

RELATIONS ENTRE LES TAUX PLASMATIQUES DE LH, DE PROGESTÉRONNE, L'ÉCHOGRAPHIE D'ULTRASONS ET LE MOMENT D'OVULATION CHEZ LA COCHETTE.

Françoise MARTINAT-BOTTÉ (1), D. RICHARD (1), Marie-Christine MAUREL (1), Martine PLAT (1), P. DESPRÉS (1),
A. LOCATELLI (1), G. GODET (2), J. LANDREVIE (2), J. BUSSIÈRE (3), G. RENAUD (3), M. TERQUI (1).

(1) I.N.R.A., Station de Physiologie de la Reproduction des Mammifères Domestiques - 37380 Nouzilly

(2) COBIPORC - Le Val, BP 2, 35590 Saint Gilles

(3) I.N.R.A., Station Expérimentale d'Insémination Artificielle. - 86480 Rouillé

L'expérience avait pour but de dater le moment d'ovulation chez la cochette avec trois méthodes, le dosage de progestérone, l'échographie d'ultrasons et de les comparer au moment du début du pic de LH.

Les oestrus de 29 cochettes Large White sont synchronisés avec du Régumate. La détection des chaleurs est réalisée avec un verrat, trois fois par jour; les femelles sont inséminées deux fois et abattues 2 jours après la 1ère I.A.. Les embryons sont collectés par lavage des oviductes. Des prélèvements de sang sont réalisés deux fois par jour à partir du 4ème jour post-Régumate et ceci jusqu'à l'abattage. Les concentrations plasmatiques de progestérone et de LH sont mesurées. Le moment d'ovulation, déterminé par la progestérone, est défini comme le 1er point «haut» correspondant à la moyenne des valeurs basales + 1 sd. La définition est la même pour le début du pic de LH. Deux examens échographiques par voie externe sont réalisés le premier jour de l'oestrus et dès le lendemain, les cochettes sont suivies à 9, 12, 16, 20, 24 heures et ceci jusqu'à l'abattage. Les images échographiques sont enregistrées et analysées. Le moment d'ovulation est fixé à l'heure de l'examen où l'on constate pour la 1ère fois la disparition des follicules sur l'écran (taches noires).

Le moment d'ovulation estimé par progestérone ou par échographie est très variable (23 à 64 heures après le début de l'oestrus) ainsi que le début du pic de LH (-23h à 23h après le début de l'oestrus). Lorsque la LH chute et atteint son niveau basal, la progestérone monte dans les heures qui suivent. Dans 72% des cas, l'ovulation a été enregistrée entre 40 et 49 heures après le début du pic de LH. Les taux de fécondation les plus élevés sont observés lorsque l'I.A. (1ère ou 2de) s'est située proche du moment de l'ovulation.

Relationships between LH, Progesterone, transcutaneous ultrasonography and time of ovulation in gilts

The aim of this work was to determine the time of ovulation in gilts by the plasma levels of progesterone (Pg), by ultrasonography and to compare these observations to the onset of the LH surge.

Twenty-nine cyclic gilts had been synchronized by 18 days treatment with Regumate (D_0 : end of the treatment). Oestrus detection was done by boar three times daily. Gilts were inseminated twice and slaughtered two days after 1st A.I. The embryos were recovered by flushing the oviducts. Blood samples were collected twice daily from D_4 till slaughtering. The time of ovulation determined by Pg was defined as the time when concentration of Pg increased plus one SD above basal level. The onset of LH peak was defined with the same principle. Two transcutaneous sonographic examinations of the ovaries were done on the first day of oestrus. Gilts were scanned at 9, 12, 16, 20, 24 h. each day until slaughtering. The time of ovulation was defined as the first time when no follicles could be detected.

The time of ovulation by Pg and ultrasonography was in agreement. The interval between beginning of oestrus and time of ovulation was variable : 23 to 64 h, the onset of LH surge ranged from -23h to 23h after the beginning of oestrus. For 72% of the gilts, ovulation was observed between 40 to 49 h after the onset of LH peak. A relationship was found with the interval 1st A.I. or 2nd A.I. and ovulation on fertilization rate in gilts. Gilts inseminated near time of ovulation, higher fertilization rate was achieved.

INTRODUCTION

Chez la truie, on observe de grandes variations en ce qui concerne la durée des chaleurs (de 12 à 144 heures) et le moment de l'ovulation (23 à 96 heures) ainsi que sa durée (de 0,5 à 7 heures; SIGNORET 1967; voir revue FLOWERS, ESBENSHADE, 1993).

La visualisation de l'ovaire est possible chez la truie par échographie d'ultrasons (WEITZE et al, 1989; SOEDE et al, 1992) ou par endoscopie (BRUSSOW et al, 1990). Ces outils ont permis de déterminer le moment d'ovulation. Cependant, l'endoscopie suppose une anesthésie générale de la femelle. Par contre, la technique d'échographie d'ultrasons peut être réalisée plusieurs fois sur le même animal sans le perturber. L'échographie d'ultrasons rend possible maintenant l'étude des interrelations entre les moments d'ovulation et d'insémination et la fertilité des truies (WABERSKI et al, 1994).

Le but de la présente étude est de mettre en oeuvre l'échographie d'ultrasons pour dater le moment d'ovulation chez la cochette et comme alternative le dosage de la progestérone. Ces deux méthodes ont été évaluées par rapport à la mesure du début du pic préovulatoire de LH. Les causes de la variabilité du moment d'ovulation sont envisagées. Comme les ovaires sont visualisables par échographie plus facilement chez les jeunes truies que chez les truies multipares (WILLMEN et al, 1992), l'étude a été réalisée que chez des cochettes.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette étude a été réalisée en juin et juillet 1993, à l'élevage expérimental de l'INRA de Nouzilly (37380). L'expérience a porté sur 29 jeunes truies Large White pubères. Chaque groupe suivi est constitué de 5 à 6 femelles.

1.1. Production et collecte d'embryons

1.1.1. Synchronisation des oestrus

Les oestrus des cochettes ont été synchronisés à l'aide d'un traitement progestatif -Régumate (20mg / j. / femelle), administré par voie orale et commencé au cours du second ou du troisième cycle oestral. La durée du traitement a été de 18 jours (le début commence alors à n'importe quel moment du cycle). Les femelles ont été alimentées individuellement (MARTINAT- BOTTÉ et al, 1989).

1.1.2. Détection des oestrus et insémination

La détection des chaleurs a été réalisée à l'aide d'un verrat trois fois par jour à 7h, 12h et 17h. Le début de l'oestrus c'est à dire le point «0» a été défini comme suit :

ex. 1: - + +
 17h 7h 12h
 ↑ 0h = "0" = début de l' oestrus

ex. 2: ⊕ + +
 12h 17h 7h
 ↑ 12h = "0" = début de l'oestrus

Le signe - signifie que la cochette n'est pas en oestrus; le

signe + indique que la femelle en présence du verrat se laisse chevaucher. Certaines femelles refusent le chevauchement bien que présentant un certain nombre de signes extérieures d'une femelle en oestrus (vulve rouge, agitement ...), le signe ⊕ a été mis. Dans le cas de l'exemple 1, le début de l'oestrus = «0» a été positionné au milieu de l'intervalle de 14 heures; pour l'exemple 2, le point «0» correspond à l'heure où le signe ⊕ a été mis.

Les cochettes ont été inséminées artificiellement (I.A.) deux fois (3.10^9 spermatozoïdes / I.A.), la première I.A. se situant 6 à 12 heures après le début de la détection de l'oestrus et la 2de I.A. 8 à 22 heures après la première insémination. La semence utilisée provient de verrats Meishan ou Croisés.

1.1.3. Récolte des embryons

À l'abattage, l'appareil génital des truies a été prélevé immédiatement. Les embryons de génotype croisé ont été récoltés 2 jours après la 1ère insémination par perfusion des deux oviductes avec du PBS (Phosphate Buffered Saline) à 37°C additionné de 2% de sérum. Les oeufs ont été placés dans du mKRB (modified Krebs Ringer Bicarbonate medium; Davis & Day, 1978) à température ambiante puis centrifugés (5 minutes à 15000 g) pour rendre visibles les pronuclei. Ils ont été observés sous microscope inversé (contraste interférentiel, grossissement x 400). Les embryons ne présentant pas de pronuclei ont été mis en culture pendant 6 jours environ (BERTHELOT & TERQUI, 1993) et examinés pour connaître leur état : fécondé ou non. Les embryons à deux cellules et plus ont été considérés comme fécondés. De même, les ovaires ont été examinés : comptage des corps jaunes et des follicules éventuels.

1.2. Détection du moment d'ovulation

1.2.1. Progestérone, LH

Des prélèvements de sang ont été réalisés deux fois par jour à heures fixes (8h et 16h) à partir du 4ième jour après l'arrêt du Régumate et ceci jusqu'à l'abattage. Les échantillons ont servi à mesurer les concentrations plasmatiques de la progestérone et de la LH au cours de l'oestrus. La progestérone a été dosée par une méthode RIA (SAUMANDE et al., 1985). Les concentrations de LH ont été mesurées à l'aide d'un kit de dosage immunoenzymatique de la LH (REPROKIT, Sanofi Santé Nutrition Animale, Libourne, France). Il a été réalisé en 3 heures selon un protocole simple (MAUREL, 1991). Les résultats ont été lus à l'aide d'un spectrophotomètre automatique pour plaque ELISA. Le moment d'ovulation, déterminé par le biais de la progestérone, a été défini comme étant le premier point «haut» de progestérone qui correspond à la moyenne des valeurs basales plus un écart - type. En ce qui concerne la LH, c'est le début du pic qui a été retenu soit la moyenne des valeurs basales plus un écart - type.

1.2.2. Visualisation des ovaires par échographie d'ultrasons

L'examen échographique a été réalisé par voie externe à l'aide d'une sonde sectorielle de 5 MHz (échographe Combison 310A, Kretz, Haguenau, France). Au moment de l'examen réalisé pendant le repas, la femelle doit être très calme pour avoir une bonne visualisation de l'ovaire. A l'issue d'une expérience préalable, nous avons pu déterminer que la sonde doit être placée en position dorsale dans la zone inguinale

pour visualiser l'ovaire. L'image obtenue sur l'écran de l'échographe traduit la coupe tissulaire située sous la partie émettrice de la sonde. Les liquides apparaissent en noir sur l'écran car ils ne renvoient pas d'écho. Les tissus renvoient des échos (échogènes); ils sont visualisés en gris plus ou moins clair selon la densité du tissu. A l'approche de l'oestrus, les images de l'utérus sont très échogènes. Les ovaires, situés près de la vessie, se présentent sous forme de taches noires plus ou moins grandes, accolées les unes aux autres (taille des follicules : 6 à 8 mm). Après l'ovulation, les taches deviennent grisées et les contours sont difficilement identifiables. Le premier jour de l'oestrus, l'examen échographique a été réalisé deux fois : 9h et 16 h. Dès le lendemain, les femelles ont été suivies à 9, 12, 16, 20, 24 heures et ceci chaque jour, jusqu'à l'abattage. Les images échographiques de chaque exploration ont été enregistrées et analysées ensuite pour fixer individuellement le moment d'ovulation. Ce dernier correspond à l'heure de l'examen où l'on constate pour la 1ère fois la disparition sur l'écran de l'échographe des follicules (taches noires). La période d'ovulation n'a pas pu être déterminée par échographie chez trois cochettes.

1.3. Collecte des données et analyse statistique

Pour chaque cochette, le taux de collecte (% d'embryons par rapport au nombre de corps jaunes) a été déterminé. Le taux de fécondation a été calculé en tenant compte des embryons qui présentaient deux pronuclei et ceux qui se sont divisés après une culture de 6 jours. L'effet du traitement sur les intervalles première I.A. - moment d'ovulation, seconde I.A. - moment d'ovulation et le nombre de femelles ayant uniquement des oeufs fécondés ont été analysés à l'aide de χ^2 (logiciel «New S Language», BECKER et al, 1988)

2. RÉSULTATS

L'âge moyen à la puberté du groupe suivi est de 184 ± 19 jours ($m \pm sd$). Nos observations ont porté sur le 3ième ± 1 cycle oestral. Au moment de l'abattage, le poids moyen a été de 133 ± 11 kg ($m \pm sd$).

2.1. Production et collecte d'embryons

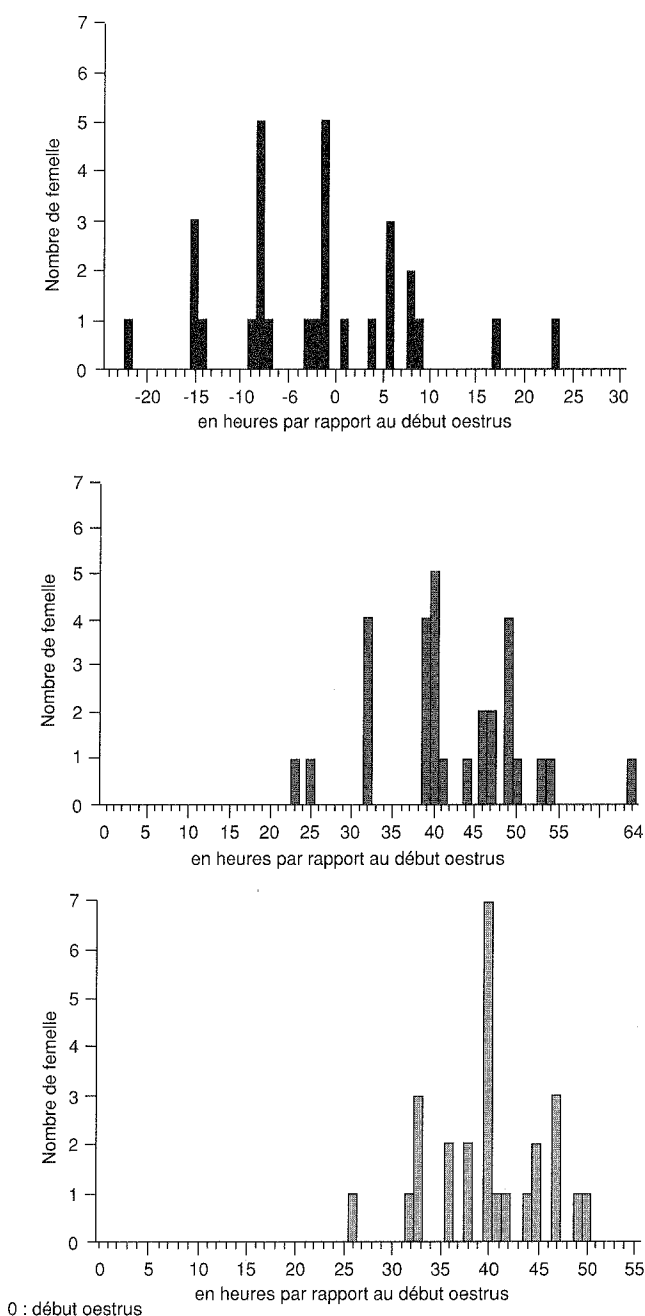
Toutes les cochettes sont venues en oestrus sur 2 jours : le 5ième ($n=23$) et le 6ième jour ($n=6$) après l'arrêt du Régumate. Au moment de l'abattage, soit 55 à 70 heures après le début de l'oestrus, 28 cochettes sur 29 ont des corps jaunes sur les deux ovaires. La dernière cochette a été abattue en cours d'ovulation 64 heures après le début de l'oestrus. Le taux d'ovulation est de 17 ± 2 corps jaunes ($m \pm sd$). Le taux moyen de collecte après le lavage des oviductes est de 92 ± 8 %. Sur la base du développement des embryons, le taux de fécondation est de 82 ± 30 %.

2.2. Comparaison des différentes méthodes

Une variabilité de 48 heures environ est observée dans l'apparition du début du pic de LH (figure 1). Il se situe 9 heures avant et 9 heures après le début de l'oestrus chez 76% des cochettes. En moyenne, le début du pic est à $2,4 \pm 10,4$ heures avant le début des chaleurs. De même, malgré un bon groupage des chaleurs, une grande variabilité est notée dans

l'apparition du moment d'ovulation estimé par le début de la montée de progestérone ou par échographie d'ultrasons : respectivement 23 à 64 heures et 26 à 50 heures par rapport au début de l'oestrus (figure 1). La moyenne des moments d'ovulation par échographie se situe à 40 ± 6 heures et à 42 ± 9 heures pour la progestérone. La détection de l'ovulation par échographie est donc antérieure de deux heures environ à celle de la progestérone. Ces différences s'expliquent en partie par la fréquence différente des examens entre les deux méthodes.

Figure 1

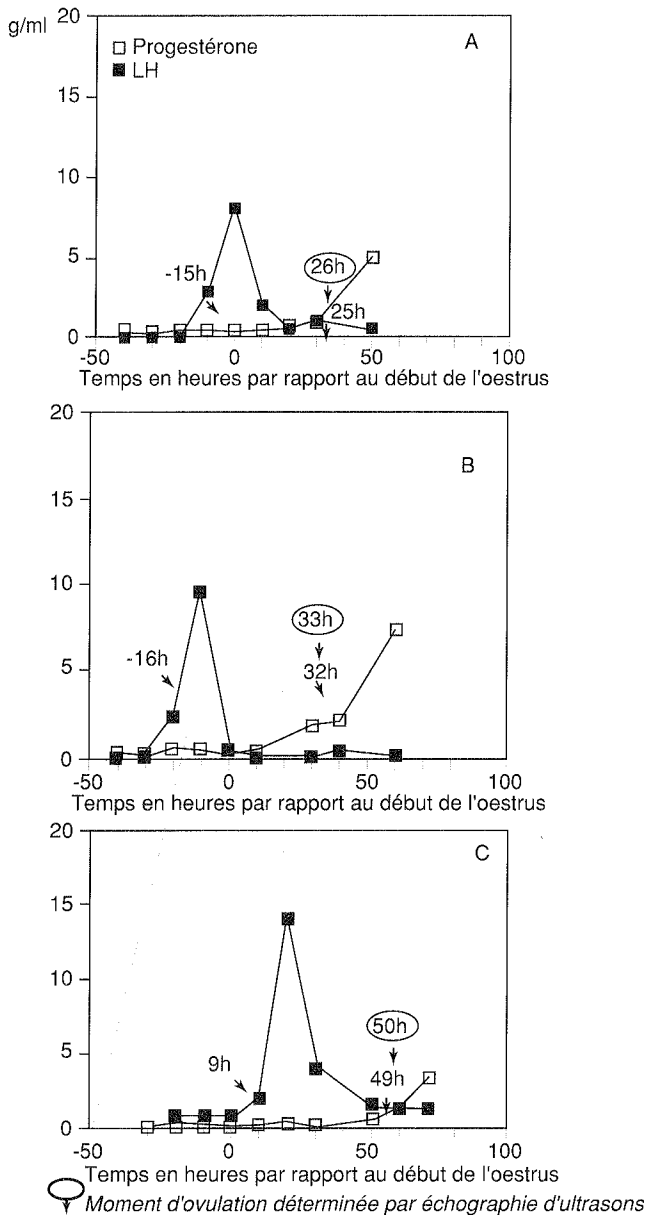


La figure 2 montre, pour les 3 truies représentées, que lorsque la LH chute et revient à son niveau basal, la progestérone monte dans les heures qui suivent.

L'intervalle début pic de LH et ovulation déterminé par échographie d'ultrasons ou progestérone est variable. Cependant,

72% des femelles ont eu un intervalle début de pic de LH - ovulation compris entre 40 et 49 h et ceci quelque soit l'outil utilisé. Pour 2 cochettes, l'intervalle début du pic - ovulation constaté par échographie est de 52 et 65 heures respectivement et pour 20% des femelles, cet intervalle est de 32 heures (figure 3).

Figure 2 - Variations de la progestérone et de la LH chez trois cochettes au moment de l'oestrus



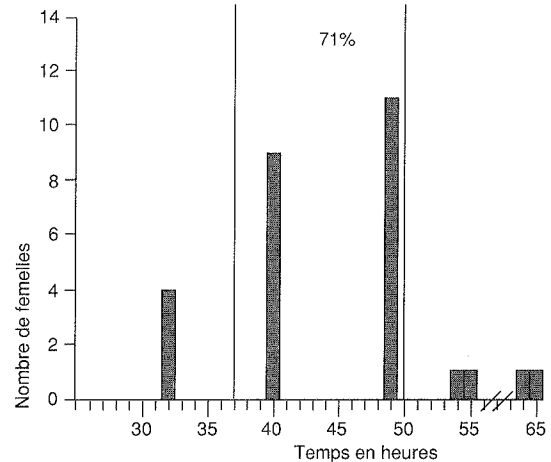
2.3. Taux de fécondation en fonction du moment d'ovulation et de l'insémination

Un effet significatif est observé entre les «intervalles I.A. - ovulation» sur le pourcentage de femelles dont tous les oeufs sont fécondés ($p < 0,02$). Ce pourcentage est faible lorsque la 1ère I.A. se situe respectivement entre 29 et 41 heures, soit la 2de I.A. 20 à 25h avant la montée de progestérone (25%, $n=4$). Si la 1ère I.A. se situe 15 heures avant la montée de progestérone, 85% des femelles n'ont que des oeufs fécon-

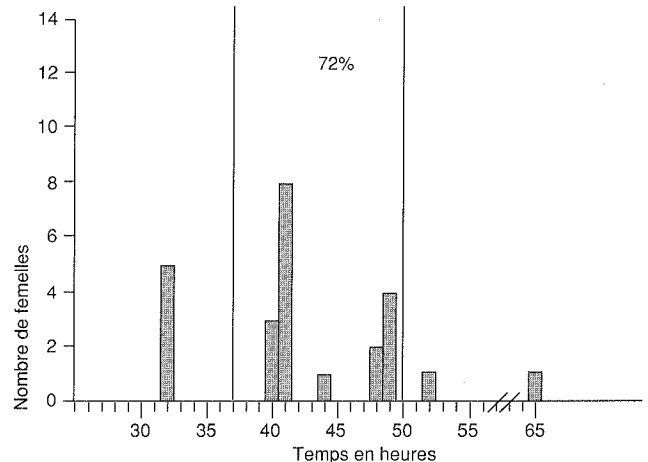
dés ($n=7$). Deux cochettes ont été inséminées pour la première fois au moment de l'ovulation, tous les oeufs étaient fécondés; un résultat similaire est observé pour les femelles inséminées au moment de l'ovulation pour la seconde fois (87,5%, $n=8$). Des résultats identiques sont observés lorsque le moment d'ovulation est déterminé par échographie d'ultrasons.

Figure 3

a) Intervalle début du pic de LH - début montée de progestérone ($n=28$)



b) Intervalle début du pic de LH - ovulation constatée par échographie ($n=25$)



3. DISCUSSION

Une grande variabilité dans l'apparition du début du pic de LH et du moment d'ovulation déterminé par échographie ou par progestérone est observée dans cette étude soit une étendue sur deux jours environ de la période d'ovulation chez la cochette. Ces résultats sont conformes à ceux de la littérature (FLOWERS, ESBENSHADE, 1993; HELMOND et al, 1986; SOEDE et al, 1994). Les oestrus des cochettes ont été synchronisés à l'aide du progestagène - Régumate; ceux-ci sont apparus sur 2 jours. Le progestagène seul ne permet donc pas de réduire la variabilité de la période d'ovulation.

Le dosage immunoenzymatique de la LH a permis d'observer que dans 72% des cas, l'intervalle début du pic de LH -

ovulation est assez constant chez la cochette. Le moment d'ovulation estimé soit par échographie soit par progestérone se produit 40 à 49 heures après le début du pic de LH. Cet intervalle est, en moyenne, de 45 ± 9 heures lorsque l'ovulation est déterminé par progestérone. HELMOND et al (1986) trouvent aussi chez des cochettes Landrace que l'intervalle pic de LH - ovulation est relativement constant : 42 ± 5 heures ($m \pm sd$). Pour cette étude, le moment d'ovulation est déterminé par le biais de la progestérone selon une définition du moment similaire à celle de notre expérience mais la fréquence des prélèvements sanguins est plus élevée : toutes les 6 heures et les données d'ovulation sont comparées par rapport au pic maximum de LH ce qui explique sûrement les différences entre les moyennes dans les deux études.

Les différents travaux réalisés précédemment sur l'échographie d'ultrasons par voie externe ou rectale indiquent que la méthode est applicable pour suivre le processus d'ovulation (WEITZE et al, 1989; SOEDE et al, 1992). Nous retrouvons ce résultat dans notre étude : le moment d'ovulation a été déterminé chez 26 cochettes sur les 29 traitées. L'échec observé chez 3 femelles relève d'ordre matériel. Par voie rectale, l'échographie permet de compter le nombre de follicules présents sur les ovaires et ainsi calculer le moment et la durée d'ovulation si les examens sont réalisés très fréquemment (SOEDE & KEMP, 1993). Cependant, la méthode n'est applicable que chez les multipares. Par voie externe, elle est possible chez toutes les catégories d'animaux à condition que l'animal soit calme. Néanmoins, l'échographie suppose de la part de l'opérateur un entraînement à la lecture et l'interprétation des images et de disposer d'un échographe ayant une très bonne résolution. La sonde sectorielle est utilisée pour la visualisation de l'ovaire. D'autre part, pour dater le moment d'ovulation, l'échographie doit être réalisée plusieurs fois au cours de l'oestrus.

En ce qui concerne le moment d'ovulation par le biais de la progestérone, sa détermination est basée sur la montée de cette hormone dans les heures qui suivent l'ovulation. Pour

cette étude, il se situe à 42 ± 9 heures après le début de l'oestrus. Les travaux de HELMOND et al (1986) et SOEDE et al (1994) confirment que la progestérone peut être utilisée comme méthode d'investigation pour dater le moment d'ovulation mais avec une précision moins grande que par échographie, du à l'impossibilité de réaliser des prélèvements sanguins à l'oreille très fréquemment dans la journée.

Par ailleurs, nous observons que lorsque la 1ère et la 2de I.A. est réalisée au moment de l'ovulation, le pourcentage de femelles ayant tous les oeufs fécondés est élevé. Ce résultat obtenu sur un nombre restreint de cochettes, corrobore ceux de WABERSKI et al (1994) mais une seule insémination était réalisée.

CONCLUSION

Le suivi par échographie ou par dosage plasmatique de progestérone permettent de déterminer le moment d'ovulation chez la cochette. Ce dernier est très variable (23 à 64 heures après le début de l'oestrus) ainsi que le début du pic de LH. Dans 72% des cas, celui-ci a lieu 40 à 48 heures avant l'ovulation. Les taux de fécondation les plus élevés sont observés lorsque l'I.A. (1ère ou 2de) s'est située proche du moment de l'ovulation.

Quelque soit la méthode utilisée pour dater le moment d'ovulation, plusieurs points sont nécessaires d'être réalisés au cours de l'oestrus. Ces méthodes constituent encore des outils d'investigations.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Madame Odile MOULIN, Messieurs D. COL et E. VENTURI, le personnel de l'Abattoir, Hopital et celui du Laboratoire de Dosages Hormonaux (I.N.R.A., P.R.M.D., 37380, Nouzilly) pour leur collaboration efficace lors de la réalisation de cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BECKER, R.A., CHAMBERS J.M., WILKS, A.R., 1988, The new S Language. edited by Wadsworth & Brooks/Cole Computer Science Series, 702 pp.
- BERTHELOT F., TERQUI M., 1993, 9ième Réunion A.E.T.E., Lyon, 10-11/09/93, p152.
- BRUSSOW K.P., RATKY J., KANITZ W., BECKER F., 1990a, *Reprod. Dom. Anim.*, 25, 184 - 190.
- DAVIS D.L., DAY B.N., 1978, *Journal of Animal Science*, 46, 1043 - 1053.
- FLOWERS W.L., ESBENSHADE K.L., 1993, *Journal Reproduction and Fertility*, 48, 217 - 228.
- HELMOND F., AARNINK A., OUDENAARDEN C., 1986, In : Embryonic mortality in farm animals, Ed. SREENAN J.M., DISKIN M.G., p 119 - 125.
- MARTINAT - BOTTÉ F., BARITEAU F., FORGERIT Y., MACAR C., MOREAU A., TERQUI M., SIGNORET J.P., 1989, *Journées Rech. Porcine en France*, 21, 125 - 128.
- MAUREL M.C., 1991, 7ième Réunion A.E.T.E., Cambridge, 14-15/09/91, p176.
- SIGNORET J.P., 1967, *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 7, 407 - 421.
- SAUMANDE J., TAMBOURA D., CHUPIN D., 1985, *Theriogenology*, 23, 719 - 731.
- SOEDE N.M., NOORDHUIZEN J.P.T.M., KEMP B., 1992, *Theriogenology*, 38, 653 - 666.
- SOEDE N.M., KEMP B., 1993, *Theriogenology*, 39, 1043 - 1053.
- SOEDE N.M., HELMOND F.A., KEMP B., 1994, *Journal Reproduction and Fertility*, 101, 633 - 641.
- WABERSKI D., WEITZE K.F., LIETMANN E., LUBBERT zur LAGE W., BORTOLZZO F.P., WILLMEN T., PETZOLDT R., 1994, *Theriogenology*, 41, 1367 - 1377.
- WEITZE K.F., HABECK O., WILLMEN T., RATH D., 1989, *Zuchthyg.*, 24, 40 - 42.
- WILLMEN T., HABECK O., WAGNER - RIETSCHER N., RICHTER L., BORTOLOZZO F., WABERSKI D., WEITZE K.F., 1992, *Proceedings of the 12th Int. Cong. Anim. Reprod.*, La Haye, 174 - 176.