (1995) ont montré que la fréquence des pulses de LH était négativement corrélée à la concentration plasmatique d'AGNE, c'est à dire qu'au moment où la vache mobilise le plus ses réserves la fréquence des pulses diminue. La LH est indispensable à la croissance et à la maturation finale de l'ovocyte. Les décharges pré-ovulatoires de LH déclenchent la reprise de la méiose par l'ovocyte qui progresse jusqu'en métaphase II (Hyttel et al., 1997 ; Humblot et al., 2005). Puis, les cellules de la granulosa modifient leur production de stéroïdes en diminuant la synthèse d'œstrogènes au profit de la synthèse de la progestérone, l'environnement progestéronique étant nécessaire à la reprise de la méiose (van den Hurk et Zhao, 2005).

In vitro, la leptine stimule elle aussi la progression de la méiose lors de la maturation ovocytaire. Elle a un effet anti-apoptose sur les cellules du cumulus environnant l'ovocyte mature et elle améliore la compétence de cet ovocyte. Ces actions sur l'ovocyte amélioreraient le nombre et la qualité des blastocystes produits in vitro (Boelhauve et al., 2005 ; Paula-Lopes et al., 2007). Chez des cochettes soumises à une diète alimentaire, la leptine chute de la même manière dans le plasma que dans le liquide folliculaire, laissant suggérer l'effet direct de la leptine sur le complexe ovocyte-cumulus en cas de sous-alimentation (Govoni et al., 2005). Chez la vache, la relation générale qui lie les concentrations plasmatiques basses de leptine avec le déficit énergétique est connue (Monget et al., 2004) mais le lien avec les concentrations du liquide folliculaire n'a pas été mis en évidence à notre connaissance.

Le système des Insulin-like Growth Factors (IGF) comprend les ligands insuline, IGF-1 et IGF-II, les protéines de liaison IGF-BP (Binding Protein) ainsi que trois récepteurs: le récepteur à l'insuline, le récepteur à l'IGF-1 (IGFR1) et le récepteur à l'IGF-II (IGFRII) (Winkler et al., 2000). En plus des protéases dégradant les IGF-BP, ce système se complexifie par l'ajout de variants des molécules et des récepteurs déjà cités.
Les concentrations en insuline plasmatique diminuent lors de bilan énergétique négatif chez la vache laitière haute productrice (Beam et Butler, 1997). Or, l'insuline stimule la réponse folliculaire à l'action des gonadotropines (Frajblat et Butler, 2000) et a probablement un effet direct sur la maturation ovocytaire (Butler et Smith, 1989).
Les IGFs et les IGFBPs sont considérés respectivement comme des stimulateurs et des inhibiteurs de la croissance et de la maturation folliculaire. La bioactivité des IGFs dans les ovaires est régulée par les IGFBPs. Celles-ci agissent comme des transporteurs et prolongent ainsi la demi-vie des IGFs dans le sérum, tandis qu'elles modulent l'action locale des IGFs au niveau des cellules et des tissus cibles (Giudice, 1992). Les récepteurs de l'IGF-1 et des IGF Binding Proteins (IGFBPs) ont été

identifiés dans les complexes ovocytes-cumulus, suggérant un effet direct de l'IGF-1 sur la régulation de la croissance folliculaire et sa maturation (Armstrong et al., 2002 ; Nuttinck et al., 2004 ; Wang et al., 2009). Via leurs récepteurs, les IGFs augmentent le nombre de petits follicules pendant la phase de recrutement, stimulent la croissance pendant la phase de sélection, et augmentent le nombre de récepteurs à LH et la production d'œstradiol en fin de croissance folliculaire (Adashi, 1998 ; Driancourt 2001 ; Wathes et al., 2003). Pendant la croissance terminale du follicule, les IGFs jouent un rôle clé dans la sensibilisation des cellules de la granulosa à l'action de la FSH. Les concentrations d'IGFBP-2 et IGFBP-4 dans le liquide folliculaire diminuent pendant la croissance folliculaire et augmentent pendant l'atrésie d'où respectivement une augmentation et une diminution de la biodisponibilité en IGFs (Mazerbourg et al., 2003).

Les concentrations basses en IGF-1 plasmatiques sont reliées au déficit énergétique chez la vache laitière en début de lactation (Beam et Butler, 1997 ; Velazquez et al., 2008). La concentration d'IGF-1 dans le sérum et dans le liquide folliculaire est positivement corrélée avec le statut énergétique de la vache (Funston et al., 1996). De plus, l'expression des gènes des IGFBP (-2 et -4) et de l'IGF-R1 est modulée en fonction du statut nutritionnel chez la brebis (Munoz-Gutierrez et al., 2004), influençant la biodisponibilité des IGFs dans le liquide folliculaire et de là, la réponse du follicule aux gonadotropines en cas de variations de couverture des besoins énergétiques (Adashi, 1998).

Zulu et al. (2002) proposent un schéma récapitulant l'action de l'IGF-1 en cas de déficit énergétique entraînant une diminution des taux d'IGF-1 (Figure II-38), ils rappellent l'action centrale (hypothalamo-hypophysaire) puis locale (ovaire) de cette hormone.

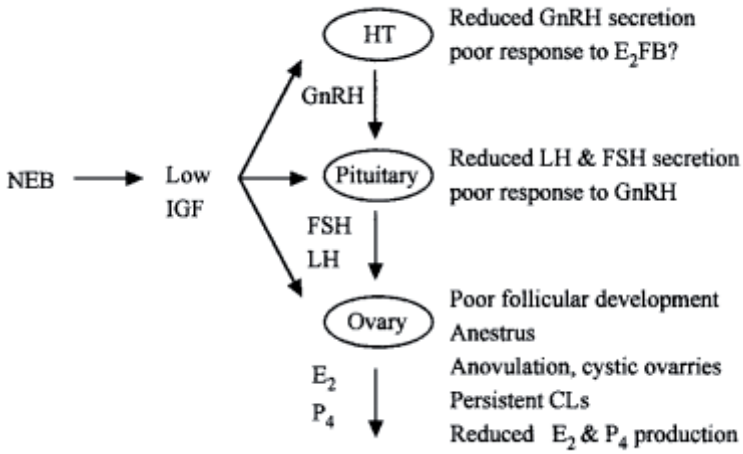


Figure II-38 Schématisation de l'effet d'une faible concentration en IGF-1 plasmatique sur l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez la vache laitière au cours du postpartum. HT : hypothalamus, E2 : Œstradiol ; P4 : progesterone ; CL : corpus luteum ; NEB : negative energy balance

- Action des métabolites

Leroy et al. (2004) ont montré que la croissance et la maturation ovocytaire étaient directement exposées aux variations biochimiques du sérum des vaches en cas de déficit énergétique (Figure II-39).

Les concentrations en glucose du liquide folliculaire varient en fonction du statut nutritionnel de la vache (Landau et al., 2000). Or, dans les cellules du cumulus, le glucose est métabolisé en pyruvate et lactate qui serviront de substrat à l'ovocyte pour générer des ATP. Dans l'ovocyte, le glucose est utilisé par la voie des pentoses phosphates pour finir dans la synthèse d'ADN et d'ARN (Sutton et al., 2003). En cas d'hypoglycémie, associée à un bilan énergétique négatif, la capacité de l'ovocyte pré-ovulatoire à se développer peut être compromise. Cependant, le follicule isolerait l'ovocyte des concentrations très basses du sérum en glucose (Leroy et al., 2004).

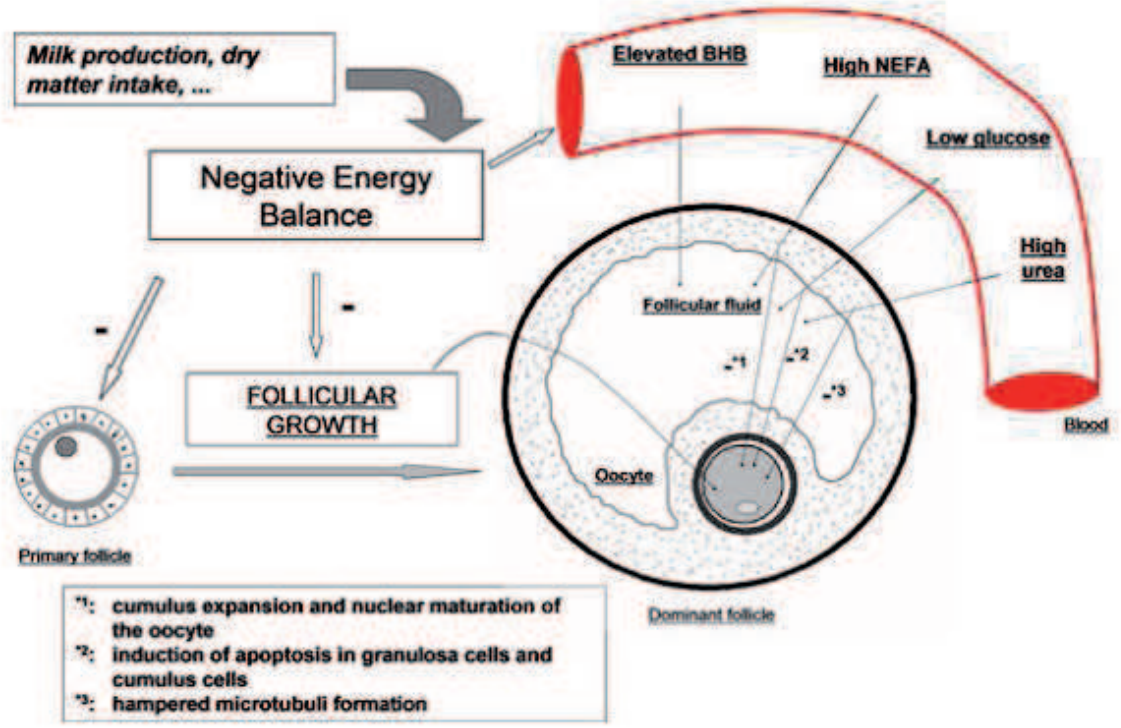


Figure II-39 Effets hypothétiques des métabolites modifiés pendant un déficit énergétique sur la croissance folliculaire et les qualités ovocytaires de vaches laitières hautes productrices (d'après Leroy et al., 2008a)

La lipomobilisation massive provoque une stéatose du foie (Vernon, 2002), diminuant l'efficacité des fonctions hépatiques. Le fonctionnement sous-optimal du foie est connu comme étant un facteur de détérioration de la fertilité de la vache laitière (Rukkwamsuk et al., 1999). Des concentrations plasmatiques élevées en AGNE, consécutives à une mobilisation des réserves lipidiques au cours de la période de déficit énergétique postpartum, se reflètent dans le liquide folliculaire du follicule dominant des vaches laitières. Or, un modèle *in vitro* dans lequel les AGNE retrouvés majoritairement dans le liquide folliculaire sont ajoutés au milieu de culture des ovocytes, montrent que les acides gras saturés (comme l'acide palmitique ou l'acide stéarique) provoquent une diminution du taux de maturation ovocytaire, probablement due à l'induction de l'apoptose et de la nécrose des cellules du cumulus lors de la maturation (Leroy et al., 2005). L'effet cytotoxique des concentrations en AGNE,

identifié aussi par Jorritsma et al. (2004) et Homa et Brown (1992), serait un facteur de détérioration de la qualité ovocytaire des vaches laitières.
L'augmentation des concentrations en corps cétoniques dans le sérum est associée à une dépression du système immunitaire, au travers de l'effet cytotoxique sur les cellules de l'immunité (Franklin et al., 1991 ; Hoeben et al., 1997). Bien que la relation entre les taux de corps cétoniques plasmatiques et dans le liquide folliculaire soit établie (Leroy et al., 2004), aucun effet cytotoxique direct n'a été démontré sur la qualité de l'ovocyte.

Enfin, dans les cas extrêmes de déficit énergétique, la vache puise dans ses réserves protéiques, augmentant ainsi les concentrations en urée et en ammoniaque du sang et du liquide folliculaire en parallèle (Leroy et al., 2004). Ces concentrations sont toxiques pour l'ovocyte (Sinclair et al., 2000 ; de Wit et al., 2001).

❖ **Action du déficit énergétique sur le corps jaune, l'oviducte et l'utérus**

Après la fécondation, la survie de l'embryon dépend de la chronologie entre le signal lutéolytique (prostaglandine) émis par les cellules de l'endomètre et le signal anti-lutéolytique (interféron tau) émis par l'embryon lui-même. L'embryon sain qui se développe normalement permet ainsi de maintenir des concentrations adéquates en progestérone synthétisée et sécrétée par les cellules lutéales pour maintenir la gestation. L'hormone clé qui garantit le développement embryonnaire et le maintien de la gestation est donc la progestérone (Mann et Lamming, 2001). Il faut un nombre de cycles suffisant avant l'insémination pour favoriser la fertilité de la vache (Butler, 2003), assurant ainsi la préparation de l'utérus à une future gestation. Or, le déficit énergétique augmente l'intervalle entre le vêlage et la première ovulation (Wathes et al., 2007a), réduit donc le nombre de cycles avant l'insémination et diminue la concentration en progestérone du deuxième et troisième cycle (Villa-Godoy et al., 1988 ; Staples et al., 1990). La qualité de la sécrétion de progestérone par le corps jaune est influencée par le niveau énergétique chez la vache. Villa-Godoy et al. (1988) puis Staples et al. (1990) ont montré que la quantité de progestérone sécrétée par le corps jaune est plus basse chez les vaches en déficit énergétique que chez celles en bilan énergétique positif. Dans ces deux études, l'influence du déficit énergétique n'est démontrée que pour le deuxième et le troisième cycle (40 à 70 jours postpartum), période privilégiée pour mettre les vaches à la reproduction. Spicer et al. (1990) ajoutent, grâce au dosage plasmatique de l'IGF-1, que la sécrétion de progestérone augmente avec la quantité d'IGF-1 alors qu'ils n'avaient pas vu de relation entre la bilan énergétique calculé et quantité de progestérone sécrétée. L'insuline et l'IGF-1, facteurs endocriniens directement liés au déficit énergétique, stimuleraient la production de progestérone par les cellules lutéales (Schams et Berisha, 2004). L'IGF-1, exercerait elle-même un effet positif direct sur le développement embryonnaire (Moreira et al., 2000).
Des études récentes se sont intéressées à l'impact du déficit énergétique sur l'appareil génital. Ainsi, Fenwick et al. (2008) ont montré que l'expression de deux IGFBP (2 et 6) diminuaient en cas de déficit énergétique sévère chez la vache par rapport à un déficit modéré. Wathes et al. (2009) ont montré qu'un déficit énergétique en début de lactation était associé à une surexpression des médiateurs de

l'inflammation dans l'endomètre : augmentation de l'expression de gènes antimicrobiens, de cytokines et leurs récepteurs, ainsi que de plusieurs gènes codant pour des interférons. Le processus de réparation de l'utérus chez les femelles en déficit énergétique était moins avancé par rapport aux femelles présentant un déséquilibre modéré, ce qui prolongeait la période de remaniement et d'inflammation de la muqueuse utérine. Enfin, Valour et al. (publication en cours) a montré la présence de gène différentiellement exprimés dans l'oviducte (relatif à l'immunologie, à la structure cellulaire, au métabolisme de lipides et à la croissance cellulaire et sa prolifération) et dans l'endomètre des vaches témoins vs. sous-alimentées prélevées entre le 4ème et le 15ème jour du cycle oestral mais aucun dans le corps jaune.

Le déficit énergétique identifié via les variations sérologiques/plasmatiques et les variations du liquide folliculaires des facteurs endocriniens et métaboliques a une action directe sur la croissance folliculaire et la maturation ovocytaire, supposant un effet néfaste sur la qualité de l'ovocyte fécondable et un rôle sur l'augmentation de l'intervalle vêlage-première ovulation. Cependant, les études s'entendent aussi pour attribuer au déficit énergétique un rôle dans les mortalités embryonnaires tardives, les sécrétions de progestérone, assurant la gestation seraient détériorées par ce déficit énergétique.

IV. Conclusion l'étude bibliographique

La fertilité (mesurée par le taux de réussite en première insémination) des vaches de race Holstein s'est dégradée au cours des 20 à 30 dernières années. Actuellement en France et aux Etats-Unis, seules 30 à 35 % des premières inséminations aboutissent à un vêlage. Les enquêtes épidémiologiques réalisées en France à l'aide de méthodes de suivi hormonal le jour de l'IA puis 21 jours après, associées aux techniques échographiques de diagnostic de gestation réalisées après le premier mois de gestation ont mis en évidence que les mortalités embryonnaires précoces de gestation sont les échecs quantitativement les plus fréquents. Au-delà, les mortalités embryonnaires tardives souvent englobées avec une partie de la mortalité fœtale seraient légèrement moins fréquentes mais très pénalisantes sur le plan économique. A partir de 80-100 jours de gestation, les vaches toujours gestantes ont de grandes chances de le rester jusqu'au vêlage. Une meilleure connaissance de la chronologie des échecs de gestation permettrait de préciser la période au cours de laquelle intervenir pour agir sur l'infertilité.

Les facteurs de risque de l'interruption de la gestation sont multiples : liés à l'animal (génétique, rang de lactation, production laitière…), à l'environnement, et à la conduite de l'élevage. Trois facteurs cependant ont évolué au cours du temps pour les vaches Holstein :

- le potentiel génétique pour la fertilité s'est dégradé du fait de sa liaison négative avec le potentiel laitier,
- les anomalies de reprise de la cyclicité deviennent de plus en plus fréquentes (c'est surtout le cas pour les phases lutéales prolongées) et elles sont asscoiées à une baisse de fertilité,
- le déficit énergétique en début de lactation a probablement augmenté avec le temps car, même si les connaissances en alimentation s'améliorent, la production laitière a beaucoup augmenté lors des dernières décénies en race Holstein.

Nous nous proposons d'explorer ces 3 facteurs dans notre travail expérimental afin de mieux comprendre leurs effets pour mieux cibler des stratégies de maîtrise qui permettraient de limiter leur action.

Hypothèses et méthodologies expérimentales

Chapitre III. Hypothèses et méthodologies expérimentales

I. Contexte

I.1. Evolution de la chronologie des échecs de gestation dans les trois grandes races laitières françaises

Le bilan réalisé par Barbat et al. (2005), complété par Le Mézec et Barbat (2007) et Le Mézec et al. (2010 a et b) faisant le point sur la fertilité des trois grandes races laitières en France a été calculé à partir des dates d'IA et des dates de vêlage enregistrées dans la base du SIG.

Le taux de non retour à X jours mesure le pourcentage de vaches ne présentant pas de nouvelle insémination à cette date et donc supposées gestantes (Barbat et al., 2005). La spécificité de la détection des chaleurs dans les élevages est élevée. Les inséminations réalisées en phase lutéale sont peu nombreuses (entre 4 et 5 % des vaches laitières mises à la reproduction sur des études en ferme à grande échelle ; Michel et al., 2003 ; Fréret et al., 2005 ; Grimard et al., 2006). L'incidence des échecs de gestation peut alors être estimée sur la base des taux de retours à l'insémination. Si la vache présente une nouvelle insémination, elle est considérée comme non gestante de l'insémination précédente. Les taux de retours à 28, 56, et 90 jours après IA permettent d'estimer la chronologie des échecs précoces de gestation entre l'insémination et le vêlage. Cependant, la sensibilité de la détection des chaleurs étant faible (55,8% dans des élevages Holstein à faible fertilité, Grimard et al., 2004a, 2005), le risque en utilisant ce critère est de sous estimer l'incidence des échecs mais cela peut permettre de comparer les races, l'évolution de la chronologie des échecs entre les races (en supposant que les variations de spécificité et de sensibilité de la détection des chaleurs, s'il y en a, ont été voisines entre les races au fil du temps).

Il apparaît ainsi que les taux de retours entre 2 et 90 jours sont plus élevés chez les vaches Holstein que chez les Normandes et les Montbéliardes connues comme étant plus fertiles (Figure III-1 et Figure III-2 a-c).

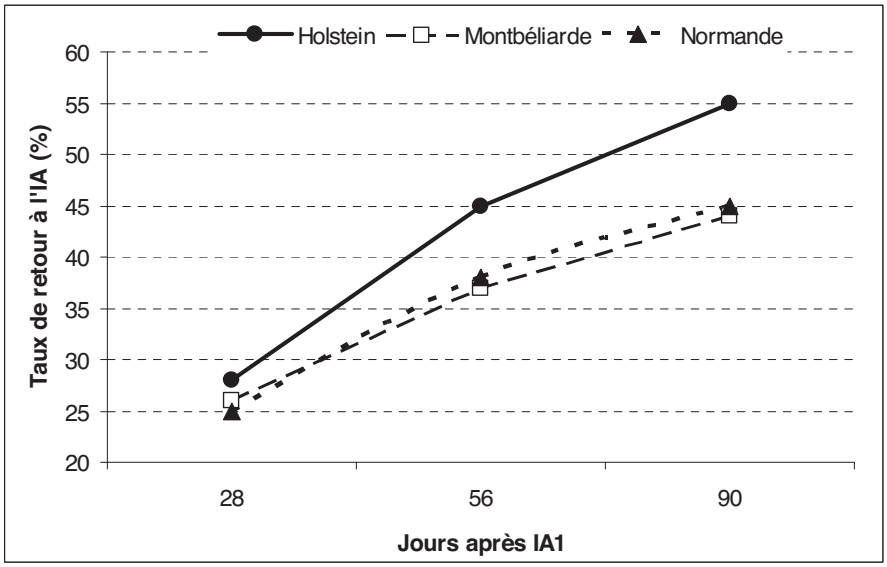
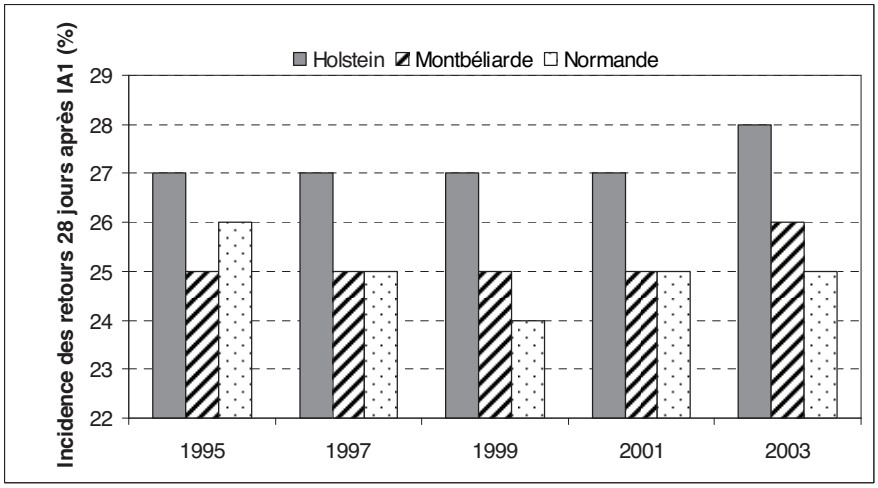
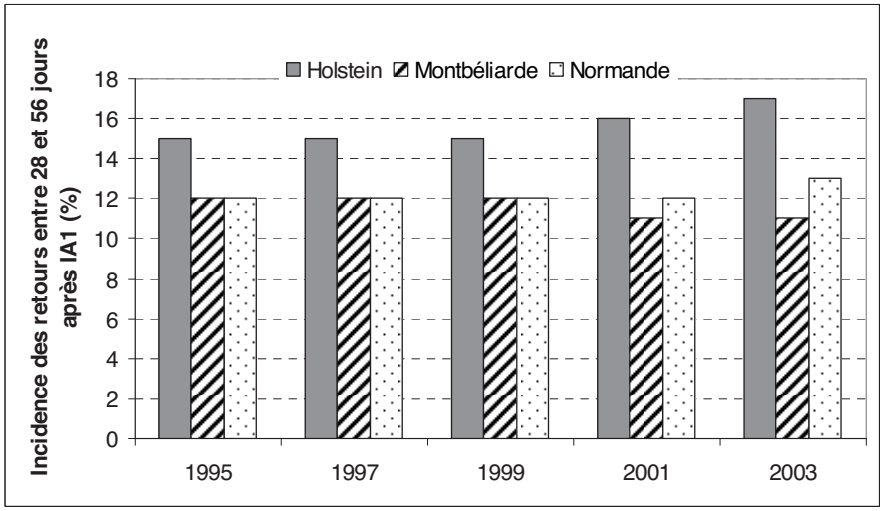


Figure III-1 Fréquence des retours après la première insémination artificielle (IA1) chez les vaches de race Holstein, Montbéliarde et Normande (toutes lactations confondues, campagne 2003 ; modifié de Barbat et al., 2005)

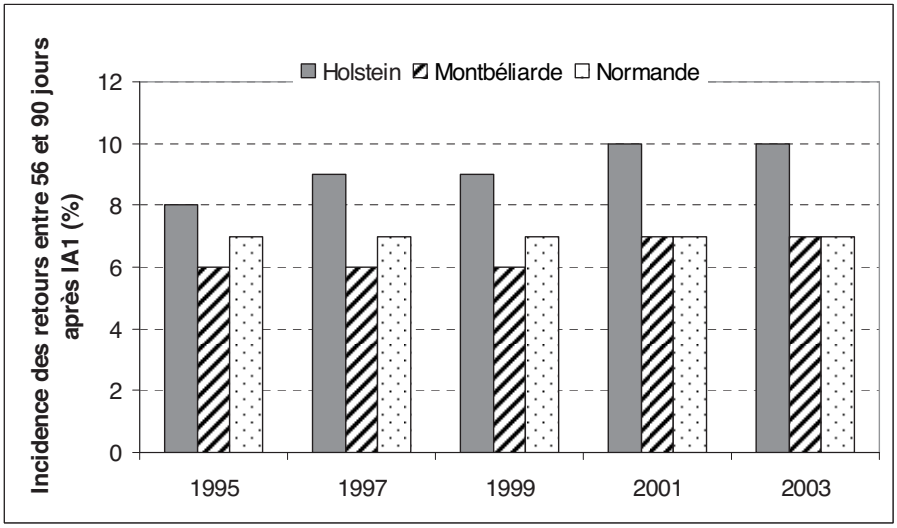
Dans les trois races, l'incidence des retours à 28 jours (Figure III-2 a), assimilée à la non fécondation-mortalité embryonnaire précoce est plus élevée que celle des retours entre 28 et 56 jours (assimilée aux mortalités embryonnaires tardives ; Figure III-2b) ou des retours après 56 jours (assimilée aux mortalités fœtales ; Figure III-2c).



a)



b)



c)

Figure III-2 Evolution de l'incidence des retours a) à 28 jours ; b) entre 28 et 56 jours et c) entre 56 et 90 jours après la première insémination chez les vaches Holstein, Montbéliardes et Normandes (toutes lactations, Modifié de Barbat et al., 2005)

Entre 1995 et 2003, l'incidence des retours après IA1 a légèrement augmenté chez les vaches Holstein alors qu'elle est restée constante chez les vaches Normandes et Montbéliardes (Figure III-2 a, b et c).

Les retours à l'insémination ou échecs de gestation sont la conséquence soit d'une absence de fécondation, soit d'une fécondation suivie d'une perte embryonnaire ou d'une perte fœtale au cours de la gestation (Figure III-3).

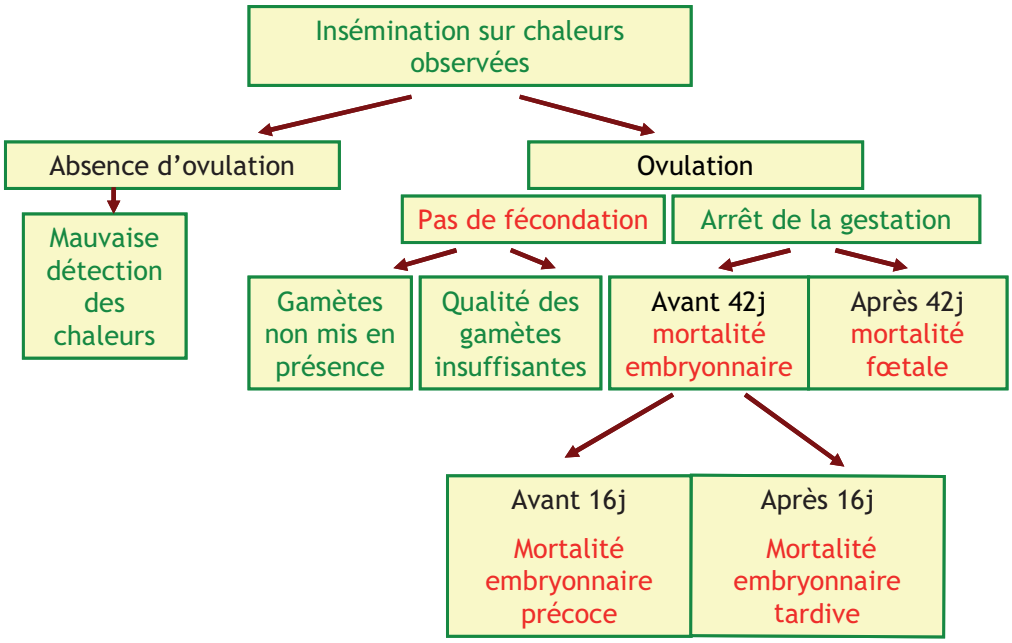


Figure III-3 Schématisation des échecs de gestation chez la vache inséminée (modifiée d'après Saint-Dizier, 2007)

L'étude des échecs précoces de gestation et de leurs facteurs de risque semble indispensable si l'on souhaite améliorer la fertilité des vaches Holstein.

I.2. Spécificités des vaches Holstein pouvant expliquer leur faible fertilité

I.2.1 Sélection génétique sur le potentiel laitier : une sélection plus importante en race Holstein que dans les autres races Françaises

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique (Chapitre II.III.2.1) la sélection sur le potentiel laitier s'est accompagnée d'une dégradation de la fertilité compte tenu de la corrélation génétique négative entre les deux caractères. Hors, en France la sélection sur le lait a été plus importante sur les dernières décennies en race Holstein qu'en race Montbéliarde ou Normande. Le progrès génétique des vaches Holstein est évalué à plus de 2 000 kg de lait entre 1989 et 2009 contre 1 300 et 1 400 kg pour les races Montbéliarde et Normande (Figure III-4).

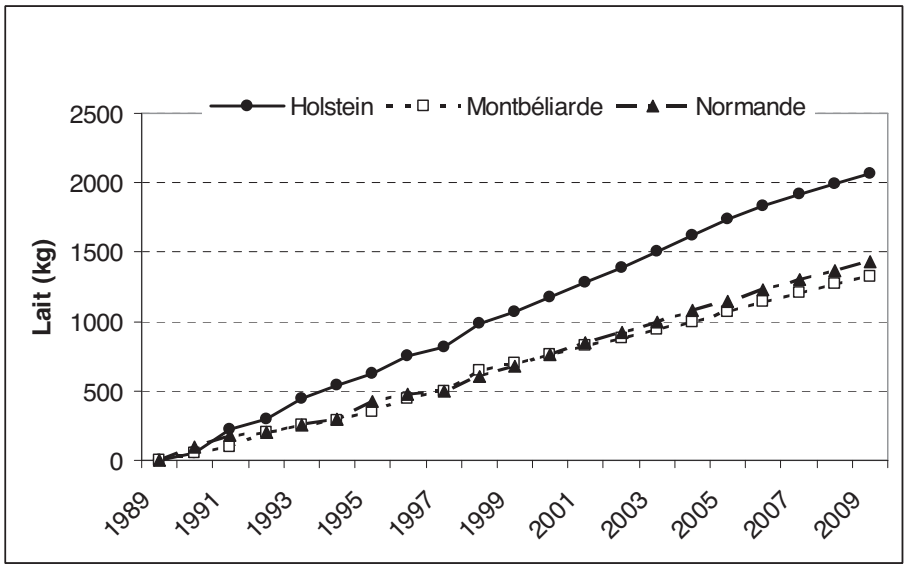


Figure III-4 Evolution du niveau génétique laitier des vaches de race Holstein, Montbéliarde et Normande en écart à 1989 (index de 2009/3, toutes lactations ; Le Mézec et al., 2010)

La prise en compte de la valeur génétique pour la fertilité des taureaux dans l'ISU depuis 2001 (Institut de l'élevage et INRA, 2001) a ralenti l'évolution défavorable de la fertilité (Le Mézec et al., 2010a) mais les effets de cette composante génétique sur les échecs précoces de gestation sont actuellement inconnus. Les connaître permettrait peut être de mieux les comprendre, de sélectionner plus tôt sur la fertilité (par des mesures précoces au cours de la gestation des filles des taureaux évalués), de rechercher des QTL liés spécifiquement aux échecs précoces qui sont les plus fréquents dans le but à terme de faire de la sélection génomique sur ces QTL.

I.2.2 Anomalies de la reprise de cyclicité postpartum : une fréquence élevée en race Holstein

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique (Chapitre II.III.2.2.4), les anomalies de reprise de la cyclicité après vêlage ont des effets sur les performances de reproduction. Or, ces anomalies sont plus fréquentes en race Holstein que dans les autres races plus fertiles (pour revues : Crowe, 2008 ; Grimard et Disenhaus, 2005). Fagan et Roche (1986) rapportent 22 % de profils hormonaux postpartum irréguliers chez la vache Frisonne Irlandaise contre plus de 45 % chez la vache de race Holstein moderne (Opsomer et al., 1998). La Holsteinisation de la race Frisonne Britannique s'est accompagnée d'une augmentation de 12 points en 20 ans du nombre d'anomalies de reprise de cyclicité recensées après vêlage (Royal et al., 2000). Chez les races fertiles en France, la fréquence des anomalies de reprise de cyclicité est plus faible qu'en race Holstein. Disenhaus et al. (2008) observent respectivement 81 % et 67 % de profils normaux de reprise de cyclicité en race Normande et Montbéliarde vs. 55 % en race Holstein.

I.2.3 Déficit énergétique en début de lactation : un déficit plus élevé en race Hosltein que dans les autres races

Comme cela a été rappelé dans l'étude bibliograhique (Chapitre II.III.2.3.3) le déficit énergétique en début de lactation pourrait expliquer en partie la faible fertilité des vaches. Les vaches Holstein, produisent davantage que les vaches Normandes et Montbéliardes (lactation brute: 8 993 kg pour les vaches Holstein, 6 541 kg pour les vaches Montbéliarde et 6 201 kg pour les vaches Normande en France en 2009 ; Institut de l'élevage, 2010)

De plus, comme cela est illustré dans la Figure III-5, la production moyenne au contrôle laitier a plus augmenté en race Holstein ces dernières décennies que dans les 2 autres races.

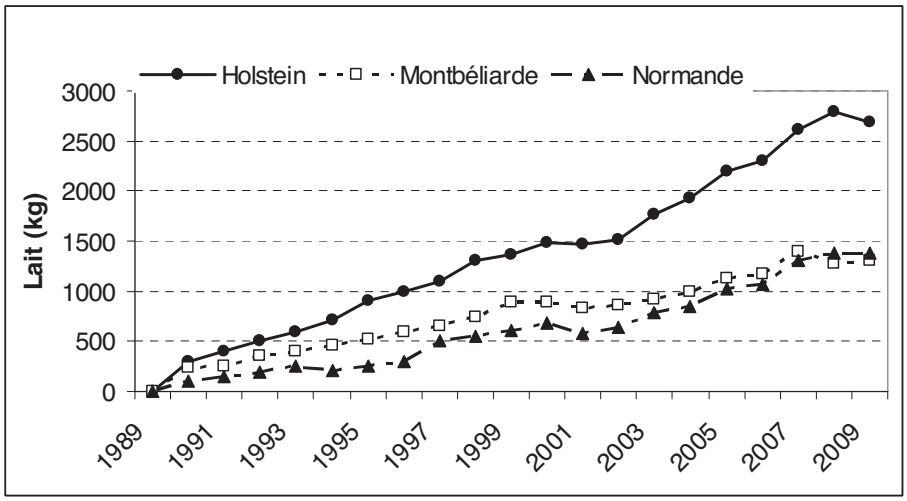


Figure III-5 Evolution de la production laitière des vaches de race Holstein, Montbéliarde et Normandes contrôlée en écart à 1989 (toutes lactations, Le Mézec, 2010)

Il est probable que ces vaches soient en déficit énergétique plus prononcé que les autres races en début de lactation et qu'elles maigrissent plus, ce qui est défavorable à leur fertilité.

II. Objectif, hypothèses

II.1. Objectif

Les échecs précoces de gestation après première insémination expliquent en grande partie les différences de fertilité observées en France entre la race Holstein et les autres races plus fertiles.

Notre objectif est d'identifier des facteurs de risque des échecs précoces de gestation après première insémination postpartum chez la vache de race Holstein. L'identification des périodes affectées doit permettre de mieux comprendre l'effet des facteurs et d'adapter les stratégies de maîtrise.

Nous explorerons les effets de trois facteurs connus sur les échecs précoces de gestation : le potentiel génétique pour la fertilité, les anomalies de reprise de la cyclicité après vêlage, le déficit énergétique en début de lactation.

II.2. Hypothèses

- **Hypothèse 1 : Le potentiel génétique de fertilité postpartum s'exprime sur les échecs précoces de gestation.**

Les effets génétiques sur la mortalité embryonnaire mesurés jusqu'à maintenant dans des enquêtes de terrain sont des effets « indirects ». Par exemple, l'index lait ou l'index économique laitier (INEL) ont été mis en relation avec l'incidence ou la fréquence de la NF-MEP ou avec la MET (Humblot, 2001 ; Grimard et al., 2006). Aucune étude à notre connaissance ne met en relation l'index de fertilité postpartum calculé depuis 2001 pour les taureaux (Institut de l'élevage et INRA, 2001) et les échecs précoces de gestation des vaches.

Nous faisons l'hypothèse que le potentiel génétique de fertilité postpartum s'exprime surtout sur les échecs précoces de gestation comme le laisse supposer les effets du potentiel laitier corrélé négativement à la fertilité.

- **Hypothèse 2 : Les anomalies de reprise de cyclicité postpartum ont des effets sur les échecs précoces de gestation**

Actuellement, les effets des anomalies de reprise de cyclicité sur les performances de reproduction sont mesurées de façon globale (Chapitre II.III.2.2.4). L'effet des anomalies de reprise de cyclicité sur le taux de réussite en première insémination est décrit sans qu'il soit possible de dire si les échecs de gestation sont des échecs précoces ou tardifs.

Le retard de reprise de cyclicité est associé à un déficit énergétique postpartum (Chapitre II.III.2.2.3). Le déficit pourrait être à l'origine d'un défaut de qualité de l'ovocyte produit au moment de l'ovulation ce qui entraînerait une augmentation de l'incidence de NF-MEP. De plus, en cas de retard de reprise de cyclicité, l'IA1 est réalisée sur une des premières ovulations postpartum. L'ovocyte et le corps

jaune qui se met en place sont réputés pour être de moins bonne qualité ce qui peut entraîner soit de la NF-MEP (ovocyte de mauvaise qualité), soit de la MET (incapacité du corps jaune à maintenir la gestation).

Lors de phase lutéale prolongée, l'imprégnation par la progestérone avant ovulation pourrait aussi entraîner une mauvaise qualité de l'ovocyte et une augmentation de NF-MEP. Le fait que les interventions au vêlage et les métrites soient un facteur de risque des phases lutéales prolongées peut avoir un effet sur la qualité de l'environnement utérin et expliquer des défauts d'implantation ce qui entraînera plutôt de la MET.

- **Hypothèse 3 : Le déficit énergétique en début de lactation est responsable d'une mauvaise qualité des ovocytes ce qui entraîne une augmentation de la non fécondation–mortalité embryonnaire précoce.**

Britt en 1992 (cf Chapitre II.III.2.3) est le premier à avoir émis l'hypothèse que le déficit énergétique pendant la phase de croissance de l'ovocyte expulsé lors de l'ovulation à l'IA1 pouvait avoir un effet sur la qualité du gamète émis et sur celle du corps jaune qui se forme après l'ovulation. A notre connaissance cette hypothèse n'a jamais été vérifiée. Certains auteurs ont tenté d'avoir une approche indirecte de cette question en comparant les ovocytes de vaches en début de lactation à ceux de vaches en milieu de lactation (Walters et al., 2002a) ou de vaches à haut potentiel génétique vs vaches à potentiel moyen (Snijders et al., 2000). Nous allons tenter de vérifier une partie de l'hypothèse : un déficit énergétique prononcé en postpartum entraîne une diminution de la qualité des ovocytes produits au moment de la mise à la reproduction chez la vache laitière.

L'effet du déficit énergétique pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression des gènes du système IGF dans le complexe ovocyte-cumulus (IGF-1, récepteur à l'IGF-1 : IGFR-1, Protéines de liaison : IGFBP-2 et IGFBP-4, (Chapitre II.III.2.3.4).

II.3. Méthodologie expérimentale

II.3.1 Mesure de l'incidence des échecs précoces de gestation

Afin de déterminer l'incidence des échecs précoces de gestation, nous avons soumis les vaches à quatre examens successifs entre l'IA1 et 60-90 jours post-insémination : deux prises de lait ou de sang pour analyse de progestérone à J0 puis à J18-25 et deux diagnostics de gestation par échographie à J35-45 puis J60-90 (Figure III-6).
L'analyse de la progestérone a été réalisée dans le plasma par radioimmunologie selon la méthode développée par Terqui et Thimonier (1974 ; laboratoire d'hormonologie de l'INRA, Nouzilly) ou dans le lait par un test ELISA (Ovucheck®MILK, Biovet Inc. 4375, Beaudry Ave, St-hyacinthe, Quebec, J2s 8w2 Canada, laboratoire d'hormonologie de l'UNCEIA).

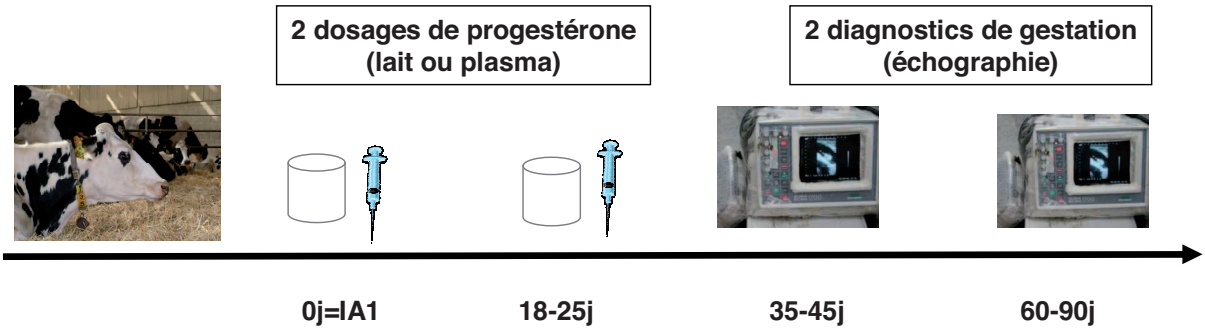


Figure III-6 Protocoles de mesures de l'incidence des échecs précoces de gestation

L'interprétation des résulats des quatre examens successifs, nous a permis de définir des phénotypes de fertilité (Tableau III-1) et de mesurer les incidences d'échecs précoces de gestation.
L'incidence de NF-MEP correspond au nombre de vaches non gestantes à J18-25 inséminées au bon moment (IA en phase folliculaire) sur le nombre de vaches inséminées au bon moment.
L'incidence de MET correspond au nombre de vache non gestantes à J45 et gestantes à J18-25 sur le nombre de vaches gestantes à J18-25.
L'incidence de MF à 60 ou 90 jours correspond au nombre de vaches non gestantes à J60-90 sur le nombre de vaches gestantes à J45.

Tableau III-1 Phénotype de fertilité

Dosage de progestérone		Retour en chaleurs	Diagnostic de gestation		Interprétation
J0	J18-25		J35-45	J60-90	
+					IA en phase lutéale
-	-	régulier			Non fécondation-mortalité embryonnaire précoce
-	+	décalé	négatif		Mortalité embryonnaire tardive
-	+	absent	positif	négatif	Mortalité fœtale
-	+	absent	positif	positif	Vache gestante à 60-90 jours

II.3.2 Identification des facteurs de risque ou des associations entre facteurs et échecs précoces de gestation

L'étude de l'**incidence** des échecs précoces de gestation plutôt que de leur **fréquence** nous semble pertinente.
Lorsque les retours à l'insémination surviennent entre l'IA1 et le vêlage, l'incidence de vaches non gestantes à chaque stade augmente la fréquence des vaches non gestantes. Il convient de ne pas conserver les vaches ayant présenté de la non fécondation-mortalité embryonnaire précoce lorsque l'on étudie la mortalité embryonnaire tardive. Sinon les deux types d'échecs sont confondus dans l'étude des facteurs de risque. Les caractéristiques de la NF-MEP vont apparaître comme cause possible d'échec après 16 jours alors qu'elles ont eu un effet avant 16 jours. Lors de l'étude des facteurs de risque de l'incidence de MET, les vaches ayant perdu leur embryon entre 16 et 45 jours

sont comparées à celles qui ont poursuivi leur gestation au delà de 45 jours. Ainsi, les vaches ayant présenté de la NF-MEP sont alors exclues de l'étude des facteurs de risque de la MET qui peuvent alors être identifiés.

II.3.3 Effet génétique sur les échecs précoces de gestation

Au moment de la mise en place de cette étude, l'estimation de la valeur génétique des femelles pour la fertilité avec une précision correcte était impossible (elle est possible aujourd'hui avec l'évaluation génomique des index, David et Fritz, 2011). Le potentiel génétique des taureaux était évalué à partir des performances de leurs filles.

Nous avons mis en place une enquête épidémiologique en ferme. Les filles d'un nombre limité de taureaux largement diffusés possédant des index de fertilité postpartum bien connus (CD>0.95) et différents ont été suivies de la première IA postpartum à 90 jours post-insémination entre le mois de septembre 2006 et le mois de septembre 2010.

L'enquête a permi d'établir le phénotype de fertilité précis de plus de 3500 filles de 12 taureaux. L'effet du génotype du père sur le phénotype des filles a pu être exploré. Le nombre de vaches incluses dans l'étude a permi d'étudier conjointement les effets génétiques et ceux de facteurs de risque connus de l'infertilité (niveau de production, qualité du lait, rang de lactation, saison d'insémination, jour de la semaine…) sur l'incidence des échecs précoces de gestation et ainsi d'ajuster les effets observés (modèles multivariés).

II.3.4 Effet des anomalies de reprise de cyclicité postpartum sur les échecs précoces de gestation

La description des anomalies de reprise de cyclicité après vêlage nécessite un suivi régulier et fréquent de la progestéronémie (minimum de deux prises de sang pour dosage de la progestérone par semaine jusqu'à l'insémination). Cette étude a donc été réalisée dans le cadre d'une station expérimentale INRA (UCEA de Bressonvilliers, Leudeville, Essonne). Ce cadre nous a permis d'effectuer, deux fois par semaine entre le vêlage et la première insémination, des prises de sang pour analyse de progestérone afin de définir les profils de reprise de cyclicité après vêlage de 239 périodes postpartum. L'enregistrement des données zootechniques (état corporel, poids vif, production laitière et qualité du lait) et de conduite d'élevage (date de vêlage, conditions de vêlage, date d'insémination, traitement) a pu être réalisé. Les structures ovariennes (follicules, corps jaune) ont été suivies par échographie transrectale. L'objectif était de déterminer si l'aspect des follicules et des corps jaunes pouvait fournir une aide au diagnostic des anomalies de reprise de cyclicité après vêlage.

II.3.5 Effet du déficit énergétique postpartum sur la qualité des complexes ovocytes-cumulus

La mise à la reproduction des vaches laitières hautes productrices a lieu entre 45 et 90 jours postpartum. Les ovocytes peuvent être récoltés *in vivo* par aspiration après ponction folliculaire échoguidée (méthode Ovum Pick-Up ou OPU). Le nombre de follicules à ponctionner (follicule à antrum) au cours du postpartum est limité par la production laitière élevée (Lucy et al., 1992 ; Kendrick et al., 1999 ; Walters et al., 2002a). Un traitement de superovulation a été appliqué afin d'augmenter le nombre de complexes ovocytes-cumulus (COC) récoltés par vache à l'OPU pour pouvoir par la suite explorer la qualité des COC récoltés.

Nous avons mis en place une expérimentation en station (Station INRA : UCEA de Bressonvilliers, Leudeville, Essonne, France). Deux lots de 11 vaches ont reçu des rations équilibrées pour couvrir une production de 40 (lot témoin) vs 32 (lot restreint) kg de lait. Les animaux ont été soumis à un traitement de synchronisation des chaleurs puis à un traitement de superovulation. Les ovocytes ont été récoltés 80 jours postpartum et leur qualité évaluée par une note visuelle et les ARNm des composants du système IGF (IGF-1, IGFR-1, IGFBP-2, IGFBP-4) ont été quantifiés.

Etudes expérimentales

Chapitre IV. Etudes Expérimentales

I. Publication et communication associées aux travaux

❖ Publications de recherche dans des revues internationales

LEDOUX D, PONSART C, GRIMARD B, GATIEN J, DELOCHE MC, FRITZ S, LEFEBVRE R, HUMBLOT P. Relationship between genetic fertility merit of Holstein bulls and the incidence of pregnancy failure between D0 and D90 after first postpartum insemination in their female offspring. Publication en cours, Animal Reproduction Science

LEDOUX D, TOUZE JL, RICHARD C, PONTER AA, BOSC MJ, GRIMARD B. *2011*. Abnormal patterns of resumption of cyclicity after calving in Holstein cows : risk factors, relationships with the ultrasound appearance of the ovaries and with gestation failure after AI. Revue de Médecine Vétérinaire, 162, 98-106

❖ Communications de recherche en congrès

LEDOUX D, GATIEN J, GRIMARD B, DELOCHE MC, FRITZ S, LEFEBVRE R, HUMBLOT P, PONSART C. *2011*. Phenotyping pregnancy failure occurring within 90 days following first postpartum insemination in Holstein cattle and relationship with fertility breeding value of bull fathers. Proc: ICAR General Assembly “New technologies and new challenges for breeding and herd management”, Bourg-en-Bresse, France, 22-24 juin 2011. Poster, accepté

LEDOUX D, GATIEN J, GRIMARD B, DELOCHE MC, FRITZ S, LEFEBVRE R, HUMBLOT P, PONSART C. *2011*. Phénotypage des échecs de gestation entre 0 et 90 jours après 1ère insemination postpartum en race Holstein et relations avec l’index de fertilité postpartum des pères utilisés. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, 18ème journées 7 et 8 décembre 2011, Communication courte, accepté.

LEFEBVRE R, FRITZ S, **LEDOUX D**, GATIEN J, GENESTOUT L, ROSSIGNOL MN, GRIMARD B, BOICHARD D, HUMBLOT P, PONSART C. *2011*. GENIFER: cartographie fine des effets de QTL de fertilité en race bovine Holstein. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, 18ème journées, Paris, 7 et 8 décembre 2011, poster, accepté.

LEDOUX D, TOUZE JL, LAIGRE P, RICHARD C, GRIMARD B. *2007*. Anomalies de reprise de cyclicité postpartum chez la vache laitière Prim’Holstein : Facteurs de risque et relation avec les structures ovariennes vues par échographie. Proc : Rencontres Recherche Ruminants, 14ème journées, Paris, décembre 2007, Poster.

LEDOUX D, TOUZE JL, LAIGRE P, RICHARD C, GRIMARD B. *2006*. Chronology of pregnancy failure related to abnormal patterns of resumption of postpartum cyclicity in dairy cows. Proc: 10th ESDAR annual Conference, Ljubljana, Slovenia, 7-9 September 2006, Reproduction in Domestic Animals 41, 4, 348, Abstract.

LEDOUX D, TOUZE JL, LAIGRE P, RICHARD C, GRIMARD B. *2006*. Relation entre la chronologie des échecs de gestation et anomalies de reprise de cyclicté postpartum chez la vache laitière. Proc : Rencontres Recherche Ruminants, 13ème journées Paris, 6-7 décembre 2006, Poster.

GRIMARD B, CONSTANT F, **LEDOUX D**, CHASTANT-MAILLARD S. *2006*. Mise à la reproduction des génisses, insémination sur chaleurs naturelles ou sur synchronisation ? In : Journées Nationales des GTV, Dijon 2006, 883-887, Communication courte.

❖ **Communications en séminaire**

HUMBLOT P, AMIGUES Y, PONSART C, GATIEN J, **LEDOUX D**, GRIMARD B, EGGEN A, FRITZ S, BOICHARD D. *2009*. Mesures phénotypiques et étude du polymorphisme de gènes candidats de QTL de fertilité femelle en race Prim'Holstein. Séminaire AGENAE/GENANIMAL 21, 22, 23 octobre 2009, Tour, Fr.

HUMBLOT P, AMIGUES Y, PONSART C, GATIEN J, **LEDOUX D**, FRITZ S. *2008* Mesures phénotypiques et étude du polymorphisme de gènes candidats de QTL de fertilité femelle en race Prim'Holstein. Séminaire AGENAE/GENANIMAL 20, 21, 22 octobre 2008, La Rochelle, Fr.

❖ **Publication à vocation de transfert (Annexe)**

LEDOUX D., HUMBLOT P, CONSTANT F, PONTER AA, GRIMARD B. *2006*. Echecs précoces de gestation chez la vache laitière. Le Point Vétérinaire. Numéro spécial Reproduction des ruminants : gestation, néonatalogie et post-partum, 37, 50-55

II. Etude expérimentale n°1 : Effet du potentiel génétique de « fertilité » sur les échecs précoces de gestation

Cette étude a été menée dans le cadre d'une collaboration entre l'UNCEIA (Union Nationale des Coopératives d'Insémination Animale), l'INRA (Institut Nationale de Recherche Agronomique, UMR INRA-ENVA BDR Biologie du Développement et Reproduction, UMR GABI Génétique Animale et Biologie Intégrative) et Labogena (Laboratoire d'Analyses Génétiques pour les Espèces Animales). Elle a été cofinancée par l'ANR (Programme GENANIMAL) et la société Apis Gene (regroupement d'organisations professionnelles comprenant l'UNCEIA, le CNIEL, INTERBEV, la CNE et l'Institut de l'Elevage).

L'article issu de ce travail est en cours de publication pour la revue Animal Reproduction Science.

II.1. Résumé

II.1.1 Dispositif expérimental

4239 vaches Holstein en première et deuxième lactation, filles de 12 taureaux largement diffusés et d'index fertilité variés (compris entre -0,7 et 1) et précis (CD≥0.95) ont été suivies de leur première insémination à 90 jours de gestation entre septembre de 2006 et septembre 2010. Pour chaque vache, la date du dernier vêlage, la date de première insémination, les dates de retour en chaleurs et/ou en deuxième IA, la production laitière, le taux protéique, le taux butyreux ont été enregistrés. Les vaches ont été soumises le jour de l'IA, 18-25 jours plus tard à une analyse de progestérone dans le lait puis à deux diagnostics de gestation par échographie à 45 jours puis à 80-100 jours.
La séquence des résultats des 4 examens réalisés, a permis de définir les phénotypes d'échecs de gestation pour 3508 vaches. L'analyse des facteurs de risque de l'incidence des échecs précoces de gestation a été réalisée par régression logistique en incluant dans les modèles l'effet du génotype paternel (Index fertilité en 3 classes) et les effets des facteurs de variation connus de la fertilité (rang de lactation, intervalle vêlage première IA, niveau de production, qualité du lait, saison d'IA, jour de la semaine de l'IA, année de l'IA, zone géographique).

II.1.2 Principaux résultats

Sur les 3508 vaches phénotypées, le taux de gestation à 90 jours après la première IA a été de 48,5 % (1702/3508). La proportion de vaches inséminées en phase lutéale a été de 5,0%. Les incidences de NF-MEP, MET et MF entre 45 et 90 jours ont été respectivement de 35,1 %, 19,0 % et 2,7 %. Les vaches issues des pères à faible index de fertilité (≤ -0,5) ont présenté plus de NF-MEP et de MET que les vaches issues de pères à index moyen ([-0,1 ; 0,3]) ou fort (≥ 0,5) mais l'incidence de la mortalité fœtale entre 45 et 90 jours a été équivalente dans les 3 classes d'index.

II.2. Article scientifique

Relationship between genetic fertility merit of Holstein bulls and the incidence of pregnancy failure between D0 and D90 after first postpartum insemination in their female offspring

LEDOUX D[1,2], PONSART C[3], GRIMARD B[1,2], GATIEN J[3], DELOCHE MC[3], FRITZ S[3], LEFEBVRE R[4], HUMBLOT P[5]

[1] Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 av du général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort Cedex, France;
[2] UMR INRA 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas Cedex, France;
[3] UNCEIA, Département Recherche et Développement, 13 rue Jouet, F-94704 Maisons-Alfort, France;
[4] UMR INRA 1313, Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France;
[5] Department of Clinical Sciences, SLU, 750-07 Uppsala, Sweden.

Summary

The object of the survey was to identify the incidence of pregnancy failure between 0 and 90 days after the first artificial insemination (AI) of Holstein cows in relation to the genetic postpartum fertility index of their sire (Fertility Index, FI). 4239 Holstein cows in their first or second lactation, born from 12 very widely used Holstein bulls, had a milk progesterone analysis on the day of the AI and 18-25 days (21.0 ± 1.5 days) later, then two pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography at 45 days (43.2 ± 8.3 days) and 90 days (94.5 ± 31.7 days). The sequence of the results of the 4 examinations carried out allowed a division into 4 phenotypes of pregnancy failure between insemination and 90 days of pregnancy in 3508 cows: (1) Insemination in the luteal phase (AI-LP, incidence 5.0 %, 177/3508); (2) fertilisation failure-early embryonic mortality (FF-EEM, incidence 35.1 %, 1169/3331, low progesterone at both D0 and D18-25); (3) late embryonic mortality (LEM, incidence 19.0 %, 411/2162, low progesterone at D0, raised at D18-25 and negative pregnancy diagnosis at D45); and (4) foetal mortality (FM, incidence 2.7%, 48/1751, positive pregnancy diagnosis at D45 then negative at D80-100). The FI of the bull was allocated to 3 classes (low [-0.7; -0.5], average [- 0.1; +0.3], and high [+0.5; 1.0]). The effect of the sire's FI on the incidence of pregnancy failure was analysed using mixed logistic regression models. The effects of the FI was corrected for known factors influencing fertility (milk yield, milk protein and milk fat contents, measured once a month during the first 3 months of lactation, number of lactations, day of the week of the AI, season of the AI, calving to first insemination interval, geographic zone, year of the survey and their interactions. The individual herd effect was accounted as a random effect. Cows from bulls with a low FI (≤ -0.5) were more at risk of FF-EEM or of LEM than cows from a bull with an average FI (Odds Ratio; OR=1.3, p=0.03; OR=1.4, p=0.007 respectively) or high FI (OR=1.3, p=0.02; OR=1.7, p<0.001 respectively). The FI had no influence on AI-LP or FM. This survey confirms the high incidences of early pregnancy failures. It details the categories of fertility in the first trimester of pregnancy and quantifies the effect of paternal genetic merit for fertility adjusted for environmental factors and female individual performances.

Key words
Fertility, embryonic mortality, genetic, fertility index, dairy cow

1 Introduction

The fertility of Holstein dairy cows, measured by the first service conception rate, has deteriorated over the last 20 to 30 years (Royal et al., 2000; Lucy 2001; Barbat et al., 2010). In France, the genetic postpartum fertility index of bulls (FI) used for artificial insemination (AI) is measured according to the number of calves born to their female offspring following artificial insemination (Institut de l'élevage and INRA, 2007). The heritability of fertility is low (between 1 and 2 %) but the genetic variability is high (σ_G=5% for conception rate at first IA; Boichard et al., 1998; Veerkamp and Beerda, 2007; Liu et al., 2008). In Holsteins, there is an inverse correlation between fertility and the quantity of milk produced. This explains the deterioration over the years as the genetic milk yield potential has improved (see reviews: Dillon et al., 2006; Dobson et al., 2007; Rodriguez-Martinez et al., 2008). In order to limit this deterioration, the genetic postpartum fertility index of bulls was introduced in 2001 in France in the synthetic breeding values, SBV (Institut de l'élevage and INRA, 2001). Since then, the first service conception rate for Holstein dairy cows has stopped deteriorating (measured between 2004 and 2008; Le Mézec et al., 2010). However, fertility remains very low in Holsteins, 10 to 15 points lower that other more fertile breeds, such as Montbéliardes and Normandes (50 % in Montbéliardes, 45 % in Normandes, less than 35 % in Holsteins for cows in their third lactation; Le Mézec et al., 2010).

Since the start of the decade of 2000, many QTL (Quantitative Trait Loci) for fertility have been identified by American and European scientists (Boichard et al., 2003; Ashwell et al. 2004; Sahana et al., 2010). Certain QTL have an important action on the first service conception rate in postpartum. Such an example is QTL BTA3 (*Bos Taurus* autosome 3) which could in itself account for 14% of genetic variation for the non-return rate at 90 days (proportion of cows not seen back in oestrus 90 days after first insemination; Guillaume et al., 2007; Druet et al., 2008). In a population of Danish and Swedish Holstein cows, other QTL have been identified as possessing a strong association ($p<10^{-5}$) between 5 fertility traits (fertility index, calving-1st AI interval, 1st service-conception interval, number of inseminations per conception, infertility veterinary treatments) and 24 QTL regions situated on 13 chromosomes (Sahana et al., 2010).
The identification of causative genes within these QTL allows on the one hand to reduce the size of the genome zones involved, and on the other hand to better identify the functions that are affected. These are probably multiple, but a better targeting of the period of pregnancy that is most affected will also point the direction for future research. Pregnancy failure most often occurs before 90 days (Santos et al., 2004), with failures before implantation being the most common cause (Humblot, 2001). Therefore this survey aimed to determine the relationship between the genetic postpartum fertility merit of Holstein bulls and the phenotype of their female offspring, by measuring the timing of pregnancy failures between 0 and 90 days after the first insemination.

2 Materials and methods

2.1 Animals

This survey was carried out thanks to the collaboration between UNCEIA (National Union of Cooperatives for Animal Insemination), INRA (National Institute for Agronomical Research) and ENVA (National Veterinary School of Alfort).

Twelve Holstein bulls, that were very widely used and of well-known genetic merit, were chosen (coefficient of determination of the Fertility Index, CD ≥ 0.95). A survey group of 4239 of their pure-bred female offspring, in their first and second lactation, spread across all of France, were followed between the first insemination postpartum and 90 days of pregnancy, during September 2006 to September 2010. These cows were inseminated by trained technicians from the insemination centres when oestrus was detected by the farmers.

2.2 Data recorded

The genetic postpartum fertility indexes of bulls (FI) correspond to the figures published on October 28th 2010 (Institut de l'Elevage and INRA, 2010a; Tableau IV-1). The breeding value of the bulls used for AI was estimated from the results of the insemination of their female offspring with a correction for random effects (genetic effects of each female, environment, interaction of the bull-insemination year) and fixed effects with many interactions (herd-year, insemination-year, month-region-year, weekday of insemination-region-year, age at AI for the heifers, calving to insemination interval, number of lactation, breed of bull, number of lactation before AI, and % of consanguinity of the cow and the calf born). The FI was expressed as units of genetic standard deviation and varied between -3 points and +3 points (0 being the average value of the reference population, the genetic value of the cows followed by the milk recording data board and born between 2002 and 2004, for the 2010 index). The FI of the bulls in this survey all had a CD above or equal to 0.95, because of their widespread use over a long period of time.

Tableau IV-1 Genetic index of postpartum fertility and number of female offspring followed, for the twelve sires included in the survey

No. of Sire	FI*	Number of female offspring per bull
6	-0.7	274
7	-0.7	414
4	-0.5	93
2	-0.1	516
3	0	258
1	0.1	180
11	0.2	314
10	0.3	234
12	0.5	442
9	0.8	280
8	0.9	269
5	1	234

* index of postpartum fertility 28/10/2010 (Institut de l'élevage and INRA, 2010a)

For each cow, the following data were recorded: date of calving, number of lactations, date of 1st insemination, date of return to oestrus and/or date of second insemination, milk yield, milk fat and milk protein content recorded once a month during the first 3 months postpartum. The data for the date of calving, number of lactations, and milk production were taken from the national database (Système d'Information Génétique). Some data were missing : 30 for number of lactation, 30 for date of calving and 234 for milk yield).

2.3 Samples and analysis

A milk sample was taken from each cow during the morning milking following oestrus detection or first insemination (D0), then at 18-25 days later (21.0 ± 1.5 days). The milk was collected after morning milking from all four quarters into a flask containing a preservative tablet (bronopol). After identification, it was sent to the UNCEIA hormone laboratory which carried out an analysis for progesterone on reception using an ELISA test (Ovucheck®MILK, Biovet Inc. 4375, av. Beaudry, Sainte Hyacinthe, Quebec, J2S 8W2 Canada). The milk progesterone level was interpreted as negative when the concentration was equal to or less than 2.5ng/ml, positive for a concentration equal to or above 3.5ng/ml and doubtful between these values. For the average values of 8.3, 0.67 and 1.70ng/ml, the inter-assay coefficients of variation were 11.5%, 8.8% and 11.5% respectively. The intra-assay coefficients of variation were 2.6%, 4.3% and 1.6% respectively.

Two pregnancy diagnosis using ultrasonography were carried out by a technician of the insemination centre at 45 days (43.2 ± 8.3 days), then at 90 days (94.5 ± 31.7 days) after the first insemination. The

ultrasound examination was recorded as either positive (embryo/foetus identified and living at the time of examination), or negative or doubtful.
The milk samples for progesterone analysis and the ultrasound pregnancy examinations recorded as doubtful were interpreted as positive, negative or were eliminated depending on the preceding and subsequent results in the sequence of samples/examinations.

2.4 Determination of the moment of pregnancy failure

The timing of the pregnancy failure was determined after studying the sequence of results of milk progesterone levels at D0, D18-D25, observed returns to oestrus and ultrasound pregnancy examinations on D45, then D90 (Table IV-2).

Table IV-2 Phenotype of postpartum fertility according to the results of progesterone levels in the milk and the pregnancy diagnosis carried out between D0 and D90 after the first insemination

Milk progesterone level		Return to oestrus	Pregnancy diagnosis		Interpretation
D0	D18-25		D45	D90	
+					AI in luteal phase
-	-	regular			Fertilisation failure - early embryonic mortality
-	+	delayed	negative		Late embryonic mortality
-	+	absent	positive	negative	Foetal mortality
-	+	absent	positive	positive	Cow pregnant at 90 days

The phenotypes of postpartum fertility are defined as follow:
The global pregnancy failure at 90 days corresponds to the number of open cows (not pregnant) at 90 days divided by the number of cows inseminated. The incidence of AI during the luteal phase corresponds to the number of cows inseminated during the luteal phase divided by the total number of cows inseminated. The incidence of fertilisation failure-early embryonic mortality (FF-EEM) corresponds to the number of open cows at D18-D25 inseminated at the appropriate time (AI during the follicular phase) divided by the total number of cows inseminated at the appropriate time. The incidence of late embryonic mortality corresponds to the number of open cows that were pregnant at D18-25 but not anymore at D45 divided by the total of cows pregnant at D18-25. The incidence of foetal mortality at 90 days corresponds to the number of open cows at D90 divided by the number of cows pregnant at D45.

2.5 Statistical analysis

The aim was to measure the relation between the genetic merit of the bull on the incidence of pregnancy failure between 0 and 90 days of the female offspring after the first insemination after calving. The variable to investigate was binary: either the failure or the maintenance of pregnancy over a given period. This binary value was tested against a dependent variable (of particular interest) and other variables that may have had influence.

The dependent variable of particular interest was the genetic merit of the bulls for postpartum fertility. This was constructed from the FI and comprised three modalities: low genetic merit (FI between -0.7 and -0.5), average genetic merit (FI between - 0.1 and +0.3), and strong genetic merit (FI between +0.5 and 1.0).

The variables of influence of the statistic models were the following factors of milk production and environment (non genetic factors): milk yield, milk protein and milk fat contents, measured once a month during the first 3 months of lactation, number of lactations, weekday of insemination, season of first insemination, calving to 1st insemination interval, geographic zone, year of survey, and their interactions.

Simple relationships between dependent variables, factors of milk production and environment, incidence of inseminations during the luteal phase and failures of pregnancy were analysed by a khi² test using the SAS® 9.2 computer programme (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Using the results of this first stage of analysis, the associated variables and their interactions at different periods of pregnancy failure with a threshold of 20% ($p<0.20$) and a random herd effect (several cows included in the survey from the same farm) were introduced in logistic regression models for mixed factors to explain failure versus maintenance of pregnancy during each period.

Logistic regression was performed by using the GLIMMIX procedure of the SAS® 9.2 software, with the random effect applied on the intercept (Witte et al., 2000). Several models for a period of pregnancy failure were carried out, equalling the number of significant univariate variables ($p<0.20$) belonging to the same group of collinear variables. For example, to describe the milk protein or milk fat contents, nine collinear variables were constructed. The final model was chosen on the p-values of fixed effects linked to the Fisher method and biologically coherent. For significant variables up to a threshold of 10%, the results were presented in the Table IV-5 and the Table IV-6 under the form of incidences observed and corrected in % of failures of pregnancy for the period concerned in each group of factor studied. The Odds Ratio (OR), confidence intervals set at 95%, and the associated p values were given for each modality relative to reference was given. A Bonferroni correction was used to adjust the p-values of the comparisons between multi-modal variables (Liquet and Commenges, 2001). As the incidence of failure was not rare, the ORs were converted into adjusted relative risks (RR), following the method described by Beaudeau and Fourichon (1998).

A variable was described as significantly associated with the dependant variable for $p\leq0.05$, a trend association for $0.05<p\leq0.10$ and significantly not associated for $p>0.10$.

3 Results

3.1 Description of cows selected for inclusion

The types of pregnancy failure could be determined with certainty in 3508 female offspring within the 4239 recruits (missing data, doubtful progesterone level/ultrasound examination). The number of female offspring per bull included in the dataset is displayed in Tableau IV-1.

The characteristics of the cows included in the survey are displayed in Table IV-3**.** The 3508 cows that were followed through came from 984 farms. The majority of the cows in the survey (61.8%) were in their first lactation. Within the multiparous cows, 87% were in their second lactation.

Table IV-3 Descriptive statistics of the 3508 Holstein cows retained in the survey

	Number of female offspring	% or mean ± sd
Average no. of cows per farm	3508	3.6±2.1
Bull FI		
≤ -0.5	781	22.3
[-0.1; 0.3]	1502	42.8
≥ +0.5	1225	34.9
Number of lactations		
Primiparous	2145	61.8
Multiparous	1327	38.2
Calving-1st AI interval (days)	3508	93.0±47.4
Calving-1st AI interval in group		
<90 days	2051	59.0
≥90 days	1427	41.0
Geographic zone of cooperative		
South-West and East	817	23.3
Normandy	864	24.6
Brittany	827	52.1
Weekday of 1st AI		
Sunday	264	7.5
Monday	595	17.0
Tuesday	542	15.5
Wednesday	531	15.1
Thursday	509	14.5
Friday	523	14.9
Saturday	544	15.5
Season of 1st AI		
Winter	1753	50.0
Spring	782	22.3
Summer	226	6.4
Autumn	747	21.3
Milk yield (kg)**		
Primiparous	2130	27.9±5.0
Multiparous	1144	34.6±6.0
Milk fat content (g/kg)**		
Primiparous	2130	38.6±4.6
Multiparous	1144	39.3±5.1
Milk protein content (g/kg)**		
Primiparous	2130	29.6±2.1
Multiparous	1144	30.3±2.4

* FI: genetic postpartum fertility index of bull on 28/10/2010 (IE and INRA, 2010)

** Average of the first 3 months of lactation, measured once a month.

3.2 Occurrences of pregnancy failure

Amongst the cows inseminated, 1805 (51.5 %) suffered pregnancy failure between AI and 90 days. 177 AIs were carried out during the luteal phase, 1169 presented failure of fertilisation-early embryonic mortality, 411 late embryonic mortality and 48 foetal mortality (Table IV-4). The pregnancy rate at 90 days for the cows included in the survey was 48.5 % (1703/3508).

Table IV-4 Frequency and incidence of pregnancy failure between 0 and 90 days after the first insemination of the 3508 Holstein cows in the survey

	n	% Frequency (denominator=3508)	% Incidence (denominator)
Pregnancy failure between AI and 90 days	1805	51.5	
AI in luteal phase	177	5.0	5.0 (3508)
Failure of Fertilisation-Early Embryonic Mortality	1169	33.3	35.1 (3331)
Late Embryonic Mortality	411	11.7	19.0 (2162)
Foetal Mortality	48	1.4	2.7 (1751)

Parameters defined in the text

3.3 Effect of the genetic postpartum fertility merit of the bulls on the timing of pregnancy failure of their female offspring between insemination and 90 days

The weekday of insemination, season of insemination, geographic zone and year of survey did not significantly influence the incidence of pregnancy failure between 0 and 90 days after insemination within the univariate analysis ($p>0.20$). Therefore these variables were not included in the multivariate models.

The FI of the bulls, adjusted for number of lactations, maximum milk yield measured once a month for three months, calving to first insemination interval and difference between TB and TP did significantly influence the frequency of pregnancy failure between 0 and 90 days for the female offspring. The female offspring of bulls with a low index (≤-0.5) displayed significantly more pregnancy failures than female offspring of bulls with indexes that were average (59.1 % vs. 51.6 %, $p\leq0.05$) or high (59.1 % vs. 50.2 %, $p\leq0.001$; Figure IV-1)

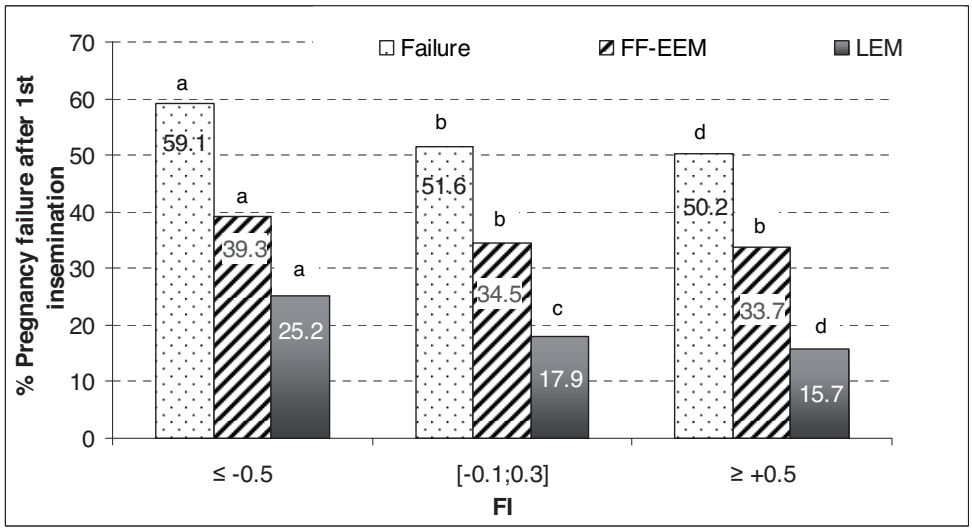


Figure IV-1 Estimated incidences (%) of pregnancy failure between 0 and 90 days (Failure, n=3420, with complete data), between 0 and 18-25 days (FF-EEM, fertilisation failure-early embryonic mortality, n=3245, cows inseminated during the follicular phase, with complete data) and between 18-25 and 45 days (LEM, late embryonic mortality, n=2114, cows pregnant at 18-25 day, with complete data), after the first insemination of Holstein cows according to the paternal postpartum fertility index

a vs. b : p≤ 0,05 ; a vs. c : p≤0,01 ; a vs. d : p≤ 0,001; FI: genetic postpartum fertility index of bulls (on 28 October 2010; Institut de l'élevage and INRA, 2010a); incidence of failure adjusted for number of lactations, calving to first insemination interval, maximum milk yield measured once a month for three months and difference between milk fat and milk protein; incidence of FF-EEM adjusted by number of lactations, calving to first insemination interval, difference between milk fat and milk protein measured once during the first three months of lactation, geographic zone of the insemination cooperative and year of survey, incidences of LEM adjusted for the number of lactations, milk yield and minimum milk protein level measured once a month during the first three months of lactation.

No significant relationship was observed between the FI, incidence of inseminations in the luteal phase and incidence of foetal mortality between 45 and 90 days after 1st AI.

3.4 Effect of the bull's genetic merit on the incidence of failed fertilisation-early embryonic mortality of their female offspring

The milk yield, weekday of insemination and season of insemination had no significant effect on the FF-EEM in the univariate analysis (p>0.20). These variables were not introduced into the multivariant models.

The FI adjusted for number of lactations, calving to first insemination interval, difference between MF-MP measured once a month during the first three months of lactation, geographic zone and year of the survey all did have a significant influence on the incidence of FF-EEM in the cows.

The female offspring of bulls with a low FI had a higher estimated incidence of FF-EEM (39.3%) than the other groups of cows (average index: 34.5 %, high index 33.7 %; p<0.05; Figure IV-1).

The risk of FF-EEM for the female offspring of bulls with a low FI increased compared to those female offspring of bulls with an average index (RR=1.1; p=0.03) or high (RR=1.1; p=0.02). For the two other indexes, the incidence of FF-EEM did not differ between the groups (Table IV-5).

The difference between the milk fat and the milk protein content, the calving to first insemination interval, the geographic zone and the year of survey were significantly associated with the incidence of FF-EEM but the number of lactations no longer had a significant effect in the multivariate models (Table IV-5).

Table IV-5 Effect of the paternal postpartum genetic fertility index of the bulls on failed fertilisation-early embryonic mortality (FF-EEM) measured between 0 and 18-25 days after the first insemination of their female offspring (n=3245 Holstein cows inseminated in the follicular phase, with full data)

Variables		Observed incidence of FF-EEM % (effective)	Corrected incidence of FF-EEM %	OR (CI of 95 %)	p-value
FI	≤ -0.5	39.4 (718)	39.3	1	
	[-0.1; 0.3]	34.5 (1392)	34.5	0.8 (0.7-1.0)	0.03
	≥ +0.5	34.3 (1135)	33.7	0.8 (0.6-1.0)	0.02
Difference MF-MP(g/kg)	[5-10]	32.7 (1405)	32.4	1	
	< 5	38.4 (576)	38.5	1.3 (1.1-1.6)	0.01
	> 10	37.3 (1264)	36.6	1.2 (1.0-1.4)	0.02
Calving-1st insemination interval	< 90 d	37.3 (1934)	37.9	1	
	≥ 90 d	32.9 (1311)	33.7	0.8 (0.7-0.9)	0.01
Number of lactations				-	0.95
Geographic zone of the cooperative	Brittany			1	
	South-West and East Normandy			-	-
				0.8 (0.7-1.0)	0.04
Year	2006	35.9 (580)	36.6	-	-
	2007	32.4 (1190)	33.0	1	
	2008	39.0 (955)	38.9	1.3 (1.1-1.6)	0.03
	2009	36.0 (520)	36.7	-	-

OR=odds ratio, adjusted; CI=confidence interval; -: no significant

FI: genetic postpartum fertility index of bulls on 28 October 2010 (Institut de l'élevage and INRA, 2010a);

MF: Milk fat measured once a month during the first three months of lactation, MP: Milk protein measured once a month during the first three months of lactation

3.5 Effect of genetic fertility merit of bulls on the incidence of late embryonic mortality in their female offspring

The milk fat content, weekday of the AI, calving to first insemination interval, geographic zone and year of the survey were not significantly associated with the incidence of LEM within the univariate analysis (p>0.20). These variables were not introduced into the multivariate analysis.

The FI of the bull adjusted for the number of lactations, milk yield and minimum milk protein content measured once a month over the first three months of lactation was significantly associated with the incidence of LEM in the cows. The female offspring of bulls with a low FI had a higher incidence of LEM (25.2%) than those cows from bulls with a FI that was average (17.9 %, p≤0.01) or high (15.7 %, p≤0.001; Figure IV-1).

The risk of LEM for cows from bulls with a low FI was higher compared to those cows from bulls with an index that was average (RR=1.3; p=0.007) or high (RR=1.4; p=0.0004). The risk of LEM did not differ between the female offspring from bulls with a moderate or high FI.

An interaction between minimum milk protein content recorded over the first 3 months of lactation and average milk yield, as well as between the milk yield and number of lactations, was observed (Table IV-6).

Table IV-6 Effect of genetic postpartum fertility index of bulls on the incidence of late embryonic mortality (LEM) measured between 18-25 and 45 days after the first postpartum insemination in their female offspring (n=2114 Holstein cows pregnant at 18-25 days, with full data)

Variables		Observed incidence of LEM observed % (effective)	Corrected incidence of LEM %	OR (CI of 95 %)	p-value
FI	≤ -0.5	26.0 (439)	25.2	1	
	[-0.1 ;0.3]	18.4 (923)	17,9	0.7 (0.5-0.9)	0.007
	≥ +0.5	16.6 (752)	15.7	0.6 (0.4-0.8)	0.0004
Milk yield* (kg)	< 27.5	16.2 (706)	13,8	1	
	[27.5-33.0]	18.3 (699)	20.0	1.6 (1.0-2.5)	0.05
	> 33.0	24.0 (709)	25.6	2.2 (1.3-3.6)	0.001
Minimum milk protein* (g/kg)				-	0.11
Number of lactations				-	0.27
Interaction between milk yield*(kg) and minimum MP* (g/kg)					
	Milk< 27.5 and MP < 27.0	8.8 (159)	9.7	1	
	Milk< 27.5 and MP ≥27.0	18.3 (547)	19.2	2.2 (1.2-4.1)	0.01
	27.5 ≤ milk≤ 33.0 and MP < 27.0	16.1 (149)	19.4	2.3 (1.0-4.8)	0.04
	27.5 ≤ milk≤ 33.0 and MP ≥27.0	18.9 (550)	20.5	2.4 (1.3-4.6)	0.008
	Milk< 33.0 and MP ≥ 27.0	23.3 (528)	24.3	3.0 (1.1-7.9)	0.001
	Milk >33.0 and MP < 27.0	24.3 (181)	26.9	3.4 (1.2-10.0)	0.0007
Interaction between milk yield* (kg) and number of lactations					
	Milk< 27.5 and primiparous	15.8 (595)	13.2	1	
	Milk< 27.5 and multiparous	18.0 (111)	16.2	-	1
	27.5 ≤ milk ≤ 33.0 and primiparous	16.1 (516)	16.2	-	0.73
	27.5 ≤ milk ≤ 33.0 and multiparous	24.6 (183)	24.4	2.1 (1.0-4.5)	0.05
	Milk>33.0 and primiparous	25.0 (212)	27.1	2.4 (1.2-4.8)	0.002
	Milk< 33.0 and multiparous	22.9 (497)	24.1	2.1 (1.2-3.8)	0.004

OR=odds ratio; CI=Confidence interval; -: no significant

FI: genetic postpartum fertility index of bulls (on 28 October 2010; Institut de l'élevage and INRA, 2010a)

*Average of first 3 months of lactation, measured once a month; MP: Milk protein measured once a month during the first three months of lactation

4 Discussion

This survey used bulls that were in widespread use. The estimation of their genetic fertility merit was therefore very accurate (CD≥ 0.95) as it was estimated from thousands of female offspring. This survey has neglected the genetic contribution of the mothers of the cows studied. Taking account the high number of female offspring per bull, the genetic value of the mothers could be taken as similar between the female offspring populations. Additionally, the size of the survey group allowed the performance of a multivariate analysis on the incidence of pregnancy failure between 0 and 90 days after AI, taking into account most of the environmental factors and phenotypic factors known to influence fertility, and that were measured in this survey.

The pregnancy rate 90 days after the first insemination (48.5%) was higher in this survey than other studies carried out in France on Holsteins (45.9 %, Fréret et al., 2006; 43.7%, Barbat et al., 2010). This is probably due to the fact that more than 95% of cows in the survey were in their first or second lactation, and these are known to be more fertile than older cows (Gröhn and Rajala-Schultz, 2000; Le Mézec et al., 2010).

The proportion of cows inseminated in the luteal phase in this survey was close to that observed in other large-scale studies that have been carried out (5.7%, n=714, Royal et al., 2000; 4.5%, n=3840, Fréret et al., 2006; 5%, n=1285, Grimard et al., 2006). This frequency was not affected by the FI of the bull. It would seem, therefore, that the genetic factor under study does not have an effect on the expression of oestrus.

In our survey group, the incidence of FF-EEM (35.1%) was close to that observed in other studies (between 20.5 and 43.6% according to Humblot, 2001; 37.8% according to Michel et al., 2003; between 32 and 43% according to Horan et al. 2005; 36.8% according to Fréret et al., 2006).

The incidence of LEM (19.0 %) was lower in this survey compared to some others carried out previously in France (29.3% between 21 and 45 days following 1st A1, Michel et al., 2003; 31.1 % between 21-24 days and 45-75 days, Fréret et al., 2006; 25.2 % between 21-24 days and 80-100 days, Grimard et al., 2006), but higher than for others (3.2 % between 28 and 56 days, Silke et al., 2002; 13.2 % between 30 and 58 days, Santos et al., 2009). Once again, the low average number of lactations can explain these differences. Fournier and Humblot (1989), Pinto et al. (2000) and Santos et al. (2009) showed that late embryonic mortality increased with the number of lactations of the cows.

After the end of organogenesis, the risk of pregnancy failure reduces (Santos et al., 2004). The incidence of foetal mortality between 45 and 90 days (2.7%) is lower in our survey group than that of EEM and LEM. Moreover, this incidence was lower in our survey than in other studies (9.6 % according to Labèrnia et al., 1996; 8.6 % according to Szenci et al., 1998; 10.7 % according to Lopez-Gatius et al., 2002). This can be due to the short period of observation and, once again, to the low

number of lactations of our survey group. Indeed, Santos et al. (2004) showed, from 15 surveys, that the frequency of FM was higher in multiparous dairy cows (average of 10.7%, between 8.3 and 24.0%, n=6,195) than in primiparous cows (average of 2.5 % between 1.5 and 10.2%, n=3 333).

The incidence of pregnancy failure between 0 and 90 days was higher in daughter offspring of bulls with a low FI. This result was as expected. Effectively, according to Mayar et al. (2007) there is a quasi-linear correlation (R^2=0.96) between fertility at first insemination of a cow (measured by the first service conception rate) and the FI of the parent bull (measured on more than 300 000 cows on first insemination which calved between May 2000 and April 2005 in 7 departments of the South-West of France).

The female offspring of bulls with a low FI had 10% (RR=1.1) more risk of FF-EEM and 30 (RR=1.3) to 40 % (RR=1.4) more risk of LEM than cows from bulls with an average or high index. The FI had no influence on FM, nor on frequency of inseminations in the luteal phase. In this study more than one genetic standard deviation separated bulls with a low index from bulls with a high index (from 1 to 1.3 standard deviation between the limits of the groups). However, a deviation of one index point between two bulls corresponds to an estimated difference of 3.5% in the success rate of their daughter offspring (Barbat et al, 2007). This study has therefore obtained a more significant effect of FI than expected. This confirms the specific impact of early pregnancy failure on the fertility of dairy cows. Moreover, the index of the bulls was established from all the AIs of their daughter offspring. This study evaluated pregnancy failure only after the first insemination, described as more likely to be followed by early failure than subsequent inseminations (Fournier and Humblot, 1989).

As far as we are aware, these direct relations have never been observed before. Humblot (2001) observed a relationship between genetic milk production potential and FF-EEM. The genetic correlation between milk yield potential and fertility was negative, and this was probably an indirect consequence of the effect of selection for milk production over fertility. The genetic effect on the FF-EEM covers many physiological elements that are able to affect the quality of the ovocytes, such as an effect on the oviduct in which fertilisation takes place, early development of the embryo: fusion of the pronucleus, the recommencement of meiosis of the ovocyte that has been blocked in metaphase II, multiple cellular divisions, early stage of the embryonic genome at the stage of 8-16 cells, nuclear differentiation, hatching of the blastocyte from the pelucid zone, elongation of the extra-embryonic tissue and implantation. The regulation of these stages can also be the cause: chemokines, cytokines, growth factors, angiogenic factors, regulation of apoptosis (see review by Kölle et al., 2010). Finally, an indirect genetic effect cannot be ruled out. For example the effect could be exercised by the capacity of ingestion or on the aptitude to mobilise body reserves for a better energy balance at the moment of insemination.

The genetic effect can also be observed on late embryonic mortality. Between 18 and 45 days, implantation and the immune mechanisms at play during implantation are probably responsible. Once again, the affected functions in the cow can be multiple.

Finally, this study did not observe any link between the genetic fertility merit of bulls and foetal mortality in their female offspring. Either the period studied (45 to 90 days) in this survey was too short to show up this effect, or the genetic effects measured in the index only have an effect on pregnancy failure in early pregnancy.

Today, in the leading 3 French breeds of dairy cows (Holstein, Montbéliarde and Normande), the fertility index of bulls is estimated from birth using genome data and followed by the addition of the reproductive performances of their female offspring (Fritz et al., 2010). The improvement of knowledge of the relationships between genotype and phenotype may be the key to the identification of the genes responsible for female fertility (Monget and Le Bail, 2009). Genotyping of females included in this study will also allow the identification of new QTL linked to different periods of pregnancy failure and thus help determine the genetic origins of infertility (Lefebvre et al., 2011).

The high number of animals followed in this study revealed the relevance of certain environmental factors, or factors known to influence fertility of the animal. The FF-EEM was influenced by 4 factors: the difference between milk fat and milk protein content during the first 3 months of lactation, calving to first insemination interval, year of observation and geographic zone. In cows presenting an average difference over the first three months of lactation between milk fat and milk protein content of less than 5gm/kg or above 10g/kg, the incidence of FF-EEM was higher than in the intermediate group. A low level of milk fat and high milk protein content is associated with acidosis in the dairy cow. Low milk protein and high milk fat is associated with lipomobilisation, an energy deficit that carries the risk of sub-clinical ketosis. Metabolic diseases (acidosis, hypocalcaemia, ketosis etc) are known to be factors that reduce the fertility of dairy cows (see review by Roche, 2006).

An increase in the calving to first insemination interval reduced the risk of FF-EEM, as this has been previously observed (see review by Sheldon and Dobson, 2004; Azawi, 2008). Cows inseminated in 2008 were more at risk of FF-EEM than cows inseminated in 2007. The particularity of 2008 could be in part explained by the outbreak of bluetongue (Afssa, 2008). This disease has deleterious effects on reproduction as this has been observed by Mounaix et al. in 2008 and Ponsart et al. in 2010.

The average milk yield in the first three months of lactation, interacting with the number of lactations and minimum milk protein influenced LEM in this study. Grimard et al. (2006) and Michel et al. (2003) also succeeded in showing a negative effect of the level of milk yield on LEM. On the other hand Silke et al. (2002), Lopez-Gatius et al. (2002) and Santos et al. (2009) did not find evidence of this association. In this study, it was the raised milk protein levels (showing a good ability to meet energy needs) interacting with the average to high levels of milk yield that were associated with LEM. This

runs along the same lines as the observations of Grimard et al. (2006), which showed an increase in LEM in the cows with the highest body condition score at the time of insemination. Labèrnia et al. (1996), Humblot (2001) and Santos et al. (2009) showed an association between a high number of lactations and LEM. This study has identified an effect of the number of lactations interacting with the level of milk yield. Highest producing multiparous cows were more at risk of LEM than lowest producing primiparous but lowest producing multiparous cows were less at risk of LEM than highest producing primiparous ones. High milk production seems to be deleterious for LEM in both primiparous and multiparous cows.

5 Conclusion

This study demonstrated evidence of a relationship between the genetic fertility merit of the bull and phenotypes of early pregnancy failure in their female offspring. There exists a relationship between the genetic value for fertility of bulls and the incidence of fertilisation failure and/or embryonic mortality before 45 days in the female offspring. The two stages appeared to be affected in the same order of magnitude. On the other hand, the genetic value of fertility of bulls did not have an influence on the incidence of foetal mortality between 45 and 90 days, nor on inseminations in the luteal phase.

Genotyping of phenotyped cows in this study should in the near future allow the identification of the QTLs linked to early and late embryonic mortality in order improve selection, but also to better understand the mechanisms that are implicated in pregnancy failure.

Acknowledgements

This study was financed by the National Agency for Resaerch (GENANIMAL) and Apis Gene.
The authors owe special thanks to the correspondent and the insemination centre: Didier Berthelot (SORELIS), Patrick Bonnand and Aurélien Michel (AMELIS), Jacky Martin (ELIACOOP), Alain Chevallier, Jean-Luc Viala and Christian Nicolas (GENOE), Jean-Michel Philippot (URCEO), Hervé de Préaumont (CIA l'Aigle), Pierrick Drevillon (CECNA), Pierre Gigant and Lionel Simerman (ELITEST), Brahim Khireddine (COOPELSO), Philippe Gisbert and Gilles Mally (GENESIA), Olivier Sourbé (Groupe Altitude), Philippe George (CIA Meurthe et Moselle), the trainees Julie Goffin, Pierre Vergiat, Benoit Mouchard and Anthony Groualle, the technicians of insemination center for ultrasound examination and the farmers for their active and persistent cooperation.

References

Afssa. 2008. Point sur la situation de la fièvre catarrhale ovine (FCO) à sérotype 1 et 8, en France et dans l'Union européenne, au 10 octobre 2008, http://www.afssa.fr/Documents/SANT-Fi-PtFCOBilan200810.pdf, consulté le 26 janvier 2011

Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, Ron M, Weller JI, Lewin HA. 2004. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. Journal of Dairy Science 87, 468-475

Azawi OI. 2008. Postpartum uterine infection in cattle. Animal Reproduction Science 105, 187-208

Barbat A, Gion A, Ducrocq V. 2007. L'évaluation génétique de la fertilité en France. Bulletin Technique de l'Insémination Animale 126, 19-22

Barbat A, Le Mézec P, Ducocq V, Mattalia S, Fritz S, Boichard D, Ponsart C, Humblot P. 2010. Female fertility in French dairy breeds: current situation and strategies for improvement. Journal of Reproduction and Development, 56, suppl S15-S21

Beaudeau F, Fourichon C, 1998. Estimating relative risk of disease from outputs of logistic regression when the disease is not rare. Preventive Veterinary Medecine 36, 243-256

Boichard D, Barbat A, Briend M. 1998. Evaluation génétique des caractères de fertilité femelle chez les bovins laitiers. Rencontres, Recherches, Ruminants 5, 103-106

Boichard D, Grohs C, Bourgeois F, Cerqueira F, Faugeras R, Neau A, Rupp R, Amigues Y, Boscher MY, Levéziel H. 2003. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. Genetics Selection Evolution 35, 77-101

Dillon P, Berry DP, Evans RD, Buckley F, Horan B. 2006. Consequences of genetic selection for increased milk production in European seasonal pasture based systems of milk production. Livestock Science 99, 141-158

Dobson H, Smith RF, Royal MD, Knight CH, Sheldon IM. 2007. The high producing dairy cow and its reproductive performance. Reproduction in Domestic Animals 42 (Suppl2) 17-23

Druet T, Fritz S, Boussaha M, Ben Jemaa S, Guillaume F, Derbala D, Zelenika D, Lechner D, Charon C, Boichard D, Gut IG, Eggen A, Gautier M. 2008. Fine mapping of quantitative trait loci affecting female fertility in dairy cattle on BTA03 using dense Single-Nucleotide Polymorphism map. Genetics 178, 2227-2235

Fournier JL, Humblot P, 1989. Fréquence et facteurs de variations de la mortalité embryonnaire tardive chez la vache laitière. Elevage et Insémination 229, 3-10

Fréret S, Ponsart C, Bahadur RD, Jeanguyot N, Paccard P, Humblot P. 2006. Enquête FERTILIA : facteurs de variation de la fertilité en 1ère insémination et des taux de mortalité embryonnaire en élevages laitiers Prim'Holstein. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants. 13, 281-284

Fritz S, Guillaume F, Croiseau P, Baur A, Hoze C, Dassonneville R, Boscher MY, Journaux L, Boichard D, Ducrocq V. 2010. Implementing Genomic Selection in the three main French dairy cattle breeds. Proc Rencontres, Recherches, Ruminants, 17, 455-458, institute de l'élevage Editions Paris, France

Guillaume F, Gautier M, Ben Jemaa S, Fritz S, Eggen A, Boichard D, Druet T. 2007. Refinement of two female fertility QTL using alternative phenotypes in French Hosltein dairy cattle. Animal Genetics 38, 72-74

Grimard B, Freret S, Chevallier A, Pinto A, Poinsart C, Humblot P, 2006. Genetic and environment factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. Animal Reproduction Science 91, 31-44

Gröhn YT and Rajala-Schultz PJ 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. Animal Reproduction Science 60-61, 605-614

Horan B, Mee JF, O'Connor P, Rath M, Dillon P. 2005. The effect of strain of Holstein-Friesian cow and feeding system on postpartum ovarian function, animal production and conception rate to first service. Theriogenology 63, 950-971

Humblot P, 2001. 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

Institut de l'élevage et Institut Nationale de Recherche Agronomique. 2001. Indexation Bovine Laitière n°2001-5, note du 6 juin 2001. La révision des index de synthèse UPRA ISU. http://www.inst-elevage.asso.fr/IMG/pdf/IBL_2001-5mel.pdf. Consulté le 18 mars 2011

Institut de l'Elevage et Institut National de la Recherche Agronomique. 2007. Indexation Bovine Laitière 2007-4 note du 12/06/2007. http://www.inst-elevage.asso.fr/html1/spip.php?page=article_espace&id_espace=935&id_article=13466, consulté le 25/06/2010

Institut de l'Elevage et Institut National de la Recherche Agronomique 2010a. Palmarès des taureaux. http://www.inst-elevage.asso.fr/html1/, consulté en octobre 2010

Kölle S, Reese S, Kummer W. 2010. New aspects of gamete transport, fertilization, and embryonic development in the oviduct gained by means of live cell imaging. Theriogenology 73, 786-795

Labèrnia J, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Lopez-Bejar M, Rutllant J. 1996. Influence of management factors on pregnancy attrition in dairy cattle. Theriogenology. 45, 1247-1253

Lefebvre R, Fritz S, Ledoux D, Gatien J, Genestout L, Rossignol MN, Grimard B, Boichard D, Humblot P, Ponsart C. 2011. GENIFER: cartographie fine et effets de QTL de fertilité en race bovine Holstein. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, accepted

Le Mezec P, Barbat-Leterrier A, Barbiers S, de Cremoux R, Gion A, Ponsart C. 2010. Evolution de la fertilité et impact de la FCO sur la reproduction du cheptel laitier français. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, 17, 157-160

Liu Z, Jaitner J, Reinhardt F, Pasman E, Rensing S, Reents R. 2008. Genetic evaluation of fertility traits of dairy cattle using a multiple-trait animal model. Journal of Dairy Science 91, 4333-4343

Liquet B, Commenges D. 2001. Correction of the p-value after multiple coding of an explanatory variable in logistic regression. Statistics in Medicine. 20, 2815-2826

Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Rutllant J, Lopez-Bejar M, 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. Theriogenology 57, 1251-1261

Lucy MC. 2001. Reproductive loss in high producing dairy cattle: where it will end? Journal of Dairy Science 84, 1277-1293

Mayar JC. 2007. L'index de fertilité dans la stratégie d'accouplements. Bulletin Technique de l'Insémination Animale, 126, 33-34

Michel A, Ponsart C, Fréret S, Humblot P, 2003. Influence de la conduite de la reproduction sur les résultats à l'insémination en période de pâturage. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, 10, 131-134

Monget P, Le Bail PY. 2009. Le phénotypage des animaux : le nouveau défi ? Rencontres Recherches Ruminants 16, 407-409

Mounaix B, David V, Lucbert J. 2008. Impact technico-économique de la FCO dans les élevages ovins et bovins français. Ed.Institut de l'élevage, CR 130838028 113p

Pinto A, Bouca P, Chevallier A, Fréret S, Grimard B, Humblot P. 2000. Sources de variation de la fertilité et des fréquences de mortalité embryonnaire chez la vache laitière. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants. 7, 213-216

Ponsart C, Gatien J, Pozzi N, Humblot P, Guérin B. 2010. Relationship between bluetongue virus infection and fetal mortality in cattle. 22, 253 (abstr. 190)

Roche JF. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. Animal Reproduction Science 96, 282-296

Rodriguez-Martinez H, Hultgren J, Bage R, Bergqvist AS, Svensson C, Bergsten C, Lidfors L, Gunnarsson S, Algers B, Emanuelson U, Berglund B, Andersson G, Haard M, Lindhé B, Stalhammar H, Gustafsson H. 2008. Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice? Ivis Reviews in Veterinary Medecine, Ed. International Veterinary Information Service, Ithaca NY

Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Woolliams JA, Lamming GE, 2000. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. Animal Science 70, 487-501

Sahana G, Guldbrandtsen B, Bendixen C, Lund MS. 2010. Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. Animal Genetics doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02064.x

Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN, 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronisation programs. Animal Reproduction Science 82-83, 513-535

Santos JE, Rutigliano HM, Sá Filho MF 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. Animal Reproduction Science 110, 207-221

Sheldon IM, Dobson H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. Animal Reproduction Science 82, 295-306

Silke V, Diskin MG, Kenny DA, Boland MP, Dillon P, Mee JF, Sreenan JM, 2002. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. Animal Reproduction Science 71, 1-12

Szenci O, Taverne MA, Beckers JF, Sulon J, Varga J, Borzsony L, Hanzen C, Schekk G. 1998. Evaluation of false ultrasonographic diagnoses in cows by measuring plasma levels of bovine pregnancy-associated glycoprotein 1. Veterinary Record 142, 304-306

Veerkamp RF, Beerda B. 2007. Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. Theriogenology 68S, S277-S273

Witte JS, Greenland S, Kim LL, Arab L. 2000. Multilevel Modeling in epidemiology with Glimmix. Epidemiology. 11, 684-688

II.3. Etude complémentaire

2269 femelles phénotypées dans l'étude précédente ont ensuite été génotypées sur 306 SNP à l'aide d'une puce (Infinium BeadChip®, Illumina Inc, San Diego, USA 306 SNP) par Labogena. L'analyse des QTL de fertilité est en cours. Ces QTL seront identifiés pour 7 phénotypes de fertilité : IA en phase lutéale, non fécondation ou mortalité embryonnaire précoce, mortalité embryonnaire tardive, mortalité embryonnaire totale, mortalité fœtale, avortements et échec global (Lefebvre et al., 2011).

Le résumé ci-dessous reprend cette étude complémentaire. Il sera présenté sous forme d'affiche aux 18ème journées du congrès Rencontres, Recherches, Ruminants, Paris, décembre 2011.

GENIFER : cartographie fine et effets de QTL de fertilité en race bovine Holstein

LEFEBVRE R[1], FRITZ S[2], LEDOUX D[3,4], GATIEN J[5], GENESTOUT L[6], ROSSIGNOL MN[6], GRIMARD B[3,4], BOICHARD D[1], HUMBLOT P[5,7], PONSART C[5]

[1] INRA UMR1313 Génétique Animale et Biologie Intégrative, 78350 Jouy-en-Josas Cedex

[2] UNCEIA, service génétique, 149 rue de Bercy 75595 Paris Cedex 12

[3] Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 av du général de Gaulle 94704 Maisons-Alfort Cedex

[4] INRA UMR1198 Biologie du Développement et Reproduction, 78350 Jouy-en-Josas Cedex

[5] UNCEIA, Département Recherche et Développement, 13 rue Jouet 94704 Maisons-Alfort

[6] LABOGENA, 78350 Jouy-en-Josas Cedex

[7] Department of Clinical Sciences, SLU, 750-07 Uppsala, Sweden

L'objectif du projet GENIFER est de confirmer l'existence de divers QTL affectant la fertilité, de les cartographier finement, et de préciser leurs effets grâce à un suivi précis des évènements entre 0 et 90 jours suivant la première insémination (IA). Le dispositif de phénotypage, décrit par Ledoux et al. (3R 2011), a impliqué 4559 vaches Holstein dans 1028 élevages. La combinaison des différentes informations (analyse de progestérone le jour de l'IA et 21 jours après, constats de gestation à 40 et 90 jours, mise bas) permet de caractériser les évènements liés à un échec de fertilité en première IA : IA au mauvais moment, non fécondation ou mortalité embryonnaire précoce, mortalité embryonnaire tardive, mortalité embryonnaire totale, mortalité fœtale, avortements et absence de mise bas. L'étude génétique porte sur 2669 femelles avec phénotype interprétable et génotypées pour 306 SNP choisis dans 16 régions de 13 chromosomes (1-6, 9, 10, 14, 15, 18, 26, 27). Ces régions ont été choisies sur la base des résultats de cartographie de QTL du projet Cartofine3, financé par APIS-GENE. Les QTL sont recherchés par analyse d'association avec la méthode Fasta et le package GenABEL du logiciel R. Le QTL principalement ciblé, situé sur le chromosome 3, est confirmé et sa localisation est affinée à 24 cM. Son effet semble maximum sur la mortalité embryonnaire tardive, tandis qu'un effet sur les mortalités précoces et les avortements n'est pas exclu. Entre 2 et 8 QTL sont confirmés ($p<0,01$) pour chacun des caractères : 6 sur le taux de mise bas, 3 sur la mortalité précoce ou non fécondation, 3 sur la mortalité embryonnaire tardive, 8 sur la mortalité embryonnaire totale, 2 sur la mortalité fœtale et 3 sur les avortements.

III. Etude expérimentale n°2 : Effet des anomalies de reprise de cyclicité postpartum sur les échecs précoces de gestation

Cette étude a été mise en place dans le cadre d'une collaboration entre l'UMR INRA-ENVA Biologie du Développement et Reproduction et l'UMR INRA-CNRS-IFCE-Université François Rabelais Physiologie de la Reproduction et des Comportements de Nouzilly. Elle a été financée par la société DESIALIS.

III.1. Résumé

III.1.1 Dispositif expérimental

La reprise de la cyclicité ovarienne a été suivie par analyse de progestérone sanguine 2 fois par semaine entre le 7ème et le 70ème jour après vêlage, sur 239 périodes postpartum (pp) de 144 vaches de race Holstein appartenant à un seul troupeau (ferme expérimentale de l'INRA, UCEA Bressonvilliers, Leudeville, Essonne). Les vaches ont été classées selon leur profil de reprise de cyclicité postpartum : profil normal, reprise de cyclicité retardée, phase lutéale prolongée, arrêt de cyclicité, autre profil anormal. La croissance des follicules et des corps jaunes ovariens a été suivie par échographie 2 fois par semaine sur 110 périodes en même temps que le suivi endocrinien. Avant la première insémination, les vaches non vues en chaleurs ou identifiées comme ayant un profil de cyclicité anormal ont été soumises à un traitement d'induction et de synchronisation des chaleurs. La gestation a été suivie par dosage de progestérone le jour de l'insémination puis 21-25 jours plus tard puis par deux diagnostics de gestation à 35 et 60 jours post insémination. La note d'état corporel a été mesurée au vêlage, 50 jours postpartum et le jour de l'IA. La production laitière, le taux protéique et le taux butyreux du lait ont été mesurés une fois par mois pendant les trois premiers mois de lactation. Les relations entre les profils postpartum de progestérone, les caractéristiques des follicules et corps jaunes vus à l'échographie et les performances de reproduction ont été analysées. Les facteurs de risques des anomalies de reprise de cyclicité ont ensuite été identifiés.

III.1.2 Principaux Résultats

Parmi les 239 périodes postpartum, 104 (43,5%) ont présenté au moins une anomalie. Les deux anomalies les plus observées ont été les phases lutéales prolongées (18,4%, 44/239) et les reprises de cyclicité retardée (16,3%, 39/239). Les statuts de fertilité après IA1 ont été déterminés pour 217 vaches : 62 vaches étaient gestantes à 60 jours (TG à 60 jours 28,6 %) ; 12 IA en phase lutéale (5,5 %), 107 non fécondation-mortalité embryonnaire précoce (Incidence 52,2 %), 25 mortalités embryonnaires tardives (incidence 25,5 %) et 11 mortalités fœtales (incidence 15,1 %).

Les facteurs de risque de la reprise de cyclicité retardée ont été la saison de vêlage, la production laitière au moment de l'IA1, la note d'état corporel 50 jours postpartum. Les facteurs de risque de phase lutéale prolongée ont été les affections génitales postpartum (rétention placentaire/métrite), le

taux protéique, le taux butyreux et le niveau de production laitière, la note d'état corporel et l'intervalle vêlage-première ovulation.

L'incidence de non fécondation-mortalité embryonnaire précoce n'a pas été affectée par le profil de reprise de cyclicité après vêlage mais les vaches à phase lutéale prolongée ont eu tendance à avoir une incidence de mortalité embryonnaire tardive-mortalité foetale plus élevée (56,3 %) que les vaches à profil de reprise de cyclicité normal (33,3 %).

III.2. Article scientifique

L'article issu de cette étude expérimentale a été publié dans la Revue de Médecine Vétérinaire, 2011, 162, 98-106.

Abnormal patterns of resumption of cyclicity after calving in Holstein cows: risk factors, relationships with the ultrasound appearance of the ovaries and with gestation failure after AI

D. LEDOUX[1,2], J.L TOUZE[3], C. RICHARD[4], A.A. PONTER[1,2], M.J. BOSC[3] AND B. GRIMARD[1,2]*

[1]*Ecole National Vétérinaire d'Alfort, 7 av du Général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort Cedex, FRANCE.*
[2]*UMR INRA 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas, FRANCE.*
[3]*UMR INRA-CNRS-Université de Tours-Haras nationaux 6175, Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre de Tours, F-37380 Nouzilly, FRANCE.*
[4]*UCEA Bressonvilliers, F-91630 Leudeville, FRANCE.*

**Corresponding author: bgrimard@vet-alfort.fr*

SUMMARY

Twice weekly blood progesterone analysis was used to monitor resumption of ovarian cyclicity in 239 postpartum periods of 144 Holstein cows in one herd between D7 and D70 postpartum (PP). Calving season, low milk production and low BCS were risk factors for delayed cyclicity (DC: 16.3%). Retained placenta and metritis, early ovulation after calving and postpartum negative energy balance were identified as risk factors for prolonged luteal phase (PLP: 18.4%). At the same time, in 110 postpartum periods, ovaries were examined twice a week by ultrasonography. In normal cows (N: 56.5%), the first large follicle (≥ 10mm) appeared 14.6 ± 3.9 days after calving, ovulation occurred 28.9±9.5 days PP and the maximum diameter of the first corpus luteum (CL) was 24.9 ± 4.9 mm. In DC cows, the interval between calving to the first large follicle tended to be longer than in normal cows (23.0 ± 15.6 d; *P=0.06*). In PLP cows, the first large follicle was delayed (17.6 ± 5.2 d, *P<0.05*), first ovulation occurred earlier (23.2 ± 6.9 d PP, *P<0.05*), the maximum size of the first CL was not different from N cows (26.2 ± 6.2 mm) despite its lifespan (33.6 ± 13.8 days). Before first AI, cows not seen in oestrus or with a diagnosed abnormal progesterone profile were submitted to oestrus induction and synchronization treatment. The proportions of treated cows were 32.8, 62.9 and 60.5% in the N, DC and PLP groups of cows (significant difference between N and abnormal cows). In N cows, the interval from calving to conception was 117.3 ± 60.6 days. Conception rate at first service (CR) was 31.3%, the incidences of early embryonic (EEM) and late embryonic-foetal mortality (LEM) were 47.9 and 33.3%. In DC cows, calving to conception interval was higher (144.0 ± 67.3 d, *P<0.05*) than N cows. CR (28.6%) and EEM (60%) incidence were not different from N cows. In PLP cows, calving to conception interval was not different (132.8 ± 62.0 d), CR was lower (16.3%, *P=0.05*) and LEM incidence tended to be higher (56.3%, *P<0.10*) than in N cows. In conclusion, transrectal ultrasonography is not effective in distinguishing normal CL from CL associated with a prolonged luteal phase. PLP seems to have a negative effect on CR and on the incidence of LEM which should be investigated on a larger scale in Holstein cows.

Keywords: Dairy cows, progesterone profile, risk factor, ultrasonography, fertility, embryonic death.

RÉSUMÉ

Anomalies de reprise de cyclicité postpartum chez les vaches Holstein : facteurs de risque, relation avec l'apparence des ovaires à l'échographie et avec les échecs de gestation après insémination

La reprise de la cyclicité ovarienne a été suivie par analyse de progestérone sanguine deux fois par semaine entre le 7ème et le 70ème jour après vêlage, sur 239 périodes postpartum (pp) de 144 vaches de race Holstein appartenant à un troupeau. Puis elle a été classée en profil normal ou anormal. Les facteurs de risque associés à l'anomalie 'retard de cyclicité' (RC : 16,3 %) ont été : la saison de vêlage, la faible production laitière et le faible état corporel. Les facteurs de risques associés à l'anomalie 'phase lutéale prolongée' (PLP : 18,4 %) ont été : la rétention placentaire et la métrite chronique, l'ovulation précoce après vêlage et le déficit énergétique pp. Lors de 110 périodes pp, les follicules et les corps jaunes (CJ) ovariens ont été identifiés puis mesurés par échographie deux fois par semaine. Chez les vaches sans anomalie (N : 56,5 %), le premier gros follicule a été échographié à 14,6 ± 3,9 jours pp. L'ovulation a eu lieu à 28,9 ± 9,5 jours pp. La taille maximale du premier CJ a été estimée à 24,9 ± 4,9 mm. Chez les vaches à RC, l'intervalle entre le vêlage et le premier gros follicule a été en tendance plus long que pour les vaches N (23,0 ± 15,6 jours ; *P = 0,06*). Chez les vaches à PLP, le premier gros follicule est apparu plus tardivement que chez les vaches N (17,6 ± 5,2 d, *P < 0.05*). La taille maximale du premier CJ n'a pas été différente des vaches N (26,2 ± 6,2 mm), alors que sa durée de vie a été prolongée (33,6 ± 13,8 jours). Avant la première IA, les vaches non vues en chaleurs ou identifiées comme ayant un profil de reprise de cyclicité anormal ont été soumises à un traitement d'induction et de synchronisation des chaleurs. La proportion de vaches traitées a été de 32,8, 62,9 et 60,5 % respectivement chez les vaches N, RC et PLP (différence significative entre vaches N et anormales). Chez les vaches à RC, l'intervalle vêlage insémination fécondante a été plus long que chez les vaches N (144,0 ± 67,3 jours vs 117,3 ± 60,6 jours, *P < 0,05*). Le taux de réussite en première IA (TRIA1), l'incidence de non-fécondation-mortalité embryonnaire précoce (NF-MEP) et l'incidence de mortalité embryonnaire tardive ou fœtale (MET-MF) n'ont pas été différentes statistiquement comparativement aux vaches N (TRIA1 : 28,6 vs 31,3 % ; NF-MEP : 60,0 vs 47,9 %). Chez les vache à PLP, l'intervalle vêlage insémination fécondante n'a pas été différent (132,8 ± 62,0 jours) alors que le TRIA1 a été statistiquement plus faible (16,3 % ; *P = 0,05*) et l'incidence MET-MF en tendance plus élevée (56,3 % ; *P < 0,10*) que pour les vaches N. En conclusion, l'échographie des ovaires ne serait pas efficace pour distinguer un corps jaune normal d'un corps jaune de phase lutéale prolongée. Les phases lutéales prolongées auraient un effet néfaste sur le TRIA1 en augmentant l'incidence de mortalité embryonnaire tardive ou fœtale.

Mots clés : Vache laitière, profils de progestérone, facteurs de risque, échographie, fertilité et mortalité embryonnaire.

Introduction

Abnormal patterns of resumption of cyclicity have often been identified in Holstein cows in numerous countries [1-2, for reviews]. Among them, delayed cyclicity and prolonged luteal phase are the most frequently observed and are negatively associated with reproductive performance [3-8]. However, if their effects on calving to first artificial insemination (AI) interval, conception rate at first AI and calving to conception interval are well documented, the effect on non-fertilization-early embryonic death and on late embryonic or foetal death are unknown. For [3], late embryonic-foetal death appeared to be increased in prolonged luteal phase cows but their observations were based on the observation of return in heat after insemination.

As recommended by [9], the combination of progesterone (P4) measurements on the day of AI and 21-24 days later, and Pregnancy Specific Proteins measurement or ultrasonography in early pregnancy might be used to identify fertilization failure-early embryonic death, late embryonic and foetal death after AI. These methods have to be used to obtain a better understanding of the effect of abnormal patterns in resumption of cyclicity on the chronology of pregnancy failure after AI.

Hormonal treatment can be used to treat anoestrus in delayed cyclicity and in prolonged luteal phase cows [1, 10, 11] but needs precise diagnosis. One manual transrectal examination as a diagnostic tool does not differentiate between normal and prolonged luteal phase cows and can therefore lead to the inappropriate administration of hormones. The abnormal patterns of resumption of ovarian cyclicity are usually identified by frequent measurements of milk or plasma P4 concentrations during the postpartum period. This method is not feasible for veterinarians who examine punctually animals before breeding. However, transrectal ultrasonography can be used to assess ovarian structures. This technique might be used to increase diagnosis accuracy if the ultrasound appearance of follicles or *corpus luteum* (CL) could be linked to abnormal ovarian function.

The present study was conducted in one herd of Holstein cows to describe the evolution in ovarian structures (follicles and CL) observed by ultrasonography during abnormal patterns of resumption of cyclicity and to quantify the effects of pre-service ovarian dysfunction on the chronology of pregnancy failure after the first insemination. Since the risk factors for abnormal patterns of resumption of fertility are linked to reproductive performance, they were investigated in this study.

Materials and Methods

ANIMALS AND MANAGEMENT

Data were collected for 239 postpartum periods from 144 Holstein cows between December 2001 and June 2005 in one herd (experimental station of INRA, UCEA Bressonvilliers Leudeville, France). The cows were reared in a loose house and fed a total mixed ration. Milk yield per cow ranged from 7 400 to 10 300 kg/year during the experiment.

Cows with retained placenta (foetal membranes not delivered within 24 hours after calving) were manually delivered and received two gynecologic oblets of chlortetracycline (Centraureo®, Virbac Santé Animale, Carros, France). Cows were examined for clinical metritis 30 days after calving and were treated if necessary with an IM injection of 500 µg prostaglandin F2α (Estrumate®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Boxmeer, The Netherlands), and an intrauterine antibiotic two days later (Metrijet®, Intervet/Schering-Plough Animal Health).

Body condition score was measured at calving (D0), on D50 and on the day of AI on a scale from 0 (very thin) to 5 (fat) estimated by palpation of ribs and tail head [12]. Milk production, milk protein and fat content were measured once a month during the first three months of lactation.

In the absence of oestrus being detected during the first 70 days of lactation, a hormonal treatment was used before systematic AI: a combination of a 3 mg Norgestomet ear implant during 10 days, IM injection of 3 mg Norgestomet and 5 mg Oestradiol valerate at implant insertion (Crestar®), 500 µg prostaglandin F2α 48 h before implant removal (Estrumate®), 400 IU eCG (ChronogestPMSG®) at implant removal and systematic AI 56 h later (Intervet/Schering-Plough Animal Health, Boxmeer, The Netherlands).

The characteristics of the 239 postpartum periods are presented in tables Ia and Ib.

The scientist in charge of the experiment was licensed to perform experiments on animals and the staff who applied the experimental procedures had attended a special course approved by the French Ministry of Agriculture.

POSTPARTUM OVARIAN PATTERNS OF RESUMPTION OF CYCLICITY

Progesterone (P4) concentrations were determined by radioimmunoassay ([13], Laboratoire d'hormonologie de l'INRA, Nouzilly, France) in plasma samples collected twice weekly from one week after calving until the first AI or until 70 days following calving if the cow was not inseminated before 70 days. Sensitivity, intra- and inter-assay coefficient of variation were; 0.1 ng/ml, 12 and 17.5%. A functional CL was considered to be present if plasma P4 concentrations were ≥ 1.5 ng/mL. As the secretion of P4 from CL starts gradually and as the samples are collected only twice a week, the beginning of the luteal phase was estimated as the first sample ≥ 0.75 ng/mL or two days before first sample if the concentration was higher than 1.5 ng/mL. The end of luteal phase was estimated as the last sample ≥ 0.75 ng/mL before a concentration ≤ 0.75 ng/mL. These thresholds were adapted from [14] to be highly specific of luteal and follicular phase.

A cycle was defined as normal when the interval between ovulations was between 18 to 24 days, with a follicular phase of 6-8 days and a luteal phase of 13-15 days. The patterns of

Descriptive variables	Definition of modalities	n	Percent
Year of calving	2001-2002	67	28.0
	2003	74	31.0
	2004-2005	98	41.0
Parity	Primiparous	81	33.9
	Multiparous	158	66.1
Calving season	Spring	50	20.9
	Other season	189	79.1
Calving conditions	Without assistance	129	54.0
	With assistance	110	46.0
Retained placenta and/or metritis	Absence	176	73.6
	Presence	63	26.4
Milk production[1] (kg/day)	<35	122	52.1
	≥35	112	47.9
Milk protein content[1] (g/kg)	<30.5	138	9.0
	≥30.5	96	41.0
Milk fat content[1] (g/kg)	<39	121	51.7
	≥39	113	48.3
Body condition score at first AI (5 point scale)	<1	77	34.5
	≥1	146	65.5

[1]Mean of 3 measurements once a month during the first 3 months of lactation; AI: Artificial insemination

TABLE IA: Characteristics of the 239 postpartum periods from 144 Holstein cows, qualitative variables.

Descriptive variable		n	Mean	SD	Minimum	Maximum
Body condition score (5 point scale)	On calving day (D0)	209	2.3	0.1	0.5	4.0
	On D50 postpartum	225	1.1	0.1	0.25	3.5
Body condition variation	From calving to D50	205	-1.2	0.1	-3.0	+0.5
(5 point scale)	From calving to first AI	202	-1.1	0.1	-3.0	+1.0
Weight at calving (kg)		170	647.0	5.3	477.0	825.0
Milk production at first AI (kg/day)		233	35.2	0.4	13.3	52.8
Milk protein content at first AI (g/kg)		233	30.3	0.2	23.8	45.9
Milk fat content at first AI (g/kg)		233	37.8	0.4	22.7	64.8

SD: standard deviation; AI: Artificial Insemination

TABLE IB: Characteristics of the 239 postpartum periods from 144 Holstein cows, quantitative variables.

resumption of cyclicity postpartum were classified according to 6 profiles as defined by [15]: normal, delayed cyclicity (P4 ≤ 0.75 ng/mL before D50 pp), cessation of cyclicity (P4 ≤ 0.75 ng/mL for more than 12 days after a normal cycle), prolonged luteal phase (P4 ≥ 0.75 ng/mL for more than 20 consecutive days), short luteal phase (P4 ≥ 0.75 ng/mL for less than 10 consecutive days after D50 pp) and irregular profile for the profiles not belonging to one of the above classes or showing a combination of two or more of abnormalities.

ULTRASONOGRAPHY OF THE OVARIES

At the same time as the blood samples were taken, 110 postpartum periods were submitted to a twice weekly examination of ovaries, by transrectal ultrasonography (Scan 900, ECM, Angoulème, France) with a 5 MHz linear probe by the same technician from one week after calving until the first AI or 70 days postpartum. Follicle and *corpus luteum* pictures were frozen when largest diameter was seen and were measured directly with the scanner for the 10 first pictures. Thereafter, all images were saved and measurements were made after each day of ultrasonography on a computer using the Perfect-image software. The software was calibrated using the first measurements done with the scanner on the first pictures. A large follicle was defined as a follicle with a diameter ≥ 10 mm. A cyst was defined as a follicle with a diameter >20 mm for 20 consecutive days (six consecutive observations on the same ovary). The cows displaying a cyst after 30 days postpartum were treated with 86 µg of Fertagyl® (GnRH, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Boxmeer, The Netherlands).

PREGNANCY STATUS AFTER FIRST AI AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE

Plasma P4 concentrations were measured the day of first AI and 21-24 days later. Ultrasonography was carried out 35-45 days and 60 days after AI, for all the inseminations until conception. When the plasma P4 concentration was high on the day of AI, cow was considered to be inseminated at the beginning (P4 ≥ 0.75 ng/mL) or during the luteal phase (P4 ≥ 1.5 ng/mL) (oestrus detection error). As described by [9], fertilization failure or early embryo mortality (FF-EEM) were considered to have occurred when plasma P4 concentrations were low (< 1.5 ng/mL) on D0 and on D21-24. Late embryo mortality (LEM) was assessed by low plasma P4 concentrations on D0, high plasma P4 concentrations on D21-24 and the absence of visualization of a conceptus by ultrasonography on D35. Foetal mortality was diagnosed when cows were pregnant on D35 but not pregnant on D60. Pregnancy was assessed by the observation of a conceptus on D60. The conception insemination was followed by a pregnancy assessed on D60. The conception rate at AI1 was the number of pregnant cows at D60 on the cows bred.

STATISTICAL ANALYSIS

Relationships between P4 profiles, characteristics of ovarian structures and reproductive performance were studied comparing normal with abnormal cows using khi^2 test for qualitative variables and student T test for quantitative variables.

Relationships between the descriptive variables and abnormal postpartum patterns of resumption of cyclicity were analysed firstly comparing abnormal and normal cows using a T test for quantitative variables and a khi^2 for qualitative ones. Variables associated with abnormal profiles with *P<0.20* were introduced in multivariate logistic regression models [16]. A step-by-step descending process of elimination was undertaken until each of the variables included was significant. The fixed year effect and the random effect of animal (to take into account the fact that the same cow could appear more than once in the sample) were introduced in all models. Later in the text, a postpartum period will be treated as a cow.

Results

The means were escorted by standard deviations.

CHARACTERISTICS OF THE POSTPARTUM PERIODS (TABLES IA AND IB)

A large proportion of calving received human assistance, as frequently observed in research stations in France. The frequency of retained placenta/metritis was high. Body condition score was low at calving and cows lost on average one point of BCS between calving and AI. Weight at calving was low but the proportion of first lactation cows was high.

ABNORMAL PATTERNS OF RESUMPTION OF CYCLICITY

Of the 239 postpartum periods, 104 (43.5%) presented at least one abnormal pattern of resumption of ovarian activity. The two main abnormal patterns were: prolonged luteal phase (PLP: 18.4%, 44/239) and delayed cyclicity (DC: 16.3%, 39/239). Short luteal phase, cessation of cyclicity and irregular profile occurred respectively in 3.4, 2.5 and 2.9% of the cows.

The mean interval from calving to commencement of luteal activity was 27.8 ± 10.2 days in N cows. This interval was decreased in PLP (24.0 ± 8.2 days, *P<0.05*) and increased in DC cows (61.9 ± 10.0 days, *P<0.05*). The mean length of a PLP was 33.6 ± 13.8 days.

OVARIAN STRUCTURES FOLLOWED BY ULTRASOUND (TABLE II)

Of the 110 postpartum periods followed by ultrasonography, 15 displayed delayed cyclicity, 20 prolonged luteal phases, 1 cessation of cyclicity, 1 short luteal phase and 6 irregular profiles. Nine cows had ovarian cysts. All cows with cysts resumed cyclic activity between 27 and 43 days postpartum. One cow with a cyst had a prolonged luteal phase and another had an irregular profile.

In DC cows, the interval between calving to the first large follicle tended to be longer than in normal cows, and the

	Normal (n=67)				**Delayed cyclicity** (n=15)				**Prolonged luteal phase** (n=20)			
	Mean	**SD**	**Mini**	**Maxi**	**Mean**	**SD**	**Mini**	**Maxi**	**Mean**	**SD**	**Mini**	**Maxi**
Calving to large follicle interval (d)	14.6^a	3.9	8	27	23.0^t	15.6	10	59	17.6^b	5.2	11	30
Maximum size of the first large follicle (mm)	13.9	3.2	10	27	12.5	2.8	10	20	13.0	2.7	10	20
Calving to first ovulation interval (d)	28.9^a	9.5	14	49	56.8^b	8.0	50	76	23.2^b	6.9	12	35
Maximum size of the first CL (mm)	24.9^a	4.9	8	38	19.3^b	5.2	9	25	26.2	6.2	16	40

Comparison between abnormal vs normal cows, a vs b: P<0.05, a vs t: P<0.10; CL: corpus luteum; SD: standard deviation.

TABLE II: Comparison ovarian structures observed by transrectal ultrasonography twice weekly with a 5 MHz linear probe from D7 to D70 postpartum between normal, delayed cyclicity and prolonged luteal phase Holstein cows.

maximum size of the first CL (8 cows resumed cyclicity during the period of observation) was significantly smaller. In PLP cows, the first large follicle appeared significantly later after calving than in normal cows but first ovulation occurred earlier. The size of the first large follicle and the maximum size of the first CL were not different between prolonged luteal phase and normal cows.

RISK FACTORS ASSOCIATED WITH POSTPARTUM ABNORMAL OVARIAN PATTERNS

The low number of cows exhibiting cessation of cyclicity, short luteal phase and irregular profiles did not allow statistical analysis.

Table III presents the three significant factors associated with DC after calving. Calving in spring increased the risk for a cow to show DC compared to calving in the other seasons (OR=3.49, *P=0.01*). The risk for DC decreased as milk production increased at first AI (OR=0.87, *P<0.001*), and as body condition score increased on D50 (OR=0.2, *P=0.001*).

Table IV presents the six factors associated with a PLP. Retained placenta and/or metritis increased the risk for a cow to exhibit a PLP compared to absence of uterine disease (OR=3.21, *P=0.03*). The risk decreased for a PLP as milk protein content increased (OR=0.29, *P=0.02* for mean protein ≥30.5 vs <30.5 g/kg), as milk fat content increased (OR=0.37, *P=0.04* for mean fat ≥39.0 vs <39.0 g/kg), as milk production increased at first AI (OR=0.92, *P=0.02*), as body condition loss decreased from calving to D50 (high BCS loss to slight loss, OR=0.56, *P=0.04*) and as the interval from calving to resumption of postpartum luteal activity increased (OR=0.95, *P=0.05*).

RELATIONSHIPS BETWEEN ABNORMAL POSTPARTUM OVARIAN PATTERNS, REPRODUCTIVE PERFORMANCE AFTER AI AND PREGNANCY STATUS (TABLE V)

Among the 239 cows, 222 were inseminated and 17 did not conceive (9 in N cows, 2 in DC cows, 4 in PLP cows, 2 in other profiles). The pregnancy status after insemination was clearly defined for 212 cows which were included in the analysis. Only 131 cows were inseminated after visual heat detection without oestrus synchronization treatment. Among them, 7 (5.3%) were in the luteal phase at insemination. The interval between calving and commencement of luteal activity and to first insemination AI and to conception, the frequency of use of oestrus synchronization treatment and conception rate at first AI were all significantly affected by abnormal postpartum pattern as presented in table V.

In DC cows, the interval between calving to commencement of luteal activity, to first AI, to conception, and frequency of utilisation of oestrus induction treatment were significantly greater than in normal cows. However, conception rate at first AI and incidence of FF-EEM were not different.

In PLP cows, calving to first AI interval and frequency of oestrus induction treatment use were greater than in normal cows. Conception rate at first AI was less than in normal cows and a trend was observed for higher incidence of LEM.

Variable	Modality	OR	CI	*P* value
Calving season	Other seasons	ref		
	Spring	3.49	1.32-9.19	0.01
Milk production at first AI (kg/day)		0.87	0.80-0.94	<0.001
Body condition score (5 point scale) on D50		0.2	0.07-0.54	0.001

OR: odds ratio; CI: Confidence interval at 95%; AI: artificial insemination.

TABLE III: Risk factors associated with delayed cyclicity in postpartum Holstein cows (n=159 postpartum periods).

Variable	Modality	OR	CI	*P* value
Retained placenta and/or metritis	Absence	ref		
	Presence	3.21	1.15-8.96	0.03
Milk protein content[1] (g/kg)	<30.5	ref		
	≥30.5	0.29	0.10-0.81	0.02
Milk fat content[1] (g/kg)	<39.0	ref		
	≥39.0	0.37	0.14-0.94	0.04
Milk production (kg/day) on day of first AI		0.92	0.86-0.99	0.02
BCS (5 point scale) on D50 – BCS at calving		0.56	0.31-0.98	0.04
Calving to first detected luteal activity (d)		0.95	0.90-1.0	0.05

[1]Mean of 3 measurements once a month during the first 3 months of lactation; OR: odds ratio; CI: Confidence interval at 95%; AI: artificial insemination; BCS: body condition score.

TABLE IV: Risk factors associated with prolonged luteal phase in postpartum Holstein cows (n=144 postpartum periods).

	Normal (n=134*)	**Delayed Cyclicity** (n=35*)	**Prolonged Luteal Phase** (n=43*)
Calving to commencement of luteal activity	27.9±10.1[a]	61.7±10.0[b]	23.7±8.1[a]
Calving to AI1 interval (d)	68.7±14.8[a]	78.2±13.7[b]	78.0±22.8[b]
Calving to conception interval (d)	117.3±60.6[a]	144.0±67.3[b]	132.8±62.0
Oestrus synchronization treatment (%)	32.8[a]	62.9[b]	60.5[b]
Conception rate at AI1	31.3[a]	28.6	16.3[b]
Incidence of fertilization failure-early embryonic death (%)	47.9	60.0	56.8
Incidence of late embryonic-foetal death (%)	33.3[a]	16.7	56.3[t]

**number of cows bred; a vs b: P<0.05; a vs t: P<0.10 (trend); AI: artificial insemination*

TABLE V: Relationships between postpartum ovarian patterns and reproductive performance after first AI.

Discussion

In this sample of cows, fertility measured by conception rate at first AI was low, even in normal cows (31.3%), compared to that observed elsewhere in France in the Holstein breed (45.9 %, n=3 840, [17]; 45.8 %, n=1285, [18]). This did not result from heat detection errors since in the present study its specificity was high (proportion of cows in luteal phase at AI was 5.3%) as observed in large field studies in France (4.5%, n=3 840, [17]; 5%, n=1285, [18]) and in the UK (5.7%, n=714, [5]). Human intervention at calving, the high frequency of retained foetal membranes and metritis, low body condition score at calving and at breeding and BCS loss between calving and breeding might explain the low conception rate.

Incidences of FF-EEM (47.9%) and LEM (33,3%) in normal cows were high compared to those observed using the same methods in large field studies in France (respectively 35.5 and 25.2% [18]; 36.8 and 31.1% [17]). In this herd, risk factors for LEM (low BCS, high milk production) and the frequency of abnormal patterns of resumption of cyclicity might explain this observation as discussed below.

In this experiment, we used the same oestrus synchronization treatment for cows exhibiting delayed cyclicity, a prolonged luteal phase and normal cycles but not seen in oestrus. The purpose was to induce ovulation without the need to detect heat and to avoid the problem of an additional pregnancy failure variation factor. This protocol is known to be effective in these three types of cow [10, 11, 19]. At the present time, oestradiol utilisation is banned in Europe. To use P4 priming as recommended in delayed cyclicity cows, the oestradiol valerate and norgestomet injection at implant insertion can be replaced by GnRH or its analogue busereline (Crestar SO® protocol, 2.5 ml Receptal® or Fertagyl® at implant insertion, with a timed AI 48 h after implant removal). They produce comparable pregnancy rates in beef and dairy cows [20, 21].

In our study, frequency of abnormal patterns of resumption of postpartum cyclicity (43.5%) was high as observed in the Holstein breed in publications since the year 2000 in large epidemiological studies [6, 15] and in observations limited to one herd [7, 22, 23, 24]. Delayed cyclicity and prolonged luteal phase were the most frequently observed problems in this study which concords with previous experiments [3, 5, 8, 15].

The specificity of CL identification by frequent transrectal ultrasonographic observation of the ovaries was high in this study (100% of the detected CL corresponded with high P4 values, no false positives) however sensitivity was not 100% (92 of the 95 cows (96.8%) with P4 secreting CL detected during the period of observation, 3 false negatives). With one single transrectal observation by ultrasonography before breeding specificity and sensitivity are high as measured by [25] in more than 1 000 dairy cows (respectively 78.7 and 85.0%). With only one observation, CL which are in the process of formation are more likely to go unidentified. Nevertheless ultrasonography appeared to be efficient to differentiate delayed cyclicity and normal or prolonged luteal phase cows. CL size and appearance by ultrasonography were the same between PLP and normal cows. Frequent observations to measure the lifespan of the CL are needed to identify PLP. Ultrasonography did not appear to be helpful in differentiating between the CL of PLP and normal cows. In conclusion, ultrasonography, even used punctually before breeding, can be sensitive and specific in differentiating between delayed cyclicity cows from other disturbances but ultrasonographic appearance of CL does not allow the differentiation between normal cows (not seen in oestrus) and prolonged luteal phase cows.

In our experiment, prolonged luteal phase had a strong negative effect of conception rate at first AI as observed by [3, 5, 8, 23, 24, 26] despite the use of oestrus synchronization treatment. This low conception rate may be related to a very long pre-service period of priming by progesterone as observed in old studies where exogenous progesterone or analog was used in first compared to the second half of the cycle or at the end of the cycle [27, 28]. Moreover, a prolonged luteal phase was associated with retained placenta and/or metritis and it has been shown that delayed uterine involution and/or retained foetal membranes are also associated with low reproductive performance [29]. Furthermore, in our experiment, this effect on conception rate is related to a tendency for higher incidence of late embryonic-foetal mortality as previously hypothesised by [3]. This late embryonic-foetal mortality can not be differentiated from a new prolonged luteal phase because the high level of progesterone on 21-24 day after AI

is not specific of the presence of an embryo. To our knowledge, this problem cannot be solved at the present time [9]. An increase in the incidence of "late embryonic mortality" is strongly associated with the decrease in fertility observed in Holstein cows over the last decades in France. For example, in the two main dairy breeds, Holstein and Montbéliarde, reproductive management, especially for AI, is essentially the same. In Holstein cows, conception rate at first AI, measured by non-return rate on day 282 after AI (NRR282) decreased from 46 to 39% between the years 1995 and 2003 [30]. Over the same time period the incidence of LEM (1 – NRR28/NRR282) increased from 37% to 46%. In Montbéliarde cows, conception rate remained stable (53% in 1995, 52% in 2003) as did the incidence of LEM (29% in 1995, 30% in 2003). These percentages were observed on large samples of cows (more than 35 million AI in Holstein cows, more than 5 million AI in Montbéliarde cows). Late embryonic mortality does not seem to be related to genetic merit for milk production [9, 18]. In our opinion, this increase in LEM incidence might be partly attributed to an increase in the frequency of prolonged luteal phases. Between 1970 and 1990, the frequency of PLP reported in the literature was lower than 3% in the Holstein breed. Since 2000, the frequency has increased to between 15 and 35% [1]. Moreover, abnormal patterns of resumption of cyclicity postpartum, and especially prolonged luteal phases, are common in Holstein cows but are observed less frequently in more fertile breeds such as Montbéliarde, Normande and Abondance [31], Swedish red and white [8], Norvegian red dairy cows [32], in cross-bred [33] or Charolais suckler cows [31]. This hypothesis should be investigated by further analysis on larger samples of fertile and infertile cows.

Metritis and retained placenta were major risk factors for a prolonged luteal phase as previously observed [8, 23, 34]. Prostaglandin F2α secretion might be reduced by endometrial inflammation which may prevent luteolysis as suggested by [35] and [34]. Additionally the first ovulation occurred early after calving in prolonged luteal phase cows, before the end of uterine involution which is probably an additional factor for low prostaglandin secretion [34]. Metritis is related to manual intervention at calving. To prevent metritis and consequently prolonged luteal phase, it is recommended to limit assistance at calving or to intervene under very hygienic conditions. Advices concerning herd management probably have to be updated on this topic.

Body condition loss after calving and lowmilk protein content, indicators of negative energy balance, were risk factors for a prolonged luteal phase in our study. This association has been observed previously by [36]. Poor nutritional management appears to be a risk factor for the two main abnormal patterns: delayed cyclicity and prolonged luteal phase.

In our study, delayed cyclicity had not significantly reduced conception rate at first AI compared to normal cows contrarily to other observations [5, 23, 26, 37]. It might be due partly to the low number of observations (35 DC cows) or to the oestrus induction and synchronization treatment used in this study, but a better conception rate in DC than in normal cows was previously observed [24]. As previously observed [22, 34, 38], DC is related to low body condition score after calving (on D50 in our experiment). In our sample, the risk for DC was higher when milk production was low and this is not in accordance with literature [2, 11, 19] but might be explained in the present experiment by nutritional level which limited both milk production and reproduction as in [4, 34, 38, 39, 40]. DC was associated with a season effect. According to [38, 41], cows which calved in spring resumed ovarian activity later than cows which calved in other seasons. In some studies [8, 34], the opposite was observed but the cows were at pasture from May to September and grazing could have indirectly modified the season effect on postpartum ovarian cyclicity resumption.

Conclusion

In our study, conducted in a herd which used oestrus synchronization treatment, the observations are not representative of general herds and it is not possible to infer general relationships. However, some of our observations support the hypothesis that the increase in the frequency of abnormal patterns of resumption of cyclicity after calving is involved in the reduction of fertility in Holstein cows.

In this study, as in epidemiological observations, prolonged luteal phase and delayed cyclicity were the main abnormal patterns of resumption of cyclicity observed after calving in Holstein cows. Prolonged luteal phase has a deeply negative effect on conception rate at first insemination. This effect seems to be explained partly by an increase of late embryonic-foetal mortality and might be involved in the decrease in fertility observed in the Holstein breed. The diagnosis of this abnormal pattern is not easy as the ultrasonographic appearance of the *corpus luteum* is not different in prolonged luteal phase and normal cows. The diagnosis requires frequent postpartum progesterone measurements and cannot be used on a large scale in commercial dairy herds. Consequently, action against this problem has to focus on prevention at the present time. As human intervention at calving and metritis are the main risk factors for prolonged luteal phase, the effects of new advice on calving management (necessity of intervention, hygienic management, housing at calving…) deserves to be investigated on a large scale. Moreover, as adequate nutritional management before and after calving prevent both prolonged luteal phase and delayed cyclicity, adequate feeding of dairy cows needs to be highlighted as a possible way in which to increase fertility in high producing dairy cows.

Acknowledgments

We thank all the technicians at the INRA station of Bressonvilliers, especially Patrice Laigre for ultrasound observations, C. Fagu, C. Flon and S. Canepa of the INRA hormonal laboratory in Tours for P4 assays.

This study was financially supported by the DESIALIS company.

References

1. - CROWE M. A.: Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. *Reprod. Dom. Anim*., 2008, **43**, Suppl 5, 20-28.
2. - GRIMARD B., DISENHAUS C.: Les anomalies de la reprise de la cyclicité après vêlage. *Le point vétérinaire*, Numéro spécial Reproduction des Ruminants : maîtrise des cycles et pathologie, 2005, **36**, 16-21.
3. - LAMMING G.E., DARWASH A.O.: The use of progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 1998, **52**, 175-190.
4. - KERBRAT S., DISENHAUS C.: Profils d'activité lutéale et performances de reproduction du vêlage à la première insémination. *Rencontres Recherches Ruminants*, 2000, **7**, 227-230.
5. - ROYAL M.D., DARWASH A.O., FLINT A.P.F., WEBB R., WOOLLIAMS J.A., LAMMING G.E.: Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim. Sci.*, 2000, **70**, 487-501.
6. - FRÉRET S., CHARBONNIER G., CONGNARD V., JEANGUYOT N., DUBOIS P., LEVERT J., HUMBLOT P., PONSART C. : Expression et détection des chaleurs, reprise de la cyclicité et perte d'état corporel après vêlage en élevage laitier. *Rencontres Recherches Ruminants*, 2005, **12**, 149-152.
7. - HORAN B., MEE JF., O'CONNOR P., RATH M., DILLON P.: The effect of strain of Holstein-Friesian cow and feeding system on post-partum ovarian function, animal production and conception rate to first service. *Theriogenology,* 2005, **63**, 950-971.
8. - PETERSSON K.J., GUSTAFSSON H., STRANDBERG E., BERGLUND B.: Atypical progesterone profiles and fertility in Swedish dairy cows. *J. Dairy Sci*., 2006, **89**, 2529-2538.
9. - HUMBLOT P.: The use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology*, 2001, **56**, 1417-1433.
10. - GRIMARD B., HUMBLOT P., PONTER A.A., CHASTANT S., CONSTANT F., MIALOT J.P.: Efficacité des traitements de synchronisation des chaleurs chez les bovins. *INRA Productions Animales*, 2003, **16**, 211-227.
11. - PETER A.T., VOS P.L.A.M., AMBROSE D.J.: Postpartum anestrus in dairy cattle. *Theriogenology*, 2009, **71**, 1333-1342.
12. - AGABRIEL J., GIRAUD J.M., PETIT M.: Détermination de la note d'état d'engraissement en élevage bovin allaitant. *Bulletin Technique CRZV Theix INRA*, 1986, **66**, 43-50.
13. - TERQUI M., THIMONIER J.: Nouvelle méthode radio-immunologique pour l'estimation du niveau de progestérone plasmatique. Application pour le diagnostic précoce de la gestation de la brebis et de la chèvre. *In* : Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série D 279, Paris, 1974, 1109-1112.
14. - THIMONIER J.: Détermination de l'état physiologique des femelles par analyse des niveaux de progestérone. *INRA Prod. Anim*., 2000, **13**, 177-183.
15. - OPSOMER G., CORYN M., DELUYKER H., DE KRUIF A.: An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. *Reprod. Dom. Anim*., 1998, **33**, 193-204.
16. - CYTEL SOFTWARE CORPORATION: Egret for Windows, User Manual, 412 pages, Cytel Software Corporation Ed, Cambridge, 1999.
17. - FRÉRET S., PONSART C., RAI D.B., JEANGUYOT N., PACCARD P., HUMBLOT P.: Facteurs de variation de la fertilité en première insémination et des taux de mortalités embryonnaires en élevages laitiers Prim'Holstein. *Rencontres Recherches Ruminants*, 2006, **13**, 281-284.
18. - GRIMARD B., FRÉRET S., CHEVALLIER A., PINTO A., PONSART C., HUMBLOT P.: Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. *Anim. Reprod. Sci.*, 2006, **91**, 31-44.
19. - RHODES F.M., MCDOUGALL S., BURKE C.R., VERKERK G.A., MACMILLAN K.L.: Invited review : treatment of cows with an extended postpartum anoestrus interval. *J. Dairy Sci*., 2003, **86**, 1876-1894.
20. - GRIMARD B., PONSART C., FRERET S., DELIZE F., CHAMBON G., DRIANCOURT M., FOURNIER R., PTASZYNSKA M., ROSSO V.: Effect of the AI Timing after Estrus Synchronization with Crestar SO on the Fertility of Induced Estrus in Charolais Heifers. *XXV World Buiatrics Congress*, Budapest, July 6-11, 2008, Abstract 916.
21. - GRIMARD B., PONSART C., HUMBLOT P., GIPOULOU C., ROSSO V., FOURNIER R., PTASZYNSKA M., DRIANCOURT M.: Comparison of Fertility Results with two Progestin based Synchronization Methods in French Conditions. *XXV world Buiatrics Congress*, Budapest, July 6-11, 2008, Abstract 918.
22. - SHRESTHA H.K., NAKAO T., SUZUKI T., AKITA M., HIGAKI T.: Relationships between body condition score, body weight, and some nutritional parameters in plasma and resumption of ovarian cyclicity postpartum during pre-service period in high-producing dairy cows in a subtropical region in Japan. *Theriogenology*, 2005, **64**, 855-866.
23. - SHRESTHA H.K., NAKAO T., SUZUKI T., HIGAKI T., AKITA M.: Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of high-producing Holstein cows. *Theriogenology*, 2004, **61**, 1559-1571.
24. - SAMARUTEL J., LING K., WALDMANN A., JAAKSON H., KAART T., LEESMÄE A.: Field trial on progesterone cycles, metabolic profiles, body condition score and their relation to fertility in Estonian Holstein dairy cows. *Reprod. Dom. Anim*., 2008, **43**, 457-463.
25. - STEVENSON J.S., TENHOUSE D.E., KRISHER R.L., LAMB G.C., LARSON J.E., DAHLEN C.R., PURSLEY J.R., BELLO N.M., FRICKE P.M., WILTBANK M.C., BRUSVEEN D.J., BURKHART M., YOUNGQUIST R.S., GARVERICK H.A.: Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. *J. Dairy Sci.*, 2008, **91**, 2901-2915.
26. - NAKAO T., MORIYOSHI M., KAWATA K.: The effect of postpartum ovarian dysfunction and endometritis on subsequent reproductive performance in high and medium producing dairy cows. *Theriogenology*, 1992, **37**, 341-349.
27. - BEAL W.E., CHENAULT J.R., DAY M.L., CORAH L.R.: Variation in conception rates following synchronization of estrus with melengestrol acetate and prostaglandin F2. *J. Anim. Sci*., 1988, **66**, 599-602.
28. - BRINK J.T., KIRACOFE G.H.: Effect of oestrus cycle stage at synchro-mate B treatment on conception and time to estrus in cattle. *Theriogenology*, 1988, **29**, 513-519.
29. - FOURICHON C., SEEGERS H., MALHER X. : Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology*, 2000, **53**, 1729-1759.
30. - BARBAT A., DRUET T., BONAITI B., GUILLAUME F., COLLEAU J.J., BOICHARD D. : Bilan phénotypique de la fertilité à l'insémination artificielle dans les trois principales races laitières françaises. *Rencontres Recherche Ruminants*, 2005, **12**, 137-140.
31. - DISENHAUS C., CUTULLIC E., BLANC F., GATIEN J., AGABRIEL J., HETREAU T., MICHEL G., PACCARD P., BADINAND F., EGAL D., PONSART C.: Caractéristiques comparées de la cyclicité après vêlage de différentes races bovines. *Rencontres Recherche Ruminants*, 2008, **15**, 383-386.
32. - GARMO R.T., MARTIN A.D., THUEN E., HAVREVOLL O., STEINSHAMN H., PRESTLØKKEN E., RANDBY A., EKNÆS M., WALDMANN A., REKSEN O.: Characterization of progesterone profiles in fall-calving Norwegian Red cows. *J. Dairy Sci*., 2009, **92**, 4919-4928.
33. - MANN G.E., KEATINGE R., HUNTER M., HEDLEY B.A., LAMMING G.E.: The use of milk progesterone to monitor reproductive function in beef suckler cows. *Anim. Reprod. Sci*., 2005, **88**, 169-177.
34. - OPSOMER G., GRÖHN Y.T., HERTL J., CORYN M., DELUYKER H., DE KRUIF A.: Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium : a field study. *Theriogenology*, 2000, **53**, 841-857.
35. - OLSON J.D., BALL L., MORTIMER R.J., FARIN P.W., ADNEY W.S., HUFFMAN E.M.: Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained foetal membranes. *Am. J. Vet. Res*., 1984, **45**, 2251-2255.

36. - PONSART C., DUBOIS P., LEVERT J., FRERET S., JEANGUYOT N., CHARBONNIER G., CONGNARD V., HUMBLOT P. : Influence des profils de note d'état corporel sur la reprise de cyclicité après vêlage en élevage laitier. *Journée Bovine Nantaise*, octobre 2005, 98-101.

37. - GAUTAM G., NAKAO T., YAMADA K., YOSHIDA C.: Defining delayed resumption of ovarian activity postpartum and its impact on subsequent reproductive performance in Holstein cows. *Theriogenology*, 2010, **73**, 180-189.

38. - SANTOS J.E., RUTIGLIANO H.M., SÁ FILHO M.F.: Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 2009, **110**, 207-221.

39. - PUSHPAKUMARA P.G.A., GARDNER N.H., REYNOLDS C.K., BEEVER D.E., WATHES D.C.: Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 2003, **60**, 1165-1185.

40. - GRÖHN Y.T., RAJALA-SCHULTZ P.J.: Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci*., 2000, **60-61**, 605-614.

41. - CLAUS R., KARG H., ZWIAUER D., VON BUTLER I., PIRCHNER F., RATTENBERGER E.: Analysis of factors influencing reproductive performance of the dairy cows by progesterone assay in milk-fat. *Brit. Vet. J.,* 1983, **139**, 29-37.

IV. Etude expérimentale n°3 : Effet du déficit énergétique postpartum sur la qualité des complexes ovocytes-cumulus

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration entre l'UNCEIA et l'UMR INRA-ENVA Biologie du Développement et Reproduction. Elle a été cofinancée par l'ANR (Programme GENANIMAL) et la société Apis-Gene.

IV.1. Résumé

IV.1.1 Dispositif expérimental

Pendant deux années consécutives 22 vaches multipares Holstein de la ferme expérimentale de l'INRA (UCEA, Bressonvilliers, Leudeville, Essonne), conduites en deux lots de niveaux énergétiques différents (restreint et témoin) ont été soumises à un traitement de superovulation puis à une ponction folliculaire par voie vaginale (OPU) à 80 jours postpartum avant et après maturation folliculaire, déclenchée par une injection de prostaglandine. Les complexes ovocytes-cumulus (COC) ont été notés après ponction (note visuelle de 1 (bonne qualité) à 4 (mauvaise qualité)). Les expressions des gènes de l'IGF-1, de son récepteur (IGFR-1), de l'IGFBP-2 et -4 ainsi que l'expression du gène PTGS2 et de l'actine ont été explorés dans les COC issus des deux lots de vaches (mesure des ARNm par RT PCR). L'effet du niveau énergétique sur le nombre, la qualité visuelle et l'expression des gènes du système IGF a été analysé.

IV.1.2 Principaux résultats

Le plan expérimental n'a pas permis de créer de différences importantes de bilan énergétique entre les lots témoin et restreint. Le lot d'alimentation n'a pas eu d'effet ni sur la quantité ni sur la qualité des complexes ovocytes-cumulus produits 80 jours postpartum. Il existe une expression des gènes du système IGF dans les complexes ovocytes-cumulus au moment de la mise à la reproduction chez les vaches laitières de race Holstein. L'expression des gènes d'IGF-1 est faible mais celle d'IGFR-1 et d'IGFBP-4 est importante. Les ARNm de l'IGFBP-2 sont aussi exprimés. Le lot d'alimentation n'a pas eu d'effet sur l'expression des ARNm du système IGF dans les complexes ovocytes cumulus.

IV.2. Article

Effet d'une restriction énergétique sur la qualité et l'expression des gènes du système IGF des complexes ovocytes-cumulus récoltés 80 jours postpartum après superovulation chez des vaches Holstein

LEDOUX D[1,2], NUTTINCK F[1,2], RICHARD C[3], PONTER AA[1,2], GRIMARD B[1,2]

[1] Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 av du général de Gaulle, F-94704 Maisons-Alfort Cedex, France;
[2] UMR INRA 1198 Biologie du Développement et Reproduction, Domaine de Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas Cedex, France;
3 UCEA Bressonvilliers, F-91630, Leudeville, France.

1 Introduction

Dans de nombreux pays, la fertilité des vaches laitières de race Holstein mesurée par le taux de réussite en première insémination diminue (Royal et al., 2000; Lucy, 2001 ; Barbat et al., 2005; Barbat et al., 2010). L'effet préjudiciable sur les performances de reproduction du déficit énergétique en début de lactation est bien connu et très documenté (Butler et Smith, 1989; Van Knegsel et al., 2005 ; Chagas et al., 2007 ; Wathes et al., 2007b). De nombreux auteurs, après Britt en 1992 (cité par Leroy et al., 2008a), mettent en cause les effets néfastes du bilan énergétique négatif sur la qualité de l'ovocyte ovulé lors de la première insémination. Le follicule préovulatoire vers 60-80 jours postpartum a réalisé sa croissance terminale pendant la période de déficit énergétique ce qui pourrait avoir un effet délétère sur l'aptitude de l'ovocyte à la fécondation et au développement. Si certains auteurs (Snijders et al., 2000 ; Walters et al., 2002a ; 2002b ; Wathes et al., 2007a) ont bien observé des effets de la production laitière, de l'état corporel, du potentiel génétique et de la parité en accord avec cette hypothèse, d'autres ont observé des effets contradictoires. Par exemple, l'effet défavorable du déficit énergétique sur la qualité des ovocytes ponctionnés n'a pas été observé par Argov et al. (2004) qui comparaient des vaches en début (73 ± 6 jours postpartum) et en fin de lactation (263 ± 60 jours postpartum). Pour Kendrick et al. (1999), l'effet est même inversé : la qualité des ovocytes de vaches correctement alimentées s'est dégradée entre 30 et 100 jours postpartum alors que celle des ovocytes des vaches sous-alimentées est restée stable.

Le déficit énergétique s'accompagne d'une diminution du taux d'IGF-1 plasmatique (Beam and Butler, 1997; Velazquez et al., 2008) qui est corrélée à la concentration intrafolliculaire d'IGF1. Chez la plupart des espèces les IGFs (Insulin Growth Factor) et les IGFBPs (Binding Protein) (en particulier IGFBP-2 and IGFBP-4) sont considérés, respectivement, comme favorisant et inhibant la croissance folliculaire et la maturation ovocytaire (Mazerbourg et al., 2003). En particulier, l'IGF1 stimule la croissance folliculaire, la croissance et la maturation de l'ovocyte, la croissance de l'embryon (Zulu et al., 2002 ; Leroy et al., 2008a ; Monniaux et al., 2009). L'IGF-1, les récepteurs de l'IGF-1 et les IGF Binding Proteins (IGFBPs) ont été identifiés au sein des complexes ovocytes-cumulus chez la vache (Armstrong et al., 2002 ; Nuttinck et al., 2004 ; Wang et al., 2009). A la fin de la différenciation folliculaire, les concentrations intrafolliculaires en IGF-BP (2 et 4) diminueraient (Monget et al., 1996 ;

Stewart et al., 1996). Nuttink et al. (2004) ont montré que l'expression de l'IGF-BP2 dans les complexes ovocytes-cumulus des vaches récoltées *in vivo* était plus élevée 12 heures avant la lutéolyse (complexes récoltés avant maturation) que 60 heures après (complexes récoltés après maturation à la suite d'une injection de 0,75 μg de PGF2α). Le système IGF est donc un bon candidat pour expliquer les effets du déficit énergétique sur le nombre et la qualité des complexes ovocytes-cumulus en tenant compte de leur stade de différenciation.

Aujourd'hui, il est possible de collecter des complexes ovocytes-cumulus *in vivo* par ponction transvaginale échoguidée (Marquant-Leguienne et Humblot, 1998; Merton et al., 2003) et de mesurer l'expression des gènes du système IGF dans de petites quantités de cellules. L'objectif de notre étude était d'explorer les effets d'un déficit énergétique en début de lactation sur la qualité et sur l'expression du système IGF de complexes ovocytes-cumulus collectés par OPU après un traitement de superovulation sur des vaches laitières hautes productrices avant et après maturation au moment de la mise à la reproduction (autour de 80 jours postpartum).

2 Matériels et méthodes

21 Animaux et conduite d'élevage

211 Animaux

L'étude a été réalisée au sein de l'Unité Commune d'Expérimentation Animale INRA de Bressonvilliers. Une centaine de vaches y sont élevées en stabulation libre sur aire paillée pendant toute l'année et sont traites deux fois par jour. Elles ont produit en moyenne 8 866 kg de lait en 2006 (n=132) et 9 395 kg en 2007 (n=135). Le troupeau est divisé en trois selon la production laitière. Un lot composé des vaches en début de lactation (5 premiers mois), un lot de vaches en fin de lactation (du 6ème au 10ème mois) et un lot de vaches taries.

Les vaches ont été soumises à un examen de l'appareil génital un mois après vêlage. La taille et la consistance utérine ont été évaluées par palpation et par échographie transrectale afin de détecter une infection utérine du type métrite chronique : mauvaise involution des cornes utérines et/ou persistance d'une lumière utérine et/ou écoulement de pus à la vulve. Les ovaires ont été palpés et échographiés par voie transrectale afin de détecter la présence de kystes folliculaires (follicule de diamètre supérieure à 25 mm). Les métrites chroniques ont été traitées par l'injection intra-musculaire de 500 μg de PGF2α (Estrumate®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Boxmeer, Pays-Bas) puis par l'application intra-utérine, 48 heures plus tard, de cephapirine (Métricure®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Boxmeer, Pays-Bas). Les vaches présentant des kystes folliculaires ont reçu une injection intra-musculaire 86 μg de GnRH (Fertagyl®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Boxmeer, Pays-Bas).

212 Mise en lot

L'essai a été réalisé sur 2 lots de 11 vaches multipares de race Holstein, 10 vaches suivies de janvier 2006 à mai 2006, et 12 de décembre 2006 à juin 2007 (N=22). La production laitière de l'année précédente avoisinait les 10 000 kg de lait en moyenne par vache et par lactation (9 985 ± 1248 kg), pour un rang de vêlage moyen de 3,7 ± 1,5 et un index génétique lait moyen positif (+457 ± 434 kg de lait).
Après le vêlage, les 22 vaches ont été appariées en fonction de leur production laitière de l'année précédente et de leur rang de lactation. Les vaches ont été réparties dans deux lots de régimes alimentaires différents, 5 vaches dans le lot témoin versus 5 dans le lot restreint la première année puis 6 versus 6 la seconde année. Les vaches les plus maigres ont été placées dans le lot restreint.

213 Compositions des rations

Les rations distribuées étaient des rations complètes à base d'ensilage de maïs, de drêche de brasserie déshydratée, de soja, d'orge aplati, de mélasse, de foin, d'un concentré protéique et d'un complément minéral.
Les vaches du lot témoin ont reçu *ad libitum* une ration complète couvrant les besoins pour une production laitière attendue de 40 kg de lait à 42 g/kg de matière grasse et 33 g/kg de matière protéique (lot début de lactation). Les vaches du lot restreint ont reçu en quantité limitée une ration complète couvrant les besoins pour une production laitière de 32 kg de lait (lot fin de lactation). Ceci représente 80% des besoins des vaches témoins si la production laitière réalisée atteint 40 kg de lait/jour, 70% des besoins si la production laitière réalisée par les vaches témoins atteint 50 kg de lait/jour.

22 Superovulation et collecte d'ovocytes par Ovum Pick Up (OPU)

221 Superovulation sur chaleurs induites

Les vaches ont été soumises à un traitement de synchronisation afin d'induire des chaleurs de référence 53 ± 5,9 jours après vêlage. Le traitement a été une combinaison (i) d'un implant sous-cutané (Crestar implant®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Boxmeer, Pays-Bas) contenant 3 mg de norgestomet déposé pendant 10 jours sur la face externe du pavillon de l'oreille (ii) d'une injection intra-musculaire à la pose de l'implant de 3 mg de norgestomet et de 5 mg de de valérate d'œstradiol (Crestar injection®) (iii), d'une injection de 500 μg de prostaglandine F2α 48 heures avant le retrait de l'implant (Estrumate®) et (iv) d'un injection le jour du retrait de l'implant de 400 UI d'eCG (ChronogestPMSG®, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Boxmeer, Pays-Bas). Les chaleurs de référence ont été induites deux jours après le retrait de l'implant.
Onze jours après les chaleurs de référence (77 ± 1,6 jours après vêlage), les vaches ont reçu un traitement de superovulation avec de la FSH porcine (Stimufol®, Mérial, Lyon). Dans le but de

collecter des ovocytes avant et après maturation folliculaire, deux protocoles ont été utilisés (Figure IV-2). Les vaches collectées avant maturation (5 vaches dans le groupe témoin et 5 vaches dans le groupe restreint) ont reçu 265 µg de pFSH répartis en trois injections intra-musculaires en doses décroissantes espacées de 12 heures (93,4 ; 93,4 et 78,2 µg de pFSH) avant l'OPU. Les vaches collectées après maturation (6 vaches dans le groupe témoin et 6 vaches dans le groupe restreint) ont reçu 500 µg de FSH répartis en 8 injections en doses décroissantes espacées de 12 heures (93,4 ; 93,4 ; 78,2, 78,2 ;.46,9 ; 46,9 ; 31,5 ; 31,5 µg de pFSH). Une injection de 750 µg de PGF2α (Estrumate®) en même temps que la 4ème injection de FSH.

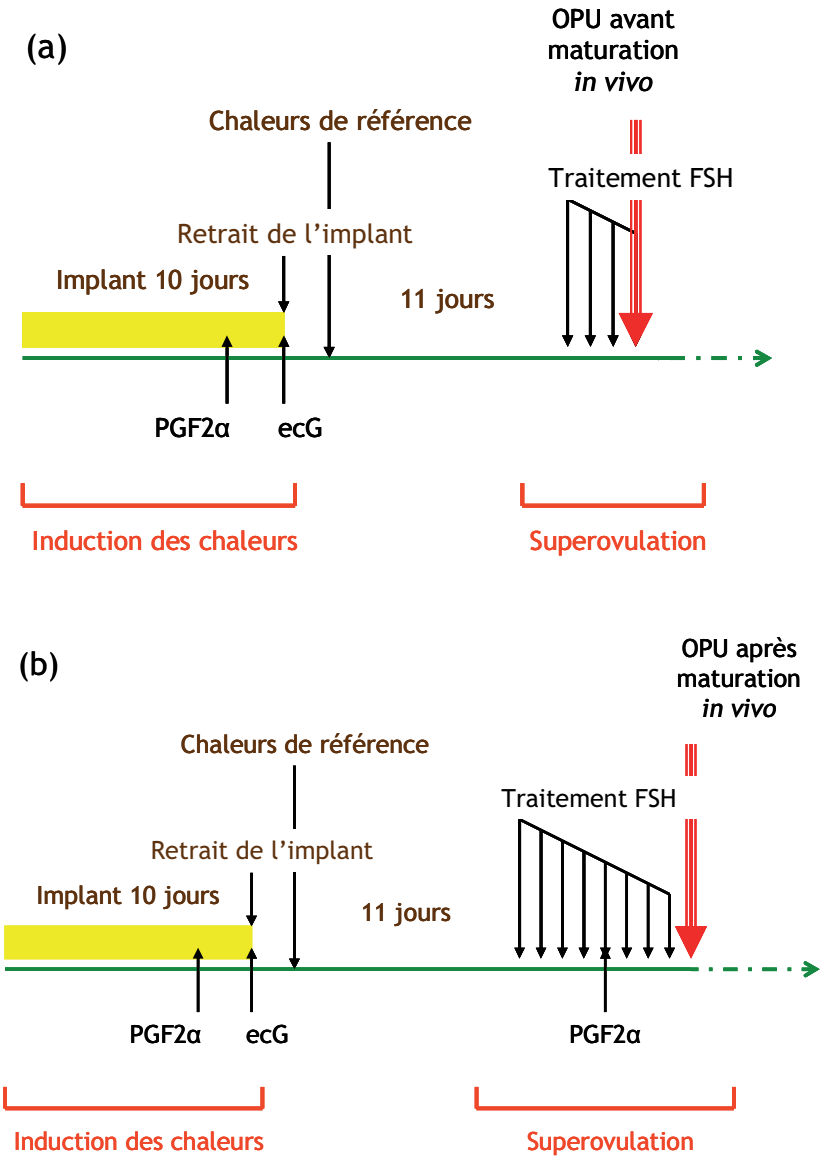


Figure IV-2 Traitement d'induction des chaleurs de référence et de superovulation des vaches collectées (a) « avant maturation » et (b) « après maturation »

222 Collecte des complexes ovocytes-cumulus et évaluation de leur qualité

Les complexes ovocytes-cumulus ont été collectés par OPU 12 heures après la dernière injection de FSH (80,9 ± 0,75 jours postpartum). Chaque vache du protocole n'a été superovulée et collectée qu'une fois.
La qualité des complexes a été notée sur une échelle de 1 (bonne qualité) à 4 (mauvaise qualité) de la grilles des critères morphologiques décrits par Marquant-Le Guienne (1998). Ils ont ensuite été immédiatement congelés à -20°C dans un minimum de volume dans des tubes Eppendorf stériles, acheminés au laboratoire puis conservés à -80°C. Tous les complexes d'une seule vache étaient conservés dans un tube.

23 Dosage des ARNm du système IGF

231 Production des courbes standards d'ADNc d'intérêt

Les procédures de RT-PCR utilisées pour obtenir les courbes standards d'ADN complémentaire (ADNc) sont détaillées par Nuttinck et al. (2004).

232 Quantification des transcrits des complexes ovocytes-cumulus par RT- PCR en temps réel

Les ARN messagers des gènes β-actine, PTGS2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2, appelé aussi cyclooxygénase 2, COX2), des composants du système IGF (IGF-1, IGFR-1, IGFBP-2, IGFBP-4) ont été quantifiés par RT-PCR en temps réel à l'aide de l'appareil ABI Prism 7000HT (Applied Biosystem, les Ulis, France). Les gènes PTGS2 et β-actine ont servi respectivement de marqueur de la différenciation et de gène domestique (Nuttinck et al., 2004).
Les complexes collectés ont été regroupés par régime alimentaire (témoin vs. restreint), par moment de ponction (avant ou après maturation) et par année. Au total, 8 pools ont été obtenus de 13,0 ± 6,5 complexes ovocytes-cumulus, dont un pool minimum contenant 4 complexes et un pool maximum contenant 21 complexes.
De ces pools ont été extraits les ARN totaux par RNA plus® (Qbiogen, Illkirch, France). Les ADNc issu de la transcription inverse des ARN totaux ont été synthétisés à partir des couples d'amorces d'oligo-dT (Tableau IV-7) et grâce à l'activité de l'enzyme Super Sript II reverse Transcriptase® (Invitrogen, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Puis, l'amplification des ADNc (transcrits des ARNm des gènes recherchés) s'est poursuivi en utilisant le SYBR green Master Mix® (Applied Biosystem). Les amorces d'olido-dT ont été désignées grâce au logiciel Design Software® (Primer Express, Applied biosystem, Les Ulis, France) en se basant sur les séquences d'ADN ovin ou bovin. Des dilutions 10^{-5} des ADNc standards ont été incluses dans chaque essai, et ont permis d'élaborer les courbes standards de quantification des gènes d'intérêts. L'expression des ARNm a été déterminée pour chaque pool lors d'analyses considérées indépendantes. Chaque PCR a été dupliquée. Les résultats des quantifications fournis par l'appareil de PCR en temps réel (ABI Prism

7000HT®) ont été traduits et sont exprimés en nombre de copie d'ARNm rapporté sur le nombre de copie de β-actine contenues dans l'échantillon. Le rapport sur la β-actine permet de supprimer la variabilité de la méthode d'isolation des ARN et de la RT-PCR et du nombre de cellules somatiques entre les échantillons.

Tableau IV-7 Couples d'amorces utilisés pour la RT-PCR en temps réel

Gène		Amorce	Taille (bps)
β-ACTIN	Upstream Downstream	5' GCT TTA CCA CCA CAG CCG AG 3' 5' CGA CGC AGC AGT AGC CAT CT 3'	101
PTGS2	Upstream Downstream	5' TCCGCCAACTTATAATGTGCAC 3' 5' GGCAGTCATCAGGCACAGGA 3'	101
IGF-I	Upstream Downstream	5' CAAAAGATGGGCATTTCCCC 3' 5' CTCCAGGGTCATTTTTGCAAG 3'	101
IGFR-I	Upstream Downstream	5' CAATGGGCAGAGCGATCATC 3' 5' GGACGGATCCCGTGTTCTTC 3'	81
IGFBP-2	Upstream Downstream	5' ACTGTGACAAGCATGGCCTG 3' 5' TCACACACCAGCACTCCCC 3'	81
IGFBP-4	Upstream Downstream	5' AACAACAGCTTCAGCCCCTG 3' 5' GGTGCTCCGGTCTCGAATTT 3'	81

Les coefficients de variation intra-essai ont été calculés à partir des résultats des gammes de standards d'ADNc selon la méthode décrite dans Rutledge et Côté (2003). Les dosages ont été effectués en une seule fois pour chaque gène recherché. Le Tableau IV-8 présente les paramètres de validation de la méthode de RT-PCR en temps réel.

Tableau IV-8 Efficacité et reproductibilité du dosage des ADNc standards

Gènes	Intervalle de concentrations[a]	r^2	Efficacités	Coefficients de variation (%)
Actine	$5.15x10^6$ à 51.5	0.99	0.9	15.5
PTGS2	$4.83x10^5$ à 48.3		1.0	20.8
IGF-1	$4.88x10^5$ à 48.8			7.4
IGFR-1	$2.90x10^5$ à 29.0			11.7
IGFBP-2	$3.04x10^5$ à 30.4			11.6
IGFBP-4	$3.7x10^5$ à 37.0		0.9	4.0

[a]en nombre de molécule d'ADN

24 Prélèvement de sang et analyses pour le suivi plasmatique du métabolisme

Des prélèvements sanguins ont été effectués le matin, une fois par semaine du vêlage jusqu'à l'OPU, avant la distribution de la ration. Ils on été collectés dans des tubes héparinés et centrifugés immédiatement. Les aliquots de plasma ont été congelés à -20℃ jusqu'au traitement simultané de tous les échantillons d'une année de protocole. Il a été dosé par colorimétrie : le glucose (Glucose-RTU®; BioMérieux, Lyon, France), les acides gras non estérifiés (AGNE ; NEFA C®; Wako Chemicals, Neuss, Germany), le β-hydroxybutyrate (BHB ; methode adaptée de Barnouin *et al.*, 1986), l'urée (Urea UV 250®; BioMérieux, Lyon, France). L'insuline et l'IGF-1 ont été dosés par radioimmunologie, respectivement basé sur de l'insuline porcine pour l'insuline (Insulin-CT®; Cis bio international, Gif-sur-

Yvette, France) et un recombinant humain pour l'IGF-1 (IGF-1-RIACT®; Cis bio International, Gif-sur-Yvette, France). Les échantillons à tester ont été traités en solution acide afin de libérer l'IGF-1 de sa protéine porteuse (BP).
Les coefficients de variation intra-essai ont été respectivement 1,25 % à 5,01 mM, 0,84 % à 0,69 mM, 2,85 % à 1,60 mM, 4,69 % à 3,01 mM, 4,0 % à 36,2 ng/ml et 5, % à 281,9 pM pour le glucose, les AGNE, le BHB, l'urée, l'IGF-1 et l'insuline. Les coefficients de variation inter-essai correspondants ont été respectivement 5,36 % à 5,24 mM, 5,06 % à 0,69 mM, 4,39 % à 1,61 mM, 8,22 % à 3,00 mM, 13,1 % à 37,4 ng/ml et 16,7 % à 276,1 pM.

25 Données collectées

La date de vêlage, les conditions de vêlage (aide difficile ou césarienne, aide facile, et sans aide), les maladies, l'état corporel et le poids vif des animaux au vêlage, 40 jours plus tard puis le jour de l'OPU ont été enregistrés. L'état corporel des vaches a été noté à l'aide de la grille de notation de l'état d'engraissement des vaches Pie noire (Bazin, 1984). Les vaches ont été pesées le matin avant la distribution de la ration. Une fois par semaine du vêlage jusqu'à l'OPU, la production laitière hebdomadaire a été relevée. Les quantités de matières grasses et de matières protéiques ont été récupérées via les données du Contrôle Laitier une fois par mois pendant les trois premiers mois de lactation.

26 Analyses statistiques

Le logiciel de traitement statistique SAS (SAS Institute, 2002-2003) a été utilisé pour les analyses statistiques. L'appariement entre les lots en début de protocole a été vérifié par un test de Student. Une analyse multivariée à données répétées incluant un effet aléatoire 'animal' a été utilisée pour tester l'effet du régime alimentaire, l'effet du temps, l'interaction du temps et du régime alimentaire sur les paramètres plasmatiques témoins du métabolisme énergétique (glucose, AGNE, BHB, urée, IGF-1 et insuline) et les données zootechniques mesurées plusieurs fois après vêlage (note d'état corporel, production laitière, composition du lait). Un effet année a été testé pour chaque modèle. Les résultats de la collecte de complexes et les quantités d'ARNm des gènes de l'IGF-1, IGFR-1, IGFBP-2 et IGFBP-4 et PTGS2 ont été comparés entre régime alimentaire et entre niveau de maturation grâce à une analyse de variance.
Dans les tableaux, les résultats sont présentés en moyennes ajustées ± erreur standard. Une valeur de $p \leq 0.05$ a été interprétée comme une différence significative, tandis que $p \leq 0.10$ a été considérée comme une tendance et $p > 0,10$ non significatif.

3 Résultats

31 Caractéristiques zootechniques des vaches

Indépendamment du régime alimentaire, deux vaches ont reçu une aide difficile au vêlage, 6 ont reçu une aide facile et 14 vaches ont vêlé sans aide. Deux mammites, 6 métrites, 3 kystes ont été enregistrés.

Au début de l'expérience, il n'y avait aucune différence entre les vache des deux groupes quant à leur production laitière de l'année précédente, le rang de lactation et leur l'index génétique lait mais les vaches restreintes avaient une note d'état corporel inférieure à celle des vaches témoins (Tableau IV-9). Contrairement à ce qui était attendu, on observe après vêlage aucune différence d'évolution du poids vif, de la note d'état corporel et de la production laitière entre les deux lots. Le taux protéique a été plus élevé dans le lot restreint que dans le lot témoin lors du premier contrôle et le rapport TB/TP a été plus élevé chez les vaches restreintes lors des 2 premiers contrôles.

Tableau IV-9 Moyennes (ajustées pour les données répétées) et erreur standard (SE) des critères zootechniques des vaches des deux lots expérimentaux

Moyenne ± SE		**Témoins n=11**	**Restreints n=11**	**valeur de p**
Production laitière de l'année précédente (kg en 305 j)		9988,8±400,6	9981,5±370,2	-
Rang de vêlage		3,7±0,4	3,7±0,5	-
Index génétique lait (kg de lait)		458,0±168,0	455,9±88,0	-
Poids vifs				
	au vêlage	711,5±17,2	691,6±16,3	-
	40 jours après vêlage	615,54±17,2	624,9±16,3	-
	80 jours après vêlage	625,42±17,2	631,7±16,3	-
Note d'état corporel				
	au vêlage	3,3±0,2	2,8±0,2	0,04
	40 jours après vêlage	1,9±0,2	1,9±0,2	-
	80 jours après vêlage	1,6±0,2	1,4±0,2	-
Production laitière (kg)				
	semaine 1	33,7±1,8	36,3±1,8	-
	semaine 2	39,7±1,8	38,9±1,8	-
	semaine 3	40,1±1,8	38,4±1,8	-
	semaine 4	40,2±1,8	42,5±1,8	-
	semaine 5	41,7±1,8	40,4±1,8	-
	semaine 6	41,1±1,8	42,5±1,8	-
	semaine 7	42,5±1,8	42,4±1,8	-
	semaine 8	41,8±1,8	40,1±1,8	-
	semaine 9	41,8±1,8	39,2±1,8	-
	semaine 10	40,7±1,8	37,8±1,8	-
	semaine 11	39,7±1,8	37,7±1,8	-
	semaine 12	41,2±1,8	36,6±1,8	0,09
Taux butyreux (g/kg)				
	1er mois de contrôle	41,0±2,1	47,9±2,1	0,02
	deuxième mois	38,1±2,1	41,7±2,1	-
	troisième mois	37,3±2,1	37,8±2,1	-
Taux protéique (g/kg)				
	1er mois de contrôle	31,0±0,8	30,0±0,8	-
	deuxième mois	29,7±0,8	28,5±0,8	-
	troisième mois	30,5±0,8	29,3±0,8	-
Taux butyreux/Taux protéique				
	1er mois de contrôle	1,3±0,1	1,6±0,1	0,004
	deuxième mois	1,3±0,1	1,5±0,1	0,05
	troisième mois	1,2±0,1	1,3±0,1	-

- non significatif (p>0.10)

32 Paramètres métaboliques témoins du métabolisme énergétique

Les concentrations plasmatiques des paramètres mesurés n'ont pas été différentes entre les deux lots (Figure IV-3) Les concentrations en insuline, IGF-1, glucose et urée ont augmenté au cours du temps ($p<0,001$) tandis que celles des AGNE et des BHB ont diminué ($p<0,001$). Un effet année a été observé sur les concentrations en urée, cet effet année a donc été pris en compte dans l'intégralité des modèles statistiques.

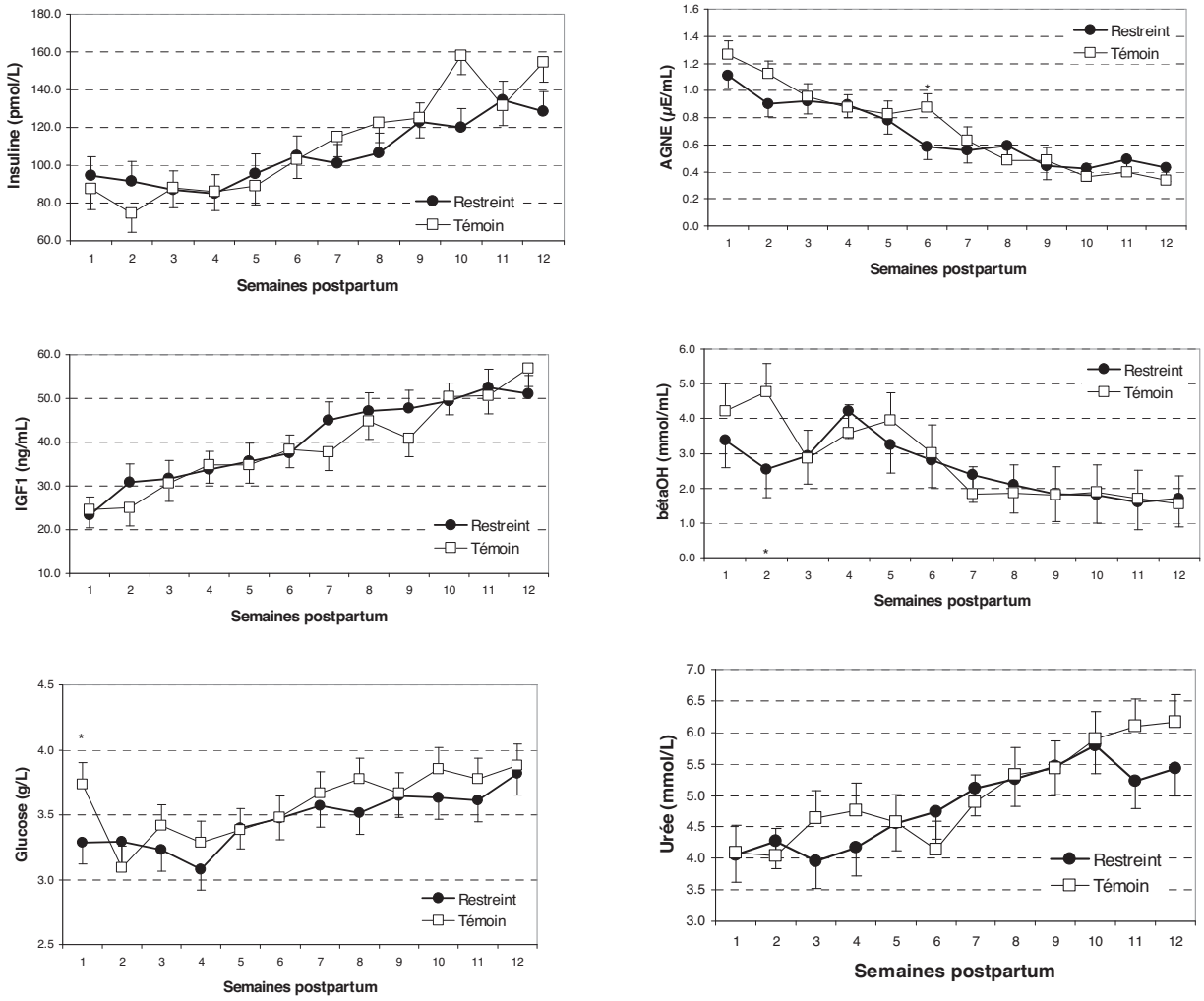


Figure IV-3 Evolution des paramètres plasmatiques (Insuline ; IGF-1 ; Glucose ; AGNE= Acide Gras Non-estérifié ; BHB= β-hydroxybutyrate ; et Urée) témoins du métabolisme énergétique chez les vaches témoins (n=11) et restreintes (n=11) au cours des 12 semaines postpartum entre les deux groupes ; moyenne ajustée et erreur standard ; * p≤ 0,05

34 Production et qualité des ovocytes

Le Tableau IV-10 présente le nombre de follicules ponctionnés et des caractéristiques des complexes ovocytes-cumulus récoltés. Le régime alimentaire n'a pas eu d'influence significative sur le nombre de follicules ponctionnés, le nombre de complexes récoltés ni sur leur qualité. Le nombre de follicules

ponctionnés par vache a eu tendance à être plus faible avant maturation qu'après maturation. Il n'y a pas eu d'effet significatif de l'année sur les paramètres mesurés.

Tableau IV-10 Caractéristiques des follicules et des complexes ovocytes-cumulus (COC ; moyenne et erreur standard) récoltés par OPU (80,9 ± 0,75 jours postpartum) avant et après maturation, après un traitement de superovulation appliqué sur des vaches laitière Holstein recevant 100% (Témoins, n=11) et 80% des besoins alimentaires (Restreints, n=11)

		Témoins n=11		Restreints n=11		p
		n	m±se	n	m±se	
Follicules	Avant maturation	90	18.0±1,1	40	8.0±0,6	R^{ns} ; $P^{\dagger}$; A^{ns}
	Après maturation	164	27.3±0,6	166	27.7±0,6	
COC	Avant maturation	27	5.4±0,6	18	3.6±0,7	R^{ns} ; P^{ns} ; A^{ns}
	Après maturation	31	5.2±0,2	28	4.7±0,8	
Qualité 1-2	Avant maturation	15	2.7±0,3	15	2.9±0,3	
	Après maturation	24	4.0±0,2	22	3.7±0,2	
Qualité 3-4	Avant maturation	12	2.2±0,2	3	0.6±0,5	
	Après maturation	7	1.2±0,3	6	1.0±0,3	

R=effet régime ; P : effet moment de ponction (avant ou après maturation) A= effet année; ns différence non significative † p≤0.10 ; se : erreur standard

35 Dosage des ARNm du système IGF dans les cellules des complexes ovocytes-cumulus

Les ARNm des gènes étudiés IGF-1, IGFR-1, IGFBP-2 et IGFBP-4 et PTGS2 ont été retrouvés dans les cellules des complexes.

Les expressions des gènes du système IGF (IGF-1, IGFR-1, IGFBP-2 et IGFBP-4) dans les complexes ovocytes-cumulus n'ont pas été modifiées par le régime alimentaire (Figure IV-4). L'IGF-1 s'est exprimé plus faiblement et l'IGF-BP4 plus fortement dans le lot restreint que dans le lot correctement alimenté mais la différence était non significative.

L'expression du gène PTGS2 n'a pas été modifiée par le moment de ponction (rapport PTGS2/Actine avant maturation 0.018±0.032 vs après maturation 0.041±0.026, p=0.61).

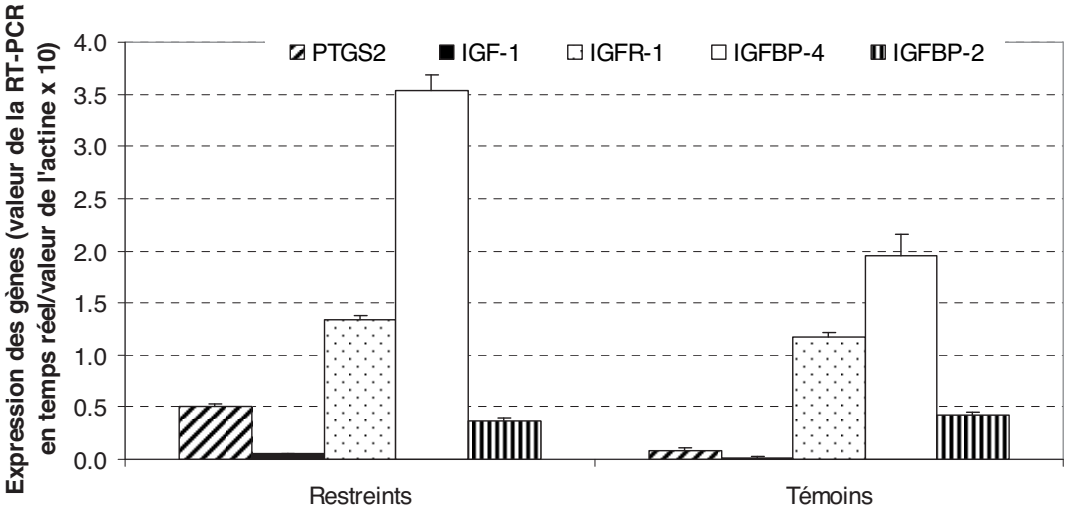


Figure IV-4 Expression des gènes PTGS2, IGF-1, IGFR-1, IGFBP-2, IGFBP-4 dans les complexes ovocytes-cumulus récoltés par OPU (80,9 ± 0,75 jours postpartum), après un traitement de superovulation appliqué sur des vaches Holstein témoins (100% des recommandations, n=11) et sur des vaches Holstein restreintes (80% des recommandations, n=11)

4 Discussion

L'objectif de notre étude était d'obtenir un déficit énergétique en début de lactation chez les vaches Holstein restreintes par rapport aux vaches Holstein témoins afin d'explorer son effet sur la qualité des ovocytes au moment de la mise à la reproduction (autour de 80 jours postpartum).
A notre connaissance, bien que l'hypothèse soit couramment rapportée dans la bibliographie, aucune autre étude ne s'est intéressée à l'influence du niveau alimentaire sur le système IGF des complexes ovocyte-cumulus au moment de la mise à la reproduction des vaches laitières de race Holstein.

41 Caractéristiques des lots

Les deux lots ont été correctement appariés sur la production laitière de l'année précédente, le niveau génétique et le rang de lactation. Les effets de ces facteurs sur la qualité des ovocytes (Snijders et al., 2000 ; Walters et al., 2002a, 2000b; Wathes et al., 2007a) ont ainsi été évités. Malheureusement, le protocole n'a pas permis de créer un déficit énergétique beaucoup plus prononcé chez les vaches restreintes que chez les vaches correctement alimentées (témoins). La production laitière, l'évolution du poids vif et de la note d'état corporel et des paramètres métaboliques après vêlages n'ont pas été différents entre les deux lots. Seule la composition du lait a reflété une lipolyse et un déficit énergétique légèrement plus accentués dans le groupe restreint que dans le groupe témoin. Les concentrations plasmatiques d'IGF-1, paramètre le plus discriminant habituellement (Spicer et al., 1990 ; Lucy et al., 1992 ; Zurek et al., 1995), n'ont pas été différentes entres les deux lots. Les vaches restreintes de notre étude se sont adaptées, très tôt après vêlage, à leurs conditions alimentaires. Le

dispositif expérimental (alimentation par lots) qui n'a pas permis de contrôler les quantités consommées par chaque animal est probablement à mettre en cause. Il est possible que les vaches restreintes aient consommé plus que les 20 à 21 kg de matières sèche qui leur ont été distribués. De plus, d'après Zorritsma et al. (2003), les vaches laitières hautes productrices de race Holstein ont une capacité d'adaptation physiologique qui leur permet de détourner l'énergie alimentaire quasiment exclusivement pour la production laitière.

42 Effet de la restriction alimentaire sur la quantité de follicules ponctionnés et sur la qualité des ovocytes

Les nombres de follicules et de complexes ovocytes-cumulus récoltés ainsi que leur qualité n'ont pas été affectés par la restriction alimentaire dans notre étude. Mais le dispositif expérimental n'a pas permis de créer un déficit énergétique plus important chez les vaches restreintes que chez les vaches témoins. Nous ne pouvons conclure sur l'effet du déficit énergétique sur la quantité et la qualité des gamètes disponibles au moment de la mise à la reproduction. Néanmoins, Hasler (2006) compare sur 20 ans des données de transfert d'embryon en ferme. Il observe que le nombre d'embryons transférables issus de superovulation n'a pas été dégradé en 20 ans alors que la fertilité des vaches a diminué sur le même intervalle de temps et que le déficit énergétique en début de lactation s'est probablement accentué. Cet argument n'est pas en faveur d'un rôle joué par la qualité des ovocytes dans la dégradation de la fertilité chez la vache laitière. De plus, Grimard et al. (publication en cours) n'identifient aucune relation entre la qualité visuelle et l'aptitude au développement mesurée *in vitro* d'ovocytes collectés par OPU entre 50 et 70 jours postpartum et la fertilité des vaches (vaches gestantes après la première ou la deuxième insémination après la période d'Ovum Pick Up). L'hypothèse de Britt (1992), citée par Leroy en 2008 n'a donc à notre connaissance jamais été vérifiée. Notre étude ne permet malheureusement pas d'apporter d'élément à la réflexion.

42 Expression des gènes du système IGF dans les complexes ovocytes-cumulus

L'expression du gène PTGS2 n'a pas clairement été modifiée par l'état de maturation des complexes comme attendu selon Nuttinck et al. (2002). L'expression est augmentée après maturation mais de façon non significative. Le nombre de complexes collectés à sans doute limité la puissance des tests statistiques.

Comme Nuttinck et al. (2004) et Fréret (2007), nous avons identifié une expression des ARNm du système IGF (IGF-1, IGFR-1, IGFBP-2, IGFBP-4), dans les complexes ovocytes-cumulus. La présence simultanée de l'IGF-1 et de son récepteur IGFR-1 conforte l'hypothèse d'une régulation autocrine de la croissance et de la maturation ovocytaire par l'IGF-1 au moins au stade du follicule antral (Giudice, 1992). Le gène de l'IGF-BP4 a été majoritairement exprimé dans les complexes par rapport aux autres gènes. L'expression de l'IGF-1 a été très faible par rapport à l'expression des autres gènes étudiés dans notre étude. Cette expression dans les cellules du follicule à antrum est très controversée. Pour Armstrong et al. (2000) et Wang et al. (2009), l'expression de l'IGF-1 n'a pas

été détectée ni au sein des cellules de granulosa ni au sein des complexes ovocytes-cumulus. En revanche, comme nous, Nuttinck et al. (2004) l'ont identifié dans les complexes et Yuan et al. (1998) dans les cellules de granulosa. Dans notre étude, le récepteur à l'IGF-1 s'est exprimé près de 100 fois plus que l'IGF-1. Ce surnombre de récepteurs serait disponible soit pour l'action endocrine de l'IGF-1 plasmatique sur le développement folliculaire et la maturation ovocytaire, soit pour l'action d'un autre ligand, l'IGF-2, toujours fortement retrouvé dans les cellules somatiques folliculaires (Armstrong et al., 2000 ; Wang et al., 2009). Les complexes ovocytes-cumulus après maturation sont destinés à être expulsés dans l'oviducte. Les récepteurs de l'IGF-1 pourraient être disponibles pour une régulation intra-oviducte des IGFs. Fenwick et al. (2008) ont identifié au sein de l'endothélium oviductal l'expression d'IGF-1 et au sein de la muqueuse et de la musculeuse l'expression de l'IGF-2.

L'expression du système IGF dans les complexes de notre étude n'a pas été modifiée par le régime alimentaire mais le dispositif expérimental n'a pas créé de déficit énergétique prononcé chez les vaches restreintes. Nous ne pouvons conclure sur l'effet potentiel du déficit énergétique sur l'expression du système IGF dans le complexe ovocyte-cumulus. Seuls, Llewellyn et al. (2007) ont montré que l'IGFBP-2 était moins exprimé chez les vaches laitières en déficit énergétique sévère au bout d'une semaine de lactation dans des follicules préantraux. Fenwick et al. (2008) ont rapporté qu'un déficit énergétique sévère deux semaines postpartum diminuait l'expression de deux IGF-BP (2 et 6) dans l'oviducte et consécutivement augmenterait la disponibilité en IGF, laissant supposer un effet favorable des sécrétions oviductales sur l'ovocyte fécondable en cas de déficit énergétique, ce qui est paradoxal avec la diminution du taux de fécondation chez les vaches en déficit énergétique sévère (Wathes et al., 2007b), à part si le déficit énergétique affecte davantage le développement embryonnaire tardif que précoce (Silke et al., 2002 ; Lopez-Gatius et al., 2002 ; Starbuck et al., 2004 ; Grimard et al., 2006).

5 Conclusion

Il existe une expression des gènes du système IGF (IGF-1, IGFR-1, IGFBP-2, IGFBP-4) dans les complexes ovocytes-cumulus des vaches laitières au moment de la mise à la reproduction. L'IGF-1 est peu exprimé mais son récepteur est exprimé en grande quantité ainsi que les ARNm de l'IGFBP-4. Ceci peut permettre une régulation de la croissance et de la maturation ovocytaire dans l'oviducte par le système IGF.

Notre protocole expérimental n'a pas permis de conclure quand a un effet du bilan énergétique sur la qualité des complexes ovocyte-cumulus et à l'expression des gènes du système IGF dans ces complexes. La question reste posée et devra être explorée avec des systèmes permettant une alimentation contrôlée complétée éventuellement d'une modification de la fréquence de traite afin de créer des différences de bilan énergétique importantes.

Remerciements

Les auteurs remercient les techniciens de Bressonvilliers qui ont réalisé les OPU, Valérie Gelin pour la notation visuelle de la qualité des ovocytes, Christine Ficheux pour les dosages des métabolites et hormones.

Références

Argov N, Arav A, Sklan D. 2004. Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. Theriogenology 61, 947-962

Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Woad KJ, 2002. Insulin-like growth factor (IGF) system in oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. Reproduction 123, 789-797

Barbat A, Druet T, Bonaiti B, Guillaume F, Colleau JJ, Boichard D. 2005. Bilan phénotypique de la fertilité à l'insémination artificielle dans les trois principales races laitières françaises. Proc: Rencontres, Recherches, Ruminants. 12, 137-140

Barbat A, Le Mézec P, Ducocq V, Mattalia S, Fritz S, Boichard D, Ponsart C, Humblot P. 2010. Female fertility in French dairy breeds: current situation and strategies for improvement. Journal of Reproduction and Development, 56, suppl S15-S21

Barnouin J, El Idilbi N, Chilliard Y, Chacornac JP, Lefaivre R. 1986. Micro-dosage automatisé du 3-hydroxybutyrate plasmatique sans déprotéinisation chez les bovins. Annales de Recherche Vétérinaire 17, 129-139

Bazin S 1984. In Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches Pie noires. ITEB Paris : Technipel, Fr

Beam SW, Butler WR, 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. Biology and Reproduction 56, 133-142

Butler WR, Smith RD, 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. Journal of dairy Science 72, 767-783

Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, JK Kay, Lindsay DR, Lucy MC, Martin GB, Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW, Webb R 2007. News perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. Journal of Dairy Science 90, 4022-4032

Fenwick MA, Llewellyn S, Fitspatrick R, Kenny DA, Murphy JJ, Patton J, Wathes DC, 2008. Negative energy balance in daity cows is associated with specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct. Reproduction 135, 63-75

Fréret S, 2007. Variation des apports alimentaires, statut métabolique et production d'embryons chez la vache laitière superovulée. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement p 195

Giudice LC, 1992. Insulin-Like Growth Factors and ovarian follicular development. Endocrine Reviews 13, 641-669

Grimard B, Fréret S, Chevallier A, Pinto A, Poinsart C, Humblot P. 2006. Genetic and environment factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. Animal Reproduction Science 91, 31-44

Grimard B, Marquant-Leguienne B, Remy D, Richard C, Nuttinck F, Humblot P, Ponter AA. The IGF system and oocyte production in postpartum dairy cows: effect of parity, relationships with subsequent fertility. Theriogenology, publication en cours

Hasler JF. 2006. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. Theriogenology 65, 4-16

Kendrick KW, Bailey TL, Garst AS, Pryor AW, Ahmadzadeh A, Akers RM, Eyestone WE, Pearson RE, Gwazdauskas FC, 1999. Effects on energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. Journal of Dairy Science 82, 1731-1740

Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IGF, Bols PEJ, 2008a. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. Reproduction Domestic Animal 43, 612-622

Llewellyn S, Fitspatrick R, Kenny DA, Murphy JJ, Scaramuzzi RJ, Wathes DC, 2007. Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitement ovarian follicles of postpartum dairy cows. Reproduction 133, 627-639

Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Rutllant J, Lopez-Bejar M, 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. Theriogenology 57, 1251-1261

Lucy MC, Beck J, Staples CR, Head HH, de La Sota RL, Thatcher WW 1992. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor I (IGF-I) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. Reproduction Nutrition Development 32, 331-341

Lucy MC. 2001. Reproductive loss in high producing dairy cattle: where it will end? Journal of Dairy Science 84, 1277-1293

Marquant-Le Guienne B, Humblot P. 1998. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. Theriogenology 49, 3-11

Mazerbourg S, Bondy CA, Zhou J, Monget P, 2003. The insulin-Growth Factor System: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? A comparative species study. Reproduction in Domestic Animals 38, 247-258

Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology 59, 651-674

Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C, Moniaux D. 1996. Insulin-growth factor binding proteins and ovarian folliculogenesis. Hormone Research 45, 211-217

Monniaux D, Caraty A, Clement F, Dalbiès-Tran R, Dupont J, Fabre S, Gérard N, Mermillod P, Monget P, Uzbekova S. 2009. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. INRA Production Animale 22, 59-76

Nuttinck F, Reinaud P, Tricoire H, Vigneron C, Peynot N, Mialot JP et al. 2002. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. Molecular Reproduction and Development 61, 93-101

Nuttinck F, Charpigny G, Mermillod P, Loosfelt H, Meduri G, Freret S, Grimard B, Heyman Y, 2004. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. Domestic Animal Endocrinology 27, 179-195

Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Woolliams JA, Lamming GE. 2000. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. Animal Science 70, 487-501

Rutledge RG, et Côté C, 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. Nucleic Acids Research, 31, e93 DOI:10.1093/nar/gng093

Silke V, Diskin MG, Kenny DA, Boland MP, Dillon P, Mee JF, Sreenan JM, 2002. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. Animal Reproduction Science 71, 1-12

Snijders SEM, Dillon P, O'Callaghan DO, Boland MP. 2000. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. Theriogenology 53, 981-989

Spicer LJ, Crowe MA, Prendiville DJ, Goulding D, Enright WJ, 1992. Systemic but not intraovarian concentrations of insuline-like growth factor-I are affected by short-term fasting. Biology of Reproduction 46, 920-925

Starbuck MJ, Dailey RA, Inskeep EK, 2004. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. Animal Reproduction Science 84, 27-39

Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE, Dawson LJ, Morgan GL et al. 1996. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-1 receptors, and steroids in dominant follicles during the first wave in cattle exhibiting regular estrus cycles. Endocrinology 137, 2842-2850

van Knegsel ATM, van den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B, 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. Reproduction, Nutrition, Developpement 45, 665-688

Velazquez MA, Spicer LJ, Wathes DC. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in female bovine reproduction. Domestic Animal Endocrinology, 35, 325-342

Walters AH, Pryor AW, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC, 2002a. Milk yield, energy balance, hormone, follicular and oocyte measures in early and mid-lactation Hosltein cows. Theriogenology 57, 949-961

Walters AH, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC. 2002b. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. Journal of Dairy Science 85, 824-832

Wang LM, Feng HL, Ma Yzh, Cang M, Li HJ, Yan ZH, Zhou P, WenJX, Bou S, Liu DJ, 2009. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. Animal Reproduction Science 114, 99-108

Wathes DC, Cheng Z, Bourne N, Taylor VJ, Coffey MP, Brotherstone S, 2007a. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. Domestic Animal endocrinology 33, 203-225

Wathes DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R, 2007b. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cows. Theriogenology 68S, S232-S241

Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC, 1998. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression fo insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. Domestic Animal Endocrinology 15, 55-63

Zorritsma R, Wensing T, Kruip TAM, Vos PLAM, Noordhuizen JPTM. 2003. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. Veterinary Research, 34, 11-26

Zulu VC, Sawamukai Y, Nakada K, Kida K, Moriyoshi M, 2002. Relationship among insulin-Like Growth Factor-1, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. Journal of Veterinary Medical Science 64, 879-885

Zurek E, Foxcroft GR, Kennelly JJ 1995. Metabolic status and interval to first ovulation in postpartum dairy cows. Journal of Dairy Science 78, 1909-1920

Discussion générale et perspectives

Chapitre V. Discussion générale et perspectives

Nous avons exploré les effets de trois facteurs qui prédisposent à la baisse de la fertilité des vaches Holstein. Dans nos protocoles, la fertilité a été mesurée grâce à l'utilisation d'un suivi endocrinien (progestérone) associé à deux diagnostics de gestation par échographie transrectale afin de séparer l'incidence de la non fécondation-mortalité embryonnaire précoce de celles de la mortalité embryonnaire tardive et de la mortalité fœtale. Cela nous a fourni des informations supplémentaires par rapport à un calcul plus tardif du taux de réussite en première insémination, seul disponible à grande échelle, estimé par le taux de non retour à l'insémination 282 jours après IA. Ces informations nous ont permis d'observer les incidences des échecs précoces de gestation.

Parmi les facteurs susceptibles d'influencer les échecs de gestation précoces (fécondation et développement embryonnaire), nous avons pu mettre en évidence et décrire l'effet du potentiel génétique, puis celui des anomalies de reprise de cyclicité postpartum et enfin l'effet du déficit énergétique postpartum.

Nous discuterons des méthodes utilisées pour préciser la chronologie des échecs de gestations et de l'importance des échecs précoces. Puis nous reprendrons les trois facteurs de risques étudiés, leurs implications dans les échecs précoces et les perspectives de maîtrise de ces facteurs qui s'ouvrent suite à notre travail.

I. Echecs précoces de gestation chez la vache de race Holstein

I.1. Méthodes utilisées pour préciser la chronologie des échecs de gestation

I.1.1 Estimation de la fréquence des inséminations en phase lutéale

Dans nos deux premières études, la mesure de la progestérone le jour ou le lendemain de l'IA (J0) dans le lait (étude 1) ou dans le sang (étude 2) nous a permis d'identifier les vaches inséminées en phase lutéale et de les exclure des calculs d'incidence des échecs de gestation. Une phase lutéale correspond à la période où la concentration en progestérone est supérieure à une valeur seuil, préalablement définie. Le début et la fin d'une phase lutéale définis à partir des données de progestérone dépendent de la fréquence des prélèvements réalisés et de la valeur seuil choisie pour définir un prélèvement positif (cf Figure II-28).

Nous avons considéré qu'une vache était en phase lutéale pour une valeur de progestérone dans le lait entier ≥ 3,5 ng/mL. Ce seuil est situé entre la valeur de 3,0 ng/mL utilisée par de nombreux auteurs (Pushpakumara et al., 2003 ; Taylor et al., 2003 ; Mann et al., 2005 ; Samarutel et al., 2008 ; Windig et al., 2008 ; Garmo et al., 2009) et celle de 4 ng/mL (Friggens et al., 2008) ou 5 ng/mL utilisée par d'autres (Kerbrat et Disenhaus, 2000 ; Ranasinghe et al., 2011). Dans le sang (étude 2), le seuil a été fixé à 1,5 ng/mL, en accord avec Thimonier (2000) qui rapporte qu'un prélèvement sanguin supérieur à un niveau seuil de 1 à 2 ng/mL selon les espèces est indicatif d'une activité lutéale.
Nous avons considéré que les vaches en dessous du seuil de détection à J0 et inséminées étaient réellement en chaleurs. Pourtant le niveau de progestérone inférieur à ces seuils ne présageait pas que la vache était bien en chaleurs au moment de l'insémination. En effet, la durée des chaleurs s'étend de moins de 9 à plus de 23 heures pour Kerbrat et Disenhaus (2004), alors que la progestérone reste sous un seuil indétectable entre 2 et 7 jours (Figure II-28 ; Chapitre II.III.2.2.1). Nous avons pu sous-estimer la fréquence des inséminations réalisées au mauvais moment.

Les fréquences de 5,0 et 5,5% de vaches inséminées en phase lutéale observées dans nos études (respectivement étude 1 et 2) sont cohérentes avec les observations précédentes en ferme au Royaume-Uni et en France (5,7 %, n=714, Royal et al., 2000 ; 4,5 %, n=3 840, Fréret et al., 2006 ; 5%, n=1285, Grimard et al., 2006 ; 6,8 %, n=537, Ponsart et al., 2006) et modélisé par Seegers et al. (2010a, 7,4 %). Cette fréquence est cependant très variable entre les élevages et les modalités de détection des chaleurs (Ponsart et al., 2006).

I.1.2 Estimation de la non fécondation – mortalité embryonnaire précoce

Nous avons choisi, pour définir la non fécondation-mortalité embryonnaire précoce (NF-MEP), l'arrêt de la gestation survenant entre l'IA et la reconnaissance maternelle de la présence du conceptus, soit jusqu'au 16ème jour après la fécondation (Humblot, 2001).

Les dosages de la progestérone le jour de l'insémination puis trois semaines plus tard, nous ont permis de détecter les vaches non gestantes 18-25 jours après insémination. Chez ces vaches, la gestation est supposée s'être interrompue avant l'action anti-lutéolytique de l'interferon-τ sécrété par les cellules mononuclées du trophoblaste autour du 16ème jour (Humblot et Dalla-Porta, 1984 ; Farin et al., 1990 ; Morgan et al., 1993). Ces mesures ne permettent pas de vérifier la présence de l'embryon au sein de l'organisme maternel. Nous n'avons alors pas pu différencier la non fécondation de la mortalité embryonnaire précoce. A notre connaissance, aucun test de diagnostic de gestation fiable, économique, très précoce et réalisable sur le terrain (peu invasif et facile à mettre en place) n'est disponible en élevage avant le premier mois de gestation. Pourtant, la distinction entre NF et MEP est sans doute indispensable à une meilleure compréhension des effets des facteurs de risque sur les résultats.

Pour objectiver la non fécondation, la méthode expérimentale consiste à laver l'oviducte de la corne utérine ipsilatérale au corps jaune sur l'animal vivant (Besenfelder et al., 2010) ou après abattage (immédiatement après abattage jusqu'à quelques heures après) de la femelle. Deux jours post-insémination, il est possible de récupérer dans le liquide de lavage un ovocyte non fécondé ou un embryon. Sept jours après IA, il est possible de collecter l'ovocyte non fécondé ou l'embryon dans la corne utérine comme le font les équipes de transfert embryonnaire sur vaches superovulées (Ponsart, 2010). En l'absence de superovulation, le taux de récupération de l'embryon ou ovocyte fécondé ou non fécondé est faible et dépendra de la technique utilisée. Sartori et al. (2002) ont récolté des structures « embryon/ovocyte » par lavage total de la corne utérine chez 60,3% de vaches non superovulées contre 30,9 % en ne lavant que la partie haute de l'utérus. Cette méthode pourrait être utilisée en station sachant que l'on ne pourra statuer avec certitude sur la fécondation que sur 60% des animaux chez lesquels une structure aura été récoltée.

Le poids des échecs de fécondation dans les échecs précoces de gestation en élevage n'est qu'hypothétique. Aux Etats-Unis, à partir de quatre études, Santos et al. (2004) ont estimé à 76,2 % le taux de fécondation des vaches laitières de race Holstein. Sartori et al. (2010) ont rapporté 83 % de taux de fécondation dans la même race. Selon ces études, l'absence de fécondation pourrait contribuer à hauteur de 15 à 25 % de la NF-MEP chez les vaches Holstein Américaines.

Après J7 et jusqu'à J18, le lavage de la corne ipsilatérale au corps jaune reste possible. L'observation du liquide de rinçage de la corne permet de statuer sur la présence ou non d'un embryon. La récupération du disque embryonnaire étant indispensable pour dater le stade de développement de l'embryon (Maddox-Hyttel et al., 2003 ; Guillomot et al., 2004). Ce type de technique est utilisable en station et sur de petits nombres d'animaux pour chiffrer les échecs précoces, distinguer, comme le propose Walsh et al. (2011), les échecs très précoces (avant J7) de ceux qui sont plus tardifs (7-21 jours). Elle entraine cependant l'interruption de la gestation en cours, ce qui ne permet pas de savoir quel aurait été le devenir de l'embryon.

Le dosage d'un facteur précoce et spécifique de la présence de l'embryon serait préférable. L'EPF est le facteur le plus précoce mis en évidence 24 h après la fécondation dans le sang maternel de souris (Athanasas-Platsis et al., 1991) puis détecté la première semaine post-insémination dans le sérum des vaches gestantes (Enomoto et al., 1993 ; Sakonju et al., 1993). La fiabilité d'un test colorimétrique de mise en évidence de l'EPF a été évaluée par Cordoba et al. (2001) chez la vache. Ce test obtient 29 % de valeur prédictive positive, 40% de valeur prédictive négative pour un taux de gestation de 30 % (calculs basés sur une sensibilité de 86 % et une spécificité très basse de 4 %). Gandy et al. (2001) ont évalué la détection de la non gestation après IA chez les génisses Holstein. Seules 44 % des génisses non gestantes ont été identifiées entre les 1er et 3ème jours, et 56 % entre les 7ème et 9ème jours de gestation. La faible fiabilité de ces tests diagnostics en limite l'intérêt. Ghaffari Laleh et al. (2008) proposent un test immunologique de mise en évidence de l'EPF pour distinguer les vaches gestantes des non gestantes dans la première semaine après l'insémination mais leurs observations se sont limitées à comparer 23 vaches inséminées à 18 vaches témoins ce qui est insuffisant pour statuer sur l'intérêt de leur méthode.

L'interferon τ est synthétisé par les cellules mononuclées du trophectoderme (Morgan et al., 1993). Une augmentation de la concentration en ARNm d'IFN-τ bovin a pu être détectée dès le 9ème à 10ème jours de gestation (Kubish et al., 2001). Sa production à grande échelle est limitée aux jours 17 à 19 (Farin et al., 1990), quand le blastocyste est en phase d'élongation rapide. Il est sécrété dans le milieu utérin. A notre connaissance, cette protéine n'a jamais été détectée dans la circulation sanguine maternelle ce qui en limite l'intérêt pour un test de diagnostic utilisable en élevage à grande échelle.

I.1.3 Estimation de la mortalité embryonnaire tardive

Nous avons défini la mortalité embryonnaire tardive (MET) comme l'arrêt de gestation après le 16ème jour après la fécondation (Humblot, 2001).

Nous avons estimé la MET par l'analyse de progestérone le jour de l'IA, 18-25 jours plus tard puis par un diagnostic de gestation par échographie transrectale à 35 (étude 2) ou 45 jours (étude 1). Nous avons fait l'hypothèse que les vaches présentant la séquence de résultats : progestérone basse le jour de l'IA, haute 18-25 jours plus tard étaient gestantes. Si l'embryon n'était pas visualisé lors de l'examen échographique du 35 ou 45ème jour nous avons considéré qu'il y avait eu mortalité embryonnaire tardive. Mais les vaches présentant une concentration élevée en progestérone trois semaines après l'insémination peuvent être des femelles à cycle œstral allongé ou ayant présenté une phase lutéale prolongée après IA sans fécondation. Ce dernier cas est assez peu probable. En effet, de nombreux auteurs ont montré que les PLP étaient plus souvent présentes lors du premier cycle œstral postpartum que lors des cycles suivants (Lamming et Darwash, 1998 ; Royal et al., 2000 ; Taylor et al., 2003 ; Ranasinghe et al., 2011). De plus, comme nous l'avons montré un des facteurs de risque important de PLP est la reprise précoce de cyclicité postpartum. Cela implique qu'une phase lutéale prolongée arrive plutôt peu de temps après vêlage. Dans son étude Ranasinghe et al. (2011) n'ont identifié aucune vache à PLP après un premier cycle allongé. Une phase lutéale

prolongée, éloignée du dernier vêlage et suivant une insémination devrait alors le plus souvent correspondre à la sécrétion d'un corps jaune gestatif plutôt qu'à celle d'un corps jaune persistant cyclique.

Il pourrait être intéressant de pouvoir faire la distinction entre les profils de progestérone cyclique ou gestatif afin de déterminer précocement si la vache est gestante. La modélisation des profils de progestérone autour de l'IA (durée de la phase folliculaire et temps pour atteindre le pic de progestérone après ovulation) proposé par Gorzecka et al. (2011) a permis d'identifier 75 % des vaches réellement gestantes et 60 % réellement non gestantes. En utilisant cette méthode, la MET sera toujours surestimée puisque que 40 % des vaches non gestantes seront mal classées. De toute évidence, il ne semble pas y avoir de moyen adapté en élevage pour confirmer la MET. La distinction entre PLP et MET reviendrait de nouveau à utiliser un test de mise en évidence précoce de l'embryon. Comme nous l'avons vu ci-dessus, ces tests ne sont pas encore disponibles en élevage.

Quoi qu'il en soit, les outils diagnostics utilisés dans nos études ne nous permettent pas de faire la différence entre une vaches gestante ayant perdu son embryon entre J16 et J35-45 et une vache non gestante mais à taux de progestérone faible à l'IA et élevé 18-25 jours plus tard. Nous avons donc probablement surestimé la mortalité embryonnaire tardive et sous-estimé la non fécondation dans nos études.

Les perspectives de dosage plus fréquents de la progestérone, comme c'est déjà le cas dans les élevages du Nord de l'Europe munis d'un robot de traite (suivi de la concentration en progestérone automatique dans le lait), pourraient permettre d'améliorer les qualités de l'estimation du taux de gestation précoce des vaches en lactation (Friggens et Chagunda, 2005 ; Friggens et al., 2008 ; Herd Navigator^{TM}, DeLaval International AB, PO Box 39, SE-147 221 Tumba, Sweden). Ces dosages ne sont pas utilisables en France à grande échelle aujourd'hui mais leur intérêt mériterait d'être étudié.

I.1.4 Estimation de la mortalité fœtale

Dans l'étude 1 nous avons pu estimer la mortalité fœtale entre 45 et 90 jours. A cette période, l'échographie transrectale de l'utérus permet de visualiser de manière précise (sensibilité : 97,7 % et spécificité : 87,7 % entre 23 et 33 jours post IA ; Pieterse et al., 1990) la présence et la vitalité du fœtus (visualisation de ses mouvements ou des battements cardiaques ; Fricke, 2002 ; Des Côteaux et al., 2009). L'analyse de la PSPB (ou des PAG) dans le sang maternelle est une alternative possible à l'échographie (Szenci et al., 1998). Elle ne nécessite aucune compétence particulière à part la réalisation d'une prise de sang. La PSPB est bien spécifique de la gestation puisqu'elle est d'origine trophoblastique (Zoli et al., 1992a). Mais l'existence de quantités de protéine très élevées plus la gestation avance (500-800 ng/mL au moment du vêlage) et la longue demi-vie (7 jours ; Ruder et Sasser, 1986) provoquent le maintien de concentrations sériques détectables (pendant 100 jours à la suite d'un vêlage, Humblot et al., 1988b ; plusieurs jours après la disparition de l'embryon en début de

gestation). Lorsque la prise de sang est réalisée l'embryon ou le foetus peuvent avoir déjà disparu alors que la concentration de PSPB est encore détectable (Figure II-12 ; Chapitre II.II.2.2).
La fenêtre d'étude choisie dans l'étude 1 (45-90 jours) nous a amené à sous-estimer la mortalité fœtale dans notre échantillon mais les pertes après 90 jours sont faibles chez la vache et notre propos était de nous intéresser plus particulièrement aux échecs précoces de gestation.

I.1.5 Difficultés rencontrées pour estimer la chronologie des échecs de gestation

La détermination précise de la chronologie des échecs de gestation a nécessité la réalisation rigoureuse de quatre examens successifs : deux prises de lait ou de sang pour analyse de progestérone suivi de deux diagnostics de gestation par échographie transrectale à des temps bien déterminés, J0, J18-25, J35-45 puis J80-100 post IA.

Ce protocole réalisé dans l'environnement bien maîtrisé de la station expérimentale de l'INRA (étude n°2) n'a engendré que 4,5 % de statut de fertilité indéterminé sur les vaches mises à la reproduction (10/222).

En revanche, les conditions de l'étude n°1 était bi en différente. Ce protocole a été mis en place entre 2006 et 2010 sur 4 239 vaches appartenant à plus de 1 000 élevages adhérents à 17 coopératives d'IA réparties sur le territoire national. Au même moment, la remise en cause du monopole de zone des coopératives d'insémination (nouveau cadre réglementaire sur l'élevage, applicable au 1er janvier 2007, article 93 de la Loi n°2006-11 du 5 janvier 2 006 d'orientation agricole) a entrainer une restructuration et un regroupement des unités de mise en place et de sélection, compliquant la collaboration entre l'UNCEIA et les Coopératives d'Insémination partenaires du projet. Ces fortes contraintes ont demandé un appui logistique lourd (stagiaires sur le terrain, suivi des dates de prélèvements et mise en place d'un protocole d'alerte avant les prélèvements et examens des techniciens intervenants en élevage), afin de diminuer le risque de données manquantes. A partir des résultats des prélèvements à J0 enregistrés dans la base de données du laboratoire d'hormonologie de l'UNCEIA, un service de rappel hebdomadaire a informé les correspondants sur le terrain des dates et n° d'animaux à prélever à 18-25 jours et à échographier durant les 4 années d'enquête. Ainsi grâce à la coopération entre les éleveurs, les inséminateurs, les stagiaires recrutés en soutien dans les grosses coopératives, les techniciens du laboratoire d'hormonologie, et la volonté des porteurs du projet nous avons pu déterminer 3508 phénotypes précis de fertilité (17 % de phénotypes indéterminés). A cause d'un ou de deux prélèvements manquants et/ou d'un intervalle IA1-IA2 > 42 jours, la NF-MEP n'a pas été pas différentiable de la MET pour 5 % des vaches, et la MET de la MF pour 2 % des vaches. Enfin, 10 % des vaches avaient un statut totalement indéterminé même après récupération des dates de vêlages dans le SIG. Il s'agissait pour plus de 80% d'entre elles de vaches perdues de vue (réformée, morte ou vendue) pour lesquelles nous n'avions pas assez de données pour conclure.

L'association des deux dosages de progestérone (J0, J18-25) complétés par des diagnostics de gestation par dosage de protéines associées à la gestation ou par échographie à J45 puis à J90 permet une bonne approximation des incidences de mortalités embryonnaires et fœtales en élevage. Cette méthode apparaît comme une alternative plus fiable que la seule détection des retours. Elle est cependant plus contraignante et plus coûteuse.

Cependant, elle n'est aussi pas parfaite puisqu'elle ne permet pas de différencier la NF de la MEP. A moins d'avoir un test (non encore disponible) permettant l'identification de l'embryon très précocement, l'estimation de la non fécondation n'est réellement réalisable qu'en station expérimentale sur de faibles nombres d'animaux. Une estimation de ce taux permettrait cependant de préciser les effets de certains facteurs (effet génétique, effet du déficit énergétique…) permettant de progresser dans la compréhension des mécanismes expliquant la faible fertilité.

La mesure fréquente des taux de progestérone dans le lait, disponible à plus ou moins court terme en élevage, permettra sans doute aussi de progresser sur l'estimation de la mortalité embryonnaire tardive.

Néanmoins, la précision des mesures réalisées dans nos études (respect des écarts entre IA et réalisation des dosages et diagnostics) a permis d'estimer la NF-MEP et la MET sur un grand nombre d'animaux.

I.2. Importance des échecs précoces de gestation

I.2.1 Comparaison de la chronologie des échecs de gestation de l'étude 1 avec les données bibliographiques

En accord avec la littérature (Chapitre II.II.3) le suivi hormonal et échographique des échecs de gestation a montré que la NF-MEP était plus élevée que la MET, elle-même plus importante que la MF.

Les méthodes de mesure de la chronologie des échecs peuvent expliquer une partie des différences observées entre les études. De même, les dates auxquelles sont réalisées les mesures doivent être prises en considération pour comparer les résultats. Dans le Tableau V-1, les résultats des études 1 (enquête en élevage) et 2 (élevage à faible fertilité) sont comparés à une compilation de 8 références reprises de l'étude bibliographique (Tableau II-4) une estimation des échecs à partir des taux de retours sur de grands nombre d'animaux (adapté de Barbat et al., 2005) et à 4 références françaises menées à grande échelle.

Tableau V-1 Comparaison des incidences des échecs de gestation chez la vache Holstein entre les résultats de l'étude 1 et 2 et les données bibliographiques

%	NF-MEP (IA-PL exclues)	MET [période considérée]	MF [période considérée]	Taux de gestation
Etude 1 n=3508	**35,1**	**19,0 [18-25;45j]**	**2,7 [45;90]**	**48,5 (à J90)**
Etude 2 n=217	**52,2**	**25,5 [21;35j]**	**15,1 [35;60]**	**28,6 (à J60)**
Compilation*	37,0	23,8 [16;45j]	12,5 [45;90]	42,0 (à J90)
Taux de retours**	28,0	17,0 [28;56j]	10,0 [56;90]	45,0 (TNR90)
Fréret et al., 2005, n=275	36,4	25,3 [21;35j]	-	47,8 (à J35)
Grimard et al., 2006, n=1285	35,5	25,2 [21;80-100j]		45,8 (à J80-100)
Fréret et al., 2006, n=3840	36,8	31,1 [21;45-75j]		45,9 (à J45-75)
Michel et al., 2003, n=965	37,8	29,3 [21;70j]		41,9 (à J70)

* d'après Santos et al., 2004 ; Humblot, 1991, 2000, 2001 ; Michel et al., 2003 ; Fréret et al., 2005 ; Grimard et al., 2006 ; Barbat et al., 2005;** modifié de Barbat et al., 2005 ; TNR90 : Taux de non retour à 90 jours ; - : non renseigné

Le taux de gestation observé dans notre étude 1 est plus élevé que ceux observé par les autres auteurs, bien qu'il soit estimé plus tard que dans d'autres enquêtes. Nous l'avons discuté dans la partie résultats : cela est dû au fait que nous avons travaillé sur des vaches en 1ère et 2ème lactation, plus fertiles que les vaches plus âgées.

L'incidence de NF-MEP de notre étude 1 est similaire à celles observées avec les mêmes méthodes dans les enquêtes à grande échelle, mais plus élevées que l'estimation par les taux de retours. Comme nous l'avons dit plus haut, l'estimation de l'incidence de NF-MEP à partir des taux de retour sous-estime ce paramètre à cause de la faible sensibilité de la détection des chaleurs.

Les incidences de MET estimées dans les enquêtes sont plus élevées que dans notre étude 1 mais Michel et al. (2003) ; Fréret et al. (2006) et Grimard et al. (2006) ont englobé la mortalité fœtale jusqu'à 70 à 100 jours dans la MET. L'incidence de MET estimée par l'incidence des retours entre 28 et 56 jours est assez proche de nos observations alors que l'on pourrait penser que là encore, l'estimation par un critère mettant en jeu l'observation des chaleurs devrait entraîner une sous-estimation de l'incidence.
Comme nous l'avons souligné dans la partie « Hypothèses » (Chapitre I) l'estimation de la MET par les taux de retours semble montrer qu'elle a plus augmenté ces dernières décennies en race Holstein qu'en race Normande ou Montbéliarde ce qui pourrait expliquer les écarts de fertilité entre ces races et la dégradation des performances en race Holstein (Figure III-1**,** Barbat et al. 2005). L'identification de ses facteurs de risque reste donc importante si l'on veut stopper sa dégradation. La MET engendre de l'augmentation des coûts non négligeables par rapport à la NF-MEP. Le nombre de jours perdus avant la remise à la reproduction est plus important en cas de MET que de NF-MEP et les réformes pour infertilité augmentent dans le cas des troupeaux conduits en vêlages groupés. La saison de reproduction passée les vaches non gestantes et peu productrices sont les premières cibles en vu d'une réforme (Diskin et Morris, 2008).

La très faible incidence de MF mesurée dans notre étude est plus basse que celles de vaches laitières plus fertiles, conduites aux pâturage et à production laitière moyenne (près de 4% entre 43 et 84 jours ; Silke et al., 2002 et 7,5 % entre 30 et 67 jours, Horan et al., 2005) ou celle de primipares allaitantes (4,2 % entre 30 et 90 jours ; Santos et al., 2004, pour revue). Cette faible incidence est difficile à expliquer. Dans l'étude n°1 nous n'avon s trouvé aucun facteur environnemental ou propre à l'animal à risque de MF. La MF serait principalement la conséquence de maladies infectieuses de troupeau (campylobacteriose, néosporose, BVD/MD (Bovine Diarrhea virus/Maladie des muqueuses) … ; Givens et Marley, 2008 ; Maillard et Chastant-Maillard, 2002) et/ou d'anomalie génétique type CVM (Agerholm et al., 2001). Or, le faible nombre de vaches par troupeau (3,6±2,1) et la recommandation faite aux éleveurs de ne pas inséminer les filles des taureaux porteurs de CVM avec un taureau porteur ont peut être limité le risque de mortalités fœtales dans notre échantillon.

Ainsi, nous validons l'importance de la NF-MEP, même sur des vaches en 1ère et 2ème lactation plus fertiles que les vaches plus âgées. La MET, mesurée plus précisément dans notre enquête que dans les autres études à grande échelle, a une incidence élevée mais moindre que la NF-MEP. Elle semble néanmoins pouvoir être impliquée dans la dégradation de la fertilité des vaches Holstein observée ces dernières années. Enfin, l'incidence de la MF semble être proche de 5-10% en race Holstein.

En termes d'incidence, la NF-MEP explique donc à elle seule l'arrêt de la gestation sur un tiers environ des femelles mises à la reproduction inséminées au bon moment et plus de 60% des échecs de gestation entre l'insémination et 90 jours de gestation.

I.2.2 Importance des échecs précoces dans les élevages à faible fertilité

L'élevage de l'étude n°2 a présenté une faible fertilité (28,6 % de taux de gestation à 60 jours) par rapport aux élevages de l'étude n°1 (48,5 % à 90 jours ; Tableau V-1).

Les incidences de NF-MEP et de MET de l'étude n°2 ont été supérieures de plus de 17 points et de plus de 6 points respectivement par rapport à l'étude 1. En revanche, les taux d'insémination en phase lutéale sont similaires entre les deux études (5,0 % étude n°1 et 5,5 % étude n°2), excluant des problèmes de spécificité de la détection des chaleurs pour expliquer les nombreux échecs dans l'étude n°2. Nous n'avons observé qu'un seul élevage à faible fertilité et il n'est pas possible de généraliser les observations faites dans cette station INRA (forte utilisation de traitements hormonaux, nombreuses anomalies de reprise de cyclicité, 43,5 %) mais d'autres auteurs confirment l'importance des échecs précoces pour expliquer la mauvaise fertilité des vaches Holstein (Walsh et al., 2011).

Parmi les échecs précoces de gestation, nous avons montré que la NF-MEP est la première cause de la mauvaise fertilité des vaches Holstein. L'incidence de MET des vaches Holstein est quantitativement deux fois moins importante que l'incidence de NF-MEP. Cependant, elle ne doit pas être négligée. En effet, le taux de retours à 56 jours des vaches Holstein est plus élevé que celui des vaches plus fertiles (Normandes ou Montbéliardes) alors que les taux de retours à 28 jours sont similaires pour les trois races. De plus, ce taux de retours tardifs aurait augmenté entre 1995 et 2003. L'augmentation de la MET pourrait donc être à l'origine de la dégradation de la fertilité des vaches Holstein. Son impact économique justifie de plus une étude de ses facteurs de risque.

II. Facteurs de risques des échecs précoces de gestation : implication et perspectives d'évolution

II.1. Implication de la détection des chaleurs pour expliquer les échecs

Nous n'avions pas comme objectif d'explorer l'impact de la mauvaise détection des chaleurs sur les échecs précoces. Mais les analyses de progestérone à J0 ont tout de même montré une faible fréquence de vaches inséminées hors période de chaleurs dans l'étude 1 et 2. La spécificité de la détection des chaleurs chez la vache Holstein est bonne et n'est pas différentes de celle des vaches de race Normande plus fertiles (Michel et al., 2003). La mauvaise détection des chaleurs ne semble pas pouvoir expliquer la faible fertilité des vaches Holstein.

En revanche, la sensibilité de détection des chaleurs est faible (55,8 % en deuxième IA) et très variable entre les élevages (entre 0 et 90,9 % ; Grimard et al., 2004a, 2005). Les variations de sensibilité chez la vache Holstein expliquent sans doute la faible fécondité : allongement de l'intervalle vêlage-IA1 et de l'intervalle entre vêlage de l'ordre de + 7 jours pour une sensibilité à la première IA réduite de 10 % (Seegers et al., 2010b). Le comportement œstral des vaches hautes productrices s'est modifié. L'intensité et la durée des chaleurs se sont beaucoup réduites (Van Eerdenburg et al., 1996 ; Kerbrat et Disenhaus, 2004). Les vaches Holstein ont des chaleurs plus discrètes que les vaches Normandes, moins fortes laitières et plus fertiles (Cutullic et al., 2009). Prenant en compte l'acceptation du chevauchement comme signe spécifique des chaleurs, l'activité motrice qui augmente au cours des chaleurs ou les modifications physiologiques, des dispositifs ont été mis au point pour aider l'éleveur à détecter les vaches en chaleurs (pour revue : Saint-Dizier, 2005). Les outils d'aide à la détection qui détectent l'acceptation du chevauchement en dehors des périodes d'observation des chaleurs par l'éleveur (pâtes colorées, dispositifs collés en avant de la base de la queue, détecteurs de pression…) augmentent la sensibilité de la détection sans en modifier la spécificité. Cependant, chez les vaches Holstein qui expriment de moins en moins l'acceptation du chevauchement, l'utilisation de signes moins spécifiques peut améliorer la sensibilité de la détection. Par exemple, l'observation de plus de quatre ou cinq comportements sexuels permet de détecter 95 à 100 % des vaches en chaleurs (Disenhaus, 2004). De nouvelles recommandations sont sans doute à mettre en place en élevage pour améliorer la fécondité des vaches laitières mais cela ne devrait avoir que peu d'effet sur la fertilité.

II.2. Génétique

Afin d'enrayer la dégradation de la fertilité, les professionnels de la sélection génétique ont intégré depuis 2001 un nouveau critère dans les objectifs de sélection fondé sur le taux de non retour après première IA des femelles (Institut de l'élevage et INRA, 2001). L'index correspondant est calculé pour les taureaux à partir des performances de leurs filles depuis 1998. Il atteint une précision suffisante pour être publié à partir de 40 filles connues d'un taureau.

Parallèlement, la Sélection Assistée par Marqueurs s'est développée en France depuis 10 ans, en utilisant initialement un nombre limité de marqueurs (microsatellites) bornant quelques QTL forts d'intérêt. Le progrès de la connaissance du génome bovin (The bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, 2009) a rapidement permis d'ajouter et de relier un nombre considérable de marqueurs aux gènes d'intérêt grâce notamment au développement d'outils génétiques tels que la puce BovineSNP50 genotyping BeadChip® (Illumina Inc, San Diego, USA). La France a tiré profit du développement du génotypage à haut débit pour mettre à la disposition des entreprises de sélection françaises, dès 2008, des évaluations génomiques dans les trois principales races bovines laitières. Puis les travaux scientifiques du programme AMASGEN (2009-2011, programme ANR et APIS-GENE) ont permis d'améliorer les outils existants et d'évoluer en juin 2010 vers une sélection génomique pour tous les caractères évalués en sélection classique dans les races Holstein, Montbéliarde et Normande. Les QTL à effets forts ne sont plus seulement pris en compte mais l'ensemble de la variabilité génétique, y compris celle due aux petits QTL (Guillaume et al., 2009 ; Fritz et al., 2010) est utilisée. La progression des connaissances sur les relations génotype-phénotype n'est plus limitée aujourd'hui par l'analyse génomique : les outils disponibles sont très performants. L'évaluation précise des phénotypes sur de grandes populations (plusieurs milliers d'animaux) devient l'enjeu d'avenir (Monget et Le Bail, 2009 ; Humblot et al., 2010). La génomique a ouvert de nouvelles perspectives prometteuses pour l'évaluation de nouveaux caractères, dont la mesure est trop coûteuse pour être réalisée sur l'ensemble des animaux contrôlés. Elle permet de plus d'obtenir des index précis à moindre coût sur des caractères à héritabilité faible qui nécessitaient la connaissance d'un grand nombre d'apparentés pour pouvoir être évalués.

Nous avons montré que l'effet génétique du potentiel de fertilité femelle s'explique en grande partie par son effet sur les échecs précoces de gestation. Par ailleurs, lorsque l'effet est ajusté sur les autres facteurs de variation de la fertilité connus et mesurés en ferme (niveau de production, rang de lactation…), le niveau génétique du père (soit 50% seulement du niveau génétique des filles observées) explique de grands écarts d'incidence d'échecs de gestation (de 5 à 10 % pour la NF-MEP et la MET) alors qu'un écart d'un point d'index entre deux taureaux correspond à une différence estimée de 3,5 % de taux de réussite de leurs filles (Barbat et al, 2007). Dans notre étude, les écarts ont été observés sur la fertilité des filles en 1ère et 2ème lactation. Ces populations de vaches représentent une forte proportion des animaux dans les élevages (59,8 % des femelles Holstein dans les élevages au contrôle laitier en 2009, Institut de l'élevage, 2010a). Il semble dès aujourd'hui possible, voire nécessaire, de communiquer sur l'intérêt de la sélection sur le potentiel de fertilité femelle des taureaux utilisés pour l'IA. Les marges de progrès semblent importantes.

Depuis cette année, l'évaluation de la valeur génétique des femelles grâce à la génomique est proposée aux éleveurs. Il sera alors possible de connaître l'index fertilité d'une femelle avec un CD estimé à 0,59 en race Holstein (David et Fritz, 2011), valeur extrêmement difficile à atteindre pour une femelle grâce à l'évaluation par le modèle animal utilisée antérieurement. Le génotypage des femelles devrait donc permettre des progrès sur la fertilité.

Notre travail pourrait de plus, faire encore évoluer la sélection génomique dans un avenir proche. En effet, la population phénotypée dans l'étude 1 a fait l'objet d'un génotypage (Humblot et al., 2008 ; 2009). Nous disposons donc aujourd'hui d'une population d'effectif raisonnable (2669 vaches sans données manquantes, Lefebvre et al., 2011) de phénotype connu sur la chronologie des échecs précoces de gestation. C'est actuellement la plus grande population connue sur des critères précis de fertilité. Les données précédentes concernaient au maximum 2103 animaux génotypés et phénotypés grâce au global taux de non retours (Tableau II-9**,** Tableau II-11). Actuellement, la relation entre le génotype de ces femelles et leur phénotype de fertilité est en cours d'analyse par l'unité INRA - GABI de Jouy-en-Josas. Cette étude génétique a pour objectif d'identifier des QTL de fertilité spécifiques des échecs précoces de gestation et si possible de les cartographier finement. Les associations entre les phénotypes des échecs de gestation et 306 SNP choisis dans 16 régions de 13 chromosomes (1-6, 9, 10, 14, 15, 18, 26, 27) ont été recherchées. Ces régions ont été choisies sur la base des résultats de cartographie de QTL du projet Cartofine3, financé par APIS-GENE. Les QTL sont recherchés par analyse d'association avec la méthode Fasta et le package GenABEL du logiciel R. Le QTL principalement ciblé, situé sur le chromosome 3 (Guillaume et al., 2006 ; Druet et al., 2008), a été confirmé et sa localisation est affinée à 24 cM. Son effet semble maximum sur la mortalité embryonnaire tardive, mais un effet sur les mortalités précoces et les avortements n'est pas exclu. Entre 2 et 8 QTL sont confirmés ($p<0,01$) pour différents caractères : 6 sur le taux de vêlage, 3 sur la non fécondation-mortalité embryonnaire précoce, 3 sur la mortalité embryonnaire tardive, 8 sur la mortalité embryonnaire totale, 2 sur la mortalité fœtale et 3 sur les avortements (Lefebvre et al., 2011). L'utilisation de ces QTL dans la sélection génomique des mâles et des femelles permettra peut être de progresser encore sur la fertilité en race Holstein.

L'impact du potentiel génétique de fertilité des taureaux sur les échecs précoces de gestation chez leurs filles est important malgré la faible héritabilité du caractère. L'estimation de la valeur génétique pour la fertilité des taureaux et des vaches grâce à la génomique est possible aujourd'hui avec une bonne précision. Les marges de progrès devraient être importantes dans l'avenir. De plus, l'apport de la génomique devrait permettre de préciser les génotypes associés aux phénotypes des échecs de gestation, de délimiter des régions génétiques intéressantes et d'y localiser des gènes candidats expliquant les résultats.

II.3. Anomalies de reprise de cyclicité après vêlage

II.3.1 Effet des anomalies sur les échecs précoces

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographie (Chapitre II.III.2.2.4), les anomalies de reprise de cyclicité après vêlage s'accompagnent d'une baisse des performances de reproduction, à la fois en terme de fécondité (augmentation des intervalles VIA1 et VIF) et de fertilité (baisse du TRIA1). Dans notre deuxième étude expérimentale, nous n'avons pas observé d'effet du retard de reprise de cyclicité sur la fertilité mais les effectifs observés sont faibles et la fertilité des vaches à reprise de cyclicité normale est basse. Pour les vaches ayant présenté une phase lutéale prolongée après vêlage, la fertilité est fortement diminuée comme l'ont déjà observé de nombreux auteurs (Nakao et al., 1992 ; Lamming et Darwash, 1998 ; Royal et al., 2000 ; Shrestha et al., 2004b ; Petersson et al., 2006, Samarutel et al., 2008 ; Ranasinghe et al., 2011). Pour ces vaches, une tendance à l'augmentation de l'incidence de mortalité embryonnaire tardive a été observée comme Lamming et Darwash (1998) l'avaient suggéré. Là encore, les effectifs sont faibles et les calculs d'incidence sont réalisés sur de petits nombres d'animaux. Il est difficile de généraliser cette observation. Elle vient cependant appuyer notre hypothèse d'un effet de l'augmentation de la fréquence des phases lutéales prolongées pour expliquer l'augmentation de la MET qui a accompagné la baisse de fertilité des vaches laitières de race Holstein.

Pour limiter les effets de ces anomalies sur la fertilité, deux stratégies sont possibles et complémentaires : détecter et traiter précocement les anomalies et lutter contre leurs facteurs de risque. Ces stratégies seront présentées pour les deux types d'anomalies les plus fréquentes : retard de reprise de cyclicité et phase lutéale prolongée.

II.3.2 Diagnostic précoce et traitement des anomalies de reprise de cyclicité

Le diagnostic des retards de reprise de cyclicité ne pose pas de problème en élevage. Dans le cadre d'un suivi de reproduction classique (Ennuyer, 2005 ; Chastant-Maillard et al., 2009) les vaches non vues en chaleurs dans les 60 jours qui suivent le vêlage doivent être examinées. Une palpation transrectale seule ou complétée d'un examen échographique des ovaires permettra d'identifier des ovaires petits et lisses et d'objectiver l'absence de corps jaune avec une bonne exactitude (pour revue : Hanzen et al., 2000 ; Stevenson et al., 2008).

Dans ce cas le traitement de choix est un traitement d'induction de l'ovulation à base de progestagène ou de progestérone à diffusion lente (pour revue, Rhodes et al., 2003). En France, les traitements disponibles sont répertoriés dans Tableau V-2 . Tous sont associées à une injection de prostaglandine avant le retrait du support de progestagène et à une administration d'eCG au retrait (action de type FSH et LH, favorise la réalisation de la fin de la maturation folliculaire). Certain ajoute une injection de GnRH à la mise en place du diffuseur de progestagène (induction de l'atrésie ou de l'ovulation d'un

follicule dominant éventuellement présent sur l'ovaire au début du traitement et développement d'une nouvelle vague folliculaire).

Tableau V-2 Taux de gestation après utilisation de traitement d'induction des chaleurs à base de progestagènes chez les vaches laitières en anoestrus

Références	Traitement	Nombre de femelle	Taux de gestation
Grimard et al., 2008b	Implant No 10j+GnRH, PGF2α 8, eCG 10, IA 48h	327*	44%
Gatien, 2010	PRID delta® 9j, PGF2α 8, eCG 9, IA 48h	77*	37,5%
	PRID delta® 9j, PGF2α 8, eCG 9, IA 56h		35,1%
Gatien et Ponsart, 2009	CIDR® 7j, PGF2α 6, eCG, IA sur chaleurs	28	46,4%
	CIDR® 7j, PGF2α 6, eCG, IA 56h	32	56,3%
de Moustier et al., 2010	CIDR® 7j, PGF2α 6, eCG, IA 56h	249	31,2% (50,2% de vaches vues en chaleurs)

No 10 : norgestomet pendant 10 jours, PRID delta® 9j et CIDR® 9j: dispositif vaginal de progestérone pendant 9 jours ; PGF2α 8 ou eCG 9 : PGF2α à 8 jours ou eCG à 9 jour ;* vaches cyclées ou non cyclées avant traitement

Le traitement associant GnRH et prostaglandine (sans progestagène) peut être utilisé en cas de retard de cyclicité (pour revue Rhodes et al., 2003 ; Amaya-Montoya et al., 2007) mais il comporte certaines limites. Il n'est efficace que si la vache présente un follicule dominant qui sera lutéinisé par la première GnRH et qui permettra l'émergence d'une nouvelle vague folliculaire. Sept jours plus tard la prostaglandine détruit le corps jaune secondaire issu de l'ovulation du follicule dominant. La seconde injection de GnRH à J9 permet d'imposer l'ovulation du follicule dominant de la vague nouvellement déclenchée. Les chaleurs interviendront le jour suivant (Chastant-Maillard et al., 2005).

Ces traitements ne sont pas efficaces à 100 % pour induire l'ovulation, notamment chez les animaux maigres (Grimard et al., 2003). Ils permettent d'atteindre des taux de gestation comparables aux vaches inséminées sans traitement (Tableau V-2). L'état corporel de la vache en retard de cyclicité doit être estimé avant tout traitement. Comme nous l'avons vu dans notre étude et dans la bibliographie (Chapitre II.III.2.3.2), le déficit énergétique objectivé par les pertes d'état entre le vêlage et l'insémination ou une note d'état basse au moment de la mise à la reproduction est fortement associé aux retards de cyclicité postpartum. En cas de note < 2,5 à la mise à la reproduction, on pourra conseiller de retarder la mise en place d'un traitement de 10 jours et d'adapter la ration voire de pratiquer un flushing dans le même temps (distribution de céréales plus fréquemment). Les vaches vont ainsi bénéficier des effets positifs de l'intervalle vêlage-traitement et de la modification du bilan énergétique (Grimard et al., 2003). Une mesure de la progestéronémie 10 jours après IA permettra de vérifier si l'ovulation a eu lieu.

Le diagnostic des phases lutéales prolongées est plus difficile. Comme nous l'avons vu dans notre étude expérimentale, l'examen gynécologique ponctuel par palpation transrectale ou par échographie ne permet pas de faire la distinction entre les vaches cyclées normalement et celles qui sont atteintes de phase lutéale prolongée. De plus, les vaches atteintes de PLP sont, le plus souvent, venues en

chaleurs précocement après vêlage. Si ces chaleurs ont été observées les vaches ne seront pas « classées » parmi les vaches non vues en chaleurs dans les 60 jours qui suivent le vêlage. Ces situations sont fréquemment rapportées en élevage (une chaleur et puis plus rien, chaleurs suivies d'anoestrus apparent, Grimard et al., 2004b). Pour un diagnostic et un traitement précoce de ces animaux, il convient alors d'examiner les animaux non inséminés au-delà du délai fixé pour la mise à la reproduction (Ennuyer, 2005 ; Chastant-Maillard et al., 2009). Les vaches en phase lutéale prolongée ne peuvent être distinguées des vaches en suboestrus (vaches cyclées mais non détectées) mais le traitement de ces deux cas fait appel aux mêmes types de protocoles de traitement : les prostaglandines (deux injections à 11-14 jours intervalle) ou l'association GnRH et prostaglandines (pour revue Grimard et al., 2003 et Rhodes et al., 2003 ; Mialot et al., 1999 ; Amaya-Montoya et al., 2007). Si la détection des chaleurs dans l'élevage est bonne, l'utilisation des prostaglandines seules doit être choisie afin de réduire le coût du traitement. Il faut garder à l'esprit que l'efficacité des traitements d'induction des chaleurs varie avec les facteurs de risque qui influencent la fertilité souvent présents lors d'anomalies (par exemple déficit énergétique et retards de reprise de cyclicité, métrites et phases lutéales prolongées). La fertilité des animaux présentant des anomalies de reprise de cyclicité sera toujours inférieure à celle des animaux normaux. Dans notre étude 2, une forte proportion des animaux à anomalie de reprise de cyclicité a été traitée mais la fertilité est restée faible à la fois pour les vaches en retard de reprise de cyclicité (non différente cependant de celle des animaux normaux) et pour celle des vaches en phase lutéale prolongée.

II.3.3 Lutte contre les facteurs de risque des anomalies de reprise de cyclicité

II.3.3.1 Retard de reprise de cyclicité

Le facteur de risque le plus souvent rapporté pour cette anomalie est le déficit énergétique postpartum. Les moyens de lutte contre ce déficit sont proposés dans la partie II.4.4, de cette discussion.

II.3.3.2 Phase lutéale prolongée

Comme nous l'avons vu dans notre étude n°2 et conformément à la bibliographie (Tableau II-18**),** les facteurs de risque majeurs de cette anomalie sont les affections génitales du postpartum (non délivrance, métrite). Encore récemment, Ranasinghe et al. (2011) l'ont confirmé. Le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries contaminant l'utérus modifierait le ratio PGE sur PGF au profit des PGE2, agent lutéotrophique et au dépend des PGF2α, agent lutéolytique, favorisant l'installation d'un corps jaune persistant (Herath et al., 2009).

Au Royaume-Uni, le réseau de surveillance des pathologies utérines a montré que la prévalence des interventions vétérinaires pour métrites avait fortement augmenté depuis 2001. En 2006, 6 % des vaches ont été soignées pour une pathologie utérine postpartum (Williams et al., 2008). Dans le même temps, la prévalence de PLP a augmenté (Figure II-30). En France, à notre connaissance, nous ne disposons d'aucune donnée nationale. Une enquête par questionnaire menée par l'Ecole

Nationale Vétérinaire d'Alfort (Deguillaume, 2010 ; Deguillaume et al., 2010) a montré que, selon l'évaluation faite par les éleveurs, 41 % des exploitations présentaient un taux inférieur à 10 % et 40 % entre 10 et 20 % d'endométrites. Une forte prévalence (≥ 20 %) de cas a été déclarée dans 20 % des élevages.

Au moment du vêlage ou peu de temps après, la contamination microbienne de l'utérus est presque systématique. Le phénomène d'involution utérine essentiel pour une nouvelle gestation est donc chez la vache un processus physiologiquement septique (Paisley et al., 1986). Si la contamination bactérienne prend le dessus sur les capacités de défense de l'hôte, la contamination physiologique se transforme en une infection pathologique. Les endométrites consécutives à ce déséquilibre s'installent entre trois et six semaines postpartum et sont caractérisées par une infiltration importante de leucocytes dans l'endomètre et une inflammation chronique (Foldi et al., 2006 ; Sheldon et al., 2006) associées à des retards de fertilité et des réformes prématurées (Fourichon et al., 2000 ; Gilbert et al., 2005). Le diagnostic précoce des mauvaises involutions utérines préconisées entre 20 et 50 jours (Ennuyer, 2005) permettra la mise en place d'un traitement adapté (Fournier et Chastant-Maillard, 2006) afin de recouvrer l'intégrité de l'endomètre utérin nécessaire à une implantation au 19ème jour post-fécondation d'un embryon futur (pour revue, Guillomot, 2001).

Afin de prévenir ce déséquilibre en faveur de la contamination pathologique, il convient de limiter la contamination bactérienne. Ainsi, les affections génitales du postpartum sont liées aux pratiques au moment du vêlage (intervention, hygiène au vêlage, hygiène de l'opérateur et du local de vêlage). Ponsart et al. (cité en 2007) avaient identifié le défaut d'hygiène au vêlage comme facteurs de risques présents dans 309 élevages audités pour problèmes de reproduction. Une étude épidémiologique sur les relations entre conditions de naissance et fertilité pourrait être un point de départ pour explorer les effets de ces pratiques. Une enquête en ferme aurait l'intérêt de remettre les connaissances à jour, donnerait une base pour relancer la communication sur le sujet. L'évolution de la taille des troupeaux et des conditions de logement des vaches laitières ces dernières décennies a probablement fait évoluer les conditions de vêlage sans que l'on puisse aujourd'hui en mesurer les conséquences. Actuellement, il semble prudent de préconiser de limiter les interventions humaines au vêlage, de respecter de bonnes conditions d'hygiène du logement, du matériel et des interventions (UNCEIA Groupe de fertilité femelle, 2006). Il apparaît aussi que l'optimisation de la fonction immunitaire peripartum via l'alimentation des vaches taries est une des principales préventions des affections utérines (complémentation vitaminique et minérale ; Leblanc, 2008).

Notre étude a permis de confirmer l'impact des deux principales anomalies de cyclicité postpartum (retard de cyclicité et phase lutéale prolongée) sur la fertilité et plus particulièrement le rôle des PLP, en augmentation chez la vache Holstein, dans les mortalités embryonnaires tardives. En élevage, ces anomalies sont facilement repérables après le vêlage. Que la vache souffre de retard de cyclicité ou d'une phase lutéale prolongée, l'éleveur notera une absence de chaleurs ou une chaleur précoce après vêlage suivie d'anoestrus apparent. Afin de mettre en place le traitement adéquat, l'aide de l'échographie transrectale de l'appareil génital parait indispensable pour différencier l'anoestrus vrai (retard de cyclicité) du suboestrus ou de la phase lutéale prolongée. Les facteurs de risque des anomalies de reprise de cyclicité vont néanmoins limiter l'efficacité des traitements hormonaux permettant d'induire l'oestrus des vaches non inséminées au-delà d'un certain délai après vêlage.

II.4. Déficit énergétique en début de lactation

Le déficit énergétique est traditionnellement cité dans la littérature comme un facteur de risque de diminution des performances de reproduction chez la vache laitière haute productrice (Chapitre II.III.2.3.3, Butler, 2000; Van Knegsel et al., 2005 ; Chagas et al., 2007 ; Wathes et al., 2007b). Si la relation déficit énergétique – retard de reprise de cyclicité est bien établie (Tableau II-26), les observations reliant déficit énergétique et fertilité *sensu stricto* sont plus rares.

II.4.1 Déficit énergétique vs déficit alimentaire global

Chez les ruminants, les apports énergétiques et protéiques sont intimement liés. Les apports énergétiques sont essentiellement le fait de la digestion des glucides présents dans la ration par la microflore ruminale (production d'acides gras volatils, principalement : acide acétique, propionique et butyrique absorbés dans le rumen, INRA, 2010). Les apports protéiques sont en grande partie assurés par les protéines microbiennes (PDIM, protéines digestibles dans l'intestin d'origine microbienne). Ces protéines représentent environ 70% des apports en début de lactation (INRA, 2010). Dans le système français, un déficit énergétique est toléré en début de lactation : les besoins doivent être couverts à partir de la 6ème semaine de lactation, la mobilisation des réserves corporelles est sensée couvrir le déficit de façon physiologique avant cette date. Les besoins protéiques par contre doivent être couverts dès le début de lactation en fournissant de l'azote dégradable, utilisable par la microflore ruminale pour fabriquer des protéines (PDIM), et des PDIA (protéines digestibles dans l'intestin d'origine alimentaire) sous forme de protéines tannées par exemple. Les apports recommandés de l'INRA seront donc légèrement déficitaires en énergie durant les 6 premières semaines de lactation par rapport aux besoins énergétiques stricts. Une diminution globale des apports (80% des recommandations par exemple) aura pour effet d'accentuer le déficit énergétique et de créer un déficit protéique qui restera inférieur au déficit énergétique si on l'exprime en pourcentage des besoins. Nous conserverons donc dans la suite du développement, la dénomination « déficit

énergétique » communément admise par la communauté scientifique, sachant que ce déficit s'accompagne, chez les ruminants, d'un déficit protéique dans pratiquement tous les cas.

II.4.2 Effet du déficit énergétique sur la qualité des ovocytes potentiellement fécondables au moment de la mise à la reproduction

L'hypothèse de Britt (1992, citée par Leroy et al., 2008a) suppose que le développement des ovocytes est sous la dépendance de leur environnement biochimique depuis le début de la croissance du follicule primordial, c'est à dire bien avant leur ovulation. Cette période s'étend sur 2 à 5 mois depuis le développement du follicule primordial jusqu'au stade préantral (Drion et al., 1996 ; Webb et al., 2004). Nous avons exploré dans notre étude expérimentale 3 les relations entre les paramètres métaboliques témoins du déficit énergétique entre le vêlage et 80,9 ± 0,75 jours postpartum (session d'Ovum Pick Up) sur la qualité des ovocytes.

Notre étude a comparé la qualité des complexes ovocytes-cumulus récoltés au moment de la mise à la reproduction entre un lot de vache correctement alimenté (témoin) et un sous-alimenté (restreint). D'autres auteurs ont utilisé des critères indirects de déficit énergétique et/ou des moments moins pertinents pour la relier directement à la fertilité. Grimard et al. (publication en cours) ont comparé la qualité des ovocytes de vaches considérées fertiles vs. subfertiles entre 50 et 70 jours postpartum (6 séssions d'Ovum Pick Up sur 3 semaines). Snijders et al. (2000) ont observé les ovocytes collectés après abattage entre 125 et 229 jours de lactation sur des vaches à potentiel génétique moyen vs élevé pour la production laitière. Walters et al. (2002a) ont comparé des ovocytes récoltés entre 30 et 45 jours postpartum à des ovocytes récoltés entre 120 et 135 jours. Argov et al. (2004) ont comparé des ovocytes ponctionnés pendant 7 semaines après 73 vs. 263 jours postpartum. L'objectif de notre protocole (créer un différentiel de bilan énergétique après vêlage et observer ses effets à temps fixe après vêlage) semblait plus adapté pour répondre à la question posée.

Le nombre de follicules à ponctionner (follicule à antrum) au cours du postpartum est limité par la production laitière élevée (Lucy et al., 1992 ; Kendrick et al., 1999 ; Walters et al., 2002a). Grimard et al. (publication en cours) ont voulu explorer l'effet du déficit énergétique sur la qualité des ovocytes susceptibles d'être fécondés mais, sans superovulation, ils n'ont récolté que peu d'ovocytes par vache. Nous avons donc choisi d'appliquer aux vaches un traitement hormonal dans le but d'augmenter le nombre de follicules à ponctionner et le nombre d'ovocytes récoltés le jour de la session d'Ovum Pick Up. Ce traitement hormonal de stimulation ovarienne a pu avoir un impact sur la qualité intrinsèque des complexes ovocyte-cumulus produits. En effet, *in vivo* c'est peut être l'équilibre hormonal, lui-même influencé par le déficit énergétique, qui a un effet sur la qualité des complexes. Il est bien établi que les perturbations endocriniennes et métaboliques dues au déficit énergétique affectent le développement ovocytaire en limitant l'ovulation, en favorisant l'atrésie du follicule dominant, et en affectant la capacité stéroïdogène du corps jaune gestationnel (Chapitre II.III.2.3.4, pour revue : Leroy et al., 2008a).

Dans notre étude n°3, les complexes ovocytes-cumulus que nous avons récoltés étaient destinés à des dosages d'expression de gènes par RT-PCR quantitative, nous avons du estimer la qualité des complexes par des critères visuels. La qualité des complexes peut être évaluée avant fécondation *in vitro* par des critères morphologiques décrits par Marquant-Le Guienne (1998) et après fécondation *in vitro* par leur capacité à être fécondés et à donner une morula puis un blastocyste. On sait qu'*in vitro* la capacité de développement est liée à la qualité visuelle des ovocytes (Kelly et al., 2007). Il est probable qu'*in vivo* ce soit aussi le cas. Pourtant, si Rizos et al. (2005) ont bien montré que les ovocytes produits par des génisses étaient de meilleure qualité visuelle que les ovocytes produits par des vaches en postpartum, Argov et al. (2004) n'ont pas observé de différence claire entre des ovocytes prélevés sur des vaches 73 vs 263 jours postpartum. L'aptitude au développement *in vitro* est une des mesures de la qualité des ovocytes fréquemment utilisée. Dans ce type d'étude, les ovocytes doivent être mis en culture vache par vache et sont donc cultivés par petit nombre. Or le nombre d'ovocytes en co-culture affecte les taux de développement (Ward et al., 2000 ; Bilodeau-Goeseels et Panich ; 2002). Les taux de développement *in vitro* peuvent donc être affectés par le nombre d'ovocytes récoltés ce qui peut biaiser les analyses des effets du déficit énergétique.
Nous avons exploré l'expression du système IGF dans les complexes ovocytes-cumulus et nous avons montré que le système IGF s'exprime dans les complexes des vaches hautes productrices 80 jours postpartum, c'est-à-dire au moment de la mise à a reproduction potentielle. D'autres auteurs avaient observé l'expression des éléments du système IGF au sein du follicule ou des complexes. L'IGF-2 a été identifié au sein des cellules thécales (Llewellyn et al., 2007) à tous les stades du follicule à antrum et des follicules ovulatoire (Armstrong et al., 2000), l'IGF-1 est présent dans les cellules de la thèque des follicules antraux, des follicules ovulatoires (Armstrong et al., 2000) et dans les cellules du cumulus (Nuttinck et al., 2004), le récepteur à l'IGF-1 dans les cellules de granulosa (Llewellyn et al., 2007) et de thèque des follicules préantraux et antraux (Armstrong et al., 2000), de l'ovocyte et du cumulus (Nuttinck et al., 2004) ; l'IGFBP-4 dans les cellules du cumulus (Nuttinck et al., 2004) et de thèque (Llewellyn et al., 2007), l'IGFBP-2 dans l'ovocyte, les cellules du cumulus (Nuttinck et al., 2004 ; Walters et al., 2006) et de granulosa (Llewellyn et al., 2007) ; l'IGFBP-5 dans les cellules de granulosa et l'IGFBP-6 dans les cellules de thèque (Llewellyn et al., 2007). Ces localisations, spécifiques des follicules en phase de croissance terminale, confirment la communication entre les différents compartiments du follicule. Le complexe ovocyte-cumulus est soumis à des facteurs de croissance stimulants (IGFs) et inhibiteurs (IGFBP ; pour revue, Monniaux et al., 2009).

De plus, nous avons montré qu'il existait, au sein de ces complexes, une plus forte expression des modulateurs (IGFBP -2 et -4 et récepteur à l'IGF-1) que de la protéine stimulatrice, l'IGF-1. Cela laisse supposer que les mécanismes entraînant une modification importante de la synthèse d'IGF-1 par le foie lors de déficit énergétique (Beam and Butler, 1997; Velazquez et al., 2008) affectent peu le complexe ovocyte cumulus. L'ovocyte préovulatoire pourrait être « protégé » de l'action néfaste sur les facteurs de croissance du déficit énergétique. Cette hypothèse serait en accord avec les résultats de Spicer et al. (1992) qui ont montré qu'un jeûne chez des génisses modifiait les concentrations plasmatiques de l'IGF-1 mais pas les concentrations du liquide folliculaire et avec ceux de Comin et

al. (1992) qui ont rapporté qu'après une restriction alimentaire, les concentrations d'IGF-1 n'étaient pas modifiées dans le follicule dominant. En revanche, d'après Funston et al. (1996) les concentrations d'IGF-1 dans le sérum et dans le liquide folliculaire seraient positivement corrélées.

L'ovocyte semble se comporter plutôt comme un « récepteur » qui pourrait être sensible aux sécrétions d'IGF-1 dans l'oviducte, le milieu oviductal étant alors plus où moins favorable à sa survie et à la fécondation. Ces effets commencent à être explorés (Valour et al., publication en cours ; Fenwick et al., 2008) mais les mécanismes en jeu semblent complexes.

Cependant, nous n'avons pas suffisamment maîtrisé les apports alimentaires dans notre étude et notre protocole ne nous a pas permis de créer un différentiel de niveau énergétique entre nos deux lots d'animaux. L'effet du déficit énergétique sur l'expression des gènes du système IGF n'a donc pas pu être exploré. Pour créer un différentiel de bilan énergétique la maîtrise des apports alimentaires et de la fréquence de traite semble être le moyen le plus sûr (Disenhaus et al., 2002 ; Patton et al., 2006 ; Llewellyn et al., 2007 ; Fenwick et al., 2008 ; Wathes et al., 2009 ; Cutullic et al., 2011) mais cela crée des déficits importants, parfois éloignés de ce que l'on peut observer en élevage.

II.4.3 Effet du déficit énergétique sur les échecs précoces de gestation

Quelques observations ont permis de mettre en relation des indicateurs du bilan énergétique (production laitière, taux protéique du lait, note d'état corporel instantanée, variation de notes d'état) et échecs précoces de gestation (Tableau II-26). Certaines ont montré que la non fécondation – mortalité embryonnaire précoce augmentait lors de déficit énergétique postpartum. Pour la mortalité embryonnaire tardive (souvent associée à la mortalité fœtale), les études sont plus nombreuses mais les résultats sont plus contradictoires (Chapitre II.III.2.3.3). L'impact du déficit énergétique y est étudié indirectement via l'état corporel des vaches à des moments variables. Si le déficit énergétique est estimé par la variation d'état corporel, la perte d'état est associée à l'augmentation de la MET (Lopez-Gatius et al., 2002 ; Silke et al., 2002). Si l'indicateur du niveau énergétique est une note d'état instantanée, la MET a été augmentée chez les vaches les plus maigres (Starbuck et al., 2004), mais aussi chez les vaches les plus grasses (Grimard et al., 2006 ; Starbuck et al., 2004). Chez ces dernières, le métabolisme est plus actif ce qui pourrait diminuer les concentrations en progestérone circulante plasmatique (augmentation de la clearance de la progestérone avec le métabolisme) et serait défavorable au maintien de la gestation (Rabiee et al., 2002 ; Sangsritavong et al., 2002 ; Vasconcelos et al., 2003).

Dans notre étude n°1 nous avons utilisé les données de la base du SIG (taux protéique, taux butyreux, quantité de lait) pour explorer les effets du déficit énergétique sur les échecs précoces de gestation.

II.4.3.1 Effet sur Non Fécondation-Mortalité Embryonnaire Précoce

Deux facteurs liés à la NF-MEP décrivaient le déficit énergétique postpartum : l'intervalle vêlage première IA et le différentiel Taux Butyreux – Taux Protéique dans le lait. Avec l'augmentation de l'intervalle vêlage première IA le déficit énergétique diminue puisque la capacité d'ingestion augmente (Figure II-34). Cela peut expliquer en partie l'effet de l'intervalle. D'autres phénomènes physiologiques entrent en jeu : avec l'augmentation de l'intervalle vêlage première IA le nombre de cycles précédant l'IA augmente et la capacité de l'utérus à assurer le développement précoce de l'embryon s'améliore probablement. Plus le rang du cycle après vêlage est élevé au moment de l'IA plus le taux de réussite est élevé (Thatcher et Wilcox, 1973 ; Butler, 2003). Friggens et Labouriau (2010) ont précisé qu'il suffisait d'au moins deux cycles pour optimiser la fertilité.

L'effet de l'écart TB-TP est plus complexe puisque ce sont les valeurs intermédiaires de l'écart (5 à 10 g/kg) qui sont les plus favorables à l'établissement de la gestation, la NF-MEP étant augmentée quand les écarts sont faibles (situations probablement liées à de l'acidose, TB faible et TP élevé) ou quand ils sont élevés (situations de déficit énergétique avec lipomobilisation, TB élevé et TP faible).

II.4.3.2 Effet sur mortalité embryonnaire tardive

Le déficit énergétique a eu un effet délétère sur la MET dans notre échantillon. En effet, les incidences de MET sont les plus élevées dans les classes de vaches les plus productives quelque soit le rang de lactation et dans les classes de vaches les plus productives qui présentent les TP les plus faibles. L'augmentation de la capacité d'ingestion des vaches après vêlage est insuffisante pour assurer la couverture des besoins de début de lactation. La majorité des vaches fortes productrices entrent alors dans une période de bilan énergétique négatif qui atteint son maximum environ deux semaines après vêlage (Butler et Smith, 1989 ; Bell, 1995). Cependant, les incidences élevées de MET dans les classes de vaches à plus de 30 kg de lait en début de lactation avec des TP élevés (> 27 g/kg et donc possiblement en déficit énergétique peu prononcé) posent question. Il pourrait s'agir d'un effet unique de la production laitière sur la MET et non d'un effet du déficit énergétique. En dissociant par leur dispositif expérimental, la corrélation négative entre production laitière et dynamique des réserves corporelles, Cutullic et al. (2011) ont mis en évidence une augmentation de la MET avec le pic de lactation de vaches en état corporel correct et une augmentation de NF-MEP avec le déficit énergétique. Ainsi, comme souligné précédemment, le « l'hyper » métabolisme du à la forte production laitière pourrait diminuer la clairance de la progestérone et nuire au maintien de la gestation (Rabiee et al., 2002 ; Sangsritavong et al., 2002 ; Vasconcelos et al., 2003) ou bien la sur-exposition aux hormones galactopoiëtiques pourraient intervenir dans les mortalités tardives. Afin d'objectiver plus justement le déficit énergétique, il aurait fallu connaître la variation de l'état corporel des vaches de notre expérience. Le très grand nombre d'intervenants (effet notateur sur le critère mesuré), de vaches et de troupeaux sélectionnés n'ont pas permis cette approche.

II.4.4 Stratégie de maîtrise du déficit énergétique postpartum chez la vache laitière

La maîtrise des apports alimentaires, notamment des apports de concentrés, permet aux éleveurs d'adapter la production laitière du troupeau aux *aleas* du marché. Dans le contexte des quotas laitiers, augmenter ou diminuer les apports de concentrés en fin de campagne permettait d'ajuster la production au quota accordé. Dans le contexte actuel de grande volatilité des prix du lait et des matières premières, les éleveurs modifient les apports de concentrés en fonction des prix du marché. Ils ont diminué les apports pour réduire la production en 2009, année de « crise du lait », mais pourraient aussi les augmenter en cas d'augmentation de la demande dans un contexte sans quotas. Cette stratégie peut être très dommageable pour la reproduction si elle est appliquée sur des vaches en postpartum et/ou en début de gestation. Il serait préférable de ne l'utiliser que sur des vaches gestantes après la fin de la période de développement de l'embryon (ie 45 jours après IA), c'est-à-dire approximativement après le premier diagnostic de gestation.

Afin de favoriser la reprise de cyclicité et éviter les retards de mise à la reproduction occasionnés par les retours tardifs de cyclicité, il est clairement établi que les vaches doivent arriver au vêlage dans un état corporel optimal, entre 3 et 3,5 selon le niveau de production laitière escompté (Fournier et Humblot, 1989 ; Starbuck et al., 2004 ; Grimard et al., 2006 ; INRA, 2010). Les apports après le vêlage doivent limiter la perte d'état corporel afin d'obtenir une note de 2,5 à l'insémination (Lopez-Gatius et al., 2002 ; Silke et al., 2002). Ces recommandations, anciennes, sont toujours d'actualité. Il est possible d'ajouter, compte tenu des effets du déficit énergétique sur les échecs précoces de gestation qu'il serait préférable de ne pas sous alimenter les animaux avant 45 jours de gestation. Une conduite en plusieurs lots (vaches non encore confirmées gestantes vs. vaches gestantes) est peut être à tester pour n'appliquer les restrictions alimentaires que sur les animaux confirmés gestants si l'on souhaite ne pas impacter la reproduction. Ceux sont cependant les animaux sur lesquels les diminutions de production seront les plus faibles et il n'est pas certain que cette option soit opérationnelle en élevage.

En conclusion, nous n'avons pas pu confirmer/infirmer l'hypothèse de Britt qui suppose un effet délétère du déficit énergétique sur la qualité des ovocytes au cours du postpartum. Les revues récentes soulèvent quelques réserves sur cette hypothèses (Leroy et al., 2008a ; Walsh et al., 2011). L'exploration des effets du déficit énergétique sur l'expression du système IGF dans les complexes ovocytes-cumulus et dans l'oviducte pourra peut être amené des compléments de réponse à la question de l'effet du déficit énergétique sur les échecs de fécondation. Ces questions restent difficiles à explorer. Il semble préférable de ne pas superovuler les animaux pour étudier la qualité des ovocytes mais il faut alors un grand nombre d'animaux pour avoir une puissance statistique suffisante. D'autre part, l'exploration des effets du déficit sur la physiologie de l'oviducte suppose soit de maîtriser une technique permettant de récupérer les sécrétions oviductales (Besenfelder et al., 2010) *in vivo*, soit de prélever les oviductes des vaches en début de lactation ce qui implique abattage ou ablation chirurgicale et qui limitera le nombre d'animaux dans les expérimentations.

Conclusion générale

Chapitre VI. Conclusion

Notre travail nous a permis de préciser l'incidence des échecs précoces de gestation chez la vache de race Holstein. Les échecs précoces (non fécondation – mortalité embryonnaire précoce) sont les plus fréquents. Ils représentent environ plus de 30 % des animaux mis à la reproduction (IA-PL exclues) et plus de 60 % du total des échecs de gestation de l'insémination à 90 jours. Après l'implantation et jusqu'à la fin de l'organogenèse (mortalité embryonnaire tardive), 15 à 20 % des gestations s'arrêtent. En début de vie fœtale le risque d'échec persiste mais son incidence est plus faible (5-10 %). A partir de 80-100 jours de gestation, les vaches toujours gestantes ont de grandes chances de le rester jusqu'au vêlage.

Un des enjeux pour l'avenir serait de pouvoir mesurer l'incidence de non fécondation et de pouvoir la distinguer de la mortalité embryonnaire précoce. Pour l'instant aucune donnée *in vivo* n'est disponible Il faudrait pour cela disposer d'un diagnostic très précoce de gestation.

Nous avons étudié les échecs précoces de gestation en race Holstein. Ils ont été reliés à des facteurs de risque d'infertilité très présents dans cette race, si on la compare aux races plus fertiles Montbéliarde et Normande.

Nous avons mis en évidence l'effet du potentiel génétique sur l'incidence de la non fécondation-mortalité embryonnaire précoce et sur celle de la mortalité embryonnaire tardive. Cet effet est important sur les vaches en première et deuxième lactation et mérite que l'on accentue l'effort de sélection sur ce paramètre. Une large population de femelles a été phénotypée pour les échecs précoces de gestation dans notre étude et cela permettra d'identifier des QTL spécifiques. La sélection génomique, accessible depuis 2010 pour les taureaux et dès 2011 pour les femelles en élevage devrait permettre de disposer d'un outil puissant (index précoces et précis pour tous les animaux) pour sélectionner ces caractères. Les éleveurs pourront ainsi choisir les taureaux améliorateurs de la fertilité mais aussi sélectionner au mieux leurs génisses.

Nous avons aussi montré l'importance du profil de reprise de cyclicité postpartum pour expliquer les échecs de gestation. Les phases lutéales prolongées notamment semblent être à l'origine d'une augmentation d'incidence de la mortalité embryonnaire tardive. Le contrôle du postpartum est un réel enjeu pour l'éleveur qui doit prévenir ces anomalies : respect des règles d'hygiène au vêlage pour éviter les métrites, régime alimentaire adéquat dès le tarissement puis en postpartum, suivi de l'état corporel jusqu'à l'IA. La détection et le traitement de ces anomalies pourrait permettre d'en limiter les effets mais une étude coût de maîtrise/bénéfices est peut être à mener afin de limiter le nombre d'animaux à examiner et le nombre de traitements à réaliser.

Enfin, le déficit énergétique a un effet sur les échecs précoces, à la fois sur la non fécondation mortalité embryonnaire précoce et sur la mortalité embryonnaire tardive. Le mécanisme qui lie déficit énergétique et échecs de gestation n'est pas élucidé à ce jour. Nous avons tenté d'explorer l'effet du déficit énergétique postpartum sur la qualité des ovocytes au moment de la mise à la reproduction. Notre protocole ne nous a pas permis de créer un différentiel de bilan énergétique entre nos deux lots et nous ne pouvons pas conclure quant à cet effet. Néanmoins, il semble que les effets de l'alimentation sur l'oviducte, sur l'utérus et sur la production de progestérone par le corps jaune puissent expliquer eux aussi les échecs de fécondation ou la mortalité embryonnaire précoce et tardive. Les questions sur les mécanismes reliant déficit énergétique en postpartum et reproduction demeurent. En l'absence de réponse, la maîtrise de la note d'état corporel au vêlage et au moment de l'IA doivent rester des objectifs. Dans le contexte actuel, il semble préférable de réserver la modulation des apports de concentré pour moduler la production aux animaux à plus de 45 jours de gestation.

L'approche finalisée et généraliste de notre travail de thèse nous a permis d'aborder la fertilité de façon très globale dans l'étude de terrain et plus explicative dans l'étude et l'expérience en station. Nous avons exploré l'impact de trois problèmes sur les échecs précoces de gestation chez la vache de race Holstein : un aspect génétique, un aspect physiologique et un aspect métabolique. Cette approche nous a permis de contribuer à fournir des outils d'amélioration de conduite d'élevage aux professionnels.

Références Bibliographiques

Chapitre VII. Références bibliographiques

Adashi EY. 1998. The IGF family and folliculogenesis. Journal of Reproductive Immunology 39, 13-19

Afssa. 2008. Point sur la situation de la fièvre catarrhale ovine (FCO) à sérotype 1 et 8, en France et dans l'Union européenne, au 10 octobre 2008, http://www.afssa.fr/Documents/SANT-Fi-PtFCOBilan200810.pdf, consulté le 26 janvier 2011

Agabriel J, Giraud JM, Petit M. 1986. Détermination de la note d'état d'engraissement en élevage bovin allaitant. Bulletin Technique CRZV Theix INRA, 66, 43-50

Agerholm JS, Bendixen C, Andersen O, Arnbjerg J. 2001. Complex vertebral malformation in Holstein calves. Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation 13, 283-289

Amaya-Montoya C, Matsui M, Kawashima C, Hayashi KG, Matsuda G, Kaneko E, Kida K,Miyamoto A, Miyake YI. 2007. Induction of ovulation with GnRH and PGF2α at two different stages during the early postpartum period in dairy cows: ovarian response and changes in hormone concentrations. Journal of Reproduction and Development, 53, 867-875

Andrew SM, Waldo DR, Erdman RA. 1994. Direct analysis of body composition of dairy cows at three physiological stages. Journal of dairy Science 77, 3022-3033

Anonyme. 1972. Committee on bovine reproductive nomenclature. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. 62, 216-237

Anonyme 2009. France Génétique Elevage. La révolution génomique, une nouveauté pour la sélection des bovins laitiers : la SAM. http://www.inst-elevage.asso.fr/html1/IMG/pdf_CR_0972106-FGE.pdf, consulté en avril 2010

Anonyme 2010a. La France Agricole. http://www.lafranceagricole.fr/actualite-agricole/situation-economique-des-agriculteurs-88-considerent-que-leur-tresorerie-s-est-degradee-en-un-an-sondage-26956.html, consulté le 30 octobre 2010

Anonyme 2010b. Agreste Conjoncture. 2009, année difficile pour les fabrications de produits laitiers. http://www.agreste.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf_synthese1111004.pdf, consulté le 30 octobre 2010

Argov N, Arav A, Sklan D. 2004. Number of oocytes obtained from cows by OPU in early, but not late lactation increased with plasma insulin and estradiol concentrations and expression of mRNA of the FSH receptor in granulosa cells. Theriogenology 61, 947-962

Armstrong DG, Gutierrez CG, Baxter G, Glazyrin AL, Mann GE, Woad KJ, Hogg CO, Webb R. 2000. Expression of mRNA encoding IGF-1, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. Journal of Endocrinology 165, 101-113

Armstrong DG, Mc Evoy TG, Baxter G, Robinson JJ, Hogg CO, Woad KJ, Webb R, Sinclair KD. 2001. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. Biology of Reproduction 64, 1624-1632.

Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Woad KJ. 2002. Insulin-like growth factor (IGF) system in oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. Reproduction 123, 789-797

Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, Ron M, Weller JI, Lewin HA. 2004. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. Journal of Dairy Science 87, 468-475

Ashworth CJ, Antipatis C. 2001. Micronutrient programming of development throughout gestation. Reproduction 122, 527-535.

Asselin E, Fortier MA. 2000. Detection and regulation of the messenger for a putative bovine endometrial 9-keto-protaglandin E2 reductase: effect of oxytocin and interferon-tau. Biology of Reproduction 62, 125-131

Athanasas-Platsis S, Morton H, Dunglison GF, Kaye PL. 1991. Antibodies to early pregnancy factor retard embryonic development in mice in vivo. Journal of Reproduction and Fertility 92, 443-451

Atkinson YH, Gogolinewens KJ, Hounsel EF, Davies MJ, Brandon MR, Seamark RF. 1993. Characterization of placentation-specific binucleate cell glycoproteins possessing a novel carbohydrate. Journal of Biological Chemistry 268, 26679-26685

Austin KJ, King CP, Vierk JE, Sasser RG, Hansen TR. 1999. Pregnancy-specific protein B induces release of an alpha chemokine in bovine endometrium. Endocrinology 140, 542-545

Ayad A, Sousa NM, Hornick JL, Touati K, Iguer-Ouada M, Beckers JF. 2006. Endocrinologie de la gestation chez la vache: signaux embryonnaires, hormones et proteines placentaires. Annales Médecine Vétérinaire 150, 212-226

Ayalon N. 1978. A review of embryonic mortality in cattle. Journal of Reproduction and Fertility 54, 483-493

Azawi OI. 2008. Postpartum uterine infection in cattle. Animal Reproduction Science 105, 187-208

Barbat A, Druet T, Bonaiti B, Guillaume F, Colleau JJ, Boichard D. 2005. Bilan phénotypique de la fertilité à l'insémination artificielle dans les trois principales races laitières françaises. Proc: Rencontres, Recherches, Ruminants. 12, 137-140

Barbat A, Gion A, Ducrocq V. 2007. L'évaluation génétique de la fertilité en France. Bulletin Technique de l'Insémination Animale 126, 19-22

Barbat A, Le Mézec P, Mattalia S, Fritz S, Ponsart C, Humblot P. 2008. Analyse phénotypique de la fertilité et son amelioration par la voie génétique. Journées Nationales des Groupements Techniques Vétérinaires (GTV), Nantes, 481-490

Barbat A, Le Mézec P, Ducocq V, Mattalia S, Fritz S, Boichard D, Ponsart C, Humblot P. 2010. Female fertility in French dairy breeds: current situation and strategies for improvement. Journal of Reproduction and Development, 56, suppl S15-S21

Barnouin J, El Idilbi N, Chilliard Y, Chacornac JP, Lefaivre R. 1986. Micro-dosage automatisé du 3-hydroxybutyrate plasmatique sans déprotéinisation chez les bovins. Annales de Recherche Vétérinaire 17, 129-139

Barone R. 1978. Anatomie comparée des mammifères domestiques : Tome 3, Splanchnologie (fascicule 2), Appareil uro-génital, foetus et ses annexes, péritoine et topographie abdominale. Paris, VIGOT. p951

Bazer FW, Burghardt RC, Johnson GA, Spencer TE, Wu G. 2008. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signalling pathways. Reproduction and Biology 8, 179-211

Bazin S 1984. In Grille de notation de l'état d'engraissement des vaches Pie noires. ITEB Paris : Technipel, Fr

Beal WE, Chenault JR, Day ML, Corah LR: 1988. Variation in conception rates following synchronization of estrus with melengestrol acetate and prostaglandin F2. Journal of Animal Science 66, 599-602

Beam SW, Butler WR. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. Biology and Reproduction 56, 133-142

Beam SW, Butler WR. 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. Journal of reproduction and fertility Suppl 54, 411-424

Beaudeau F, Fourichon C. 1998. Estimating relative risk of disease from outputs of logistic regression when the disease is not rare. Preventive Veterinary Medecine 36, 243-256

Beckers JF, Wouters-Ballman P, Ectors F. 1988. Isolation and radioimmunoassay of a bovine pregnancy specific protein. Theriogenology 29, 219 (abstract)

Beg MA, Ginther OJ. 2006. Follicle selection in cattle and horses: Role of intrafollicular factors. Reproduction 132, 365-377

Bell AW. 1995. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. Journal of Animal Science 73, 2804-2819

Ben Jemaa S, Fritz S, Guillaume F, Druet T, Denis C, Eggen A, Gautier M. 2008. Detection of quantitative trait loci affecting non-return rate in French dairy cattle. Journal of Animal Breeding and Genetics 125, 280-288

Ben Jemaa S. 2009. Cartographie fine de QTL de fertilité femelle chez les bovins laitiers français. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), soutenue le 05 mars 2009, p190

Berger PJ, Shanks, RD, Freeman AE, Laben RC. 1981. Genetic Aspects of Milk Yield and Reproductive Performance. Journal of Dairy Science 64, 114-122

Besenfelder U, Havlicek, Kuzmany A, Brem G. 2010. Endoscopic approaches to manage in vitro and in vivo embryo development : use of the bovine oviduct. Theriogenology. 73, 768-776

Bilodeau-Goeseels S, Panich P. 2002. Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. Animal Reproduction Science 71, 143-155

Blache D, Celi P, Blackberry MA, Dynes RA, Martin GB. 2000. Decrease in voluntary feed intake and pulsatile luteinizing hormone secretion after intracerebroventricukar infusion of recombinant bovine leptin in mature male sheep. Reproduction, Fertility and Development 12, 373-381

Boelhauve M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF. 2005. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro produced blastocysts. Biology of Reproduction 73, 737-744

Boichard D, Manfredi E. 1994. Genetic analysis of conception rate in French Holstein dairy cattle. Acta Agriculturae Scandinavica, Section A 44, 138-145

Boichard D, Maignel L, Verrier E. 1996. Analyse généalogique des races bovines laitières françaises. INRA Production Animale 9, 323-335

Boichard D, Barbat A, Briend M. 1998a. Evaluation génétique des caractères de fertilité femelle chez les bovins laitiers. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 5, 103-106

Boichard D, Le Roy P, Leveziel H, Elsen JM. 1998b. Utilisation de marqueurs moléculaires en génétique animale. INRA Production Animale 11, 67-80

Boichard D. 2000. Production et fertilité chez la vache laitière. Commission Bovine, Draveil le 24 et 25 octobre 2000 33-34, http://www1.clermont.inra.fr/commission-bovine/themes/draveil2.htm

Boichard D, Barbat A, Briend M, 2002. Bilan phénotypique de la fertilité chez les bovins laitiers. AERA. Reproduction, Génétique et Performances AERA Ed. Lyon, 5-9

Boichard D, Grohs C, Bourgeois F, Cerqueira F, Faugeras R, Neau A, Rupp R, Amigues Y, Boscher MY, Levéziel H. 2003. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. Genetics Selection Evolution 35, 77-101

Bousquet D, Bouchard E, du Tremblay D. 2004. Decreasing fertility in dairy cows : myth or reality ? Proc: 23ème Congrès Mondial de Buiatrie, 11-16 juillet 2004, Québec, Canada http://www.ivis.org/proceedings/wbc/wbc2004/WBC2004-Bousquet-ang-simple1.pdf, consulté le 8 mai 2011

Breuel KF, Lewis PE, Schrick FN, Lishman AW, Inskeep EK, Butcher RL. 1993. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. Biology of Reproduction 48, 655-661

Brink JT, Kiracofe GH. 1988. Effect of oestrus cycle stage at synchro-mate B treatment on conception and time to estrus in cattle. Theriogenology. 29, 513-519

Bulman DC, Lamming GE. 1978. Milk progesterone levels in relation to conception, repeat-breeding and factors influencing acyclicity in dairy cattle. Journal of Reproduction and Fertility 30, 177-188

Bulman DC, Wood PDP. 1980. Abnormal patterns of ovarian activity in dairy cows and their relationships with reproductive performance. Animal Production 30, 177-188

Butler JE, Hamilton WC, Sasser RG, Ruder CA, Hass GM, Williams RJ. 1982. Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. Biology of reproduction 68, 925-933

Butler ST, Marr AL, Pelton SH, Radcliff RP, Lucy MC, Butler WR. 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-1 and GH receptor 1A. Journal of Endocrinology 176, 205-217

Butler WR. 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. Journal of Dairy Science 81, 2533-2539

Butler WR. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. Livestock Production Science 83, 211-218

Butler WR, Everett RW, Coppock CE, 1981. The relationships between energy balance, milk production and ovulation postpartum in Holstein cows. Journal of Animal Science 53, 742-748

Butler WR, Smith RD, 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. Journal of dairy Science 72, 767-783

Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R, 1995. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. Reproduction in Domestic Ruminants III. Journal of Reproduction and Fertility 49, 335-350

Campbell BK, Telfer EE, Webb R, Baird DT, 2000. Ovarian autografts in sheep as a model for studying folliculogenesis. Molecular and Cellular Endocrinology 163, 137-139

Cartmill JA, El Zarkouny SZ, Hensley BA, Rozell TG, Smith JF, Stevenson JS. 2001. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. Journal of Dairy Science. 84, 799-806

Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, JK Kay, Lindsay DR, Lucy MC, Martin GB, Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW, Webb R 2007. News perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. Journal of Dairy Science 90, 4022-4032

Charpigny G, Reinaud P, Huet JC, Guillomot M, Charlier M, Pernollet JC, Martal J. 1988. High homology between a trophoblastic protein (trophoblastin) isolated from ovine embryo and alpha-interferons. Federation of European Biochemical Societies letters 228, 12-16

Chastant-Maillard S, Fournier R, Remmy D, 2005. Actualités sur le cycle de la vache. Le Point vétérinaire, numéro spécial Reproduction des ruminants : maîtrise des cycles et pathologie 36, 10-15

Chastant-Maillard S, Charpentier L, Deguillaume L, Buret Y, Gipoulou C. 2009. Suivi de reproduction en élevage bovin : pratique actuelles en France. Bulletin des GTV, 50, 109-114

Chebel RC, Santos JE, Reynolds JP, Cerri RL, Juchem SO, Overton M. 2004. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. Animal Reproduction Science 84, 239-255

Chevallier A, Humblot P. 1998. Evolution des taux de non retour après insémination artificielle: effet du contrôle du délai de mise à la reproduction sur les résultats de fertilité. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 5, 75-77

Chilliard Y. 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review. Journal Dairy Science 76, 3897-3931

Claus R, Karg H, Zwiauer D, Von Butler I, Pirchner F, Rattenberger E. 1983. Analysis of factors influencing reproductive performance of the dairy cows by progesterone assay in milk-fat. British Veterinary Journal 139, 29-37

Comin A, Gerin D, Cappa A, Marchi V, Renaville R, Motta M, Fazzini U, Prandi A. 2002. The effect of an acute energy deficit on the hormone profile of dominant follicles in dairy cows. Theriogenology 58, 899-910

Cordoba MC, Sartori R, Fricke PM. 2001. Assessment of a commercially available early conception factor (ECP) test for determining pregnancy status of dairy cattle. Journal of Dairy Science 84, 1884-1889

Crowe MA. 2008. Resumption of ovarian cyclicity in post-partum beef and dairy cows. Reproduction in Domestic Animal 43, suppl 5, 20-28

Curran S, Pierson RA, Ginther OJ. 1986. Ultrasonographic appearance of the bovine conceptus from days 20 to 60. Journal of the American Veterinary Medical Association 189, 1295-1302

Cutullic E. 2010. Concurrence entre lactation et reproduction chez la vache laitière. Thèse en vue de l'obtention du Doctorat de l'Université de Caen Spécialité Biologie Animale et Végétale, p 286

Cutullic E, Delaby L, Causeur D, Michel G, Disenhaus C. 2009. Hierarchy of factors affecting behavioural signs used for oestrus detection of Holstein and Normande dairy cows in a seasonal calving system. Animal of Reproduction Science 113, 22-37

Cutullic E, Delaby L, Gaillard Y, Disenhaus C. 2011. Dairy cows's reproductive response to feeding level differs according to the reproductive stage and the breed. Animal 5, 731-740

Cytel Software Corporation: Egret for Windows, User Manual, 412 pages, Cytel Software Corporation Ed, Cambridge, 1999

David X, Fritz S. 2011. La génomique : après les schémas, voilà les élevages. Bulletin Technique de l'Insémination Animale, 139, 19-21

de Jarnette JM, Saacke RG, Bame J, Vogler CJ. 1992. Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attemps to alter their number in artificially inseminated cattle. Journl of Animal Science 70, 484-491

de Moustier V, Constant F, Deguillaume L, Chastant-Maillard S. 2010. Efficiency of CIDR® for the treatment of anovulatory anestrus in dairy cows. Proc: XXVI World Buiatrics Congress, Nov. 14-18 2010, Santiago de Chile, Chile (poster 1041)

de Vries A. 2004. Trends in reproductive performance in dairy cows: What do the number tell us? Proc: Florida Dairy Reproduction Road Show, 1-8; consulté le 15 novembre 2010, http://dairy.ifas.ufl.edu/drs/2004/Trends.pdf

de Vries A, Risco CA. 2005. Trens and Seasonality of Reproductive performance in Florida and Georgia Dairy Herds from 1976 to 2002. Journal of Dairy Science 88, 3155-3165

de Vries A. 2008. What is improved dairy cattle reproductive performance worth? Proc: 13ème Congresso Internacional Anembe de medicina bovina, Salamanca, 7-10 mai 2008, 145-153

de Vries MJ, van der Beek S, Kaal-Lansbergen LMTE, Ouweltjes W, Wilmink JBM. 1999. Modeling of energy balance in early lactation and the effect of energy deficits in early lactation on first detected estrus postpartum in dairy cows. Journal of Dairy Science 82, 1927-1934

de Vries MJ, Veerkamp RF. 2000. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. Journal of Dairy Science 83, 62-69

de Wit AAC, César MLF, Kruip TAM. 2001. Effects of urea during in vitro maturation on nuclear maturation and embryo development of bovine cumulus-oocyte complexes. Journal of Dairy Science 84, 1800-1804

Deguillaume L. 2010. Inflammation géntitale post-partum chez la vache. Thèse pour obtenir le grade de docteur délivré par l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech), soutenue le 14 décembre 2010

Deguillaume L, Gondran C, Chastant-Maillard S. 2010. Attitude et opinion des éleveurs laitiers français face aux endométrites. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, 17, 106 (poster)

Del Vecchio RP, Sutherland WD, Sasser RG. 1996. Bovine luteal cell production in vitro of prostaglandin E2, oxytocin and progesterone in response to pregnancy-specific protein B and prostaglandin F2α. Journal of Reproduction and Fertility 107, 131-136

Des Côteaux L, Gnemmi G, Colloton Jill. 2009. Ultrasonography of the bovine female genital tract. Veterinary Clinical Food Animal. 25, 733-752

Dillon P, Berry DP, Evans RD, Buckley F, Horan B. 2006. Consequences of genetic selection for increased milk production in European seasonal pasture based systems of milk production. Livestock Science 99, 141-158

Disenhaus C. 2004. Mise à la reproduction chez la vache laitière: actualités sur la cyclicité post-partum et l'oestrus. Proc : Journées nationales des GTV, Tours 859-865

Disenhaus C., Kerbrat S., Philippot J.M., 2002. La production laitière des 3 premières semaines est négativement associée avec la normalité de la cyclicité chez la vache laitière. Rencontres Recherche Ruminants, 9, 147-150

Disenhaus C, Kerbrat S, Philippot J.M, 2003. Entre "fureur" et pudeur : actualités sur l'expression de l'œstrus chez la vache laitière. In Journée bovine nantaise, Nantes, 9 octobre 2003, Chauvin A. Fourichon F. et Seegers H. Ed, 94-101

Disenhaus C, Cutullic E, Blanc F, Gatien J, Agabriel J, Hetreau T, Michel G, Paccard P, Badinand F, Egal D, Ponsart C. 2008. Caractéristiques comparées de la cyclicité après vêlage de différentes races bovines. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 15, 383-386

Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM. 2006. Embryos survival in dairy cows managed under pastoral conditions. Animal Reproduction Science. 96, 297-311

Diskin MG, Morris DG. 2008. Embryonic and early foetal losses in cattle and other Ruminants. Reproduction Domestic Animal 43, suppl 2, 60-267

Dobson H, Smith RF, Royal MD, Knight CH, Sheldon IM. 2007. The high producing dairy cow and its reproductive performance. Reproduction in Domestic Animals 42 (Suppl2) 17-23

Domecq JJ, Skidmore AL, Lloyd JW, Kaneene JB. 1997. Relationship between body condition scores and conception at first artificial insemination in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. Journal of Dairy Science 80, 113-120

Dosogne H, Massart-Leen AM, Burvenich C. 2000. Immunological aspects of pregnancy-associated glycoproteins. Advances in Experimental Medecine and Biology 480, 295-305

Driancourt MA. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. Theriogenololgy 55, 1211-1239

Driancourt MA, Levasseur MC, 2001. Cycles estriens et cycles menstruels. In La reproduction des mammifères et l'Homme. Eds C Thibault et MC Levasseur. Paris, France. INRA Edition-Ellipses pp. 680-698

Driancourt MA, Gougeon A, Monniaux D, Royère D, Thibault C. 2001. Folliculogenèse et ovulation. In La reproduction chez les mammifères et l'Homme. Eds C Thibault et MC Levasseur. Paris, France. INRA Edition-Ellipses pp. 316-347

Drion PV, Beckers JF, Ectors FJ, Hanzen C, Houtain JY, Lonergan P. 1996. Régulation de la croissance folliculaire et lutéale: 1 Folliculogenèse et atrésie. Le Point Vétérinaire, numéro spécial 28, Reproduction des ruminants, 37-47

Druet T, Fritz S, Boussaha M, Ben Jemaa S, Guillaume F, Derbala D, Zelenika D, Lechner D, Charon C, Boichard D, Gut IG, Eggen A, Gautier M. 2008. Fine mapping of quantitative trait loci affecting female fertility in dairy cattle on BTA03 using dense Single-Nucleotide Polymorphism map. Genetics 178, 2227-2235

Ducos A. 2001. Mortalité embryonnaire et génétique. Proc : AERA, Paris, 4 décembre 2001, 51-65

Ducos A, Berland HM, Pinton A, Séguéla A, Brun-Baronnat C, Darré A, Darré R. 2000. Contrôle chromosomique des populations animales d'élevage. INRA Productions Animales 13, 25-35

Ducos A, Eggen A, Darre R, Boichard D. 2002. Les anomalies génétiques dans l'espèce bovine. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 9, 85-91

Dunne LD, Diskin MG, Sreenan JM. 2000. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. Animal Reproduction Science 58, 39-44

Edmonson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. Journal of Dairy Science 72, 68-78

Ehrhardt RA, Slepetis RM, Siegal-Willott J, van Amburgh ME, Bell AW, Boisclair YR, 2000. Development of a specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. Journal of Endocrinology 166, 519-528

El-Din Zain A, Nakao T, Abdel Raouf M, Moriyoshi M, Kawata K, Moritsu Y. 1995. Factors in the resumption of ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. Animal Reproduction Science 38, 203-214

Ennuyer M. 2005. Approche française globale du suivi de fécondité. Le Point Vétérinaire, numéro spécial Reproduction des ruminants : maîtrise des cycles et pathologie, 36, 42-49

Enomoto S, Kondo S, Kamimura S, Hamana K. 1993. Viability of transferred bovine embryos monitored by early pregnancy factor (EPF). Journal of Reproduction and Development 39, 57–60

Evans AC. 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. Reproduction and Domestic Animal 38, 240-246

Fagan JG, Roche JF. 1986. Reproductive activity in postpartum dairy cow based on progesterone concentrations in milk or rectal examination. Irish Veterinary Journal 40, 124-131

Fahey J, McNamara S, Murphy JJ, O'Callaghan D, Mee JF. 2005. Effects of diets fed to dairy cows before and after calving on their plasma progesterone profiles after calving. The Veterinary Record 156, 505-509

Farin CE, Imakawa K, Hansen TR, MacDonnell JJ, Murphy CN, Farin PW, Roberts RM. 1990. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. Biology of reproduction 43, 210-218

Farin CE, Farmer WT, Farin PW. 2010. Pregnancy recognition and abnormal offspring syndrome in cattle. Reproduction, Fertility and Development 22, 75-87

Fazeli A. 2008. Maternal communication with gametes and embryos. Theriogenology 70, 1182-1187

Fenwick MA, Llewellyn S, Fitspatrick R, Kenny DA, Murphy JJ, Patton J, Wathes DC. 2008. Negative energy balance in dairy cows is associated with specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct. Reproduction 135, 63-75

Foldi J, Kulcsar M, Pecsi A, Huyghe B, de Sa C, Lohuis JA, Cox P, Huszenicza G. 2006. Bacterial complications of postpartum uterine involution in cattle. Animal Reproduction Science, 96, 265-281

Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development : activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Animal of Reproduction Science 78, 135-163

Fourichon C, Seegers H, Bareille N, Beaudeau F 1999. Effects of disease on milk production in the dairy cow : a review. Preventive Veterinary Medecine 41, 1-35

Fourichon C, Seegers H, Malher X. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. Theriogenology, 53, 1729-1759

Fourichon C, Seegers H, Bareille N, Beaudeau F, 2001. Estimation des pertes et de l'impact économiques consécutifs aux principaux troubles de santé en élevage bovin laitier. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, 8, 137-143

Fournier JL, Humblot P. 1989. Fréquence et facteurs de variations de la mortalité embryonnaire tardive chez la vache laitière. Elevage et Insémination 229, 3-10

Fournier R, Chastant-Maillard S. 2006. Traitement des métrites chroniques chez la vache. Le Point Vétérinaire, numéro spécial Reproduction des ruminants : gestation, néonatalogie et post-partum, 37, 122-128

Frajblat M, Butler WR. 2000. Metabolic effects of insulin and IGF-1 in bovine ovarian follicle wall culture. Biology of Reproduction 62, Suppl1, 293 (abstract)

Franklin ST, Young JW, Nonnecke BJ. 1991. Effects of ketones, acetate, butyrate, and glucose on bovine lymphocyte proliferation. Journal of Dairy Science 74, 2507-2514

Fréret S. 2007. Variation des apports alimentaires, statut métabolique et production d'embryons chez la vache laitière superovulée. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement p 195

Fréret S, Chevallier A, 2002. Fecondité des vaches laitières: point de vue d'une coopérative d'insémination artificielle. Evolution depuis 1987 sur la zone de l'URCO. A.E.R.A. 11-16

Fréret S, Charbonnier G, Congnard V, Jeanguyot N, Dubois P, Levert J, Humblot P, Ponsart C, 2005. Expression et détection des chaleurs, reprise de la cyclicité et perte d'état corporel après vêlage en élevage laitier. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants. 12, 149-152

Fréret S, Ponsart C, Rai DB, Jeanguyot N, Paccard P, Humblot P. 2006. Enquête FERTILIA : facteurs de variation de la fertilité en 1ère insémination et des taux de mortalité embryonnaire en élevages laitiers Prim'Holstein. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants. 13, 281-284

Fricke PM. 2002. Scanning the future-Ultrasonography as a reproductive management tool for dairy cattle. Journal of Dairy Science. 85, 1918-1926

Friedrich M, Holtz W. 2010. Establishment of an ELISA for measuring bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum or milk and its application for early pregnancy detection. Reproduction in Domestic Animal 45, 142-146

Friggens NC, Chagunda MGC. 2005. Prediction of the reproductive status of cattle on the basis of milk progesterone measures: model description. Theriogenology 64, 155-190

Friggens NC, Ridder C, Lovendahl P. 2007. On the use of milk composition measures to predict the energy balance of dairy cows. Journal of Dairy Science. 90, 5453-5467

Friggens NC, Bjerring M, Ridder C, Hojsgaard S, Larsen T. 2008. Improved detection of reproductive status in dairy cows using milk progesterone measurements. Reproduction in Domestic Animal. 43 (Suppl.2) 113-121

Friggens NC, Labouriau R. 2010. Probability of pregnancy as affected by oestrus number and days to first oestrus in dairy cows of three breeds and parities. Animal Reproduction Science. 118, 155-162

Fritz S, Colleau JJ, Druet T, Boscher MY, rossignol MN, Malafosse A, Boichard D. 2003. Mise en place d'une Sélection Assistée par Marqueurs dans les trois principales races bovines laitières françaises. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 10, 53-56

Fritz S, Guillaume F, Croiseau P, Baur A, Hoze C, Dassonneville R, Boscher MY, Journaux L, Boichard D, Ducrocq V. 2010. Mise en place de la Sélection Génomique dans les trois principales races françaises de bovins laitiers. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, 17, 455-458

Fulkerson WJ, Wilkins J, Dobos RC, Hough GM, Goddard ME, Davison T. 2001. Reproductive performance in Holstein-Friesian cows in relation to genetic merit and level of feeding when grazing pasture. Animal Science 73, 397-406

Funston RN, Seidel GE Jr, Klindt J, Roberts AJ. 1996. Insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding proteins in bovine serum and follicular fluid before and after the preovulatory surge of luteinizing hormone. Biology of Reproduction 55, 1390-1396

Gandy B, Tucker W, Ryan P, Willians A, Tucker A, Moore A, Godfrey R, Willard S. 2001. Evaluation of the early conception factor (ECF) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. Theriogenology 56, 637-647

Gao H, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Li X, Bazer FW. 2009. Select nutrients in the ovine uterine lumen. I. Amino acids, glucose, and ions in uterine luminal flushing of cyclic and pregnant ewes. Biology of Reproduction 80, 86-93

Garmo RT, Martin AD, Thuen E, Havrevoll O, Steinshamn H, Prestløkken E, Randby A, Eknæs M, Waldmann A, Reksen O. 2009. Characterization of progesterone profiles in fall-calving Norwegian Red cows. Journal of Dairy Science 92, 4919-4928

Gatien J, Ponsart C. 2009. CIDR : peut-on inséminer systématiquement 56 heures après le retrait ?. Bulletin Technique d'Insémination Animale, 133, 41-42

Gatien J. 2010. PRID® Delta : une IA 48 heures ou 56 heures après le retrait ?. Bulletin Technique d'Insémination Animale 137, 33-35

Gautam G, Nakao T, Yamada K, Yoshida C. 2010. Defining delayed resumption of ovarian activity postpartum and its impact on subsequent reproductive performance in Holstein cows. Theriogenology 73, 180-189

Gautier M. 2003. Cartographie fine de QTL chez les bovins laitiers. In : Laboratoire de Génétique Biochimique et de Cytogénétique-Département de Génétique Animale. AgroParisTech, Jouy en Josas

Gautier M, Fritz S, Grohs C, Boichard D, Eggen A. 2003. Cartographie fine d'un QTL intervenant sur la fertilité femelle chez les bovines laitiers. Proc Rencontres, Recherches, Ruminants 10, 41-44

Ghaffari Laleh V, Ghaffari Laleh R, Pirany N, Moghadaszadeh ahrabi M. 2008. Measurement of EFP for detection of cow pregnancy using rosette inhibition test. Theriogenology 70, 105-107

Gibb MJ, Ivings WE, Dhanoa MS, Sutton JD. 1992. Changes in body components of autumn-calving Holstein-Friesian cows over the first 29 weeks of lactation. Animal Production 55,339-360

Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. 2005. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. Theriogenology, 64, 1879-1888

Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. 1989. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. Biology of Reproduction 41, 247-254

Giudice LC. 1992. Insulin-Like Growth Factors and ovarian follicular development. Endocrine Reviews 13, 641-669

Givens MD, Marley MSD. 2008. Infectious causes of embryonic and fetal mortality. Theriogenology. 70, 270-285

Goddard ME, Hayes BJ. 2009. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. Nature Reviews Genetics. 10, 381-391

Gorzecka J, Codrea MC, Friggens NC, Callesen H. 2011. Progesterone profiles around the time of insemination do not show clear differences between of pregnant and not pregnant dairy cows. Animal Reproduction Science 123, 14-22

Govoni N, Galeati G, Castellani G, Tamanini C. 2005. Leptin concentrations in plasma and follicular fluid from prepubertal gilts as influenced by fasting, refeeding and insulin. Hormone and Metabolic Research 37, 152-158

Green JA, Roberts RM. 2006. Etablishment of an ELISA for the detection of native bovine pregnancy-associated glycoproteins secreted by trophoblast binucleate cells. Methods in Molecular Medecine 122, 321-330

Green JC, Volkmann DH, Poock SE, MacGrath MF, Ehrhardt M, Moseley AE, Lucy MC. 2009. Technical note: A rapid enzyme-linked immunosorbent assay blood test for pregnancy in dairy and beef catlle. Journal of Dairy Science 92, 3819-3824

Grimard B, Humblot P, Ponter AA, Mialot JP, Sauvant D, Thibier M. 1995. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. Journal of Reproduction and Fertility 104, 173-179

Grimard B, Humblot P, Ponter AA, Chastant S, Constant F, Mialot JP. 2003. Efficacité des traitements de synchronisation des chaleurs chez les bovins. INRA Productions Animales, 16, 211-227 http://www.inra.fr/internet/Produits/PA/

Grimard B, Fréret S, Seegers H, Ponsart C, Chevallier A, Pinto A, Humblot P. 2004a. Qualité de la détection des chaleurs lors de la surveillance des retours à 3 semaines en troupeaux bovins laitiers à faible fertilité. In H. Seegers Ed, Journée bovine nantaise, Nantes, 7 octobre 2004, 144-145, Poster

Grimard B, Disenhaus C, Mialot JP. 2004b. Premier œstrus détecté précocement mais suivi d'anœstrus apparent chez la vache laitière. In : Seegers H. Ed, Journée Bovine Nantaise, Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, 7 octobre 2004, 89-93

Grimard B, Disenhaus C. 2005. Les anomalies de la reprise de la cyclicité après vêlage. Le Point Vétérinaire, Numéro spécial Reproduction des Ruminants : maîtrise des cycles et pathologie 36, 16-21

Grimard B, Fréret S, Seegers H, Ponsart C, Chevallier A, Humblot P. 2005. Sensitivity and specificity of visual oestrus detection 3 weeks after first AI in low fertility dairy herds in France. 9th Annual Conference of The European Society for Domestic Animal Reproduction. 1-3 September, Murcia, Reproduction in Domestic Animals, 40, (4), p 358, Poster.

Grimard B, Fréret S, Chevallier A, Pinto A, Poinsart C, Humblot P. 2006. Genetic and environment factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. Animal Reproduction Science 91, 31-44

Grimard B, Ponsart C, Freret S, Delize F, Chambon G, Driancourt M, Fournier R, Ptaszynska M, Rosso V. 2008a. Effect of the AI Timing after Estrus Synchronization with Crestar SO on the Fertility of Induced Estrus in Charolais Heifers. Proc: XXV World Buiatrics Congress, Budapest, July 6-11, Abstract 916

Grimard B, Ponsart C, Humblot P, Gipoulou C, Rosso V, Fournier R, Ptaszynska M, Driancourt M. 2008b. Comparison of Fertility Results with two Progestin based Synchronization Methods in French Conditions. Proc: XXV World Buiatrics Congress, Budapest, July 6-11, Abstract 918

Grimard B, Marquant-Leguienne B, Remy D, Richard C, Nuttinck F, Humblot P, Ponter AA. The IGF system and oocyte production in postpartum dairy cows: effect of parity, relationships with subsequent fertility. Theriogenology, publication en cours

Gröhn Y.T, Rajala-Schultz PJ. 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. Animal Reproduction Science 60-61, 605-614

Guillaume F, Ben Jemaa S, Fritz S, Druet T, Gautier M. 2005. Développement d'indicateurs alternatifs de la fertilité femelle chez les bovins laitiers. Application à la cartographie fine de QTL. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 12, 158

Guillaume F, Gautier M, Ben Jemaa S, Fritz S, Eggen A, Boichard D, Druet T. 2007. Refinement of two female fertility QTL using alternative phenotypes in French Hosltein dairy cattle. Animal Genetics 38, 72-74

Guillaume F, Fritz S, Croiseau P, Legarra A, Robert-Granié C, Colombani C, Patry C, Boichard D, Ducrocq V. 2009. Modèles d'évaluation génomique : application aux populations bovines laitières françaises. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, 16, 399-406

Guillomot M. 2001. L'implantation du blastocyste. In La Reproduction chez les mammifères et l'Homme. Eds C Thibault et MC Levasseur. Paris, France: Inra-Editions-Ellipses pp.457-478

Guillomot M, Turbe A, Hue I, Renard JP. 2004. Staging of ovine embryos and expression of the T-box genes Brachyury and Eomesodermin around gastrulation. Reproduction 127, 491-501

Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R. 2000. Growth and antrum formation of bovine antral follicles in long-term culture in vitro. Biology of Reproduction 62, 1322-1328

Hansen LB, Freeman AE, Berger PJ. 1983. Association of heifer fertility with cow fertility and yield in dairy cattle. Journal of Dairy Science 66, 306-314

Hansen PJ, Soto P, Natzke RP. 2004. Mastitis and fertility in cattle - possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality. American Journal of Reproduction and Immunology 51, 294-301

Hansen TR, Austin KJ, Perry DJ, Pru JK, Teixheira MG, Johnson GA. 1999. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. Journal of Reproduction and Fertility 54, 329-339

Hanzen C, Pieterse M, Scenczi O, Drost M. 2000. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. The Veterinary Journal 159, 161-170

Hanzen C. 2001. Facteurs de risque de la mortalité embryonnaire chez la vache. Proc : AERA. 67-74

Harris T, Battaglia DF, Brown ME, Brown MB, Carlson NE, Viguié C, Williams CY, Karsh FJ. 2000. Prostaglandins mediate the endotoxin-induced suppression of pulsatile gonadotropin-releasing hormone and luteinizing hormone secretion in the ewe. Endocrinology 141, 1050-1058

Hasler JF. 2006. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. Theriogenology 65, 4-16

Herath S, Lilly ST, Fischer DP, Williams EJ, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. 2009. Bacterial lipopolysaccharide induces an endocrine switch from prostaglandin F2α to prostaglandin E2 in bovine endometrium. Endocrinology. 150, 1912-1920

Heuer C, Van Straalen WM, Schukken YH, Dirkzwager A, Noordhuizen JPTM. 2000. Prediction of energy balance in a high yielding dairy herd in early lactation: model development and precision. Livestock Production Science 65, 91-105

Hoeben D, Heyneman R, Burvenich C. 1997. Elevated levels of beta-hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. Veterinary Immunology and Immunopathology 58, 165-170

Höglund JK, Guldbrandtsen B, Su G, Thomsen B, Lund MS. 2009. Genome scan detects quantitative trait loci affecting fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. Journal of Dairy Science 92, 2136-2143

Holmberg M, Andersson-Eklund L. 2006. Quantitative trait loci affecting fertility and calving traits in Swedish dairy cattle. Journal of Dairy Science 89, 3664-3671

Holmberg M, Sahana G, Andersson-Eklund L. 2007. Fine mapping of a quantitative trait locus on chromosome 9 affecting non-return rate in Swedish dairy cattle. Journal of Animal Breeding and Genetics 124, 257-263

Homa ST, Brown CA. 1992. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. Journal of Reproduction Fertility 94, 153-160

Hommeida A, Nakao T, Kubota H. 2005. Onset and duration of luteal activity postpartum and their effect on first insemination conception rate in lactating dairy cows. Journal of Veterinary Medecine and Science 67, 1031-1035

Horan B, Mee JF, O'Connor P, Rath M, Dillon P. 2005. The effect of strain of Holstein-Friesian cow and feeding system on postpartum ovarian function, animal production and conception rate to first service. Theriogenology 63, 950-971

Houben EH, Dijkhuizen AA, Van Arendonk JA, Huirne RB. 1993. Short- and long-term production losses and repeatability of clinical mastitis in dairy cattle. Journal of Dairy Science 76, 2561-2578

Humblot P. 1986. La mortalité embryonnaire chez les bovins. In: Henry Suchet J., Mintz M., Spira A. Recherche récente sur l'épidémiologie de la fertilité. Facteurs de risque-prévention. S.F.E.F Paris Masson Editions. 213-242

Humblot P. 1991. Signaux embryonnaire et contrôle de la gestation des ruminants. Revue de Médecine Vétérinaire. 167, 193-202

Humblot P. 2000. The frequency and variation of embryonic mortality, and the use of Pregnancy Specific Proteins to monitor pregnancy failures in ruminants. Proc: 3rd ESDAR. 19-27

Humblot P. 2001. 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

Humblot P, Dalla Porta MA. 1984. Effect of conceptus removal and intra-uterine administration of conceptus tissue on luteal function in the cow. Reproduction Nutrition Development 24, 529-541

Humblot P, Camous S, Martal J, Charlery J, Jeanguyot N, Thibier M, Sasser G. 1988a. Pregnancy-specific protein B, progesterone concentrations and embryonic mortality during early pregnancy in dairy cows. Journal of Reproduction and Fertility 83, 215-223

Humblot P, Camous S, Martal J, Charlery J, Jeanguyot N, Thibier M, Sasser RG. 1988b. Diagnosis of pregnancy by radioimmunoassay of a pregnancy-specific protein in the plasma of dairy cows. Theriogenology 30, 257-268

Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarre AS, Joly CG, Herrmann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H, Callesen H, 2005. Effect of stage of follicular growth during superovulation on developemental competence of bovine oocytes. Theriogenology 63, 1149-1166

Humblot P, Amigues Y, Ponsart C, Gatien J, Ledoux D, Fritz S. 2008 Mesures phénotypiques et étude du polymorphisme de gènes candidats de QTL de fertilité femelle en race Prim'Holstein. Seminaire AGENAE/GENANIMAL 20, 21, 22 octobre 2008, La Rochelle, Fr

Humblot P, Amigues Y, Ponsart C, Gatien J, Ledoux D, Grimard B, Eggen A, Fritz S, Boichard D. 2009. Mesures phénotypiques et étude du polymorphisme de gènes candidats de QTL de fertilité femelle en race Prim'Holstein. Seminaire AGENAE/GENANIMAL 21, 22, 23 octobre 2009, Tour, Fr

Humblot P, Le Bourhis D, Fritz S, Colleau JJ, Gonzalez C, Guyader-Joly C, Malafosse A, Heyman Y, Amigues Y, Tissier M, Ponsart C. 2010. Reproductive technologies and genomic selection in cattle. Veterinary Medicine International doi : 10.4061/2010/192787

Huston K. 1993. Heritability and diagnosis of congenital abnormalities in food animals. Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice 9, 1-9

Huszenicza G, Haraszti J, Molnar L, Solti L, Fekete S, Ekes K, Yaro AC. 1988. Some metabolic characteristics of dairy cows with different post partum ovarian function. Journal of Veterinary Medecine 35, 506-515

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Theriogenology 47, 23-32

Institut de l'élevage et Institut Nationale de Recherche Agronomique. 2001. Indexation Bovine Laitière n°2001-5, note du 6 juin 2001. La révision des index de synthèse UPRA ISU (Juin 2001). http://www.inst-elevage.asso.fr/IMG/pdf/IBL_2001-5mel.pdf. Consulté le 18 mars 2011

Institut de l'Elevage et Institut National de la Recherche Agronomique. 2007. Indexation Bovine Laitière 2007-4 note du 12/06/2007. http://www.inst-elevage.asso.fr/html1/spip.php?page=article_espace&id_espace=935&id_article=13466, consulté le 25/06/2010

Institut de l'Elevage. 2010. Résultats du contrôle laitier, espèce bovine.2009. Ed Institut de l'Elevage, Paris, 105 p, http://www.inst-elevage.asso.fr/html1/IMG/pdf_Partie_bovine_CL_2009.pdf, consulté le 15 novembre 2010

Institut de l'Elevage et Institut National de la Recherche Agronomique 2010a. Palmarès des taureaux. http://www.inst-elevage.asso.fr/html1/, consulté en octobre 2010

Institut de l'Elevage et Institut National de la Recherche Agronomique. 2010b. Indexation Bovine Laitière n°2010-6. L'évaluation génétique de nouveaux caractères, note du 17/06/2010, http://www.inst-elevage.asso.fr/spip.php?article18662, consulté le 18/02/2011

Institut National de la Recherche Agronomique et Union Nationale des Coopératives d'Insémination Animale. 1990. Blastographie. Elevage et insemination 235, 3-39

Institut Nationale de la Recherche Agronomique 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprin. 1st edition. Inra edition, Fr

Institut Nationale de la Recherche Agronomique 2010. Alimentation des bovins, ovins et caprin. Besoins des animaux-Valeurs des aliments. Tables INRA 2010. Edition remaniée. Edition QUAE

Ireland JJ, Mihm M, Austin E, Diskin MG, Roche JF. 2000. Historical perspective of turnover of dominant follicles during bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. Journal of Dairy Science 83, 1648-1658

Janson L, Andreasson B. 1981. Studies on fertility traits in Swedish dairy cattle. IV. Genetic and phenotypic correlation between milk yield and fertility. Acta Agriculturae Scandinavica, Section A-Animal Science 31, 313-322

Jordan ER, Fourdraine RH. 1993. Characterization of the management practices of the top milk producing herds in the country. Journal of Dairy Science 76, 3247-3256

Jorritsma R, Wensing T, Kruip TAM, Vos PLAM, Noordhuizen JPTM 2003. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. Veterinary Research 34, 11-26

Jorritsma R, César M, Hermans JT, Kruitwagen CLJJ, Vos PLAM, Kruip TAM. 2004. Effects on non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes *in vitro.* Animal Reproduction Science 81, 225-235

Kawashima C, Sakaguchi M, Suzuki T, Sasamoto, Takahashi Y, Matsui M, Miyamoto A. 2007. Metabolic profiles in ovulatory and anovulatory primiparous dairy cows during the first follicular wave postpartum. Journal of reproduction and development 53, 113-120

Kaye PL. 1997. Preimplantation growth factor physiology. Reviews of Reproduction 2, 121-127

Kellogg DW, Pennington JA, Johnson ZB, Panivivat R. 2001. Survey of management practices used for the highest producing DHI herds in the United States. Journal of Dairy Science 84(E.Suppl.), E120-E127

Kelly JM, Kleemann DO, Rudiger SR, Walker SK. 2007. Effects of grade of oocyte-cumulus complex and the interactions between grades on the production of blastocysts in the cow, ewe and lamb. Reproduction in Domestic Animal, 42, 577-582

Kendrick KW, Bailey TL, Garst AS, Pryor AW, Ahmadzadeh A, Akers RM, Eyestone WE, Pearson RE, Gwazdauskas FC. 1999. Effects on energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. Journal of Dairy Science 82, 1731-1740

Kennedy J, Dillon P, O'Sullivan K, Buckley F, Rath M. 2003. The effect of genetic merit for milk production and concentrate feeding level on the reproductive performance of Holstein-Friesian cows in a grass-based system. Animal Science 76, 297-308

Kerbrat S et Disenhaus C 2000. Profils d'activité lutéale et performances de reproduction du vêlage à la première insémination. Proc : Rencontres Recherches Ruminants 7, 227-230

Kerbrat S et Disenhaus C. 2004. A proposition from an updated behavioural characterisation of the oestrus period in dairy cows. Applied Animal Behaviour Science. 87, 223-238

Khatkar MS, Thomson PC, Tammen I, Raadsma HW. 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis Genetics Selection Evolution. 36, 163–190

King WA. 1990. Chromosome abnormalities and pregnancy failures in domestic animals. Advances in Veterinary Science and Comparative Medecine 34, 229-250

Knight PG, Glister C. 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. Reproduction 121, 503-512

Kölle S, Reese S, Kummer W. 2010. New aspects of gamete transport, fertilization, and embryonic development in the oviduct gained by means of live cell imaging. Theriogenology 73, 786-795

Komaragiri Madhav VS, Casper DP, Erdman RA. 1998. Factors affecting body tissue mobilisation in early lactation dairy cows. II. Effect of dietary fat on mobilisation of body fat and protein. Journal of Dairy Science 81, 169-175

Konigsson K, Savoini G, Govoni N, Invernizzi G, Prandi A, Kindahl H, Veronesi MC. 2008. Energy balance, leptin, NEFA and IGF-1 plasma concentration and resumption of post partum ovarian activity in Swedish red and white breed cows. Acta Veterinaria Scandinavica doi:10.1186/1751-0147-50-3

Kubish HM, Larson MA, Ealy AD, Murphy CN, Roberts RM. 2001. Genetic and environmental determinants of interferon-tau secretion by in vivo-and in vitro-derived bovine blastocysts. Animal Reproduction Science 66, 1-13

Kühn C, Bennewitz J, Reinsch N, Xu N, Thomsen H, Looft C, Brockmann GA, Schwerin M, Weimann C, Hiendleder S, Erhardt G, Medjugorac I, Förster M, Brenig B, Reinhardt F, Reents R, Russ I, Averdunk G, Blümel J, Kalm E. 2003. Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. Journal of Dairy Science 86, 360-368

Labèrnia J, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Lopez-Bejar M, Rutllant J. 1996. Influence of management factors on pregnancy attrition in dairy cattle. Theriogenology. 45, 1247-1253

Lamming GE, Bulman DC, 1976. The use of milk progesterone radioimmunoassay in the diagnosis and treatment of subfertility in dairy cows. British Veterinary Journal 132, 507-517

Lamming GE, Darwash AO. 1998. The use of progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. Animal Reproduction Science 52, 175-190

Landau S, Braw-Tal R, Kaim M, Bor A, Bruckental I. 2000. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. Animal Reproduction Science 64, 181-197

Lander ES, Botstein D. 1989. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121, 185-199

Le Mézec P, Barbat A. 2007. Un répit dans la baisse de la fertilité. Bulletin Technique de l'Insémination Animale 126, 15-18

Le Mézec P. 2010. Le cheptel laitier français : Evolution génétique et phénotypique 1989-2009, Prévision d'évolution génétique 2009-2015. Compte-rendu 001072033, Institut de l'élevage, Département Génétique, Service Aptitudes et Sélection des races laitières. http://www.inst-elevage.asso.fr/IMG/pdf_CR_1072033-cheptel_lait_franc_1989-2009.pdf. consulté le 21 avril 2011

Le Mézec P, Barbat-Leterrier A, Barbiers S, de Cremoux R, Gion A, Ponsart C. 2010a. Evolution de la fertilité et impact de la FCO sur la reproduction du cheptel laitier français. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, 17, 157-160

Le Mézec P, Barbat-Leterrier A, Barbier S, Gion A, Ponsart C. 2010b. Fertilité des principales races laitières-Bilan 1999-2008. Compte-rendu n° 001072030. Institut de l'Elevage, D épartement Génétique-Servive Aptitudes et sélection des races laitières. 35 p http://www.fcoinfo.fr/IMG/pdf/Fertilite_des_principales_races_laitieres_-_Bilan_1999_-_2008_P._Le_Mezec_Avril_2010.pdf, consulté le 18 avirl 2011

Le Roy P, Elsen JM. 2000. Principes de l'utilisation des marqueurs génétiques pour la détection des gènes influençant les caractères quantitatifs. INRA Productions Animales, hors série Génétique moléculaire : principe et application aux populations animales, 211-215

LeBlanc SJ. 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance : a review. The veterinary Journal, 176, 102-114

Ledoux D, Humblot P, Constant F, Ponter AA, Grimard B. 2006. Echecs précoces de gestation chez la vache laitière. Le Point vétérinaire, numéro spécial : Reproduction des ruminants : gestation, néonatalogie et post-partum 37, 50-55

Lefebvre R, Fritz S, Ledoux D, Gatien J, Genestout L, Rossignol MN, Grimard B, Boichard D, Humblot P, Ponsart C. 2011. GENIFER: cartographie fine et effets de QTL de fertilité en race bovine Holstein. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants, affiche acceptée

Leroy JLMR, Vanholder T, Delange JR, Opsomer G, van Soom A, Bols PEJ, Dewulf J, de Kruif A, 2004. Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. Theriogenology 62, 1131-1143

Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, de Kruif A, Genicot G, van Soom A, 2005. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on development capacity of bovine oocytes in vitro. Reproduction 130, 485-495

Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IGF, Bols PEJ. 2008a. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. Reproduction Domestic Animal 43, 612-622

Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Goovaerts IGF, Bols PEJ. 2008b Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II Mechanisms linking nutrition and reduced oocytes and embryo quality in high-yielding dairy cows. Reproduction Domestic Animal 43, 623-632

Leymarie P, Martal J. 2001. Du corps jaune cyclique au corps jaune gestatif. In La Reproduction chez les mammifères et l'Homme. Eds C Thibault et MC Levasseur. Paris, France: Inra-Editions-Ellipses pp. 479-504

Liefers SC, Veerkamp RF, te Pas MFW, Delavaud C, Chilliard Y, van der Lende T. 2003. Leptin concentrations in relation to energy balance, milk yield, intake, live weight and estrus in dairy cows. Journal of Dairy Science 86, 799-807

Liquet B, Commenges D. 2001. Correction of the p-value after multiple coding of an explanatory variable in logistic regression. Statistics in Medicine. 20, 2815-2826

Liu Z, Jaitner J, Reinhardt F, Pasman E, Rensing S, Reents R. 2008. Genetic evaluation of fertility traits of dairy cattle using a multiple-trait animal model. Journal of Dairy Science 91, 4333-4343

Llewellyn S, Fitspatrick R, Kenny DA, Murphy JJ, Scaramuzzi RJ, Wathes DC. 2007. Effect of negative energy balance on the insulin-like growth factor system in pre-recruitement ovarian follicles of postpartum dairy cows. Reproduction 133, 627-639

Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Rutllant J, Lopez-Bejar M. 2001. Persistent ovarian follicles in dairy cows: a therapeutic approach. Theriogenology 56, 649-659

Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Rutllant J, Lopez-Bejar M. 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. Theriogenology 57, 1251-1261

Lopez-Gatius F, Yaniz J, Madriles-Helm D. 2003. Effect of body condition score and score change on the reproductive performance of dairy cows: a meta-analysis. Theriogenology 59, 801-812

Lopez-Gatius F, Garbayo JM, Santolaria P, Yaniz JL, Almeria S, Ayad A, de Sousa NM, Beckers JF. 2007. Cross-breed pregnancies were associated with higher plasmatic pregnancy-associated glycoprotein (PAG) concentration throughout gestation in Neospora-seropositive dairy cows. Theriogenology 67, 502-508

Lucy MC. 2001. Reproductive loss in high producing dairy cattle: where it will end? Journal of Dairy Science 84, 1277-1293

Lucy MC, 2003. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. Reproduction Suppl 61, 415-427

Lucy MC, 2007. The bovine dominant ovarian follicle. Journal of Animal Science 85, E89-E99

Lucy MC, Beck J, Staples CR, Head HH, de La Sota RL, Thatcher WW. 1992. Follicular dynamics, plasma metabolites, hormones and insulin-like growth factor I (IGF-I) in lactating cows with positive or negative energy balance during the preovulatory period. Reproduction Nutrition Development 32, 331-341

Lucy MC, Jiang H, Kobayashi Y. 2001. Changes in the somatotrophic axis associated with the initiation of lactation. Journal of Dairy Science 84-E113-E119

MacDonald KA, Roche J. 2004. Condition scoring made easy. In Condition scoring made easy, Condition scoring dairy herds. Dexcel Ltd., Hamilton, New Zealand, p36

MacNatty KP, Juengel JL, Wilson T, Galloway SM, Davis GH, Hudson NL, Moeller CC, Cranfield M, Reader KL, Laitinen MPE, Groome NP, Sawyer HR, Ritvos O. 2003. Oocyte-derived growth factors and ovulation rate in sheep. Reproduction Suppl 61, 339-351

Maddox-Hyttel P, Alexopoulos NI, Vajta G, Lewis I, Rogers P, Cann L, Callesen H, Tveden-Nyborg P, Trounson A. 2003. Immunohistochemical and ultrastructural characterization of the initial post-hatching development of bovine embryos. Reproduction 125, 607-623

Maillard R, Chastant-Maillard S. 2002. Viroses et reproduction. Proc: Société Française de Buiatrie 242-261

Malher X, Beaudeau F, Philipot JM. 2006. Effects of sire and dam genotype for complex vertebral malformation (CVM) on risk of return-to-service in Hosltein dairy cows and heifers. Theriogenology 65, 1225-1225

Mann GE, Keatinge R, Hunter M, Hedley BA, Lamming GE. 2005. The use of milk progesterone to monitor reproductive function in beef suckler cows. Animal Reproduction Science. 88, 169-177

Mann GE, Lamming GE. 2001. Relationship between maternal environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. Reproduction 121, 175-180

Markusfeld O. 1987. Incative ovaries in high-yielding dairy cows before service: aetiology and effect on conception. Veterinary Record 121, 149-153

Marquant-Le Guienne B. 1998. Petit atlas de l'ovocyte bovin. Elevage et Insémination 288, 24-30

Marquant-Le Guienne B, Humblot P. 1998. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. Theriogenology 49, 3-11

Martal J, Lacroix MC, Lourdes C, Saunier M, Winterberger-Torres S. 1979. Trophoblastin an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. Journal of Reproduction and Fertility 56, 63-73

Mattalia S, Barbat A, Danchin-Burge C, Brochard M, Le Mezec P, Minery S, Jansen G, Van Doormaal B, Verrier E. 2006. La variabilité génétique des huit principales races bovines laitières françaises: quelles evolutions, quelles comparaisons internationales? Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 13, 239-246

Maurer RR, Chenault JR. 1983. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. Journal Animal of Science 56, 1186-1189

Mayar JC. 2007. L'index de fertilité dans la stratégie d'accouplement. Bulletin Technique de l'Insémination Animale, 126, 33-34

Mayne CS, Verner M, McCaughey WJ, McCoy MA, Lennox SD, Catney DC, Kennedy B, Wylie ARG, Gordon FJ. 2001. An investigation of the key factors influencing reproductive performance in dairy herds in Northern Ireland. In : fertility of the high producing dairy cow, Occasional Publication n°26, British Society of Animal Science, Diskin Ed, (2), 323-329

Mazerbourg S, Bondy CA, Zhou J, Monget P. 2003. The insulin-Growth Factor System: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? A comparative species study. Reproduction in Domestic Animals 38, 247-258

Menezo Y, Renard JP. 1993. The life of the egg before implantation. In Reproduction in mammals and man. Eds C Thibault, MC Levasseur et RHF Hunter. Paris, France : Ellipses

Mermillod P. 2001. Croissance et maturation de l'ovocyte in vivo et in vitro. In La Reproduction des mammifères et de l'Homme. Eds C Thibault et MC Levasseur. Paris, France : INRA-Editions Ellipses pp. 348-366

Merton JS, de Roos AP, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PL, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. Theriogenology 59, 651-674

Mialon MM, Renand G, Camous S, Martal J, Ménissier F. 1994. Detection of pregancy by radioimmunoassay of a pregnancy serum protein (PSP60) in cattle. Reproduction Nutrition and Developemnt. 34, 65-72

Mialot JP, Laumonnier G, Ponsart C, Fauxpoint H, Barassin E, Ponter AA, Deletang F. 1999. Postpartum subestrus in dairy cows : comparison of treatment with prostaglandin $F_{2\alpha}$ or GnRH + prostaglandin $F_{2\alpha}$ + GnRH. Theriogenology, 52, 910-911

Mialot JP, Constant F, Chastant-Maillard S, Ponter AA, Grimard B. 2001. La croissance folliculaire ovarienne chez les bovins: nouveautés et applications. Proc : Journée Européennes de la Société Française de Buiatrie, Novembre 2001, Paris, France, 163-168

Michel A, Ponsart C, Fréret S, Humblot P. 2003. Influence de la conduite de la reproduction sur les résultats à l'insémination en période de pâturage. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 10, 131-134

Mihm M, Crowe MA, Knight PG, Austin EJ. 2002. Follicle wave growth in cattle. Reproduction in Domestic Animal 37, 191-200

Minery S. 2007. La fertilité dans les objectifs de sélection internationaux. Bulletin Technique de l'Insémination Animale 126, 23-26

Monget P, Besnard N, Huet C, Pisselet C, Moniaux D. 1996. Insulin-growth factor binding proteins and ovarian folliculogenesis. Hormone Research 45, 211-217

Monget P, Froment P, Moreau C, Grimard B, Dupont J. 2004. Les interactions métabolisme-reproduction chez les bovins, influence de la balance énergétique sur la fonction ovarienne. Proc : 23ème Congrès mondial de Buiatrie,11-16 juillet, Québec, Canada

Monget P, Le Bail PY. 2009. Le phénotypage des animaux : le nouveau défi ? P¨roc : Rencontres, Recherches, Ruminants 16, 407-409

Monniaux D, Caraty A, Clement F, Dalbiès-Tran R, Dupont J, Fabre S, Gérard N, Mermillod P, Monget P, Uzbekova S. 2009. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. INRA Production Animale 22, 59-76

Moor M, Rowson LE. 1966. Local uterine mechanism affecting luteal function in the sheep. Journal of Reproduction and Fertility 11, 307-310

Moreira da Silva F, Burvenich C, Paape MJ, Beckers JF, Leen AM. 1997. Effect of cortisol, estradiol, progesterone and pregnancy-associated glycoprotein on oxidative burst (OB) activity of bovine neutrophils (PMN) Proc: 32nd National Meeting of the Society for leukocyte Biology, Baltimore, USA, le 4-7 décembre 1997, 214

Moreira F, Risco CA, Pires MF, Ambrose JD, Drost M, Thatcher WW. 2000. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. Journal of Dairy Science 83, 1237-1247

Morgan G, Wooding FB, Godkin JD. 1993. Localization of bovine trophoblast protein-1 in the cow blastocyst during implantation: an immunological cryoultrastructural study. Placenta 14, 641-649

Morton H, Hegh V, Clunie GJ. 1974. Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test. Nature 249, 459-460

Morton H, Clunie G, Shaw F. 1979. A test for early pregnancy in sheep. Research Veterinary Science 26, 261-262

Morton H, Cavanagh AC, Athanasas-Platsis S, Quinn KA, Rolfe BE. 1992. Early pregnancy factor has immunosuppressive and growth factor properties 4, 411-422

Mounaix B, David V, Lucbert J. 2008. Impact technico-économique de la FCO dans les élevages ovins et bovins français. Ed.Institut de l'élevage, CR 130838028 113p

Muncie SA, Cassady JP, Ashwell MS. 2006. Refinement of quantitative trait loci on bovine chromosome 18 affecting health and reproduction in US Holsteins. Animal Genetics 37, 273-275

Munoz-Gutierrez M, Blache D, Martin GB, Scaramuzzi RJ, 2004. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I IGF receptor and IGF-binding protein 2 in sheep following five days of nutritional supplementation with glucose, glucosamine or lupins. Reproduction 128, 747-756

Murray J,G. 1959. Infertility in the cow and heifer. Veterinary Record. 71, 1128-1144

Nachtomi E, Eger S, Amir S, Schindler H. 1986. Postpartum nonesterified fatty acids concentration in blood plasma of dairy cows fed different energy levels prepartum. Nutrition Reports International 34, 521-527

Nakao T, Morisyoshi M, Kawata K. 1992. The effect of postpartum ovarian dysfunction and endometritis on subsequent reproductive performance in high and medium producing dairy cows. Theriogenology 37, 341-349

Nebel RL, MacGilliard ML. 1993. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. Journal of dairy science 76, 3257-3268

Nielsen US, Aamand GP, Andersen O, Bendixen C, Nielsen VH, Agerholm JS. 2003. Effects for complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle. Livestock Production Science 79, 233-238

Norman HD, Wright JR, Hubbard SM, Miller RH, Hutchison JL. 2009. Reproductive status of Holstein and Jersey cows in the United States. Journal of Dairy Science 92, 3517-3528

Northey DL, French LR. 1980. Effect of embryo removal and intra-uterine infusion of embryonic homogenates on the life span of the bovine corpus luteum. Journal of Animal Science 50, 298-302

Nuttinck F, Reinaud P, Tricoire H, Vigneron C, Peynot N, Mialot JP, Mermillod P, Charpigny G. 2002. Cyclooxygenase-2 is expressed by cumulus cells during oocyte maturation in cattle. Molecular Reproduction and Development 61, 93-101

Nuttinck F, Charpigny G, Mermillod P, Loosfelt H, Meduri G, Freret S, Grimard B, Heyman Y. 2004. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-oocyte complexes during oocyte maturation. Domestic Animal Endocrinology 27, 179-195

Olson JD, Ball L, Mortimer RJ, Farin PW, Adney WS, Huffman EM. 1984. Aspects of bacteriology and endocrinology of cows with pyometra and retained fetal membranes. American Journal of Veterinary Research 45, 2251-2255

Opsomer G, Coryn M, Deluyker H, De Kruif A. 1998. An analysis of ovarian dysfunction in high yielding dairy cows after calving based on progesterone profiles. Reproduction in Domestic Animals 33, 193-204

Opsomer G, Gröhn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, de Kruif A. 2000. Risk factors for postpartum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a fiel study. Theriogenology 53, 841-857

Paisley LG, Mickelsen WD, Anderson PB. 1986. Mechanism and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review. Theriogenology 25, 353-381

Patton J, Kenny DA, Mee JF, O'Mara FP,Wathes DC, Cook M, Murphy JJ. 2006. Effect of milking frequency and diet on milk production, energy balance, and reproduction in dairy cows. Journal of Dairy Science 89, 1478-1487

Paula-Lopes FF, Boelhauve M, Habermann FA, Sinowatz F, Wolf E. 2007. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. Biology and Reproduction 76, 532-541

Pedernera M, Garcia SC, Horagadoga A, Barchia I, Fulkerson WJ. 2008 Energy balance and reproduction on dairy cows fed to achieve low or high milk production on a pasture-based system. Journal of Dairy Science 91, 3896-3907

Pérényi Z, Szenci O, Sulon J, Drion PV, Bekers JF. 2002. Comparison of the ability of the three radioimmunoassay to detect pregnancy-associated glycoproteins in bovine plasma. Reproduction Domestic Animal 37, 100-104

Peter AT. 2004. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. Reproduction in Domestic Animals 39, 1-7

Peter AT, Vos PLAM, Ambrose DJ, 2009. Postpartum anestrus in dairy cattle. Theriogenology 71, 1333-1342

Petersson KJ, Gustafsson H, Strandberg E, Berglund B. 2006. Atypical progesterone profiles and fertility in Swedish dairy cows. Journal of Dairy Science 89, 2529-2538

Picard-Hagen N, Gayrard V, Berthelot X, Humblot P. 2001. Physiologie du développement embryonnaire chez les ruminants. Application au diagnostic de mortalité embryonnaire. Proc : A.E.R.A. 6-21

Pieterse MC, Szenci O, Willemse AH, Bajcsy CSA, Dieleman SJ, Taverne MAM. 1990. Early pregnancy diagnosis in cattle by means of linear-array real-time ultrasound scanning of the uterus and a qualitative and quantitative milk progesterone test. Theriogenology 33, 697-707

Pinto A, Bouca P, Chevallier A, Fréret S, Grimard B, Humblot P. 2000. Sources de variation de la fertilité et des fréquences de mortalité embryonnaire chez la vache laitière. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 7, 213-216

Pollot GE, Coffey MP. 2008. The Effect of genetic merit and production system on dairy cow fertility, measured using progesterone profiles and on-farm recording. Journal Dairy Science 91, 3649-3660

Ponsart C. 2010. National Statistical data of bovine embryo transfer activity in Europe (2009). Proc: Association Europeenne de Transfert Embryonnaire, 26ème colloque Scientifique 35, http://www.aete.eu/pdf_publication/29.pdf, consulté le 8 mars 2011

Ponsart C, Dubois P, Levert J, Fréret S, Jeanguyot N, Charbonnier G, Congnard V, Humblot P. 2005. Influence des profils de note d'état corporel sur la reprise de cyclicité après vêlage en élevage laitier. Journée Bovine Nantaise, octobre 2005, 98-101

Ponsart C, Fréret S, Charbonnier G, Giroud O, Dubois P, Humblot P. 2006. Description des signes de chaleurs et modalités de détection entre le vêlage et la première insémination chez la vache laitière. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 13, 273-276

Ponsart C, Frappat B, Le Mézec P, Fréret S, Seegers H, Paccard P, Humblot P. 2007. Une palette d'outils pour améliorer la reproduction des vaches laitières. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 14, 351-358

Ponsart C, Gatien J, Pozzi N, Humblot P, Guérin B. 2010. Relationship between bluetongue virus infection and fetal mortality in cattle. Reproduction, Fertility and Development 22, 253 (abstr. 190)

Ponter AA, Guélou K, Duvaux-Ponter C. 2005. Influence de l'alimentation sur la mortalité embryonnaire. Le Point Vétérinaire, numéro spécial Reproduction des ruminants : maîtrise des cycles et pathologie 36, 100-105

Pushpakumara PGA, Gardner NH, Reynolds CK, Beever DE, Wathes DC. 2003. Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. Theriogenology 60, 1165-1185

Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. 2004. Ovarian follicular growth and atresia : the relationship between cell proliferation and survival. Journal of Animal Science 82(Suppl).E), E40-E52

Rabiee AR, MacMillan KL, Schwarzenberger F, Wright PJ. 2002. Effects of level of feeding and progesterone dose on plasma and faecal progesterone in ovariectomized cows. Animal Reproduction Science 73, 185-195

Rajala-Schultz PJ, Frazer GS, 2003. Reproductive performance in Ohio dairy herds in the 1990s. Animal Reproduction Science 76, 127-142

Ranasinghe RMSBK, Nakao T, Yamada K, Koike K, Hayashi A, Dematawewa CMB. 2011. Characteristics of prolonged luteal phase identified by milk progesterone concentrations and its effects on reproductive performance in Holstein cows

Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL, 2003. Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anoestrus interval. Journal of Dairy Science 86, 1876-1894

Rizos D, Burke L, Duffy P, Wade M, Mee JF, O'Fareell KJ, MacSiurtain M, Boland MP, Lonergan P. 2005. Comparison between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitro. Theriogenology 63, 939-949

Robel P. 2001. La stéroïdogenèse: les enzymes et la régulation de leur expression génomique. In La reproduction chez les mammifères et l'Homme. Eds C Thibault et MC Levasseur, Paris, France. INRA Editions-Ellipses pp 144-154

Roberts RM, Chen Y, Ezashi T, Walker AM. 2008. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. Stem Cell and Development Biology 19, 170-177

Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. 2001. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. Reproduction. 122, 965-979

Roche JF, Diskin MG. 2001. Resumption of reproductive activity in the early postpartum period of cows. In : fertility of the high producing dairy cow, Occasional Publication n°26, British Society of Animal Science, Diskin Ed, (1), 31-42

Roche JF. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. Animal Reproduction Science 96, 282-296

Rodriguez-Martinez H, Hultgren J, Bage R, Bergqvist AS, Svensson C, Bergsten C, Lidfors L, Gunnarsson S, Algers B, Emanuelson U, Berglund B, Andersson G, Haard M, Lindhé B, Stalhammar H, Gustafsson H. 2008. Reproductive performance in high-producing dairy cows: can we sustain it under current practice? Ivis Reviews in Veterinary Medecine, Ed. International Veterinary Information Service, Ithaca NY

Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Woolliams JA, Lamming GE. 2000. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. Animal Science 70, 487-501

Ruder CA, Sasser RG. 1986. Source of bovine pregnancy specific protein B during the post-partum period and estimation of half-life of bPSPB. Journal of Animal Science (suppl 1) 335, abstract

Rukkwamsuk T, Wensing T, Kruip TAM. 1999. Relationship between triacylglycerol concentrations in the liver and first ovulation in postpartum dairy cows. Theriogenology 51, 1133-1142

Rutledge RG, Côté C. 2003. Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves. Nucleic Acids Research, 31, e93 DOI:10.1093/nar/gng093

Saha S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y. 2000. In vitro culture of bovine preantral follicles. Animal Reproduction Science 63, 27-39

Sahana G, Guldbrandtsen B, Bendixen C, Lund MS. 2010. Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. Animal Genetics doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02064.x

Saint-Dizier M. 2005. La détection des chaleurs chez la vache. Le Point Vétérinaire, numéro spécial : Reproduction des ruminants : 36, 22-27

Saint-Dizier M. 2007. Baisse de fertilité des bovins laitiers : mécanismes biologiques impliqués. Bulletin Technique de l'Insémination Animale 126, 10-14

Sakaguchi M, Sasamoto Y, Suzuki T, Takahashi Y, Yamada Y. 2006. Fate of cystic ovarian follicles and the subsequent fertility of early postpartum dairy cows. Veterinary Record 159, 197-201

Sakonju I, Enomoto S, Kamimura S, Hamana K. 1993. Monitoring bovine embryo viability with early pregnancy factor. Journal of Vetenary Medecine Science 55, 271–274

Samarutel J, Ling K, Waldmann A, Jaakson H, Kaart T, Leesmäe A. 2008. Field trial on progesterone cylces, metabolic profiles, body condition score and their relation to fertility in Estonian Holstein dairy cows. Reproduction in Domestic Animal 43, 457-463

Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17β in dairy cattle. Journal of Dairy Science 85, 2831-2842

Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN, 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronisation programs. Animal Reproduction Science 82-83, 513-535

Santos JE, Rutigliano HM, Sá Filho MF. 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. Animal Reproduction Science 110, 207-221

Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. Journal of Dairy Science 85, 2803-2812

Sartori R, Bastos MR, Wiltbank MC. 2010. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. Reproduction, Fertility and Development 22, 151-158

Sasser RG, Ruder CA, Ivani KA, Butler JE, Hamilton WC. 1986. Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. Biology of reproduction 35, 936-942

Savio JD, Boland MP, Hynes N, Roche JF. 1990. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. Journal of Reproduction and Fertility 88, 569-579

Schams D, Berisha B. 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle – an overview. Reproduction of Domestic Animal 39, 241-251

Schrooten C, Bovenhuis H, Coppieters W, Arendonk JAM. 2000. Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. Journal of Dairy Science 83, 795-806

Schulman NF, Sahana G, Lund MS, Viitala SM, Vilkki JH. 2008. Quantitative trait loci for fertility traits in Finnish Ayrshire cattle. Genetics Selection Evolution 40, 195-214

Seegers H, Coulon R, Beadeau F, Fouchet M, Quillet JM, 2001. Etude descriptive et identification de facteurs de variation de différentes catégories de retour après insémination artificielle en troupeau laitiers. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 8, 357-360

Seegers H, Billon D, Bossard-Appert E, Ponsart C, Paccard P, Disenhaus C, Gatien J, Salvetti P, Grimard B, Chanvallon A, Bareille N. 2010a. Evaluation rétrospective de la qualité de la détection des chaleurs en troupeau bovin laitier à partir de données déjà disponibles. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 17, 133-136

Seegers H, Billon D, Bossard-Apper E, Ponsart C, Bareille N. 2010b. Impact économique d'une qualité non optimale de détection des chaleurs en troupeaux laitiers à fort niveau de production. Proc : Rencontres, Recherches, Ruminants 17, 146 (poster)

Semanbo DKN, Eckersall PDE, Sasser RG, Ayliffe TR. 1992. Pregnancy-Specific Protein B (PSPB) and progesterone in monitoring viability of the embryo in early pregnancy in the cow after experimental infection with actinomyces pyogenes. Theriogenology 37, 741-748

Sheldon IM, Dobson H. 2004. Postpartum uterine health in cattle. Animal Reproduction Science 82, 295-306

Sheldon IM, Lewis GS, Leblanc S, Gilbert RO. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. Theriogenology, 65, 1516-1530

Short RE, Bellows RA, Staigmiller RB, Berardinelli JG, Custer EE. 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. Journal of Animal Science 68, 799-816

Shrestha HK, Nakao T, Higaki T, Suzuki T, Akita M. 2004a. Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holstein cows. Theriogenology, 61, 637-649

Shrestha HK, Nakao T, Suzuki T, Higaki T, Akita M. 2004b. Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period on subsequent reproductive performances of high-producing Holstein cows. Theriogenology 61, 1559-1571

Shrestha HK, Nakao T, Suzuki T, Akita M, Higaki T. 2005. Relationships between body condition score, body weight, and some nutritional parameters in plasma and resumption of ovarian cyclicity postpartum during pre-service period in high-producing dairy cows in a subtropical region in Japan. Theriogenology 64, 855-866

Silke V, Diskin MG, Kenny DA, Boland MP, Dillon P, Mee JF, Sreenan JM. 2002. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. Animal Reproduction Science 71, 1-12

Silva E, Sterry RA, Kolb D, Mathialagan N, MacGrath MF, Ballam JM, Fricke PM. 2007. Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after time artificial insemination. Journal of Dairy Science 90, 4612-4622

Silvia WJ. 1998. Changes in reproductive performance of Holstein dairy cows in Kentucky from 1972 to 1996. Journal of Dairy Science 81(suppl 1), 244 (Abstract)

Sinclair KD, Kuran M, Gebbie FE, Webb R, MacEvoy TG. 2000. Nitrogen metabolism and fertility in cattle. II Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. Journal of Animal Science 78, 2670-2680

Smitz JE, Cortvindt RG. 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. Reproduction 123, 185-202

Snijders SEM, Dillon P, O'Callaghan DO, Boland MP. 2000. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. Theriogenology 53, 981-989

Sorensen AC, Lawlor T, Ruiz F. 2007. A survey on fertility in the Holstein populations of the world. Proc: International Conference on Fertility in Dairy cows (EEAP Satellite Meeting), Liverpool Hope university, UKRU, 30-31 août 2007, 63-64

Sousa NM, El Amiri B, Remy B, Drion PV, Beckers JF. 2002. Signaux embryonnaires de la gestation. Proc : Société Française Bovine, Paris le 29, 30, 31 Octobre 2002 95-115

Spicer LJ, Tucker WB, Adams GD, 1990. Insulin-like growth factor-1 in dairy cows: relationships among energy balance, body condition activity and estrus behavior. Journal of Dairy Science 73, 929-937

Spicer LJ, Crowe MA, Prendiville DJ, Goulding D, Enright WJ. 1992. Systemic but not intraovarian concentrations of insuline-like growth factor-I are affected by short-term fasting. Biology of Reproduction 46, 920-925

Sreenan JM, Diskin MG, Morris DG. 2001. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. Proc: BSAS, Occasional meeting "Fertility in the high-Producing dairy cow". 26, 93-104

Staples CR, Thatcher WW, Clark JH. 1990. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. Journal Dairy Science 73, 938-947

Starbuck MJ, Dailey RA, Inskeep EK. 2004. Factors affecting retention of early pregnancy in dairy cattle. Animal Reproduction Science 84, 27-39

Stevenson JS, Tenhouse DE, Krisher RL, Lamb GC, Larson JE, Dahlen CR, Pursley JR, Bello NM, Fricke PM, Wiltbank MC, Brusveen DJ, Burkhart M, Youngquist RS, Garverick HA. 2008. Detection of anovulation by heatmount detectors and transrectal ultrasonography before treatment with progesterone in a timed insemination protocol. Journal of Dairy Science 91, 2901-2915

Stewart RE, Spicer LJ, Hamilton TD, Keefer BE, Dawson LJ, Morgan GL, Echternkamp SE. 1996. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-1 receptors, and steroids in dominant follicles during the first wave in cattle exhibiting regular estrus cycles. Endocrinology 137, 2842-2850

Stronge AJH, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG. 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. Theriogenology 64, 1212-1224

Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. 2003. Effects of in vivo and in vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. Human Reproduction Update 9, 35-48

Szenci O, Taverne MA, Beckers JF, Sulon J, Varga J, Borzsony L, Hanzen C, Schekk G. 1998. Evaluation of false ultrasonographic diagnoses in cows by measuring plasma levels of bovine pregnancy-associated glycoprotein 1. Veterinary Record 142, 304-306

Taylor C, Rajamahendran R. 1991. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant cows. Journal of Dairy Science 74, 115-123

Taylor VJ, Beever DE, Bryant MJ, Wathes DC. 2003. Metabolic profiles and progesterone cycles in first lactation dairy cows. Theriogenology 59, 1661-1677

Terqui M, Thimonier J. 1974. Nouvelle méthode radio-immunologique pour l'estimation du niveau de progestérone plasmatique. Application pour le diagnostic précoce de la gestation de la brebis et de la chèvre. In : Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série D 279, Paris, 1109-1112

Thatcher WW, Wilcox CJ, 1973. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status of the dairy cow. Journal of Dairy Science 56, 608-610

Thatcher WW, Guzeloglu A, Mattos R, Binelli M, Hansen TR, Pru JK. 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. Theriogenology 56, 1435-1450

The bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, Elsik CG, Tellam RL, Worley KC. 2009. The genome sequence of Taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. Science 324, 522-528

Thibault C. 2001. La fécondation. In La reproduction des mammifères et l'Homme. Eds C Thibault et MC Levasseur. Paris, France. INRA Edition-Ellipses pp. 367-389

Thimonier J. 2000. Détermination de l'état physiologique des femelles par analyse des niveaux de progestérone. INRA Production Animal 13, 177-183

Thomsen B, Horn P, Panitz F, Bendixen E, Petersen AH, Holm LE, Nielsen VH, Agerholm JS, Arnbjerg J, Bendixen C. 2006. A missense mutation in the bovine *SLC35A3* gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. Genome Research 16, 97-105

Tillard E, Nabeneza S, Faye B, Humblot P. 2001. Respective frequencies of early and late embryonic mortality in Prim'Holstein cows under subtropical conditions. Proc: BSAS, Occasional meeting “Fertility in the high-Producing dairy cow. 26, 389-392

Tillard E, Humblot P, Faye B. 2003. Impact des déséquilibres énergétiques post-partum sur la fécondité des vaches laitière à la Réunion. Proc : Recherches, Rencontres, Ruminants 10, 127-130

UNCEIA Groupe Fertilité Femelle 2006. Repro Guide. Ed UNCEIA. Paris, France : UNCEIA

Valour D, Hue I, Degrelle SA, Déjean S, Marot G, Dubois O, Germain G, Humblot P, Ponter AA, Charpigny G, Grimard B. Mild underfeeding associated metabolism evolution correlates with gene expression in the genital tract of 80 days postpartum cyclic dairy cows. Physiological Genomics, en cours de publication

van Arendonk JAM, Hovenier R, De Boer W. 1989. Phenotypic and genetic association between fertility and production in dairy cows Livestock Production Science 21, 1-12

van den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology 63, 1717-1751

van Eerdenburg FJ, Loeffler HS, van Vloiet JH. 1996. Detection of oestrus in dairy cows : a new approach to an old problem. Veterinary Quarterly 18, 52-54

van Knegsel ATM, van den Brand H, Dijkstra J, Tamminga S, Kemp B. 2005. Effect of dietary energy source on energy balance, production, metabolic disorders and reproduction in lactating dairy cattle. Reproduction, Nutrition, Developpement 45, 665-688

Vasconcelos JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. 2003. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. Theriogenology 60, 795-807

Veerkamp RF. 1998. Selection for economic efficiency of dairy cattle using information on live weight and feed intake : a review. Journal of Dairy Science 81, 1109-1119

Veerkamp RF, Emmans GC. 1995. Sources of genetic variation in energetic efficiency of dairy cows. Livestock Production Science 44, 87-97

Veerkamp RF, Beerda B. 2007. Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. Theriogenology 68S, S277-S273

Velazquez MA, Spicer LJ, Wathes DC. 2008. The role of endocrine insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in female bovine reproduction. Domestic Animal Endocrinology 35, 325-342

Vermorel M. 1978. Feed evaluation for ruminants. II. The new energy systems proposed in France. Livestock Production Science 5, 347-365

Vernon RG. 2002. Nutrient partitioning, lipid metabolism and relevant imbalances. Proc: The 12th World Buiatric Congress, 18-23 August, Hannover, Germany

Verstegen J, Fellmann D, Beckers JF. 1985. Immunodetection of bovine chorionic sommatomammotrophin (bCS). Acta Endocrinology 109, 403-410

Villa-Godoy A, Hughes TL, Emery RS, Chapin LT, Fogwell RL. 1988. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. Journal of dairy Science 71, 1063-1072

Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. Animal Reproduction Science 123, 127-138

Walters AH, Pryor AW, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC, 2002a. Milk yield, energy balance, hormone, follicular and oocyte measures in early and mid-lactation Hosltein cows. Theriogenology 57, 949-961

Walters AH, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC. 2002b. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. Journal of Dairy Science 85, 824-832

Walters KA, Binnie JP, Campbell BK, Armstrong DG, Telfer EE. 2006. The effects of IGF-1 on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. Reproduction 131, 515-523

Wang LM, Feng HL, Ma Yzh, Cang M, Li HJ, Yan ZH, Zhou P, WenJX, Bou S, Liu DJ. 2009. Expression of IGF receptors and its ligands in bovine oocytes and preimplantation embryos. Animal Reproduction Science 114, 99-108

Wango EO, Hear RP, Wooding FB. 1992. Regulation of steroid synthesis and metabolism in isolated binucleate cells of the placenta in sheep and goats. Journal of Reproduction and Fertility 109, 53-58

Ward FA, Lonergan P, Enright BP, Boland MP. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. Theriogenology, 54, 433-446

Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT, McAllister AJ. 2002a. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. Journal of Dairy Science 85, 244-251

Washburn SP, White SL, Green Jr. JT, Benson GA. 2002b. Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems. Journal of Dairy Science 85, 105-111

Wathes DC, Tailor VJ, Cheng Z, Mann GE. 2003. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in teh post partum cows. Reproduction Suppl 61, 219-237

Wathes DC, Cheng Z, Bourne N, Taylor VJ, Coffey MP, Brotherstone S, 2007a. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. Domestic Animal endocrinology 33, 203-225

Wathes DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R. 2007b. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cows. Theriogenology 68S, S232-S241

Wathes DC, Cheng Z, chowdhury W, Fenwick MA, Fitzpatrick R, Morris DG, Patton J, Murphy JJ. 2009. Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. Physiological Genomics 39, 1-13

Wattiaux MA. 1999. Dairy Essentials.Ed M the Babcock Institute for International Dairy Research and Development, The University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA

Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Amstrong DG. 2004. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. Journal of Animal Science 83 (E suppl.), E63-E74

Weems YS, Kim L, Humphreys V, Tsuda V, Blankfein R, Wong A, Weems CW. 2007. Effect of luteinizing hormone (LH), pregnancy-specific protein B (PSPB), or arachidonic acid (AA) on secretion of progesterone and prostaglandins (PG) E (PGE; PGE1 and PGE2) and F2α (PGF2α) by ovine corpora lutea of the estrous cycle or pregnancy in vitro. Protaglandins and other Lipid Mediators 84, 163-173

Williams EJ, Herath S, England GCW, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. 2008. Effect of *Escherichia coli* infection of the bovine uterus from the whole animal to the cell. Animal 2, 1153-1157

Windig JJ, Beerda B, Veerkamp RF. 2008. Relationship between milk progesterone profiles and genetic merit for milk production, milking frequency, and feeding regimen in dairy cattle. Journal of Dairy Science 91, 2874-2884

Winkler R, Pasleau F, Boussif N, Hodzic D, 2000. Le système IGF : synthèse et données récentes. Revue Médicale de Liège 55, 725-739

Witte JS, Greenland S, Kim LL, Arab L. 2000. Multilevel Modeling in epidemiology with Glimmix. Epidemiology. 11, 684-688

Wolf E, Arnold GJ, Bauersachs S, Beier HM, Blum H, Einspanier R, Fröhlich T, Herrler A, Hiendleder S, Kölle S, Prelle K, Reichenbach HD, Stojkovic M, Wenigerkind H, Sinowatz F. 2003. Embryo-maternal communication in bovine-strategies for deciphering a complex cross-talk. Reproduction Domestic Animal 38, 276-289

Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. Animal Reproduction Science 60-61, 535-547

Wooding FB, Wathes DC. 1980. Binucleate cell migration in the bovine placentome. Journal of Reproduction and Fertility 59, 425-430

Wooding FB. 1984. Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. American Journal of Anatomy 170, 233-250

Wooding FB. 1992. Current topic: the synepitheliochorial placenta of ruminant: binucleate cell fusions and hormone production. Placenta 13, 101-113

Wooding FB, Morgan G, Monaghan S, Hamon M, Hear RP. 1996. Functional specialization in the ruminant placenta: evidencefor two populations of fetal binucleate cells of different selective synthetic capacity. Placenta 17, 75-86

Wright IA, Russel JF. 1984. Partition of fat, body composition and body condition score in mature cows. Animal Production 38, 23-32

Wylie ARG, Woods S, Carson AF, MacCoy M, 2008. Periprandial changes in metabolite and metabolic hormone concentrations in high-genetic-merit dairy heifers and their relationship to energy balance in early lactation. Journal of Dairy Science 91, 577-586

Xie S, Low BG, Nagel RJ, Beckers JF, Roberts RM. 1994. A novel glycoprotein of the aspartic proteinase gene family expressed in bovine placental trophectoderm. Biology of reproduction 51, 1145-1153

Ytournel F, Gilbert H, Boichard D. 2008. Comment affiner la localisation d'un QTL? INRA Productions Animales 21, 147-158

Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC. 1998. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. Domestic Animal Endocrinology 15, 55-63

Zhu LH, Armentano LE, Bremmer DR, Grummer RR, Bertics J. 2000. Plasma concentration of urea, ammonia, glutamine around calving, and the relation of hepatic triglyceride, to plasma ammonia removal and blood acid-base balance. Journal of Dairy Science 83, 734-740

Zoli AP, Beckers JF, Wouters-Ballman P, Closset J, Falmague P, Ectors F. 1991. Purification and characterisation of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. Biology of Reproduction 45, 1-10

Zoli AP, Demez P, Beckers JF, Reznik M, Beckers A. 1992a. Light and electron microscopic immunolocalization of bovine pregnancyassociated glycoprotein in the bovine placentome. Biology of Reproduction 46, 623-629

Zoli AP, Guilbault LA, Delahaut P, Benitez Ortiz W, Beckers JF. 1992b. Radioimmunoassy of a bovine pregnancy-associated glycoprotein in serum: its application for pregnancy diagnosis. Biology of Reproduction 46, 83-92

Zulu VC, Sawamukai Y, Nakada K, Kida K, Moriyoshi M. 2002. Relationship among insulin-Like Growth Factor-1, blood metabolites and postpartum ovarian function in dairy cows. Journal of Veterinary Medical Science 64, 879-885

Zurek E, Foxcroft GR, Kennelly JJ. 1995. Metabolic status and interval to first ovulation in postpartum dairy cows. Journal of Dairy Science 78, 1909-1920

Annexe

Chapitre VIII. Annexe

❖ **Article de synthèse publié dans le Point Vétérinaire, numéro spécial 2006**

INFERTILITÉ CHEZ LES BOVINS LAITIERS

Échecs précoces de gestation chez la vache laitière

Savoir détecter les échecs précoces de gestation chez la vache laitière permet d'améliorer la fécondité, en particulier pour les troupeaux de prim'holstein dans lesquels les performances de reproduction se détériorent.

Résumé

En France, près des deux tiers des inséminations premières chez la vache laitière de race prim'holstein sont suivies d'une remise à la reproduction. À partir de la synthèse d'études réalisées en conditions de terrain, selon nos estimations, sur 100 vaches en première insémination, 52 ne commencent pas leur gestation ou ne la poursuivent pas au-delà de la période embryonnaire. L'échec se situe de manière préférentielle au moment de la fécondation. Cependant, plus l'échec est tardif, plus il contribue à la dégradation de la fécondité.



par Dorothée Ledoux*

Patrice Humblot**
Fabienne Constant*
Andrew A. Ponter***
Bénédicte Grimard***

** Unité de reproduction animale, ENV d'Alfort, 7, avenue du Général-de-Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex*
*** Union nationale des coopératives d'élevage et d'insémination animale, Service recherche et développement, 13, rue Jouët, 94700 Maisons-Alfort*
**** Unité de zootechnie, ENV d'Alfort, 7, avenue du Général-de-Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex*

En France, la baisse de fertilité observée après une première insémination artificielle en race holstein est de 1 % par an depuis 1995. Plus alarmant, chez les vaches primipares, alors qu'en 1995 près d'une insémination sur deux aboutissait à une gestation, en 2003, seules deux inséminations sur cinq sont considérées comme fécondantes (non suivies d'une nouvelle insémination et compatibles avec une durée de lactation ou une date de vêlage) [6]. Au total, près des deux tiers des inséminations premières chez la vache laitière multipare (64 %) sont suivies d'une remise à la reproduction. Dans les années 1980, il était courant d'incriminer la mortalité embryonnaire et fœtale pour expliquer ces échecs car le taux de fécondation était considéré comme élevé (95 %) [5, 11]. Mais le profil des vaches laitières a évolué. Devenues hautes productrices à la suite de la sélection génétique sur le potentiel laitier, ces vaches pourraient présenter une chronologie des échecs différente de celles des années 1980. L'objectif de cet article est de présenter un schéma actualisé de la chronologie de ces échecs chez la vache laitière, afin d'identifier la (ou les) période(s) la (ou les) plus à risque. Après avoir présenté les outils de diagnostic de la mortalité embryonnaire, la chronologie puis les facteurs prédisposants des échecs de gestation précoce chez la vache laitière sont décrits.

Mortalité embryonnaire

▸ **La mortalité embryonnaire** est l'interruption de la gestation durant la période embryonnaire chez les bovins [21. La mortalité embryonnaire précoce, avant le 16e jour de gestation, se distingue de la mortalité embryonnaire tardive survenant après cette date [27, 36].

▸ **Cliniquement,** il n'est pas possible de distinguer la mortalité embryonnaire précoce (sauf dans le cas de récolte d'embryons) de l'absence de fécondation (infertilité proprement dite). De même, le diagnostic de mortalité embryonnaire tardive ne peut pas être établi seulement sur la base d'un constat précoce de la gestation (progestérone, PSPB, échographie), suivi d'un constat tardif de gestation négatif. Les retours décalés ou les cycles allongés ne sont pas systématiquement imputés à la mortalité embryonnaire.

Méthodes de mise en évidence

Au cours d'une gestation, la phase embryonnaire se définit par convention comme la période comprise entre la fécondation et la fin de l'organogenèse. Elle prend donc fin au 42e jour de gestation chez les bovins [1]. La période fœtale couvre le reste de la gestation jusqu'au vêlage (voir l'article de P. Chavatte-Palmer, "Diagnostic de gestation et suivi du fœtus", dans ce numéro).

Deux sources d'échecs de gestation coexistent après la mise à la reproduction :

- l'absence de fécondation en raison d'une mauvaise synchronisation entre l'ovulation et l'insémination et de la non-fusion des gamètes mâle et femelle ;
- l'arrêt de la gestation qui peut avoir lieu lors du développement embryonnaire ou de la vie fœtale (voir l'ENCADRÉ "Mortalité embryonnaire").

Pour quantifier les échecs précoces de gestation et leur importance selon la période de la gestation explorée, des méthodes très différentes peuvent être employées (voir le TABLEAU "Méthodes de mise en évidence des échecs de gestation chez la vache" et la FIGURE "Utilisation des outils diagnostiques au cours de la gestation").

1. Techniques expérimentales

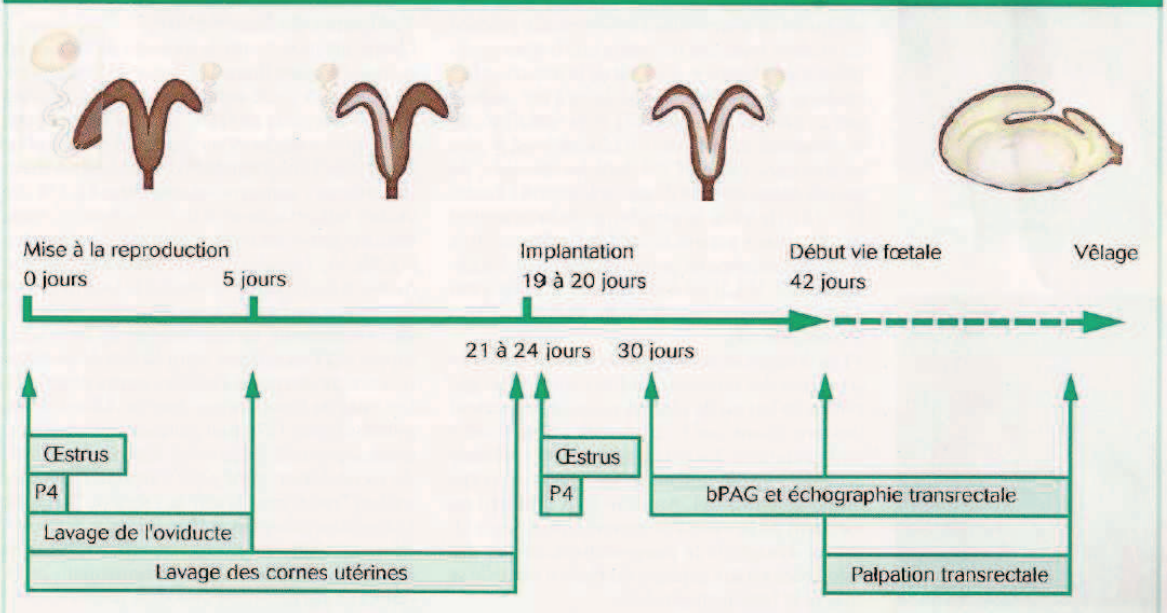
Seul l'abattage permet de récupérer, dans les premiers jours suivant la fécondation, l'ovocyte ou le jeune embryon avec une grande certitude, par perfusion de l'oviducte. Cette dernière est possible aussi par voie chirurgicale, mais la technique est invasive et moins sûre. La mono-ovulation dans l'espèce bovine limite beaucoup l'utilisation de ces procédures expérimentales. L'abattage ou la perfusion de l'oviducte, bien que lourds, sont les seules méthodes qui permettent de différencier la non-fécondation (NF) de la mortalité embryonnaire précoce (MEP) lors d'intervention dès le troisième jour après la mise à la reproduction (collecte respectivement dans l'oviducte d'un ovocyte non fécondé ou d'un embryon). Après le passage de l'embryon dans l'utérus (vers le sixième jour après la fécondation), il est possible de le récupérer pendant sa vie libre par lavage de l'utérus par voie cervicale (jusqu'au vingtième jour pour les équipes expérimentées).

Méthodes de mise en évidence des échecs de gestation chez la vache

Méthodes [références]	Chronologie des échecs de gestation après mise à la reproduction				Remarques
	NF	MEP	MET	MF	
Abattage					
Lavage de l'oviducte [33]	Oui de 2 à 5 jours(1)	Non	Non	Non	Technique expérimentale définitive et coûteuse
Lavage de la corne utérine [33]	Oui à partir de 6 jours(1)	Oui de 6 à 14 jours(1)			
Chirurgicale					
Lavage de l'oviducte [7]	Oui de 2 à 5 jours(1)	Non	Non	Non	Technique expérimentale invasive, mais non définitive
Lavage de la corne utérine [12]	Oui de 6 à 8 jours(1)	Oui de 6 à 14 jours(1)			
Non chirurgicale					
Lavage de la corne utérine [42]	Oui de 6 à 8 jours(1)	Oui de 6 à 18 jours(1)	Non	Non	Technique expérimentale non invasive (cathétérisme cervical)
Observation des chaleurs [37, 44]	Non	Oui mais inclut la NF	Oui	Oui	Peu fiable, relatif à la longueur de l'intervalle interœstrus, à la sensibilité et à la spécificité de la détection des chaleurs
Progestérone (P4) [13]			Oui	Non	Permet de préciser si la vache est mise à la reproduction au bon moment
Progestérone et PSPB [19, 26]	Non	Oui mais inclut la NF	Oui	Oui	PSPB possible à partir de 100 jours *post-partum*
Échographie transrectale [47]	Non	Non	Oui mais après 30 jours(1)	Oui	Met en évidence la présence d'un conceptus vivant à partir de 30 jours(1)
Palpation transrectale [31]	Non		Non	Oui	Diagnostic tardif dépendant de l'expérience du manipulateur

NF : non-fécondation ; MEP : mortalité embryonnaire précoce ; MET : mortalité embryonnaire tardive ; MF : mortalité fœtale.
(1) Après insémination.

Utilisation des outils diagnostiques au cours de la gestation



P4 : taux de progestérone du sang ou du lait.
bPAG : taux sanguin de protéines associées à la gestation.

Pathologie de la gestation



Cliché : Unité de reproduction animale, ENVA

PHOTO 1. Échographie d'un utérus gravide de vache laitière à 35 jours de gestation.



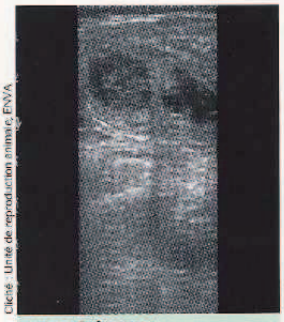
Cliché : Unité de reproduction animale, ENVA

PHOTO 2. La technique de l'échographie permet de réaliser un diagnostic précoce de gestation.



Cliché : Unité de reproduction animale, ENVA

PHOTO 3. L'échographie est une technique d'imagerie utilisable en élevage.



Cliché : Unité de reproduction animale, ENVA

PHOTO 4. Image échographique d'une mort embryonnaire tardive.

Ces techniques précoces permettent non seulement de quantifier, dès les premiers jours de gestation, la mortalité embryonnaire, mais également de réaliser des analyses complémentaires sur le conceptus récolté (évaluation morphologique, quantification de l'expression de gènes ou d'activité de synthèse).

2. Techniques utilisées en élevage

Dans un contexte d'élevage, plus l'échec de gestation est mis en évidence précocement, moins la fécondité est dégradée, puisque l'éleveur peut alors rapidement prendre la décision de remettre la femelle à la reproduction.

• L'observation des chaleurs après insémination est l'outil le plus couramment utilisé pour suspecter une mortalité embryonnaire ou fœtale. Pour le troupeau, le critère global analysé est le taux de retour en chaleurs régulier (vers trois semaines) ou irrégulier [44]. Cependant, un intervalle intercœstrus non modifié (18 à 24 jours) ne permet pas de différencier la non-fécondation de la mortalité embryonnaire précoce, alors que l'allongement de cet intervalle révèle une mortalité embryonnaire tardive (MET) ou fœtale (MEF). En effet, si la lutéolyse intervient dans les 24 jours après la mise à la reproduction, elle peut être associée à un défaut de fécondation ou à une mortalité embryonnaire précoce, tandis que la lyse du corps jaune au-delà de 24 jours est à relier à une mortalité embryonnaire tardive ou fœtale [26]. L'embryon a alors eu le temps d'émettre un signal de maintien du corps jaune, dû à l'action antilutéolytique de l'interféron τ, ce qui entraîne un allongement du cycle sexuel. La perte de l'embryon avant 16 jours de gestation n'entraîne donc pas d'allongement du cycle (MEP), alors que si elle a lieu plus tardivement, l'intervalle entre deux chaleurs est allongé (MET ou MEF) [27, 36]. L'observation des retours en chaleurs donne une forte présomption de la mortalité embryonnaire précoce ou tardive, mais elle nécessite une bonne sensibilité et une bonne spécificité de la détection des chaleurs et implique que la vache a été inséminée en période d'œstrus [37]. Si la spécificité de la détection des retours en chaleurs est élevée en moyenne (90 à 95 %) dans les élevages, de grands écarts existent d'une exploitation à l'autre [17, 18]. De plus, la sensibilité de la détection de ces retours est très faible (de l'ordre de 50 % en moyenne, avec de grands écarts entre les élevages) [17, 18]. Il est donc difficile d'utiliser ces données comme base d'étude, sauf sur de très grands effectifs.

• Les dosages de la progestérone associés à l'observation des chaleurs, réalisés sur des échantillons de lait ou de plasma sanguin, apportent des précisions sur le diagnostic de mortalité embryonnaire. Le principe de cette méthode est fondé sur la détection ou non d'un corps jaune fonctionnel. Analysé tout d'abord au moment de la mise à la reproduction, le résultat du dosage de la progestérone donne des informations sur la phase du cycle à laquelle se trouve la femelle inséminée :

- soit en phase folliculaire, donc possiblement en chaleurs, avec P4 < 1,2 ng/ml dans le plasma ou P4 2,5 ng/ml dans le lait ;
- soit en phase lutéale, donc hors de la période des chaleurs, si P4 ≥ 1,8 ng/ml dans le plasma ou P4 > 3,5 ng/ml dans le lait.

Lors de l'analyse vers 21 à 24 jours après l'insémination, un niveau bas de progestérone indique l'absence de gestation. Combiner ces deux périodes d'analyse limite l'incidence de faux positifs [19].

• Enfin, le dosage des glycoprotéines spécifiques de la gestation (*pregnancy specific protein B* ou PSPB, PAG et PSP60) et l'échographie par voie transrectale permettent un diagnostic direct de la présence du conceptus après 30 jours (PHOTOS 1, 2 et 3) [34, 43, 52]. En pratique, le dosage de la PSPB est effectué à partir d'échantillons de sang prélevés chez des vaches à plus de 100 jours *post-partum* et à plus de 30 jours après insémination [28]. Après 45 jours, la palpation transrectale permet de suivre la gestation. Elle est éventuellement complétée d'une échographie si le praticien souhaite connaître l'état de vitalité du fœtus. Ces techniques, utilisées plus tardivement dans la gestation, permettent la mise en évidence de morts embryonnaires ou fœtales survenant chez des vaches préalablement diagnostiquées gravides (PHOTO 4).

Quantification de la mortalité embryonnaire

Les études synthétisées ci-après présentent les résultats pour des vaches en production laitière, sans anomalie susceptible de modifier les résultats individuels de reproduction et n'étant pas soumises à un traitement de superovulation. Les périodes au cours desquelles ont lieu les échecs sont étudiées de façon successive : la fécondation, la mortalité embryonnaire précoce, puis la mortalité embryonnaire tardive.

1. Absence de fécondation

L'asynchronisme entre le moment de l'ovulation et l'insémination limite la chance de fécondation en raison du vieillissement rapide des gamètes dans le tractus génital (environ 24 heures pour les spermatozoïdes et moins de six heures pour l'ovocyte). L'insémination des vaches au mauvais moment concerne en moyenne 4 à 5 % des vaches laitières mises à la reproduction, mais cette fréquence est très variable entre les élevages [15, 30, 35]. Lorsque l'insémination a lieu au bon moment (en phase de chaleurs), le taux de fécondation des vaches laitières approche 90 % [5]. Plus récemment, un taux moyen de 76 % a été rapporté à l'issue d'une compilation de données concernant des vaches laitières américaines [41]. Les taux de fécondation chez la vache laitière publiés depuis 1978 sont globalement constants, contrairement à l'idée selon laquelle les échecs de fécondation sont plus fréquents chez les vaches "modernes" (voir le TABLEAU "Taux de fécondation chez les vaches laitières"). Cependant, ces chiffres doivent être relativisés car ils ont été obtenus dans des environnements différents et à partir de l'analyse d'un nombre limité de vaches. À notre connaissance, aucune étude n'a évalué la réussite de la fécondation chez les vaches laitières dans les élevages français.

2. Mortalité embryonnaire précoce

Le taux de mortalité embryonnaire précoce est très variable : entre 11 et 81,6 %, pour une moyenne de 36,6 %, tous pays et toutes races confondus (voir le TABLEAU "Taux de mortalité embryonnaire précoce chez les vaches laitières"). Cette large fourchette peut être expliquée notamment par les différences de méthodologie utilisée et par des conditions d'échantillonnage propres à chaque étude réalisée dans des pays et pour des races différents. En France, le taux de mortalité embryonnaire précoce est, en moyenne, de 37,6 % pour les vaches laitières prim'holstein. Dans la plupart des études, elle ne peut être différenciée de la non-fécondation, il s'agit donc d'une fréquence cumulée NF + MEP.

Une légère augmentation de cette mortalité est perceptible au cours des 20 dernières années : + 4 points (voir la FIGURE "Évolution des taux de non-fécondation ou de mortalité embryonnaire précoce et de mortalité embryonnaire tardive en France chez la vache prim'holstein en élevage"). Quand les pertes très précoces sont cumulées (NF et MEP), elles sont quantitativement plus importantes que celles dues à la mortalité embryonnaire tardive et concernent le plus souvent plus d'un tiers des échecs après insémination.

Chez les génisses, les pertes cumulées NF/MEP seraient moins importantes que chez les vaches laitières multipares. Cela pourrait s'expliquer, entre autres, par le taux de fécondation proche

Taux de fécondation chez les vaches laitières

Année [référence]	Pays	Type de vache	Nombre de vaches collectées	Fréquence (%)
1978 [5]	Israël	VL	12	83
1980 [46]	Irlande	VL production moyenne	183(1)	85 à 100(1)
1992 [10]	Virginie (EU)	Holstein	22(2)	75,5(2)
2002 [42]	Wisconsin (EU)	VL	39(1)	71,5(1)

(1) Moyenne sur deux études. (2) Moyenne sur quatre études.
VL : vache laitière ; EU : États-Unis.

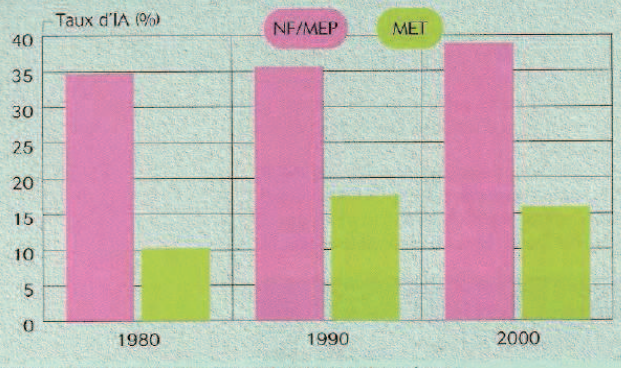
Taux de mortalité embryonnaire précoce chez les vaches laitières

Année [référence]	Pays	Type de vache	Méthode	Effectif	Taux
1978 [5]	Israël	VL	Abattage	18	11 %
				20	20 %
				21	43 %
1986 [23, 25]	France	PH	Observation des chaleurs et dosages hormonaux	1063	25,8 %(1)
		Normande		1001	20,5 %(1)
		Montbéliarde		622	25,5 %(1)
1989 [13, 25]		PH		753	43,6 %(1)
1991 [24, 25]				177	35,6 %(1)
		Normande		119	37 %(1)
2000 [19, 26, 38]		PH		1395	31,6 %(1)
2001 [49]	France (Réunion)			847	36,8 %(1)
2002 [35]	France	Normande/ PH		882	37,7 %(1)
2002-2003 [22]	Irlande	Holstein américaine		78	43 %(1)
		Holstein NZ		78	32 %(1)
2004 [14]	France	PH		269	37,2 %(1)
2004-2005 [30]				234	45,3 %(1)
2004-2005 [15]				4066	36,5 %(1)
2002 [42]	Wisconsin (EU)	Vache en lactation	Lavage utérin	38	81,6 %
				41	47,2 %

MEP : mortalité embryonnaire précoce ; VL : vache laitière ; EU : États-Unis ; PH : prim'holstein ; NZ : Nouvelle-Zélande.
(1) % englobant les non-fécondations et la MEP.

Pathologie de la gestation

Évolution des taux de non-fécondation ou de mortalité embryonnaire précoce et de mortalité embryonnaire tardive en France chez la vache prim'holstein en élevage



NF/MEP : non-fécondation ou mortalité embryonnaire précoce ; MET : mortalité embryonnaire tardive ; IA : insémination artificielle.
D'après [13, 14, 15, 19, 23, 24, 25, 26, 30, 35].

de 100 % pour cette tranche d'âge [42]. Cependant, il paraît intéressant de vérifier cette hypothèse puisque, récemment, le taux de réussite en première insémination de la génisse laitière a eu tendance à se dégrader [6].

3. Mortalité embryonnaire tardive

Lorsqu'il est mesuré en élevage, le taux de mortalité embryonnaire tardive paraît moins élevé que celui de l'ensemble NF/MEP. Environ 15 % des inséminations sont concernées, pour 30 % du total des pertes embryonnaires. L'incidence de cette mortalité est néanmoins élevée (nombre de morts après 21 jours/vaches gestantes à 21 jours). Pour Grimard et coll., 25 % des vaches prim'holstein perdent leur embryon/fœtus entre 21 et 80 à 100 jours [19].

4. Chronologie des échecs

Pour bilan, un tableau de la chronologie des pertes au cours de la gestation des vaches laitières de race prim'holstein en France a été construit à partir des références citées ci-dessus (voir le TABLEAU "Estimation des pertes au cours de la gestation chez la vache laitière prim'holstein en première insémination en France"). Pour 100 vaches en première insémination, il permet de donner une prévision de la période pour laquelle la fréquence ou l'incidence des pertes est la plus élevée. Par manque de données françaises et pour pouvoir, malgré tout, estimer la non-fécondation séparément de la mortalité embryonnaire précoce, nous avons supposé que le taux de fécondation des vaches françaises était proche de celui des vaches hautes productrices américaines (76 %) [41]. Ce tableau montre que 52 % des premières tentatives de mise à la reproduction des vaches aboutiraient à un échec entre l'insémination et la fin de la vie embryonnaire. Ces pertes se répartiraient en 24 échecs à la fécondation pour 100 vaches inséminées, 13 morts embryonnaires entre le 2e et le 16e jour et 15 morts embryonnaires tardives entre le 16e et le 35e jour. Isolées des pertes embryonnaires précoces, les pertes lors de la fécondation sembleraient être quantitativement les plus importantes, alors que les pertes embryonnaires précoces et tardives seraient quantitativement proches. Cependant, les pertes tardives contribuent davantage à la dégradation de la fécondité que les pertes précoces, en raison du retard pris pour la remise à la reproduction et du risque de réforme encouru [44].

La clé du succès d'une gestation menée à terme dépend donc fortement du taux de fécondation et de la survie embryonnaire. En élevage, une des stratégies ayant pour objectif de limiter les pertes consiste à agir sur les facteurs prédisposants.

Facteurs prédisposants

• Les situations qui compromettent le synchronisme observé entre les gamètes mâle et femelle ou entre la vésicule embryonnaire et l'ensemble utéro-ovarien de la mère sont susceptibles d'entraîner l'absence de fécondation ou l'arrêt de la gestation. La prédisposition à la mortalité embryonnaire est multifactorielle (voir le TABLEAU complémentaire "Facteurs prédisposants de la mortalité embryonnaire chez la vache laitière", sur planete-vet.com).

Dans la plupart des études, l'alimentation, la production laitière, l'état corporel des animaux, l'âge, le potentiel génétique, l'état sanitaire et la

Points forts

- En élevage, l'absence de fécondation est confondue avec la mortalité embryonnaire précoce.
- Le dosage de la progestérone (dans le lait ou dans le sang) est associé à l'observation des retours en chaleurs pour diagnostiquer les pertes précoces avant 24 jours de gestation.
- L'échographie entre 30 et 35 jours est une méthode de choix pour identifier la mortalité embryonnaire tardive.
- Plus de 50 % des pertes se situent entre l'insémination artificielle et 35 jours de gestation.
- Le moment de la fécondation serait la phase la plus critique du bon déroulement de la gestation.
- La prédisposition à la mortalité embryonnaire est multifactorielle

Estimation des pertes au cours de la gestation chez la vache laitière prim'holstein en première insémination en France

Jour de gestation	Effectif	Estimation du taux de pertes[1]	Estimation de l'incidence de pertes[2]
J0	100 vaches inséminées		
J2	76[3] ovocytes fécondés	24 %	24 %
J16	63[4] embryons viables	13 %	17 %
J35	48[4] vaches gestantes	15 %	23,8 %
J80 à J100	38[4] vaches gestantes	10 %	20,8 %
Terme	36[5] vêlages	2 %	5,2 %

[1] % sur 100 vaches inséminées. [2] % sur le nombre de vaches gestantes au stade précédent. [3] D'après [41]. [4] D'après [14, 19, 24, 25, 26, 35]. [5] D'après [6].

saison de reproduction influencent la mortalité embryonnaire (PHOTO 5). Certaines études, associant enregistrement des données de non-retour en chaleurs et dosages hormonaux, montrent que les facteurs influençant les NF/MEP et MET sont différents [26, 35]. Toutefois, il n'est pas possible, à partir de telles études épidémiologiques, de distinguer à partir des données collectées dans les fermes les rôles respectifs des facteurs sur l'absence de fécondation ou la MEP puisque aucun test biologique ne permet de les distinguer.

• L'analyse simultanée des effets génétiques et phénotypiques sur la production laitière permet d'observer qu'un fort potentiel génétique aggraverait de manière plus importante la NF/MEP tandis que la MET serait associée à la production laitière des vaches [26, 38]. La sélection génétique sur la production laitière augmenterait alors la NF/MEP pouvant résulter d'une qualité inférieure des ovocytes et des follicules avant ovulation.

• L'état corporel des animaux est aussi un facteur souvent étudié. Plusieurs études ont montré que l'amaigrissement entre le vêlage et les premiers mois avant la mise à la reproduction a des effets défavorables sur la fertilité (PHOTO 6) [14, 31, 45]. Plus précisément, Lopez-Gatius et coll. indiquent que la chute d'un point de la note d'état pendant le premier mois de lactation multiplie par 2,4 le risque de mortalité embryonnaire tardive [31]. Des données similaires montrant des effets défavorables de l'amaigrissement prononcé ont été obtenues chez des vaches laitières hautes productrices dans les conditions subtropicales [50]. *A contrario*, une note d'état élevée au vêlage et à l'insémination suivante augmenterait la MET, particulièrement chez la vache haute productrice [13, 19, 26]. Un bilan énergétique négatif révélé par les variations d'état corporel affecte donc la survie embryonnaire.

• Michel et coll. rapportent un écart de fertilité entre les races prim'holstein et normande : la NF/MEP serait plus importante pour la première, comparativement à la seconde [35]. La production laitière plus élevée chez les vaches prim'holstein n'expliquerait pas totalement cet écart de fertilité. Cette différence interraciale pourrait s'expliquer par l'existence de facteurs génétiques ou par un bilan énergétique différent entre les deux races en début de lactation, influençant le taux des mortalités embryonnaires à différents stades de gestation.

• Le stress thermique est aussi connu comme une cause d'altération de la qualité des ovocytes [42]. L'augmentation de la température favoriserait l'absence de fécondation et/ou la mortalité embryonnaire précoce par défaut de développement embryonnaire [51]. *A contrario*, deux études ont montré que la fréquence de MET diminuait en été par rapport à l'hiver [13, 19]. En raison de l'hyperthermie associée, un processus infectieux et/ou inflammatoire [13, 21, 32] favorise aussi l'arrêt de la gestation à tous les stades (indépendamment de l'embryotoxicité propre de l'agent pathogène).

• D'autres facteurs sont moins systématiquement recherchés. Il s'agit, par exemple, de la présence de corps jaunes additionnels qui diminuerait le risque de mortalité par le maintien d'un taux élevé de progestérone. Cette augmentation du nombre de corps jaunes pourrait représenter une adaptation à la chaleur pour certaines races. Cet effet protecteur serait plus prononcé dans les conditions subtropicales et/ou au moment de fortes chaleurs [31].

• Hiérarchiser les facteurs influents et identifier leur impact sur les échecs de gestation aux différents stades nécessitent des études épidémiologiques à grande échelle. Cependant, la mise en œuvre de ce type de travaux, fondé sur l'enregistrement concomitant des facteurs de risque et des résultats de dosages hormonaux, est très coûteuse et rarement réalisée. C'est pourquoi aucun facteur n'est identifié comme ayant un impact dominant sur les pertes précoces.



Cliché : Unité de reproduction animale, ENVA

PHOTO 5. Un excès en protéines dans la ration favorise le risque de mort embryonnaire.



Cliché : Unité de reproduction animale, ENVA

PHOTO 6. Un mauvais état corporel est associé aux échecs précoces de gestation.

Les échecs de fécondation et les échecs précoces de gestation représentent une forte composante de l'infertilité chez la vache laitière. En pratique courante, compte tenu de la sensibilité de la détection des chaleurs, l'association de méthodes de diagnostic précoce permettrait de prévenir la dégradation de la fécondité en élevage laitier en remettant les animaux le plus tôt possible à la reproduction, afin de limiter les effets économiques des pertes tardives.

Dans les élevages à faible fertilité :

- la mesure du taux de progestérone dans le sang ou le lait le jour de l'IA et 21 à 24 jours plus tard pour le diagnostic des échecs au moment de la fécondation ou avant le signal trophoblastique de l'embryon pourrait être systématisée ;
- puis l'usage de l'échographie ou du dosage de la PSPB, dès 30 jours, permettrait l'identification des échecs plus tardifs. Ces dernières méthodes devraient tenir une place de choix en élevage laitier [16]. ■

Bibliographie

6 - Barbat A, Druet T, Bonaiti B, Guillaume F, Colleau JJ, Boichard D. Bilan phénotypique de la fertilité à l'insémination artificielle dans les trois principales races laitières françaises. Proc. Rencontres, Recherches, Ruminants. 2005;12:137-140.

13 - Fournier R, Humblot P. Fréquence et facteurs de variation de la mortalité embryonnaire tardive chez la vache laitière. El. Insem. 1989;229:3-10.

19 - Grimard B, Fréret S, Chevallier A, Pinto A, Ponsart C, Humblot P. Genetic and environmental factors influencing first service conception rate and late embryonic/foetal mortality in low fertility dairy herds. Anim. Reprod. Sci. 2006;91:31-44.

26 - 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. Theriogenol. 2001;56:1417-1433.

30 - Ledoux D, Touzé JL, Laigre P, Richard C, Grimard B. Relation entre chronologie des échecs de gestation et anomalies de reprises de cyclicité *post-partum* chez la vache laitière. Proc. Rencontres, Recherches, Ruminants. 2006 (Poster accepté pour publication).

31 - Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Rutllant J, Lopez-Bejar M. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. Theriogenology 2002;57:1251-1261.

35 - Michel A, Ponsart C, Fréret S, Humblot P. Effet des pratiques d'élevage sur le résultats à l'insémination des vaches normandes et prim'holstein au pâturage. El. Insem. 2004;322:4-16.

41 - Santos JE, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RL, Galvao KN. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. Anim. Reprod. Sci. 2004;82-83:513-535.

44 - Seegers H, Coulon R, Beaudeau F, Fouchet M, Quillet JM. Étude descriptive et identification de facteurs de variation de différentes catégories de retours après insémination artificielle en troupeaux laitiers. Proc. Rencontres, Recherches, Ruminants. 2001;8:357-359.

46 - Sreenan JM, Diskin MG, Morris DG. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. Proc. BSAS, Occasional meeting "Fertility in the high-Producing dairy cow. 2001;26:93-104.

Le TABLEAU "Facteurs prédisposants de la mortalité embryonnaire chez la vache laitière" et les références complètes de cet article sont consultables sur le site ***www.planete-vet.com*** Rubrique ***bibliographie***