

Université de Montréal

**Analyse de la fertilité des vaches laitières Holstein « Repeat Breeder »**

par

Ariane Bonneville-Hébert

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M. Sc.)

en sciences vétérinaires

option reproduction

Décembre 2009

Ariane Bonneville-Hébert, 2009

Université de Montréal  
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Analyse de la fertilité des vaches laitières Holstein « *Repeat Breeder* »**

présenté par  
Ariane Bonneville-Hébert

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Alan Goff, président- rapporteur  
Réjean Lefebvre, directeur de recherche  
Daniel Bousquet, codirecteur  
Luc DesCôteaux, membre du jury

## Résumé

L'importance de la problématique des vaches laitières non gestantes avec multiples inséminations (> 3) communément appelées « Repeat Breeder » (RB), au Québec, repose sur deux facteurs: son incidence et son impact économique. Actuellement, l'incidence du syndrome RB au Québec est de  $\pm 25\%$  (Rapport annuel, juin 2008, [www.dsahr.ca](http://www.dsahr.ca)). Les pertes monétaires associées à ce problème proviennent des frais vétérinaires et d'insémination, de la diminution de productivité ainsi que des pertes en lien avec la réforme involontaire. Afin d'avoir de meilleures connaissances sur ce syndrome, nous devons connaître les facteurs de risques généraux impliqués et ensuite explorer la condition individuelle de ces vaches problèmes.

Dans la première partie de ce mémoire, une banque de données informatisées répertoriant 418 383 lactations fut analysée. L'objectif de ce projet de recherche était d'évaluer l'impact des problèmes reproducteurs post-partum et l'effet du nombre de lactations comme facteurs de risques de la vache Repeat Breeder. L'analyse a permis d'établir la dystocie comme étant la condition ayant le plus de conséquences sur la fertilité future. D'autres facteurs de risques à savoir le nombre de lactations influencent le pronostic reproducteur.

La deuxième partie de ce mémoire consistait à explorer, à l'aide d'outils cliniques, la condition individuelle des vaches RB. Une étude cohorte fut menée sur des vaches Holstein en fin de période d'attente volontaire au jour 7 du cycle oestral. Les tests cliniques étudiés furent la vaginoscopie, l'examen transrectal, l'ultrasonographie du système reproducteur, la présence d'estérases leucocytaires, la bactériologie et la biochimie du liquide utérin, la cytologie endométriale et le profil de progestérone sérique. Les résultats de ces tests cliniques dévoilent que l'examen bactériologique du liquide utérin est révélateur du statut reproducteur futur.

**Mots-clés:** Repeat Breeder, performances reproductrices, problèmes post-partum, nombre de lactations, réforme, examen du système reproducteur, vaches laitières.

## Abstract

Two factors underlie the Repeat Breeder (RB) concerns in Quebec: its incidence and economic impact. Currently RB incidence in Quebec is of  $\pm 25\%$  (yearly Report, June 2008, [www.dsahr.ca](http://www.dsahr.ca)). Monetary losses related to the RB are the result of veterinary expenses and insemination, loss of productivity and the involuntary culling. In order to have a better knowledge of this syndrome, one must understand the general risk factors involved and then explore the individual condition of these problem cows.

The goal of the first part of the project was to assess the impact of the postpartum reproductive problems and the effect of the lactation number as risk factors of the Repeat Breeder cow. A computerized data bank listing 418 383 lactations was analyzed. The analysis established dystocia as being the condition with the most consequences on future fertility. Other risk factors namely the number of lactations influence the reproductive prognosis as well.

The second part of the research was to explore the individual condition of the RB using clinical tools. A cohort study was conducted on Holstein cows at the end of the voluntary waiting period on day 7 of the oestrous cycle. The clinical tests studied were vaginoscopy, trans-rectal examination, ultrasonography of the reproductive system, presence of leukocyte esterase, bacteriology and biochemistry of uterine fluid, endometrial cytology and serum progesterone profile. The results of these clinical tests reveal that the bacteriological analysis of uterine fluid is indicative of future reproductive status.

**Keywords:** Repeat Breeder, reproductive performance, post-partum problems, number of lactations, culling, examination of the reproductive system, dairy cows.

## Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	iv
Table des matières .....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures et graphiques.....	ix
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements .....	xii
Introduction.....	1
Recension des écrits .....	2
Chapitre 1 : outils actuels d'analyse de la fertilité .....	2
Anamnèse (troupeau – individuelle).....	2
Examen physique.....	8
Examen transrectal par palpation .....	9
Échographie.....	11
Vaginoscopie .....	12
Bactériologie du milieu utérin .....	14
Cytologie endométriale .....	16
Biopsie utérine .....	20
Profil hormonal.....	23
Chapitre 2 : outils futurs potentiels.....	25
Estérases leucocytaires .....	26
Métricheck.....	27
Caractérisation de l'échotexture utérine.....	27
Biochimie des sécrétions endométriales.....	29
Hystéroscopie .....	33

Objectifs et hypothèses de la recherche.....	34
Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling in Quebec dairy cows. ....	35
Identification de marqueurs physiques et biochimiques de la condition utérine de la vache Repeat Breeder ...	49
Discussion générale .....	72
Conclusion générale.....	75
Bibliographie.....	76

## Liste des tableaux

### Recension des articles scientifiques

<b>Tableau I</b> : Mesure des performances reproductrices des vaches laitières Holstein avec endométrite et sans endométrite (n = 1865).....	6
<b>Tableau II</b> : Classification des bactéries isolées lors de cultures aérobiques et anaérobiques de 328 écouvillons utérin selon leur potentiel pathogénique dans l'utérus.....	15

### Premier article

#### **Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling in Quebec dairy cows.**

<b>TABLE 1:</b> Lactational incidence of postpartum reproductive problems (PPP) according to parity on 418 383 lactations between 2000 and 2006.....	45
<b>TABLE 2:</b> Results of logistic regression model of Repeat Breeder cows from Quebec data base of 418 383 lactations between 2000 and 2006. Odds ratios are present for repeat breeders cows and classify according to postpartum reproductive problem and parity.....	45
<b>TABLE 3:</b> Proportion of Culling (%) for control and repeat breeder cows from Quebec database of 418 383 lactations between 2000 and 2006.....	45
<b>TABLE 4:</b> Logistic regression presenting effect of postpartum reproductive problems and parity on culling for the group of repeat breeder cows (N = 87,823 RB cows) from Quebec database between 2000 and 2006....	46

### Deuxième article

#### **Identification de marqueurs physiques et biochimiques de la condition utérine de la vache Repeat Breeder**

<b>Tableau 1</b> : Distribution des résultats des tests dichotomiques et catégoriques selon les groupes de vaches contrôles ( n = 9) et Repeat Breeder (n = 8). .....	66
<b>Tableau 2</b> : Identification des bactéries aérobiques retrouvées dans le liquide utérin, après la méthode de lavage utérin avec saline stérile, selon les groupes de vaches contrôles (n = 9) et Repeat Breeder (n = 8) ...	66

<b>Tableau 3 :</b> Concentration des paramètres biochimiques retrouvés dans le liquide utérin au J7 du cycle oestral selon les groupes de vaches contrôles ( n = 9) et Repeat Breeder (n = 8).....	67
<b>Tableau 4 :</b> Distribution des moyennes et écarts type ( ) des données de biochimie du liquide utérin récolté au jour 7 du cycle oestral chez les vaches contrôles (n = 9) et RB (n = 8).....	67

## Liste des figures et graphiques

### Recension des écrits

<b>Figure 1.</b> Taux de conception en fonction du nombre de jours en lait (JEL) (D.S.A laitier).....	4
<b>Figure 2.</b> Augmentation de la production laitière, de l'intervalle entre les vêlages et du nombre d'inséminations (IA) par conception entre les années 1970 à 2000.....	5
<b>Figure 3.</b> Angle d'inclinaison de la vulve.....	9
<b>Figure 4.</b> Exemples de classification des écoulements retrouvés à la vaginoscopie.....	13
<b>Figure 5.</b> Composantes d'une cytobrosse servant au prélèvement d'un échantillon du milieu utérin dans le but d'effectuer une cytologie endométriale d'une vache.....	17
<b>Figures 6.</b> Préparation des lames cytologiques.....	18
<b>Figure 7 :</b> Exemple de cellules (endométriales; neutrophiles; vaginales) retrouvées lors de cytologies endométriales provenant d'un lavage utérin chez la vache laitière.....	19
<b>Figure 8.</b> Morphologie utérine.....	21
<b>Figure 9.</b> Profil hormonal normal de la progestérone plasmatique chez les receveuses gestantes (n=15) et non gestantes (n=5).....	24
<b>Figure 10.</b> Illustration des différents profils de progestérone possibles en période post-partum chez la vache laitière.....	25
<b>Figure 11.</b> Bâtonnet réactif urinaire pour la détection des estérases leucocytaires (Multistix 10SG de Bayer).....	26
<b>Figure 12.</b> Variations échographiques des niveaux de gris et de l'homogénéité utérine durant le cycle oestral chez la vache laitière. ....	28

### Premier article

**Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling in Quebec dairy cows.**

<b>Figure 1.</b> Proportion of control and repeat breeder cows with each postpartum disorder.....	46
---	----

### Deuxième article :

**Identification de marqueurs physiques et biochimiques de la condition utérine de la vache Repeat Breeder**

**Figure 1** . Corrélation entre les valeurs de créatinine kinase (cK) et de lactate déshydrogénase (LDH).....68

**Figure 2**. Courbe de survie: intervalle entre le vêlage et l'insémination fécondante pour les vaches contrôles (en noir) et RB (en rouge).....68

## Liste des sigles et abréviations

ASTLQ : Amélioration de la santé des troupeaux laitiers du Québec  
Al : Aluminium  
BEN: Balance énergétique négative  
Ca : Calcium  
Ck : Créatinine kinase  
Cl: Chlore  
COOP : Coopérative agricole  
Cu: Cuivre  
dL : Décilitre  
DSA : Dossier de santé animal  
FIV : Fécondation in vitro  
FMV : Faculté de médecine vétérinaire  
g : gramme  
IA : Insémination artificielle  
I.C : Intervalle de confiance  
JEL : Jours en lait  
K : Potassium  
L : Litre  
LDH : Lactate déshydrogénase  
LH : Luteinising Hormone  
LPS : Lipopolysaccharide  
mg : milligramme  
Mg : Magnésium  
mmol : millimol  
ml : millilitre  
Na : Sodium  
PAV : Période d'attente volontaire  
PMN : Polymorphonucléaire  
PPP : Problème post-partum  
RB : Repeat breeder  
R.C. :Rapport de cote  
RP : Rétention placentaire  
RPM : Rotation par minute  
R.R : Rapport de risque  
Se : Sensibilité  
Sp : Spécificité  
TE : Transfert d'embryon  
U : Unité internationale  
µg : Microgramme  
Zn: Zinc

## Remerciements

Plusieurs personnes dans mon entourage professionnel et personnel m'ont secondée dans la réalisation de mon mémoire. Je me trouve avare de mots pour leur exprimer à quel point je leur sais gré de tout le temps et pour tous les conseils qu'ils m'ont généreusement octroyés. En tout premier lieu, je veux remercier **Dr Jean Durocher**. En effet, l'idée d'entreprendre une maîtrise à la sortie de mon doctorat en médecine vétérinaire ne se serait pas concrétisée s'il n'avait pas piqué mon intérêt en reproduction bovine. Par l'intermédiaire de journées de mentorat, Dr Durocher, m'a aidé à tisser un lien avec une entreprise privée soit **Alliance Boviteq** qui a décidé par la suite de chapeauter financièrement et professionnellement mon travail de maîtrise, ce qui fut fort appréciable. De plus, je tiens à rendre hommage à **Dr Réjean Lefèbvre**, qui se retrouve parmi les professeurs qui se sont démarqués à mes yeux, lors de mon parcours doctoral. En effet, il a su capter mon intérêt pour la reproduction bovine. Comme Directeur de maîtrise, Dr Lefèbvre a contribué à l'élaboration et l'application de mon projet de recherche. Malgré son horaire chargé, sa porte était toujours grandement ouverte pour m'écouter et m'épauler judicieusement dans mon cheminement professionnel. Par ailleurs, dans le même esprit de palmarès de professeurs remarquables, il est important, pour moi, de témoigner, aujourd'hui, toute mon estime, à **Dr Daniel Bousquet**. J'ai eu la chance de le côtoyer comme professeur, co-Directeur de ma maîtrise et collègue de travail à Alliance Boviteq (2007-2009). Dr Bousquet a contribué, par ses connaissances et son expertise à la réalisation non seulement de ce travail, mais encore à mon développement en tant que professionnelle. Je ne voudrais surtout pas oublier de saluer **Dr Émile Bouchard et Dr Denis du Tremblay** pour le soutien et l'aide apportée principalement pour le premier article tout comme **M. Guy Beauchamp** que je tiens à remercier particulièrement pour le support dans les analyses statistiques. Finalement, je veux exprimer un vif merci à mon amoureux, **Rick Favreau**, qui m'a encouragée à persévérer dans chacune des étapes de mes études universitaires et à mes chers parents, **France Bonneville et Claude Hébert**, qui sont toujours là pour m'aider à me réaliser comme être humain à part entière et à qui je dois beaucoup. Mon succès fait partie de leur réussite.

## Introduction

La fertilité du cheptel laitier mondial se détériore de façon significative depuis les deux dernières décennies (1-3). Une perte économique notable, dérivant de ce fait, affecte les entreprises en production laitière. Une augmentation de la population de vaches considérées comme sous fertiles est devenue notoire. La vache "*Repeat Breeder*" (RB), incluse dans cette catégorie, se définit généralement comme une vache non gestante, cliniquement normale, avec une cyclicité régulière et un registre minimum de trois inséminations (4). Cette définition de "*Repeat Breeder*", établie il y a plusieurs années dans un contexte d'élevage tout à fait différent du nôtre à ce jour (2009), sert encore de référence aujourd'hui dans les analyses d'infertilités.

L'investigation des problèmes de fertilité / fécondité s'avère complexe. Les problèmes potentiels de fécondation sont rapportés jusqu'à environ 15% (5) et la mortalité embryonnaire, pour sa part, entre 21 et 65 % (6). Ils représentent deux situations importantes menant aux échecs de conception des vaches. Des facteurs de risques extrinsèques (les problèmes post-partum, l'alimentation, la régie de troupeau, les éléments de stress) et intrinsèques (les anomalies morphologiques, la génétique, les anomalies des gamètes, les désordres hormonaux, la fonction et l'intégrité du milieu utérin) incarnent la source du problème.

L'environnement du système reproducteur est critique pour la fécondation et la survie de l'embryon (7-9). L'étude de l'intégrité et de la normalité du milieu utérin des vaches, entre les années 70' et 90' (10-15) revient dans les analyses d'aujourd'hui (16-21). Des modifications métaboliques (10), alimentaires (15, 16, 22, 23), hormonales (14), immunologiques (24) et infectieuses (25) peuvent être à la source de changements du milieu utérin et enfin, responsable en partie des problèmes de reproduction.

Une approche globale et individuelle s'impose afin d'examiner les problèmes de fertilité / fécondité chez la vache. D'une part, globalement, connaître les facteurs de risques impliqués dans la catégorisation de la population «RB» se dévoile comme un atout. L'analyse statistique de dossiers de santé animale, répertoriés dans un logiciel, permet de reconnaître certains facteurs de risques impliqués. D'autre part, une étude clinique individuelle des changements physiologiques et biochimiques au niveau utérin et systémique permet de préciser certains éléments engagés dans la problématique.

## **Recension des écrits**

### **Outils d'analyse de la fertilité chez l'espèce bovine**

Plusieurs outils sont à la disposition des médecins vétérinaires afin d'analyser les problèmes de reproduction. Des banques de données informatiques, répertoriant une importante quantité d'informations sur les indices reproducteurs, existent et permettent d'identifier les facteurs de risques généraux aux problèmes de fertilité. De plus, une gamme importante d'outils cliniques existe afin d'évaluer plus spécifiquement le tractus reproducteur. Actuellement, le temps et l'équipement nécessaire limitent leur utilisation à la ferme. Par contre, dans un centre de références de fertilité bovine et / ou lors de cas réfractaires aux avenues thérapeutiques, ces instruments deviennent très précieux afin d'approfondir le diagnostic d'infertilité d'un animal et/ou d'un troupeau.

Dans le résumé d'articles scientifiques qui suit, chacun des outils d'analyses énoncés sera suivi d'une description succincte de son usage et de la pertinence des résultats obtenus relative au pronostic reproducteur. L'objectif est de répertorier les tests diagnostiques connus pour expliquer les problèmes de fécondité / fertilité chez la vache.

## **Chapitre 1 : outils actuels d'analyse de la fertilité**

### **Anamnèse (troupeau – individuelle)**

La complexité des problèmes de fertilité, formulée dans la présente recherche sous le terme «syndrome Repeat Breeder» est à caractère multifactoriel. Plusieurs éléments doivent être pris en considération lors d'investigation des problèmes de reproduction soit : l'alimentation, la vaccination, la régie des vêlages et des vaches en début de lactation, les problèmes post-partum, la détection des chaleurs, la méthode d'insémination, la santé générale du troupeau, etc. Les données récupérées sur l'ensemble des dossiers permettent d'une part, l'exploration et la découverte des facteurs de risques associés à une problématique et d'autre part, incitent à considérer l'importance de l'effet de ces derniers et à déterminer leur portée globale (26-31).

D'après de nombreuses études épidémiologiques, les causes les plus communes associées aux problèmes de fertilité sont: la détection des chaleurs, la synchronisation inadéquate entre l'insémination et l'ovulation, une fonction lutéale inadéquate, la technique d'insémination artificielle, les problèmes d'alimentation, les kystes folliculaires, l'endométrite, le stress thermique, les retards d'involution utérine et les agents infectieux (32). La plupart des études épidémiologiques sur la reproduction utilisent les indices de reproduction tels

que le nombre de jours ouverts ou l'intervalle vêlage – insémination fécondante, les chances de conception aux inséminations artificielles (IA), l'intervalle vêlage - première insémination et le nombre d'inséminations artificielles (IA) par conception comme variable dépendante pour mesurer l'effet des paramètres sélectionnés.

L'existence des banques de données en santé animale (DSA laitier, Dairy com, Raleigh DHIA record system, etc....) est nécessaire. L'entrée systématique de données pertinentes sur chaque dossier animal est importante puisqu'elle permet de comprendre rapidement l'historique de santé de l'animal ou du troupeau et d'orienter l'examen clinique en fonction du cas. L'entrée des données dans la banque de données est une limitation importante de l'analyse. Elle peut être discutable à cause du grand nombre d'utilisateurs du système. Par contre, la puissance notable de ces répertoires incite à leurs utilisations.

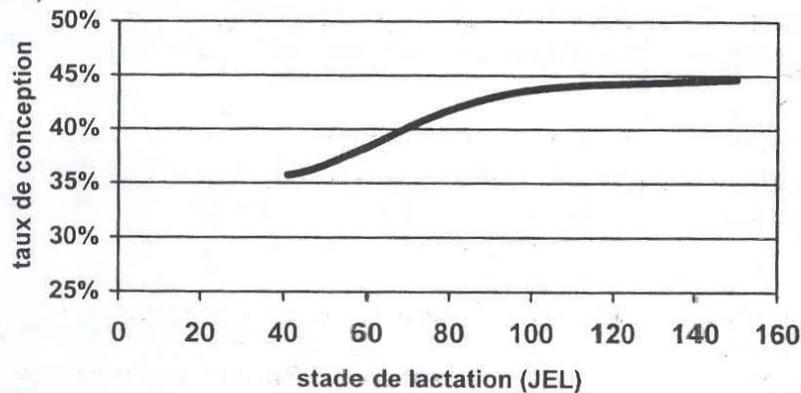
L'entrée de données particulières à chacune des vaches permet un meilleur suivi et de l'animal et du troupeau. L'historique de l'animal donne de l'information sur sa condition actuelle et ses antécédents. Le regard sur le dossier de santé informe sur l'âge, le nombre de lactations, le nombre de jours en lactation (JEL), la production laitière, les performances reproductrices antérieures ainsi que la présence ou absence de problèmes post-partum ou autres. Ceci peut apporter des informations complémentaires aux observations cliniques.

Les informations possibles et pertinentes au pronostic reproducteur subséquent sont par exemple :

- L'âge et le nombre de lactations. Les taures ont habituellement des performances reproductrices supérieures aux vaches adultes. Dans le cas contraire, des malformations congénitales (persistance de l'hymen, aplasie segmentaire), la possibilité de «free» martinisme (jumeaux mâle-femelle à la naissance) et de troubles hormonaux (kyste ovarien, anoestrus) sont suspects. En retour, les facteurs influençant la reproduction chez les vaches avec parités avancées sont: une augmentation de la production de lait (3), de la balance énergétique négative (3), de la mortalité embryonnaire (33) et de l'incidence des problèmes reproducteurs, la métrite en est un exemple (30, 34).
- Le nombre de jours en lactation (JEL). Il est généralement reconnu que lorsque la première IA est réalisée avant les 3 premiers mois de la lactation, les chances de conception à la première saillie diminue et par le fait même le nombre total d'insémination augmente (**Figure 1**). Le repos physiologique du système reproducteur et le temps d'observation des chaleurs sont deux raisons pouvant expliquer les meilleures performances reproductrices. Par contre, chaque jour supplémentaire de l'intervalle vêlage/première insémination, correspond à une augmentation de 0.7 jour de l'intervalle vêlage - insémination fécondante (jours ouverts) (35).

**Figure 1.** Taux de conception en fonction du nombre de jours en lait (JEL) (D.S.A laitier).

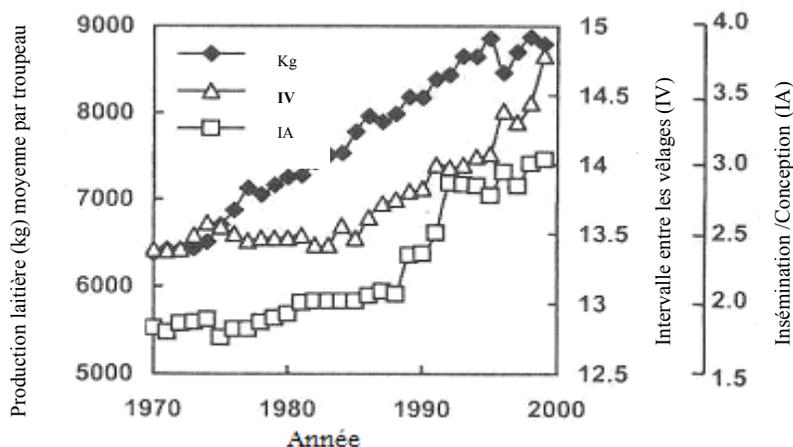
Tiré et autorisé de (35)



- La production laitière. L'augmentation du nombre de vaches infertiles coïncide avec l'augmentation de la production laitière (**Figure 2**). La forte production lactée demande une ingestion de matière sèche supérieure à la normale. L'augmentation du métabolisme va de soit avec cette condition et parallèlement, une augmentation du catabolisme des hormones stéroïdiennes tel l'oestrogène et la progestérone est envisageable (36). Néanmoins, les articles se contredisent. L'augmentation de la production de lait à un effet mineur sur la reproduction comparé aux autres facteurs de risque (3). Une haute production laitière augmentera seulement le risque de problèmes de fertilité si les conditions de régie de troupeaux sont sous optimales, la sous- alimentation en est un exemple (37). En effet, les productions laitières supérieures associées avec une balance énergétique négative de sévérité et/ou de durée importante sont reliées à une altération du développement de l'embryon et particulièrement de l'ovocyte (38).

**Figure 2.** Augmentation de la production laitière, de l'intervalle entre les vêlages et du nombre d'inséminations (IA) par conception entre les années 1970 à 2000.

Tirée et autorisée de (3). Reproduit et traduit.



Les données furent récupérées sur 143 fermes laitières à partir du système d'entrées de données *DHIA* de 1970 à 1999 (« communication personnel, J.S. Clay, Dairy Records Management systems, Raleigh, NC »)

Kg : Production laitière moyenne en Kg de lait produit par troupeau de vaches laitières

IV : Intervalle entre les vêlages (mois)

IA : Nombre d'inséminations artificielles par conception

- L'historique des lactations antérieures : Une vache avec retard de cyclicité ou arrêt de cyclicité en période post-partum la lactation précédente a beaucoup plus de chances d'avoir le même profil l'année suivante (R.C 2.16; I.C : 1.36-3.44) (39). Cet élément indique la possibilité d'une influence génétique.
- La présence de problèmes reproducteurs en période post-partum. Ces derniers influencent l'involution utérine de même que l'activité ovarienne, altérant ainsi les performances reproductrices futures de l'animal (30). La dystocie, la rétention placentaire, la métrite (28), le kyste ovarien (36) et l'endométrite (34, 40) sont reconnus pour être associés à de mauvaises performances reproductrices (29). Les mesures des performances reproductrices chez les vaches laitières avec endométrite versus sans endométrite sont illustrées dans **le Tableau I** (41). Dans cette dernière étude, l'endométrite était identifiée selon les signes cliniques suivant soit par la présence d'écoulements purulents (examen externe de la région périnéale et examen vaginoscopique), par la mesure du col utérin de >7.5 cm entre 20 et 33 JEL, ou par la présence des écoulements mucopurulents après 26 JEL (examen externe de la région périnéale et examen vaginoscopique).

**Tableau I** : Mesure des performances reproductrices des vaches laitières Holstein avec endométrite et sans endométrite (n = 1865).

Données tirées et autorisées de (41). Reproduit et traduit.

Variables	Endométrite		P
	Oui	Non	
Jours moyens : 1 <sup>ère</sup> insémination (JEL)	80	75	0.002
Taux de conception : 1 <sup>ère</sup> insémination (%)	29.8	37.9	0.01
Risque cumulatif de gestation (%)	70.6	79.6	0.0004
Gestante à 120 JEL (%)	33.5	47.4	0.0001
Moyenne de jours ouverts (JEL)	150	122	0.0001
Nombre d'inséminations / vache gestante	2.35	2.15	0.06
Pourcentage de réforme: toutes conditions confondues (%)	27.9	21.1	0.01
Pourcentage de réforme: cause reproduction (%)	6.7	3.8	0.02

Les examens reproducteurs réalisés sont: inspection de la région du périnée, vaginoscopie et l'examen transrectal entre 20 et 33 JEL.

Depuis longtemps, les vaches problèmes (ayant expérimenté : vêlage difficile, rétention placentaire, infection utérine, kyste ovarien) en comparaison aux vaches sans problème sont reconnues pour avoir un intervalle vêlage - première insémination plus long ( $82.1 \pm 1.2$  jour *versus*  $75 \pm 0.8$  jour;  $P < 0.001$ ) et un nombre d'inséminations artificielles supérieurs ( $2.33 \pm 0.6$  *versus*  $1.96 \pm 0.04$ ;  $P < 0.01$ ) résultant, approximativement, à 30 jours ouverts additionnels ( $147.2 \pm 3.0$  *versus*  $117.9 \pm 1.7$  jour;  $P < 0.01$ ) (29). D'après les résultats d'une méta-analyse et concernant les kystes ovariens, les intervalles vêlage - première insémination et l'intervalle vêlage - insémination fécondante augmentent chez les vaches kystiques respectivement de 6 à 11 jours et entre 20 à 30 jours et plus en comparaison aux vaches non kystiques (42). La période post-partum sélectionnée pour la détection des kystes n'est cependant pas déterminée pour chacune des études.

- L'augmentation de consanguinité à travers les races. Cet élément semblerait être un facteur de risque des mauvaises performances reproductrices. Le degré de consanguinité (%) peut donner un indice sur les performances reproductrices prévues *versus* un animal de même mérite génétique, mais avec une consanguinité proche de la moyenne de la race (43). Ces données sont toutefois plus difficiles à obtenir et à évaluer.

- **La santé en général**: Les interrelations entre la santé en général et la reproduction sont très complexes. Le stress de la maladie a un impact négatif sur la reproduction. L'exemple des problèmes locomoteurs est très éloquent. Une étude démontre que les vaches qui développent des problèmes de boiteries dans les 30 premiers jours de la lactation ont plus de chances de présenter des kystes ovariens (R.C : 2.63,  $p < 0.04$ ) et ont des performances reproductrices inférieures aux vaches indemnes de cette condition (44). Les chances de concevoir, pour les vaches avec boiteries, sont diminuées de plus de la moitié (RR : 0.43;  $p < 0.0002$ ) sur une période de 480 jours (44). Autre que la boiterie, des situations de stress, tel que la fièvre de lait, un stress social durant la période de reproduction, le transport, l'hypoglycémie à des temps précis du cycle oestral, sont sujet à affecter la reproduction de la vache (45). Ces facteurs de stress interfèrent à des temps précis de la relâche hormonale impliquée dans le déroulement de la phase folliculaire.

Les problèmes métaboliques tels que la fièvre vitulaire et l'acétonémie sont des facteurs de risque des mauvaises performances reproductrices. En terme d'acétonémie et, en lien avec la balance énergétique négative, la concentration relative de BHB (beta hydroxy butyrate) et la durée de l'augmentation de cette concentration sont négativement associées avec la probabilité de gestation à la première insémination (46). Plus précisément, les vaches avec une concentration de BHB supérieure ou égale à 1000  $\mu\text{mol/L}$  dans la première semaine post-partum ou une concentration supérieure ou égale à 1400  $\mu\text{mol/L}$  dans la deuxième semaine post-partum ont 20 % moins de chance d'être gestantes à la première insémination (46).

Finalement, les hautes performances en production laitière, la saison, le stress, la balance énergétique négative et les problèmes post-partum sont tous des facteurs prédisposant de mauvaises performances reproductrices, mais aussi des facteurs prédisposants du kyste folliculaire (follicule anovulatoire de plus de 2,5 cm de diamètre, pendant 10 jours consécutifs, sans structure lutéale), chez un animal en anoestrus ou présentant un oestrus continu (36, 47). Ce dernier est une des pathologies du système reproducteur les plus communes chez la vache laitière (entre 6 et 19%) et est aussi étroitement lié avec les problèmes de reproduction (47). Une prédisposition génétique pour ce problème est possible. Une relâche inadéquate de l'hormone LH par la glande pituitaire suite à une altération de l'axe hypothalamo- hypophysaire est l'hypothèse la plus acceptée(47). Aux États-Unis, la présence de kystes ovariens augmente approximativement de 22 et 64 jours l'intervalle entre le vêlage et l'insémination fécondante et coûte 137 \$ / vache en raison des pertes de lait et des frais vétérinaires encourus (48).

## Examen physique

La condition et la conformation physique de l'animal peuvent parfois aider à élucider la problématique en termes de reproduction. Les éléments principaux à regarder incluent : l'évolution de la condition de chair en période post-partum et l'angulation de la vulve.

- Condition de chair : L'évolution de la condition de chair en période péri-partum peut indiquer, de manière subjective, la sévérité de la balance énergétique. La perte de condition de chair (>1 point sur une échelle de 5 points : 1 étant très maigre et 5 très grasse) en début de lactation, associée indirectement à la sévérité et la durée de la balance énergétique négative (BEN), indique des performances reproductrices futures sous optimales (49, 50). La BEN influence le retour de cyclicité post-partum de la vache. Elle retarde l'activité ovarienne en modulant la relâche pulsatile de l'hormone LH (51). Ceci se traduit par un plus petit nombre de cycles oestriques avant la première insémination. Un autre mécanisme relie aussi la BEN avec le développement de l'ovocyte. Le statut de la balance énergétique négative affecte la santé des follicules primaires et indirectement la compétence et la qualité de l'ovocyte mature (38). Ainsi, une altération du processus normal de croissance folliculaire peut se répercuter plus tard dans la lactation.
- L'angle d'inclinaison de la vulve est important (Figure 3) : un angle portant sur l'horizontal est un facteur de risque de l'urovagin. L'urovagin augmente les chances d'endométrite et de mauvaises performances reproductrices. Les vaches avec un urovagin, en comparaison aux vaches sans, nécessitent plus d'inséminations pour devenir gestantes (5 *versus* 2,  $P < 0.001$ ), un nombre de jours ouverts supérieur (370 *versus* 136,  $P < 0.001$ ), plus de chances d'être non gestantes à 210 jours (R.C : 6.62; I.C : 2.91 à 15.11) et d'être réformées (R.C : 5.32; I.C : 2.52 à 11.21) (52)

### Figure 3. Angle d'inclinaison de la vulve

Tirée et autorisée de (52). Reproduit et traduit



(a) Vulve verticale (b) Vulve horizontale

### Examen transrectal par palpation

L'examen transrectal par palpation est l'outil le plus couramment utilisé en pratique pour évaluer le tractus reproducteur de la vache. Celui-ci fut longtemps recommandé de routine en période post-partum (53) malgré qu'il soit de plus en plus délaissé dans les troupeaux qui utilisent des programmes plus intensifs de synchronisation de la reproduction. L'involution utérine, la présence d'infection et/ou anomalies utérine et la cyclicité de la vache peuvent ainsi être évaluées en partie suite à un examen du tractus reproducteur par la voie transrectale. Évidemment, le diagnostic de gestation est aussi possible. Par contre, ce dernier est réalisé une fois la période d'attente volontaire terminée et ou suite à une insémination artificielle et ou à une saillie naturelle.

L'involution utérine est un bon indicateur des futures performances reproductrices. Il est un processus de retour à la normale, anatomiquement et physiologiquement, de l'utérus. L'involution normale complète (macroscopique et microscopique) de l'utérus nécessite entre 45 et 50 jours chez l'espèce bovine (54). L'involution la plus rapide est souhaitée, car une fois complète, l'utérus est éligible pour une prochaine gestation. La plupart des modifications utérines s'observent dans les deux premières semaines post-partum (55). Physiquement, l'utérus doit réduire sa taille et réparer son endomètre.

Le retard d'involution utérine présage une infertilité temporaire et/ou permanente chez la vache affectée (54). Leblanc et al 2002a, conclut qu'entre 20 et 33 jours post-partum, le diamètre des cornes de l'utérus (> 8 cm) et du col utérin (> 7.5 cm) sont associées significativement ( $P \leq 0.02$ ) avec une diminution entre 20 et 40 % des chances de gestation dépendamment du moment de l'examen (20-33 JEL). La présence prolongée de micro-organismes dans l'environnement utérin peut-être responsable de ce retard (55). Par exemple, lorsque des changements importants au niveau de l'endomètre sont provoqués par une infection telle que *Arcanobactérium pyogènes*, l'involution utérine peut être retardée d'un mois suite à la disparition de l'agent bactérien en question (56).

L'examen transrectal est aussi la méthode la plus courante pour diagnostiquer une infection utérine. Toutefois, cette technique est sûrement la moins sensible et spécifique des méthodes disponibles (57). La possibilité de faux-négatifs est possiblement plus importante que les faux-positifs. La taille, la consistance de l'utérus et du col utérin de même que la présence ou non de liquide dans l'utérus font partie des critères établis pour diagnostiquer une anomalie utérine (55). Devant l'absence de changement physique évident, un diagnostic d'inflammation et/ou d'infection utérine peut être manqué. Ainsi, l'endométrite (inflammation de l'endomètre utérin sans signe systémique associé) est facilement passée inaperçue, tandis que le pyomètre (inflammation de l'endomètre associée à une accumulation d'une substance purulente dans l'utérus) et la métrite (inflammation de l'ensemble des couches de la paroi utérine) sont plus facilement identifiables. L'ajout d'examens complémentaires à l'examen transrectal en période post-partum permet d'être plus sensible et de minimiser les faux-négatifs. D'après Kasimanickam, entre 20 et 47 jours post-partum, sans examen complémentaire, l'examen transrectal n'est pas une technique diagnostique qui apporte une valeur prédictive sur les chances de gestations futures (40). Selon certains auteurs, l'examen post-partum devrait débiter après 28 jours en lait en combinaison avec l'examen vaginoscopique (34).

L'identification des structures ovariennes par examen transrectal peut permettre au médecin vétérinaire d'identifier la période du cycle oestral. Toutefois, l'examen par palpation transrectale reste imparfait. L'identification d'une structure lutéale palpable (CL) ou d'un follicule dominant sur un ovaire, entre 20 et 33 JEL, est associée à une augmentation d'environ 20 % de chance de gestation en comparaison aux vaches sans structure ovarienne palpable à ce moment (34). En période post-partum, le temps requis pour le retour à la cyclicité est de 18 à 25 JEL (54). L'identification d'anomalie ovarienne telle que le kyste ovarien est aussi possible (36). Les problèmes de fertilité sont alors explicables tant aussi longtemps que le kyste ovarien est présent et fonctionnel.

Finalement, le diagnostic de gestation par palpation transrectale est possible et couramment utilisé dans les suivis de troupeaux afin de maintenir de hauts niveaux de performances reproductives. L'identification hâtive des vaches non gestantes permet au médecin vétérinaire et à l'éleveur de planifier des actions comme par exemple un programme de synchronisation des chaleurs et ou de l'insémination afin de planifier

une future gestation dans un intervalle de temps rapproché. Les signes positifs du diagnostic de gestation par palpation transrectale sont : le glissement de membranes (30 à 90 jours), la présence de la vésicule amniotique (30 à 75 jours), du fœtus (> 90 jours), des placentomes (>75 jours)(47). La rapidité d'exécution, la demande minimum de matériel (gants de fouille et lubrifiant) et de personnel (1 à 2 personnes) pour la réalisation de la palpation transrectale présentent les avantages de cette pratique. Toutefois, contrairement à l'échographie du système reproducteur, le diagnostic de gestation palpation ne donne aucune information sur le développement et la viabilité de l'embryon ou du fœtus. Dans le cas de problèmes de fertilité, ces données peuvent être déterminantes.

## Échographie

En complémentarité à l'examen transrectal, l'échographie est de plus en plus courante dans la pratique d'aujourd'hui. Son emploi est assez facile, non invasif et de plus en plus pratique de par l'existence d'appareils échographiques portables. Elle permet de caractériser l'apparence de l'utérus, de confirmer la présence de liquide à l'intérieur du vagin et de l'utérus, d'évaluer l'activité ovarienne, d'identifier et localiser des anomalies non repérées lors de l'examen transrectal, diagnostiquer la gestation précoce et autres applications liées à la gestation (exemples : identification de gestations gémellaires, sexage de fœtus). Cette technique assure une meilleure estimation des changements utérins. De plus, l'échographie permet de détecter, d'évaluer et de suivre l'évolution des conditions physiologiques et pathologiques du tractus reproducteur sans envahir la lumière utérine (58).

L'utilisation de l'échographie afin d'évaluer l'involution utérine est plus objective que l'examen transrectal seul (59). Cet examen permet une précision supplémentaire quant à la quantification de la progression de l'involution utérine. Toutefois, en période post-partum, l'examen de la taille et du volume utérin afin d'évaluer le processus d'involution utérine par palpation transrectale semble démontrer une certaine utilité pour établir un pronostic reproducteur chez la vache laitière (59).

L'appareil échographique permet la détection de petite quantité de liquide à l'intérieur de l'utérus. La présence de liquide intra-utérin entre 20 et 47 jours post-partum est un indice d'endométrite (60) et est significativement associée à une réduction des performances reproductrices (40). L'évidence de liquide intra-utérin identifié par un examen échographique de l'utérus est fortement associée à un résultat de culture bactérienne positive (61). Ainsi, la relation entre le liquide *in utero* et la réduction des chances de conception s'explique par la présence d'infection utérine avant la fin de la période d'attente volontaire.

L'échographie est aussi l'outil diagnostique complémentaire à l'examen transrectal dans les cas de pathologie utérine. Le pyomètre, par exemple, est facilement diagnostiqué à l'aide de l'échographie. Une accumulation assez importante de liquide (échogénicité hétérogène) se voit à l'intérieur de l'utérus. Sachant que les infections utérines (pyomètre, métrite aiguë et chronique, endométrite, mucomètre et écoulements

purulents), sont des facteurs de risque significatifs des problèmes de fertilité chez la vache, l'échographie peut nous aider à les démasquer (62).

L'échographie permet aussi l'identification et la confirmation des structures ovariennes normales et pathologiques (exemple : kyste ovarien). Un meilleur suivi de la vague folliculaire est ainsi envisageable. La combinaison de l'examen échographique des structures ovariennes en parallèle au suivi des fluctuations hormonales de progestérone sérique est utile afin de détecter les altérations possibles au niveau du cycle oestral chez les vaches «Repeat Breeder» (63).

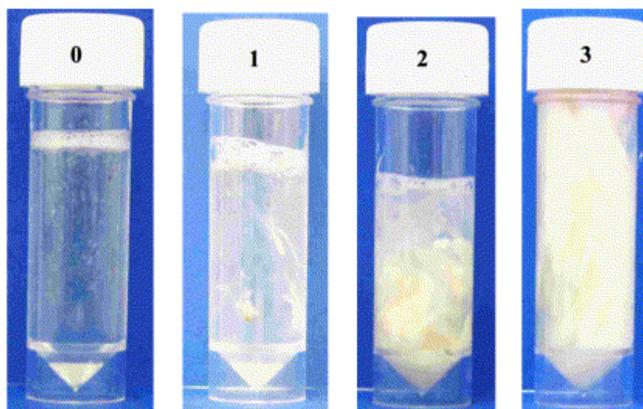
Finalement, l'utilisation la plus fréquente et la plus pratique de l'échographie demeure le diagnostic de gestation précoce. L'identification hâtive des vaches non gestantes devient nécessaire et de plus en plus importante dans le contexte économique de l'industrie laitière. L'objectif global est de réduire l'intervalle entre le vêlage et l'insémination artificielle fécondante. La diminution des intervalles entre les inséminations pour les vaches non gestantes est donc fondamentale pour atteindre cet objectif. Le diagnostic de gestation peut se faire par une personne expérimentée à l'aide de l'appareil ultrasonographique à partir de 26 jours post insémination (47). Ainsi, les problèmes de fertilités peuvent être détectés beaucoup plus rapidement que la palpation transrectale. Toutefois, en raison du moment du diagnostic de gestation, il importe de noter que l'identification du nombre de mortalités embryonnaires est d'autant plus importante par cette méthode (47).

## Vaginoscopie

L'examen vaginal se réalise, la plupart du temps, à l'aide d'un cylindre en carton rigide à usage unique « vaginoscope» de dimensions 45,7 cm de long par 3.2 cm de diamètre. Ce test est utile pour examiner l'aspect du col utérin et du vagin, voir et déterminer la provenance d'écoulements (mucus, urine, pus...), caractériser, en termes d'apparence, les écoulements (**Figure 4**) et discerner la présence de trauma et /ou de cicatrices intra vaginales.

**Figure 4.** Exemples de classification des écoulements retrouvés à la vaginoscopie.

Tirée et autorisée de (64). Reproduit et traduit.



Scores des écoulements vaginaux : 0) mucus clair ou transparent; 1) mucus avec flocons blancs de matériel purulent; 2) < 50 ml de l'exsudat contient  $\leq$  50 % de matériel mucopurulent; 3) > 50 ml de l'exsudat contient  $\geq$  50% de matériel purulent, habituellement blanc ou jaune et occasionnellement sanguinolent.

Les écoulements vaginaux originant du col utérin sont un bon indicateur d'une infection utérine (55). Les signes cliniques associés à l'endométrite post-partum sont un écoulement purulent détectable dans le vagin 21 jours après le vêlage et/ou un écoulement mucopurulent 26 jours post-partum (60). La gravité de l'endométrite s'apprécie selon les caractéristiques visuelles et olfactives des écoulements vaginaux à un moment précis (64). Plusieurs éléments tels que la gravité de l'infection, les contractions myométriales, le cycle hormonal, les mécanismes de vidanges utérines, la conformation périnéale, la condition de chair, les changements de position (debout, couché) et l'exercice de la vache influencent les résultats de la vaginoscopie (40). Un examen unique par vaginoscopie manque toutefois de précision. Parfois, les écoulements peuvent se présenter quelques heures (24h) suite à l'examen transrectal (40). Étant donné la situation, un examen transrectal incluant un massage systématique de l'utérus devraient toujours précéder l'examen vaginoscopique.

Un examen vaginoscopique positif représente un marqueur de mauvaises performances reproductrices subséquentes (34, 65). Entre 27 et 33 JEL post-partum, la présence de pus, lors de l'inspection de la région périnéale, à l'examen vaginoscopique ou suite à l'examen transrectale s'associe à une diminution des chances de conception de 25 % ( $P = 0,02$ ). De plus, entre 27 et 33 jours post-partum, il ressort que le diagnostic d'endométrite à l'aide du vaginoscope est beaucoup plus sensible que l'examen par palpation transrectale seule (34). Une étude identifie la sensibilité (Se) et la spécificité (Sp) de la vaginoscopie lors de diagnostic d'endométrite à 72% et à 87% respectivement (66). Malgré l'utilisation peu fréquente en pratique du vaginoscope, cet outil apporte des informations supplémentaires à l'examen transrectal sur le statut utérin immédiat de la vache examinée. L'utilisation de cette méthode dans les stabulations libres comporte

cependant des limites en raison du matériel nécessaire et de l'obligation de nettoyer adéquatement la vulve avant chaque examen (55).

## Bactériologie du milieu utérin

Suite au vêlage, en comparaison avec la plupart des mammifères, la lumière utérine de la majorité des vaches se trouve contaminée (67). Environ 90% des utérus sont contaminés dans les 15 premiers jours suivant le vêlage (56). L'invasion bactérienne du milieu utérin perdure et fluctue durant les semaines suivantes au vêlage (56). Un grand nombre de bactéries peut surpasser les mécanismes naturels de défense utérine et aboutir en infection. La rétention des membranes placentaires, la dystocie et le délai d'expulsion des lochies suite à un défaut de contractions myométriales sont des facteurs prédisposants à l'infection utérine (54).

Le prélèvement d'échantillons pour analyse bactériologique peut se faire selon diverses techniques, telles que l'écouvillon utérin à l'aide de la cytobrosse ou par prélèvement de liquide lors de lavage utérin. Lors de la prise de l'échantillon, un maximum de propreté est prescrit afin de minimiser les chances de contamination (faux positifs) et de mauvaise interprétation.

Les bactéries isolées, en début de période post-partum, incluent un grand spectre d'agents bactériens. Ceux-ci se divisent en deux groupes : aérobiques et anaérobiques. Les agents aérobiques le plus souvent retrouvés s'énumèrent comme suit: *Escherichia coli*, *Arcanobactérium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp* et *Pasteurella multocida*. Quant aux agents anaérobiques, on rencontre principalement *Clostridium spp*, *Bacterioides spp*, et *Fusobacterium spp* (53). En général, deux à trois semaines après la parturition, la plupart des bactéries pathogènes, chez la grande majorité des vaches, disparaissent (55, 67). Les infections utérines persistantes sont classifiées, la plupart du temps, comme endométrites et/ou métrites. Ces infections, lorsque persistantes, touchent environ 10 à 15 % du cheptel laitier et réduisent l'efficacité de la reproduction (30, 60, 68, 69). Dans le cas d'infections persistantes, l'agent aérobique *Arcanobacterium pyogenes* est le plus fréquemment retrouvé (55, 67, 68, 70). Il est l'agent numéro un des dommages inflammatoires infligés à l'utérus (53, 71). D'autres bactéries reconnues comme des agents pathogènes de l'utérus sont indiquées dans le **Tableau II** (72).

**Tableau II** : Classification des bactéries isolées lors de cultures aérobiques et anaérobiques de 328 écouvillons utérin selon leur potentiel pathogénique dans l'utérus.

Tiré et autorisé de (64). Reproduit et traduit.

1	2	3
<i>A. pyogenes</i> (137)	<i>Bacillus licheniformis</i> (82)	<i>Clostridium perfringens</i> (6)
<i>P. melaninogenicus</i> (23)	<i>Enterococcus faecalis</i> (40)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)
<i>E. coli</i> (104)	<i>M. haemolytica</i> (3)	Micrococcus species (11)
<i>F. necrophorum</i> (18)	<i>Pasteurella multocida</i> (3)	<i>Providencia stuartii</i> (4)
	<i>Peptostreptococcus</i> species (35)	Proteus species (16)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (17)	Staphylococcus species, coagulase negative (25)
	Non-haemolytic Streptococci (11)	$\alpha$ -Haemolytic Streptococci (113)
		<i>Streptococcus acidominimus</i> (4)
		<i>Aspergillus</i> species (3)

Catégories : 1) agents pathogènes associés avec des lésions endométriales; 2) agents potentiellement pathogènes isolés dans la lumière utérine des vaches lors de cas d'endométrite, habituellement non associés avec des lésions endométriales; 3) agents contaminants opportunistes isolés dans la lumière utérine des vaches sans évidence d'endométrite. Le nombre indiqué entre les parenthèses correspond au nombre d'isolats étudiés.

D'autres conditions infectieuses sont possibles et impliquées dans les problèmes de fertilité soient : les infections par *Trichomonas foetus* (70) ou *Campylobacter fetus ssp venerealis* (70), *Leptospira interrogans serovar hardjo* (70), *Haemophilus somnus* (70), *Ureaplasma diversum* (25), *Neospora caninum* (70), *Mycoplasma bovis* (25) et *Mycoplasma bovigenitalium* (25).

L'évaluation bactériologique des sécrétions utérines est réalisable depuis longtemps. Par contre, son utilisation n'est que sporadique puisque la décision de traiter l'animal est souvent prise avant le rapport des résultats de la bactériologie (55). La culture du liquide utérin (milieux aérobique et anaérobique) nous prodigue des informations supplémentaires sur le milieu utérin sans préciser définitivement le besoin ou non d'intervenir lors de résultats positifs (57). Effectivement, un résultat positif à la bactériologie n'identifie pas forcément une pathologie utérine (54). Ainsi, le coût associé à la procédure est rarement justifié pour le producteur (55). De plus, la valeur seule de l'analyse bactériologique durant les sept premières semaines post-partum n'est pas reconnue comme un bon indicateur des performances reproductrices futures (56). Actuellement, la culture bactérienne et un test d'antibiorésistance sont indiqués lors d'infection utérine réfractaire aux traitements usuels (55). L'usage de tests complémentaires à la bactériologie (ex. : cytologie endométriale, tests d'estérases leucocytaires) pourrait aussi aider à préciser la condition utérine.

Le lien unissant l'infection utérine persistante et l'infertilité pourrait s'expliquer par différents mécanismes impliquant l'axe reproducteur (60). D'une part, la présence de lésions endométriales pourrait perturber la fonction reproductrice (72). D'autre part, l'infection utérine influence négativement le cycle ovarien. Des anomalies de cycles tels que les kystes ovariens, l'anoestrus persistant et les phases lutéales prolongées expliquent les échecs subséquents de reproduction (30, 61). Les produits libérés par les bactéries

perturberaient la sécrétion de la *GnRH* et de la *LH* de même qu'ils réduiraient la sensibilité de la glande pituitaire aux pulsations de la *GnRH* provenant de l'hypothalamus (73). La sécrétion de prostaglandines *E2* (lutéotrophique), suivant l'action des (Lipopolysaccharide) *LPS* sur l'endomètre utérin, pourrait aussi expliquer les phases lutéales prolongées (60). Néanmoins, le mécanisme exact par lequel les bactéries, leurs produits ou les agents du système immunitaire interagissent sur la fonction reproductrice reste à préciser.

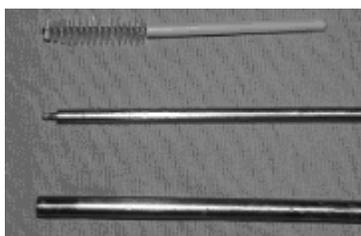
## Cytologie endométriale

L'usage de la cytologie endométriale fournit au médecin vétérinaire un procédé intéressant afin de caractériser et quantifier la réaction inflammatoire à l'intérieur de l'utérus. La cytologie endométriale demeure un indicateur de l'inflammation plus sensible que la biopsie endométriale (74). Toutefois, la cytologie ne refléterait pas toujours exactement le degré d'inflammation de l'endomètre (75). L'endomètre utérin a une habileté immunologique pour la détection rapide des bactéries pathogènes (60). Les neutrophiles constituent la première ligne de défense contre ces agents pathogènes. La population de polymorphonucléaires (PMN) au niveau de l'endomètre utérin augmente donc lors de la présence d'infection. La cytologie endométriale nous permet de quantifier cette réaction. Du point de vue diagnostique, l'infection utérine est présente lorsqu'il y a une contamination de l'utérus par un agent bactérien pathogène. L'inflammation endométriale est la réponse immunitaire à une infection utérine. L'infection utérine est identifiée lors de bactériologie aérobiques et anaérobiques du milieu utérin, tandis que l'inflammation endométriale est actuellement diagnostiquée à l'aide de la cytologie endométriale. La combinaison de l'examen cytologique avec un examen bactériologique du milieu utérin aide à mieux préciser la condition de l'environnement utérin. Chez l'espèce équine, la combinaison de ces deux examens est courante afin d'identifier plus précisément les cas d'endométrites (76).

Le prélèvement des échantillons, la réalisation des lames cytologiques et l'interprétation des résultats sont les trois étapes importantes. Un échantillon représentatif du milieu utérin doit être récolté. Les méthodes connues pour le prélèvement sont soit la cytobrosse (**Figure 5**) ou le lavage utérin.

**Figure 5.** Composantes d'une cytobrosse servant au prélèvement d'un échantillon du milieu utérin dans le but d'effectuer une cytologie endométriale d'une vache.

Tirée et autorisée de (74)



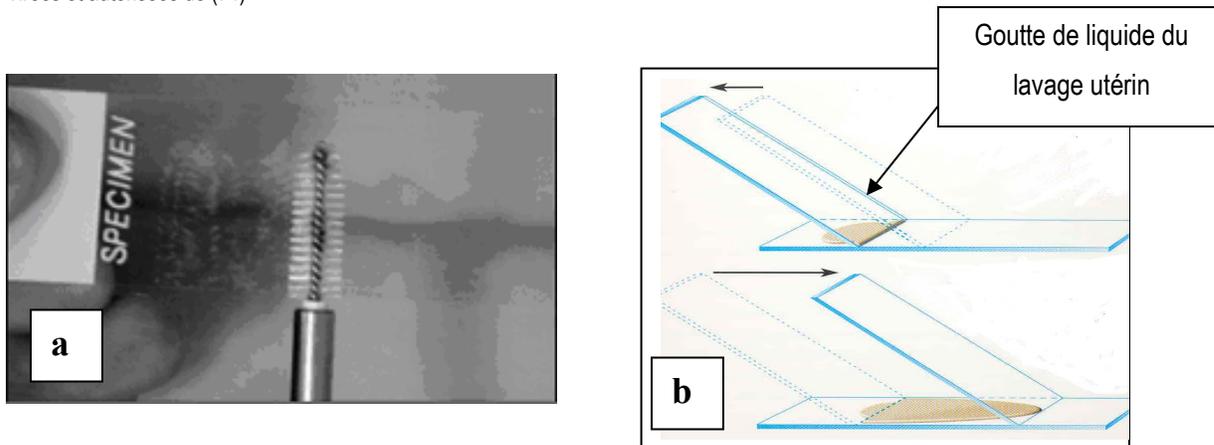
La méthode de prélèvement par cytobrosse se décrit ainsi : la cytobrosse reliée à l'extrémité d'une tige d'acier inoxydable (65 cm de longueur, 4 mm de diamètre externe) est introduite à l'intérieur d'une autre tige en acier inoxydable protectrice (50 cm de longueur, 6 mm de diamètre externe). Ces dernières sont protégées par une chemise sanitaire. Une fois lubrifié, le matériel est engagé dans le vagin préalablement nettoyé. La manipulation des instruments à l'intérieur du col est effectuée par méthode transrectale. À l'entrée du col utérin, la chemise sanitaire est perforée et la cytobrosse protégée de la tige d'acier inoxydable sont avancées dans le col utérin, par manipulation transrectale, pour se rendre au corps utérin. Une fois dans l'utérus, la cytobrosse est avancée et une rotation dans le sens horaire, 1 quart de tour est effectué afin de prélever du matériel cellulaire provenant de l'endomètre adjacent (77). Une fois le prélèvement endométrial réalisé, la tige protectrice est laissée en place, et la cytobrosse est retirée et appliquée sur une lame.

La méthode par lavage utérin peu varier d'un praticien à l'autre (matériel utilisé, solution de lavage, temps de lavage) (77). Cette méthode ressemble à celle de la récolte d'embryons. La plupart du temps un cathéter utérin stérile est utilisé pour entrer dans l'utérus. Toutefois l'usage de paillette à infusion est envisageable. L'usage de 20 ml de saline stérile (0.9%) est commun. Un massage peut parfois être utilisé afin de récolter le liquide infusé. L'échantillon prélevé dans la seringue d'infusion est ensuite déplacé dans un tube stérile pour analyses ultérieures.

La réalisation des lames de cytologie est présentée dans les **Figures 6**. Si la méthode de lavage utérin est utilisée, l'échantillon de liquide utérin doit être, au départ, centrifugé pour augmenter la population cellulaire sur la lame.

## Figures 6. Préparation des lames cytologiques.

Tirées et autorisées de (74)



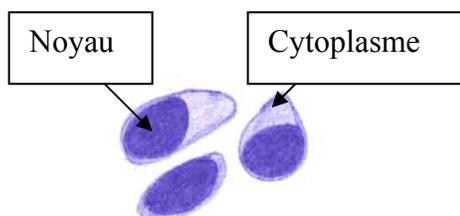
- Illustration de l'étalement de l'échantillon sur la lame de cytologie à l'aide de l'extrémité de la cytobrosse.
- Démonstration du mouvement entre les deux lames de cytologie afin d'étaler la gouttelette de l'échantillon de liquide provenant d'un lavage utérin.

La première étape de l'évaluation cytologique est de déterminer la cellularité de la lame sous microscope au grossissement de 10X. Un échantillon peu cellulaire, c'est-à-dire qui contient peu de cellules, peut contenir une faible quantité de cellules inflammatoires et ainsi mal représenter l'environnement utérin. Les principaux éléments à regarder sur la lame sont les cellules épithéliales (**Figure 7**), neutrophiles (**Figure 7**) lymphocytes, macrophages, la présence de bactéries et des globules rouges. Parfois, on peut aussi retrouver des cellules vaginales (**Figure 7**). Ceci représente un indice de contamination cellulaire lors du prélèvement.

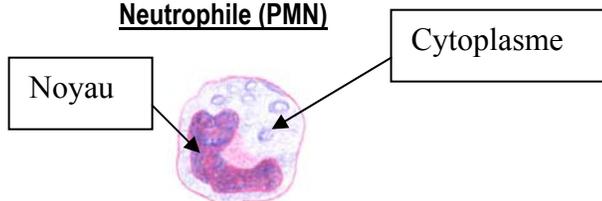
**Figure 7 :** Exemple de cellules (endométriennes; neutrophiles; vaginales) retrouvées lors de cytologies endométriales provenant d'un lavage utérin chez la vache laitière.

Reproduction personnelle

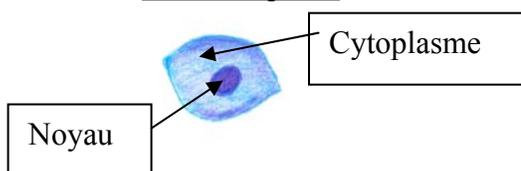
### Cellules endométriales



### Neutrophile (PMN)



### Cellule vaginale



La quantification du degré d'inflammation endométriale est identifiée selon un ratio : le compte de neutrophiles (polymorphonucléaires: PMN) versus le compte de cellules totales (incluant majoritairement les cellules épithéliales) (76). La présence de lymphocytes, macrophages et/ou plasmocytes indique un problème chronique. Une fois le décompte des cellules terminé, la qualité cellulaire doit être interprétée. Des changements dégénératifs (modification de la membrane cellulaire, hypersegmentation du noyau, formation de vacuole, inclusion de gouttelette, etc.) peuvent parfois être présents et limiter la capacité d'interprétation.

L'endométrite est défini comme une inflammation limitée de l'endomètre présent 21 jours après la parturition et sans signe clinique systémique chez l'animal affecté (78). Cette dernière est divisée en deux catégories soit l'endométrite clinique et sous-clinique. L'endométrite clinique est diagnostiquée lorsque des

écoulements purulents ou mucopurulents sont présents après 21 et 26 jours post-partum respectivement (78). L'endométrite sous clinique est diagnostiquée à l'aide de la cytologie endométriale soit ( $> 18\%$  neutrophiles) entre 20 et 33 JEL et ( $>10\%$  neutrophiles) entre 34-47 JEL. Selon Gilbert, entre 40 et 60 jours post-partum, la présence de neutrophiles dans l'utérus est considérée comme une endométrite sous clinique et augmente le nombre de jours ouverts de 39 jours chez les vaches positives par rapport aux négatives (79). Plus précisément, une étude démontre que la présence d'une cytologie positive ( $> 18\%$  neutrophiles) entre 20 et 33 JEL et ( $>10\%$  neutrophiles) entre 34-47 JEL est associée significativement à des performances reproductives réduites de 41% ( $P = 0.001$ ) et 44 % ( $P = 0.0004$ ) respectivement, comparées aux vaches avec cytologie négative (40).

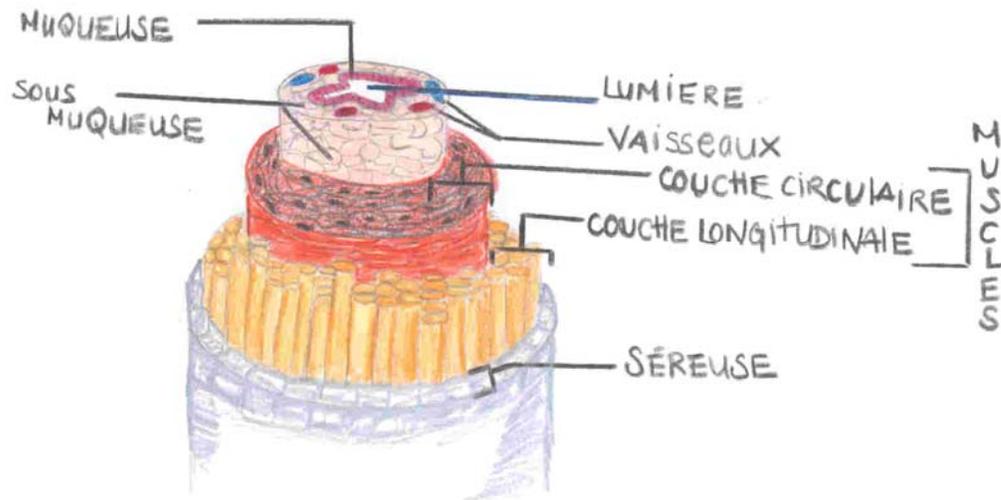
Les limites diagnostiques de la cytologie endométriale concernent la méthode de récolte, de préparation et d'interprétation des lames. Concernant la méthode de récolte, la technique de cytobrosse est plus facile, rapide, et possiblement plus représentative de l'inflammation réelle que le lavage utérin (74). La présence de débris dans les spécimens cytologiques, de l'effet de dilution et de la centrifugation de l'échantillon liquide sont des limites de la technique lors de lavages utérins. Le prélèvement par cytobrosse évalue uniquement l'endomètre situé dans le corps utérin. Le lavage utérin peut donner une meilleure image de l'utérus dans son ensemble. Le type de micro-organismes retrouvés dans l'utérus et la durée de l'infection expliquent parfois la mauvaise association entre l'inflammation endométriale et l'interprétation d'inflammation lors de cytologie (75). La conséquence principale de ces limites diagnostiques est une sous-estimation des cas d'inflammation réelle (75). Ainsi, la réalisation de tests complémentaires autres que la cytologie endométriale peut aider à identifier l'endométrite chez la vache laitière. Entre autres, l'utilisation de la cytologie combinée avec l'examen échographique (identification de liquide intra-utérin) est utile dans le diagnostic d'endométrite sous clinique. Un résultat positif obtenu lors des deux tests (cytologie endométriale positive et présence de liquide in utero), entre 20 et 47 jours post-partum, est associé avec une diminution des chances de gestation versus l'identification d'un seul test positif (40). L'identification d'une cytologie positive ( $> 18\%$  neutrophiles) entre 20 et 33 JEL et ( $>10\%$  neutrophiles) entre 34-47 JEL, plus l'identification de liquide intra-utérin entre 20 et 47 JEL diminuent les chances de gestation de 60% comparativement aux vaches sans cytologie positive et sans liquide intra-utérin ( $P < 0.01$ )

## Biopsie utérine

Morphologiquement, l'utérus de la vache se compose de quatre couches de tissus : la muqueuse (endomètre), la sous muqueuse, la musculaire et la séreuse (**Figure 8**)

### Figure 8. Morphologie utérine

Reproduction personnelle.



La biopsie utérine est une technique nous permettant d'évaluer histologiquement l'endomètre. La lumière, l'épithélium, le *stratum compactum*, le *stratum spongium* et les glandes endométriales sont les principales structures visibles et évaluables (80). Les changements visibles incluent l'épaisseur de la surface épithéliale, les changements au niveau des cellules épithéliales (exemple : vacuolisation), l'épaisseur de l'épithélium glandulaire, la taille de la lumière et la présence de sécrétion à l'intérieur des glandes endométriales, le degré de développement des glandes, et l'œdème stromal (81).

Afin d'être représentatif, la biopsie utérine doit être de taille minimum de 4mm x 6 mm. De plus, en raison de la grande variabilité pathologique de chaque biopsie, plusieurs spécimens devraient être prélevés: cornes droite et gauche ainsi que dans le corps de l'utérus. Les « pinces alligators » ou le « poinçon à biopsie » sont deux instruments disponibles pour les biopsies endométriales chez le bovin. Chaque instrument doit être assez tranchant de façon à couper le tissu endométrial et non à le compresser. L'usage d'instruments non appropriés, de même que la manipulation inadéquate de l'échantillon peut conduire à de nombreux artefacts rendant l'analyse de l'échantillon pratiquement impossible (82).

Un élément important qui complique l'analyse des biopsies est le nombre de jours post-partum. La difficulté d'analyse diminue avec l'augmentation des JEL (83). De plus, à des fins de diagnostics, les trouvailles pathologiques doivent toujours être considérées en fonction du statut reproducteur (ex.: période post-partum, jours du cycle oestral, historique et examen clinique de l'animal). Par exemple, des modifications de l'endomètre sont présentes en fonction des variations hormonales. Brièvement, l'œstrogène est reconnu pour stimuler la prolifération de l'épithélium de la lumière utérine et glandulaire. La progestérone induit

l'activité sécrétoire des glandes endométriales qui deviennent plus tortueuses, embranchées et sécrétoires (84). Ces changements sont importants pour préparer l'endomètre utérin à l'implantation de l'embryon. Concernant le processus inflammatoire, l'endomètre génère plusieurs changements histologiques (53, 57, 82, 85). Généralement, lors d'inflammation, l'épithélium superficiel desquame et devient nécrotique. L'endomètre, quant à lui, devient hyperhémique, congestionné et le nombre de cellules plasmatiques, de neutrophiles et de lymphocytes s'accroît (53, 57, 82, 85). Lors d'inflammation, les glandes endométriales peuvent devenir kystiques et une fibrose péri glandulaire peut s'installer et causer une atrophie et une cicatrisation de l'endomètre (53, 57, 82, 85). La présence de glandes kystiques est toutefois moins fréquente que la fibrose péri glandulaire et serait aussi non associée significativement aux performances reproductrices. D'une part, le degré et la quantité de fibrose retrouvée au pourtour des glandes endométriales peut-être corrélé négativement avec les chances de conception (82); c'est-à-dire que plus le degré de fibrose est important, moins élevées seront les chances de conception. D'autre part, les infiltrations cellulaires focales au niveau de l'endomètre sont plus ou moins utiles pour établir un pronostic reproducteur (82). Ces lésions peuvent parfois s'avérer être des vestiges d'une ancienne endométrite post-partum (82). Ces infiltrats peuvent prendre jusqu'à plusieurs mois avant de disparaître après l'insulte. Des signes d'inflammation chronique comme la dilatation des glandes endométriales et la fibrose péri glandulaire augmentent globalement le nombre d'inséminations par gestation (82). Dans cette dernière étude, les vaches ayant des problèmes de reproduction (non gestante après 175 JEL ou réformée en raison de Repeat Breeding) présentaient un indice d'inflammation du *stratum compactum* beaucoup plus sévère et un degré de fibrose au pourtour des glandes endométriales supérieur dans la corne précédemment gravide au 26<sup>e</sup> jour après le vêlage (J26) et dans les deux cornes (J40) en comparaison des vaches avec une bonne reproduction (gestante < 119 JEL).

La biopsie utérine a été longtemps recommandée comme test complémentaire à la palpation transrectale pour compléter l'évaluation de l'utérus. Toutefois, considérant le temps, le coût, le matériel, l'expertise nécessaire, celle-ci n'est pas ou peu utilisée dans la pratique bovine courante. La biopsie endométriale est plutôt indiquée lors d'évaluation complète du tractus reproducteur de vache «Repeat Breeder» de haut potentiel génétique (82).

La biopsie utérine peut avoir des conséquences néfastes en provoquant directement des dommages endométriaux (86) et indirectement en causant de mauvaises performances reproductrices subséquentes en particulier lorsque cette dernière est effectuée entre 26 et 40 JEL (80). D'autres auteurs la considèrent comme sécuritaire et sans répercussion négative (82). Le manque d'études sur le sujet nous empêche actuellement de conclure sur l'importance et la pertinence d'utiliser la biopsie utérine comme outils diagnostiques dans l'évaluation complète du tractus reproducteur de la vache laitière.

## Profil hormonal

Depuis longtemps, les variabilités dans la synthèse de la progestérone entre les animaux et à différents moments du cycle sont soupçonnées comme étant une cause d'asynchronie utérine et indirectement de mortalité embryonnaire (87). L'asynchronie hormonale provoque certainement un environnement utérin sous optimal pour les gamètes mâles, femelles et/ou pour l'embryon.

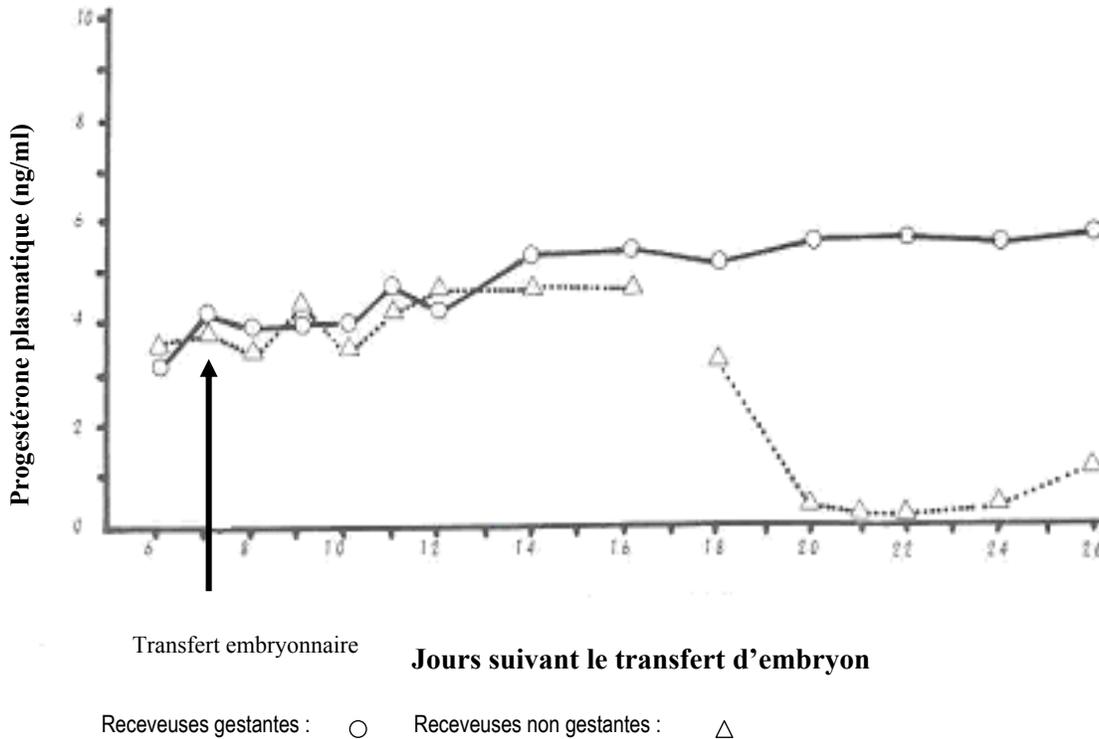
Il est bien établi que les hormones stéroïdiennes influencent le développement et le fonctionnement de l'endomètre. Sachant que chez la vache, la progestérone est primordiale pour le maintien de la gestation et que cette dernière nous informe sur la cyclicité de la vache, elle est l'hormone la plus souvent analysée. La progestérone est mesurable dans le lait et le sang (39, 88).

L'insémination au mauvais temps, le retard de production de progestérone après l'ovulation et/ou les concentrations sous optimales de progestérone durant la phase lutéale sont suggérés comme étant responsables, en partie, des échecs de reproduction. Premièrement, l'insémination à un temps inapproprié peut-être une cause d'échec de fertilisation. Une étude évaluant les niveaux de progestérone dans le lait indique qu'environ 20 % des vaches sont inséminées en dehors de la période de l'œstrus (89). Une concentration de progestérone supra basale ( $> 0.5$  nmol/L ou  $> 1.13$  ng/ml) lors de l'insémination est significativement associée à une faible probabilité de conception chez la vache laitière (38, 63).

Une altération dans la production de progestérone résultant d'une dysfonction de la fonction lutéale est fréquemment énoncée comme facteur de risque de mortalité embryonnaire chez la vache (90). Le retard dans la formation du corps jaune et/ou dans la production de progestérone après l'ovulation pourrait être la cause. Le profil hormonal normal chez la vache gestante et non gestante est illustré à la **Figure 9**. Une concentration de plus de 3 ng/ml identifie la présence d'une activité lutéale (91). L'intervalle normal entre deux périodes œstrales chez la vache est de  $20.94 \pm 3.48$  jours (91).

**Figure 9.** Profil hormonal normal de la progestérone plasmatique chez les receveuses gestantes (n=15) et non gestantes (n=5).

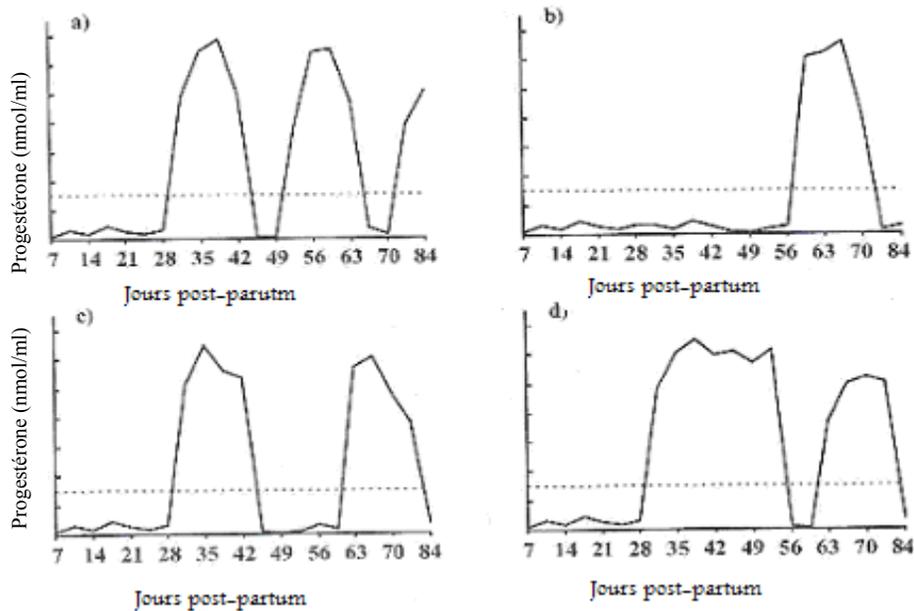
Tirée et autorisée de (90). Reproduit et traduit.



Certaines vaches présentent des profils hormonaux de progestérone atypique en période post-partum (**Figure 10**). Les facteurs de risque de profils hormonaux anormaux sont la dystocie, la rétention placentaire, les écoulements vaginaux anormaux et la métrite (30). Dans une étude, sur les vaches Swedish, 29.6 % des vaches avaient un profil de progestérone atypique en période post-partum (39). Un début de cyclicité rapide augmente la probabilité que la vache soit inséminée plus tôt après le vêlage, augmente les chances de conception, raccourcit l'intervalle vêlage – insémination fécondante, et réduit le nombre d'inséminations artificielles (IA) par gestation (92). En contrepartie, les vaches avec des profils de progestérone atypique avant la première insémination ont un intervalle vêlage – insémination fécondante prolongé et un nombre d'inséminations artificielles (IA) par gestation supérieur aux vaches avec des profils normaux (91).

**Figure 10.** Illustration des différents profils de progestérone possibles en période post-partum chez la vache laitière.

Tirée et autorisée de (39). Reproduit et traduit.



a) Profil normal b) Cyclicité retardée c) Arrêt de cyclicité d) Phase lutéale prolongée

Un profil hormonal séquentiel, plus qu'un examen unique est nécessaire pour détecter une fonction lutéale anormale, (63). L'évaluation de la progestérone, à partir d'échantillon de lait, en période post-partum, est une méthode efficace pour caractériser l'activité ovarienne des vaches (91).

## Chapitre 2 : outils futurs potentiels

Plusieurs outils sont actuellement au stade de la recherche et ne sont pas encore utilisés couramment dans la pratique vétérinaire chez les bovins laitiers. L'accroissement de nos connaissances des outils de mesure et des facteurs de risque causant des problèmes de fertilité chez la vache laitière nous permettrait d'être plus performants lors de diagnostics d'infertilité de même que dans le choix de la thérapeutique adaptée à la condition. La transposition de connaissances en médecine humaine (utilisation des estérases leucocytaires, hystérocopie) vers la médecine vétérinaire, peut nous aider à développer des outils pertinents dans plusieurs domaines dont celui de la reproduction bovine. Le perfectionnement d'une technique et/ou la découverte de certaines utilités d'un appareil (indices d'échotexture utérine par méthode

ultrasonographique), ou l'élaboration d'anciennes techniques de diagnostics (exemple : la biochimie utérine) représentent des pistes d'avancement vers des découvertes diagnostiques. Ainsi, voici des informations sur certains outils en développement dans le domaine de la reproduction : estérases leucocytaires, métrichack, indice d'échotexture utérine, biochimie endométriale, et l'hystérocopie.

## Estérases leucocytaires

Lorsque le système de défense utérin s'active, les cellules inflammatoires infiltrant l'endomètre et la lumière utérine. Les neutrophiles phagocytent et neutralisent les bactéries par différents mécanismes. Une enzyme estérase est relâchée par les cellules polymorphonucléaires (PMN). La quantification relative de l'activité de ces estérases leucocytaires s'avère maintenant possible à l'aide d'un papier bâtonnet réactif pour divers liquides corporels comme l'urine, le liquide pleural et le liquide cébrospinal. Ce test (**Figure 11**) permet un diagnostic rapide d'infection. En médecine humaine, une étude évaluant l'efficacité du test de détection des estérases leucocytaires lors de diagnostic de péritonites spontanées bactériennes, détermine la sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives positives et négatives du test à 63 %, 96%, 82 % et 81 % respectivement. La prévalence de la péritonite bactérienne lors de l'étude était de 21 % (93).

**Figure 11.** Bâtonnet réactif urinaire pour la détection des estérases leucocytaires (Multistix 10SG de Bayer).

Images tirées du présent projet de recherche



### Identification de l'échelle colorimétrique

Négatif



Traces



Faible



Moyen



Fort



L'enzyme estérase relâchée par les cellules PMN réagit avec un élément estérifié chimique sur le bâtonnet. La réaction provoque un changement de couleur. L'intensité de la coloration sur l'échelle colorimétrique correspond au compte de leucocytes (94), par exemple, avec le Multistix 10SG (Bayer Diagnostics Corporation, Puteaux, France) : négatif = 0 PMN / mm<sup>3</sup> ; Traces = 15 PMN / mm<sup>3</sup> ; Faible = 70 PMN / mm<sup>3</sup> ; Moyen = 125 PMN / mm<sup>3</sup> ; Fort = 500 PMN / mm<sup>3</sup> (93). Ce type de bâtonnet demande moins de matériel et

se fait plus rapidement que la cytologie endométriale et la bactériologie utérine. Par contre, la pertinence de son usage sur le liquide utérin est encore inconnue.

## Métricheck

Une étude réalisée en Nouvelle-Zélande sur des vaches laitières décrit l'utilisation potentielle d'un nouveau test, le Métricheck® (Simcrotech, Hamilton, New Zealand; <http://www.simcrotech.co.nz/product>). Un hémisphère de silicone (4cm) attaché à une tige d'acier inoxydable de 50 cm représente l'outil énoncé. Ce dernier a comme fonction la détection de matériel purulent à l'intérieur du vagin. De façon brève, le Métricheck® est un dispositif permettant le grattage de la muqueuse vaginale. Une évaluation des écoulements/sécrétions, s'il y a, se fait à partir du matériel récolté sur la portion concave et convexe de l'outil. La caractérisation des écoulements se décrit ainsi : 0 : aucun écoulement; 1 : mucus clair; 2 : petite quantité de flocons de matériel purulent dans un mucus clair; 3 : écoulements mucopurulents ( $\leq 50\%$  de pus); 4 : écoulements mucopurulents ( $> 50\%$  de pus); 5 : écoulements mucopurulents ( $> 50\%$  de pus) avec odeur associée (66).

Afin d'identifier les vaches souffrant d'une endométrite clinique, lors d'une même étude, le Métricheck® est plus rapide, plus sensible, mais moins spécifique que la vaginoscopie (Métricheck® Se : 96%; Sp : 77% et vaginoscopie Se : 72%; Sp : 87%) (66). On retrouve plus de faux positifs mais moins de faux négatifs. Les faux positifs peuvent être alliés à la détection de matériel purulent d'origine vaginale uniquement (vaginite). L'absence d'identification de l'origine des écoulements peut rendre un diagnostic erroné.

D'après une étude, l'utilisation du Métricheck® avant le début de la période de reproduction, permet d'établir un pronostic sur les performances reproductrices futures. Les chances de conception à la première insémination diminuent de façon linéaire avec l'augmentation des scores du Métricheck® 35 jours avant le début de la période de reproduction (Score 0+1 : 51.6%; Score 2 : 46.8%; Score 3 : 45.6%; Score 4 : 31.1%; Score 5 : 25.6%) (66). La combinaison de l'historique post-partum et des résultats de ce test semble un bon outil pour identifier les vaches à risques de mauvais succès en terme de reproduction (66).

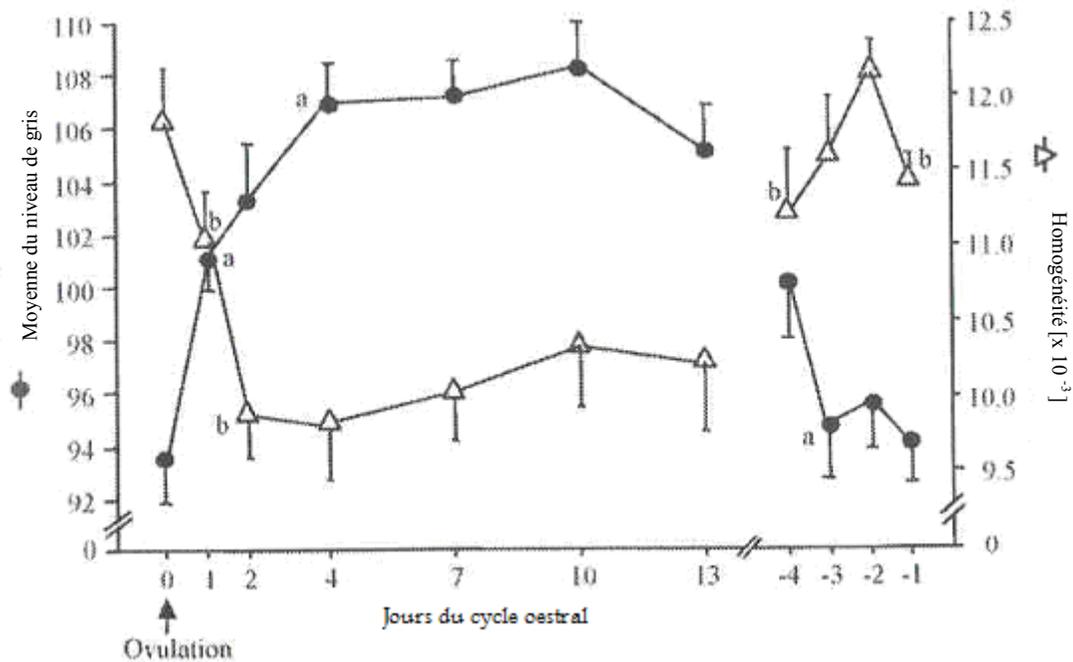
## Caractérisation de l'échotexture utérine

Les caractéristiques échographiques de l'utérus, encore peu exploitées jusqu'à ce jour, peuvent être utilisées comme un indice biologique général du ratio œstrogène - progestérone chez la vache (58). L'utérus illustre un aspect échographique beaucoup plus hétérogène, caractéristique de l'œdème présent au niveau de l'endomètre durant la période périœstrale versus un aspect beaucoup plus homogène durant le diestrus. La quantité d'œstrogènes en circulation est responsable de l'œdème endométrial.

Contrairement à ce que l'on observe, les changements d'homogénéité obtenus à l'aide d'un programme d'analyse informatique d'échotexture utérine nous illustrent l'inverse de ce que l'on croirait voir (95). La distinction provient de la définition d'homogénéité (95). L'œdème, se caractérise par l'augmentation de la taille et surface des zones hypo échogènes et ainsi par l'accroissement du nombre de pixels voisins d'intensité de gris identique pour une surface quelconque (95). Ainsi, l'œdème utérin, pour l'œil de l'observateur, prend un aspect hétérogène tandis que le programme informatique conclut à un aspect plus homogène. L'opposé est aussi présent pour le diestrus (95). Autres que l'homogénéité, les changements de texture utérine observés à l'ultrasonographie peuvent être mesurés à l'aide d'un programme informatique d'analyse de l'échotexture utérine et illustrés à la **Figure 12** (95). La plupart des programmes mesurent les niveaux de gris des images échographiques à titre de comparaison.

**Figure 12.** Variations échographiques des niveaux de gris et de l'homogénéité utérine durant le cycle oestral chez la vache laitière.

Tirée et autorisée de (95). Reproduit et traduit.



Cet outil d'évaluation objectif permet d'ajouter des informations à notre examen transrectal sur les changements physiologiques et pathologiques de l'endomètre utérin (95). Son usage pourrait même éventuellement être utile en ce qui concerne le diagnostic d'endométrite et une détermination plus précise du cycle oestral chez la vache (95). L'application pratique de cet outil reste tout de même à déterminer.

## Biochimie des sécrétions endométriales

L'embryon bovin séjourne dans l'oviducte pour les trois à quatre premiers jours de vie. Il accède ensuite à l'utérus pour éventuellement commencer son implantation environ au *jour 20* (96). Durant cette période, les glandes endométriales synthétisent, transportent et sécrètent des substances essentielles pour la survie et le développement des cellules embryonnaires (97, 98). L'exactitude et la pertinence de l'évaluation du lait utérin restent à être démontrées dans les analyses de fertilité. Une meilleure connaissance des sécrétions utérines normales et anormales est une occasion de mieux comprendre les facteurs importants pour la fécondation et plus particulièrement la survie embryonnaire. La récolte de liquide utérin est le principal obstacle à l'élaboration de la technique diagnostique. Lors de cannulations utérines, entre 5 et 10 mg de macromolécules sont retrouvés dans l'utérus. La majorité des études actuelles s'intéressent à la quantification et qualification des substrats énergétiques, de l'urée, du pH, des protéines, des lipides, des électrolytes et des vitamines présentes dans le liquide utérin. Les études réalisées sur les sécrétions utérines ciblent différents jours du cycle oestral. Les prochains paragraphes présentent les informations les plus pertinentes relatives aux composantes des sécrétions utérines.

Le **métabolisme des sucres** est un élément très complexe du développement embryonnaire précoce (99). Le liquide retrouvé dans l'oviducte, chez la femme et la vache, se compose majoritairement de glucose, lactate et pyruvate. Toutefois, le lactate se retrouve en plus grande concentration dans l'oviducte *versus* le sérum et l'utérus en début de cycle oestral (18, 99). Le lactate résulte du catabolisme du glucose réalisé dans l'oviducte. La présence de lactate en grande quantité s'explique par les besoins de l'embryon. Jusqu'au stade de blastocyte, la source d'énergie principale pour ce dernier est le lactate et le pyruvate. L'embryon serait, à ce stade, inhabilité à métaboliser le glucose dû au manque et ou quantité insuffisante d'hexokinase et de pyruvate kinase (99).

Une fois l'entrée en fonction du génome embryonnaire (stade 8 cellules), le glucose devient un substrat clef. Ce genre de glucide, constituant la source essentielle d'énergie pour l'organisme, permet la synthèse des lipides, des acides aminés et du matériel nucléaire (99). Ainsi, ceci expliquerait la concentration supérieure de glucose dans la lumière utérine comparativement à celle de l'oviducte lors du passage de l'embryon de l'oviducte vers l'utérus (18). De plus, la concentration de glucose intra-utérine serait toujours supérieure à celle du plasma tout au long du cycle oestral. Aucune association entre la concentration utérine et le sang n'est observée (10). Ceci suggère un mécanisme de sécrétion utérine autre que la diffusion facilitée (10, 18). Un mécanisme actif de sécrétion serait possible puisqu'il existe une activité enzymatique dans la lumière utérine. Deux enzymes importantes sont présentes dans le métabolisme du glucose: l'aldolase et la

glucose-6-phosphodéshydrogénase (*G-6-PDH*) (100). L'activité de la *G-6-PDH* est importante durant le diestrus car elle peut métaboliser le glucose comme source directe d'énergie et aussi peut le dégrader par la voie des pentoses. Il existe d'autres substrats énergétiques qui sont aussi favorables au développement embryonnaire surtout au moment de la transition morula - blastocyste: le citrate et le malate (99).

Une altération du métabolisme des sucres au niveau de l'endomètre utérin chez les vaches avec problèmes de conception est possible. En effet, un excès de lactate, dans les milieux de culture *in vitro*, perturbe les fonctions mitochondriales de l'embryon (99). Certains prouvent que les vaches avec embryons anormaux ont des concentrations de glucose supérieures aux vaches avec embryons normaux (13, 101). À l'inverse de cet énoncé : 1) les sujets atteints de troubles de fertilité présentent une concentration de glucose intra-utérin significativement plus faible durant le post-oestrus (1.06 mmol/L ou 106 mg/100ml pour le groupe des vaches infertiles versus 1.6 mmol/L ou 160 mg/100ml pour les vaches fertiles) (10); 2) les vaches infertiles, «Repeat Breeder», arborent une concentration de glycogène endométrial inférieure comparée aux vaches fertiles lors de la fin de l'oestrus (102). Contrairement à ces résultats, une absence de différence est rapportée entre les concentrations des hydrates de carbone du liquide utérin des vaches avec embryons normaux *versus* anormaux (18). Hugentobler et al. (2008) rapporte des concentrations de glucose variant entre 3.78 et 4.54 mM chez des taures.

**L'urée**, composé produit par mécanisme de protection contre l'accumulation d'ammoniac en circulation, peut être retrouvée facilement dans les sécrétions utérines de vaches nourries avec des grandes concentrations de protéines dégradables (15). Des modifications dans les concentrations d'urée et du pH utérin, suite à l'utilisation de diètes avec des quantités excessives de protéines dégradables, sont reliées à des problèmes d'infertilité chez la vache (10). Il semblerait que l'urée fragiliserait la survie de l'embryon et d'autant plus celui de l'ovocyte (103). Des embryons récupérés de vaches avec une concentration d'urée plasmatique élevée *versus* une concentration basse ont produit significativement un taux de gestation inférieur (11.1 % versus 35.1% respectivement;  $P < 0.02$ ). Pourtant, aucune différence n'a été retrouvée dans la quantité d'embryons, leur qualité ou le stade de développement. La présence excessive d'urée dans l'environnement embryonnaire induirait des problèmes intrinsèques de l'embryon (104).

Une concentration élevée en urée suite à l'apport excessif en protéines dégradables dans la ration s'associe à plusieurs modifications: une réduction de magnésium, potassium et du phosphore à l'intérieur des sécrétions utérines (15). De plus, cet apport démesuré de protéines peut être corrélé avec une acidification du **pH utérin** (16). L'embryon serait très susceptible à une réduction du pH dans son environnement allant jusqu'à en diminuer la survie (16). Le maintien du pH interne de l'embryon est critique pour la conservation de l'homéostasie. Le pH retrouvé dans l'utérus bovin, +/- jour 7 du cycle oestral, chevauche un degré légèrement acide soit 6.96 (105) à légèrement alcalin 7.13 (13). L'embryon semble

plus résistant à des variations alcalines grâce à l'échangeur  $HCO_3^-/Cl^-$ . Les stress acides peuvent être délétères pour les embryons (29).

**Les protéines** servent en général d'enzymes, de molécules de transport des vitamines, d'hormones stéroïdiennes et de minéraux et possiblement de modulateurs de l'activité génétique (11). La signification biologique de ces dernières au niveau du tractus reproducteur reste toutefois encore énigmatique. La majorité des protéines retrouvées dans le liquide utérin sont des protéines du sérum dont les plus fréquentes sont l'albumine, la transferrine et l'immunoglobuline G (12, 98, 99). Globalement, les acides aminés compétitionnent entre eux pour être transportés à l'intérieur de l'embryon. Un nombre réduit de transporteurs et des affinités différentes augmentent la rivalité (99). La glycine, l'alanine et le glutamate sont impliqués dans la normalisation du pH cellulaire et potentiellement dans la protection de l'embryon contre les stress osmotiques (Bavister et al, 1983, Van Winkle et al 1990).

Il est démontré, entre autres, chez le rat et le lapin (11), qu'une petite quantité de protéines spécifiques à l'utérus, nommée blastokinine ou utéroglobuline, serait indispensable pour le développement embryonnaire (12, 98). En ce qui concerne les ruminants, la situation est beaucoup moins claire. Une sécrétion active de la part de l'utérus est suspectée due aux concentrations élevées de protéines retrouvées dans la lumière utérine versus celles provenant du sang en début de cycle oestral (17). Cependant, aucune protéine spécifique n'a été identifiée. Un transfert sélectif de composés plasmatiques et/ou une synthèse locale demeurent équivoques (106). La synthèse locale est certainement possible puisqu'il est démontré que les cellules épithéliales tubaires de vache en culture sont capables de sécréter l'hypotaurine et la taurine (106).

Il existe des changements majeurs de concentration des protéines à l'intérieur du milieu utérin selon le jour du cycle oestral. Les résultats d'une étude relative à l'évaluation du niveau de protéines dans le liquide de lavage utérin /oviductes en regard des vaches contrôles versus les «Repeat Breeder» aux jours 6 à 8 démontre que la concentration de protéines totales est significativement plus élevée dans le liquide de lavage des vaches «contrôles» en comparaison aux vaches Repeat Breeder (contrôles :  $166 \pm 6.45 \mu\text{g/ml}$  versus Repeat Breeder :  $114 \pm 1.48 \mu\text{g/ml}$ ;  $P < 0.001$ ) (101). La mesure du niveau des protéines à l'intérieur de biopsies endométriales, lors de la fin de l'oestrus, se démarque en étant supérieure chez les vaches fertiles versus les «Repeat Breeder» (102). Par contre, relativement aux résultats d'une autre étude (14), aucune différence significative dans la concentration des protéines intra-utérines entre les groupes de vaches (normale:  $11.5 \pm 2.3 \text{ mg (J5)}$ , RB :  $6.7 \pm 5.4 \text{ mg (J5)}$ ) et les jours du cycle oestral (J0-15) n'existait.

**Les lipides** sont représentés par les phospholipides, les triglycérides, les acides gras libres, le cholestérol libre et estérifié. L'embryon nécessite l'apport de lipides pour assurer la synthèse de ses membranes. Des changements concernant les lipides retrouvés dans les milieux composant l'oviducte et/ou l'utérus pourraient altérer le développement embryonnaire. *In vitro*, les inhibiteurs de la synthèse de cholestérol

bloquent la transition de l'embryon du stade morula à blastocyste (99). Théoriquement, l'apport endogène de cholestérol est suffisant pour assurer les divisions embryonnaires jusqu'au stade de blastocyste (99).

**Les ions** jouent un rôle essentiel dans la formation du liquide provenant de l'oviducte et de l'utérus (19). Les activités enzymatiques de même que le pH de l'oviducte et du lait utérin seraient en partie régulés par la concentration et le mouvement des ions. D'après des études biochimiques sur les sécrétions génitales bovines, le magnésium, le chlore, le sodium, le sulfate, le calcium, le potassium, le phosphore et le zinc seraient présents et mesurables (19, 101, 107, 108).

Le magnésium jouerait probablement le rôle de coenzyme dans le métabolisme des hydrates de carbone (107). Son importance au niveau du développement foetal est aussi soulevée du fait que des malformations fœtales sont rapportées lors de déficiences sévères en magnésium (15). Le chlore et le sodium constitueraient les deux éléments majeurs dans la composition du lait utérin (19). Le chlore se traduirait comme l'électrolyte responsable en grande partie de la sécrétion de liquide à l'intérieur de la lumière utérine (19) tandis que le sodium, quant à lui, serait la substance fondamentale pour l'expansion du blastocyste expliquant sa concentration supérieure dans l'utérus entre les *jours 6 et 8* du cycle oestral (19). L'éventuelle formation du blastocèle demande des transformations importantes dans la physiologie cellulaire: la pompe à sodium (ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>) et l'antiport Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> fonctionnent conjointement de manière à garder le rapport interne K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> stable tout en augmentant la masse aqueuse pour établir la formation du blastocèle. Concernant les anomalies de concentration de sodium, la quantité de sodium contenue dans les sécrétions prélevées au niveau cervical, au moment de l'oestrus chez les vaches anormales en termes de reproduction, s'avère plus basse que celui des sujets normaux (107).

Les concentrations de phosphore, de magnésium, de potassium et de calcium semblent osciller distinctement entre les vaches avec reproduction «normale» versus les vaches avec reproduction «anormale». Des différences de concentration sont répertoriées à plusieurs périodes distinctes du cycle oestral (108). Des concentrations de calcium (*Ca*), phosphore (*P*), potassium (*K*) et de zinc (*Zn*) sont supérieures dans le liquide de lavage utérin de vaches avec embryons anormaux J7 (101). Des résultats similaires, dix (10) ans plus tard, sont repris dans un autre article où les concentrations de *Ca*, *Mg* et de *K* se montrent encore une fois supérieures de façon significative ( $p < 0.03$ ) chez les vaches avec des embryons anormaux (13).

En ce qui a trait au potassium, des concentrations légèrement élevées, en milieu de culture, améliorent le taux de développement embryonnaire chez la souris (99). On souligne l'importance de la présence du K intra-utérin pour la modification des membranes (blastocyste et épithélium utérin) nécessaires au processus d'implantation embryonnaire (19). Malgré cela, pour contredire son effet bénéfique, un niveau de potassium *in vitro* égal à celui *in vivo* provoque un effet délétère sur les embryons (99). À l'exception du *Ca*, le *P*, le *Mg*, le *K* et le *Na* possèdent une concentration supérieure dans les sécrétions utérines versus le sérum. Un

mécanisme de sécrétion et ou de concentration active est donc plausible (108). L'absence absolue ou le manque de sensibilité possible des instruments de mesure ne nous permet pas l'identification de métaux tels que l'aluminium (*Al*) le cobalt (*Co*), le cuivre (*Cu*), le fer (*Fe*), et le manganèse (*Mn*) à l'intérieur du lait utérin (107). De plus, certains composés semblent préjudiciables pour l'embryon tels les ions Fer ( $Fe^{2+}$ ) et Cuivre ( $Cu^{2+}$ ).

Finalement, peu de documentation existe sur la présence de **vitamines** dans les milieux physiologiques entourant l'embryon. Toutefois, parmi les rôles attribués aux sécrétions tubaires, la protection des gamètes et de l'embryon contre les phénomènes d'oxydation en ferait partie. La présence de vitamines liposolubles telles que la vitamine *A* et la vitamine *E* jouent, *in vivo* comme *in vitro*, un rôle protecteur contre les radicaux libres (99). Le bêta-carotène antioxydant, présent au niveau de l'ovaire et de l'utérus, suggère un rôle de protection contre les dommages oxydatifs au niveau de l'utérus assurant un environnement utérin adéquat pour le développement embryonnaire (109).

## Hystérocopie

L'hystérocopie est une méthode diagnostique couramment utilisée en médecine humaine pour identifier des problématiques utérines chez la femme surtout lors de saignements utérins anormaux (110). L'usage d'un fibroscope pour évaluer l'aspect de l'endomètre utérin est très intéressant. En médecine vétérinaire, l'usage de cet appareil pourrait être multiple : 1) caractériser l'apparence de l'endomètre utérin normal; 2) outil de diagnostic lors de pathologie utérine; 3) technique de prélèvement de biopsie utérine (caroncule); 4) permettre la recherche *in vivo* sur les embryons; 5) permettre la recherche et la capture d'objet perdu tel que: paillettes d'insémination et/ou de transfert pouvant mener à des problèmes de fertilité ultérieure. Toutefois, cette méthode nécessite l'achat d'appareils très coûteux et très fragiles rendant ce dispositif non applicable pour la pratique bovine de tous les jours. Cette technique est présentement en développement à la Faculté de médecine vétérinaire de St-Hyacinthe.

## Objectifs et hypothèses de la recherche

L'objectif de la recherche est d'approfondir nos connaissances sur les facteurs de risques des problèmes de fertilité chez la vache laitière et sur les outils nous permettant de les identifier.

Les **HYPOTHÈSES** sont celles-ci: **Projet 1** : Les vaches laitières exposées aux problèmes utérins post-partum sont plus à risque d'être classées "*Repeat Breeder*" (RB) et éventuellement d'être réformées. **Projet 2** : Les changements utérins associés au syndrome «RB» sont présents à la fin de période d'attente volontaire (PAV) et altèrent les performances reproductrices subséquentes. Finalement, globalement, la prédiction du potentiel reproducteur d'une vache laitière est possible en fonction de l'historique post- partum annoté au dossier de la vache (**Projet 1**) et/ou des résultats d'examens évaluant la condition utérine en fin de PAV (**Projet 2**)

Une investigation au départ globale et par la suite individuelle de la vache «*Repeat Breeder*» actuelle définit les deux portions du projet. En premier lieu, à partir d'un logiciel d'entrée de données, une évaluation des effets des problèmes post-partum et de la parité sur la catégorisation «*Repeat Breeder*» ainsi que la décision de réforme associée à ce groupe de vaches est réalisée (**Projet 1**). En deuxième lieu, suivant une approche clinique individuelle, il est question d'identification de marqueurs physiques et biochimiques du système reproducteur à la fin de la PAV chez les vaches laitières «*Repeat Breeder*» (**Projet 2**).

Les avantages de ces deux portions d'étude sont de permettre de 1) comprendre l'importance de l'utilisation des banques de données pour l'analyse du problème «RB» de même que de cibler et quantifier l'effet de certains facteurs de risques impliqués dans la problématique; 2) de saisir la pertinence de l'utilisation des tests cliniques sur les vaches en fin de période d'attente volontaire en vue de donner un pronostic reproducteur futur; 3) d'actualiser les données sur le sujet des sécrétions utérines et de produire une banque de données sommaire des valeurs normales et anormales. En ce qui concerne la deuxième portion de l'étude, les analyses biochimique, bactériologique et cytologique du liquide utérin donnent des indices sur le statut métabolique, infectieux et inflammatoire de l'utérus à un moment précis. Le développement de tests sur le liquide utérin pourrait éventuellement permettre d'utiliser le lavage utérin thérapeutique comme un élément diagnostique des problèmes de reproduction. Le volet thérapeutique de la vache «RB» pourrait ainsi bénéficier des découvertes cliniques, d'autant plus que les traitements du système reproducteur sont, pour la grande majorité, utilisés de manière empirique. Bref, approfondir nos connaissances sur les facteurs de risques des problèmes de fertilité chez la vache laitière et les outils en mesure de les reconnaître nous permettrait d'être plus à l'aise lors de diagnostics d'infertilité de même que dans le choix de thérapeutique adaptée à la condition.

# **Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and culling in Quebec dairy cows.**

A. Bonneville-Hébert\*, E. Bouchard\*, D. Du Tremblay\*, R. Lefebvre\*

\*Département de Sciences Cliniques, faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 7C6.

Corresponding Author: A. Bonneville-Hébert

Faculté de Médecine Vétérinaire

Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

Keywords: Dairy cow, Repeat Breeder, Postpartum Disorders, Parity, Reproductive Performance and Culling.

## Summary

The objective of this study was to quantify the effect of postpartum reproductive disorders and parity on repeat breeder status (four or more inseminations to become pregnant) and involuntary culling. Reproductive data of 418,383 lactations were taken from a computerized databank of health records for dairy cows. A logistic regression model was used with dystocia, retained placenta, metritis complex and parity as fixed effect risk factors and herd was entered as the random effect. Of the postpartum problems studied, dystocia had the greatest effect on future fertility. Dystocia increased the odds of a cow being a repeat breeder by 44% (OR : 1.44; CI: 1.37-1.51). Compared to first-parity cows, cows in second, third and fourth parities had significantly higher odds of being a repeat breeder: 18% (OR: 1.18; CI: 1.16-1.20), 24% (OR: 1.24; CI: 1.21-1.26) and 42% (OR: 1.42; CI: 1.39-1.45), respectively. The odds for second-, third-, or fourth-parity repeat breeders being culled were 24% (OR: 1.24; CI: 1.20-1.28), 39% (OR: 1.39; CI: 1.35-1.43) and 67% (OR: 1.67; CI: 1.62-1.71) respectively, while postpartum reproductive problems had less of an effect.

## Résumé :

L'objectif de cette étude est de quantifier l'effet des problèmes reproducteurs postpartum et du nombre de lactations sur la catégorisation «RB» ainsi que la décision de réforme conditionnelle à ce statut. Une banque de données informatisées répertoriant 418 383 lactations a été analysée en utilisant des modèles de régression logistique. L'étude démontre que la dystocie est la condition ayant le plus d'effets sur la fertilité future. Une vache avec un historique de dystocie a 44% (RC : 1.44, IC : 1.37-1.51) plus de chances d'être catégorisée RB. La deuxième, troisième et quatrième lactation ont 18% (RC : 1.18, IC : 1.16-1.20), 24% (RC : 1.24, IC : 1.21-1.26) et 42% (RC : 1.42, IC : 1.39-1.45) plus de chances de devenir RB versus la première lactation. Une RB de deuxième, troisième et quatrième lactation augmente de 24 % (RC :1.24, IC : 1.20-1.28), 39 % (RC :1.39, IC : 1.35-1.43) et 67 % (RC : 1.67, IC : 1.62-1.71) le risque de réforme par rapport à une vache primipare, tandis que l'effet de l'historique des problèmes postpartum s'estompe dans ce dernier modèle.

ABBREVIATIONS: AI: Artificial Insemination, OR: Odds Ratio, CI: Confidence Interval, RB: Repeat Breeder, RP: Retained placenta

#### **INTRODUCTION:**

There has been a significant decline in the fertility of dairy herds throughout the world in recent years (1-3). Quebec's dairy herds are no exception. Among the reasons cited are changes in the monitoring of fertility, increased milk production, the intensification of genetic selection, and the health – in particular uterine health – of cows (3).

Cows that fail to conceive after several attempts are a problem for the producer. Repeat breeder (RB) cows fall into this category. RBs cycle normally and have no clinical abnormalities after a minimum of three inseminations (4). The economic losses associated with RB cows are considerable: increased veterinary expenses, increased insemination costs, reduced productivity and losses due to involuntary culling.

For many years, the primary cause of culling in animal husbandry has been reproductive problems (5, 6). In contrast to the situation in the 1950's, poor reproductive performance now has a much greater influence on the decision to cull than does weak dairy production (6). The more time it takes for a cow to conceive, the greater the odds are of being culled. Involuntary culling, because it is not associated with dairy production, negatively affects a herd's profitability.

Diseases of the reproductive system lead to a reduction in fertility (5-8). The magnitude of the effect on reproductive performance depends on the severity of the condition, the timing of the condition and herd management practices. The large number of uterine problems and the great variation in their clinical presentation complicates the diagnosis. One way of simplifying the classification of conditions is to consider clinical metritis, endometritis and pyometritis as variables of the same disease and to combine them into one diagnostic category: metritis complex (9, 10). Dystocia, retained placenta (RP), metritis and endometritis result from mechanical and/or functional damage to the uterus and significantly decrease fertility. Some of these conditions are even recognized as being associated with ovarian dysfunction (5, 11). The re-

establishment of normal ovarian activity depends on uterine involution (5). Involution disorders cause temporary and/or permanent infertility. Several researchers have proposed models to elucidate the effects of the various conditions on reproductive performance (7, 12).

The hypothesis of the present study is as follows: uterine problems identified in the first 30 days postpartum and increased parity decrease the probability of conception in cows and therefore increase the odds of being categorized a RB and of being culled. The key objective is to quantify how reproductive problems during the postpartum period and parity affect the odds of being a RB and of being culled. This study investigates the most common postpartum uterine problems: dystocia, RP and metritis complex.

## **MATERIAL AND METHODS**

A databank consisting of dairy herd health records compiled by DS@HR (2725 boul. Casavant ouest, St-Hyacinthe, Québec J2S 0E5) was used in this study. The databank includes data from approximately one third of dairy cows in Quebec, the majority of which are Holsteins. The database represents a total of 448,321 lactations in 2030 herds between years 2000 and 2006. The selected herds were served by 59 private veterinary clinics in Quebec. The reproductive data were validated using a herd validation system based on the rate of data recording associated with reproductive follow-up (veterinary examinations, diseases, pregnancy diagnosis). This rate represents the proportion of codes in the reproductive sector divided by the number of cows active in a month. The following situations were excluded from the analysis: cows on a superovulation protocol and cows with a history of less than three inseminations without reproductive success. Therefore, the final number of lactations included in this analysis was reduced to 418,383 lactations.

The unit of observation is the health record of each cow for one lactation period. Each cow is associated with a herd and a private veterinary clinic. The databank gives parity, number of inseminations, outcome of conception for each AI (success or failure); presence/absence of dystocia, RP and metritis complex, and culling data. The cows were categorized as RBs if they had at least three recorded unsuccessful AI attempts

for the same lactation. All cows that became pregnant after three or fewer insemination attempts were included in the “control” group.

The postpartum problems considered for the analysis were dystocia, RP and metritis complex (9, 10). The producers and veterinarians identified the reproductive problems and entered the data into the cow's health record. The data analysis focused on the problems within the first 30 days of the cow's lactation. Each condition was reported on the animal health record in conformity with the standard codes used in the dairy health records. The category of dystocia combines the interventions of cesarean section, fetotomy, forced extraction by a veterinarian, forced extraction by the producer and observations of abnormal presentation. A RP was considered to have occurred when the placental membranes were not expelled within 24 hours after calving. Metritis complex comprises acute/chronic metritis, endometritis and purulent discharge, the latter referring to any abnormal discharge that is whitish in colour, odorous or not, and located at the vulva or inside the vagina. Such discharge can originate in the uterus and therefore be associated with a uterine problem such as metritis, pyometritis or endometritis, or it can originate from the vagina, reflecting a simple vaginitis.

#### STATISTICAL ANALYSIS

Descriptive data analysis and statistical analyses were carried out using SAS version 9.1 (Cary, NC). The initial analysis of co-linearity using the chi-square test found no significant relationships between the variables. A logistic regression was then constructed using the different risk factors as fixed effects and herd as the random effect. It was recognized that there may be clustering of events both within a farm and within a cow. To address this issue, the same analysis was repeated using MLWIN; the farm and cow ID within farm being considered as hierarchical levels. This analysis showed that less than 1% of the variation in the total variance occurs at the level of the cow within the farm. It was therefore justified to use only farm as the random factor in our analysis.

Two different models were analysed. For the first, the dependant variable was cow status (RB versus control), as defined above in our description of the databank (N = 418,383 lactations). The second analysis

takes into account the dependent variable – culled versus not culled – on the RB group alone (N = 87,823 lactations). The independent variables are identical for both analyses: presence/absence of the postpartum disorders listed above and parity. All of the postpartum disorders are dichotomous variables (0: absent, 1: present). There are four levels for parity: 1, 2, 3 and 4+. The effects of each variable were measured using an odds ratio. Contrasts with sequential Bonferroni correction were used to compare the prevalence of postpartum disorders between levels of parity. A significance level of 0.05 was used for all analyses.

## Results

The proportion of postpartum disorders for each level of parity is presented in **Table 1**. There is clearly systematic variation based on parity. Comparisons between the different parity groups show that: 1) dystocia was more frequent during first parity, 2) the prevalence of RP increased with parity, and 3) metritis complex was more prevalent in fourth-parity cows. **Table 1** also gives the total lactational incidence of postpartum disorders in this study as well as that observed in other scientific articles reviewed. Finally, **Figures 1** shows the proportion of control and repeat breeder cows for each postpartum disorder.

**Table 2** presents the results of the first analysis, which uses cow status (RB versus control) as the dependant variable and postpartum disorders and parity as the independent variables. The results for a given parity are with respect to the first parity. The analysis shows that the odds of being a RB increased if the cow had a postpartum problem and increased with parity. Dystocia had the most negative impact on fertility.

Reproductive inefficiency, or at least RB status, is an important risk factor for culling. Overall, 35% of RB cows were culled compared to only 8% of control cows (**Table 3**). Given these results, it was decided to look at the risk factors affecting culling in the RB group. The culling decision during the lactation was used as the dependent variable and the same risk factors of the first analysis were entered and tested in the new model. Odds ratios for culling are presented in **Table 4**. Postpartum reproductive events and parity were risk factors for culling after more than three inseminations. Uterine disorders early on in the lactation did not seem to have a great impact on the final verdict. However, parity greatly affected the decision to cull a cow.

## DISCUSSION

The findings of the present study for the prevalence and potential impact of dystocia are similar to the results of previous studies. Although dystocia is rare, it greatly influences future outcomes in terms of reproduction and/or culling (7). The underlying causes of this disorder may include uterine inertia (13), contamination of the reproductive system following obstetrical manipulations (8), stress and pain caused by this event (5, 14) and impairment of uterine involution.

The delay in uterine involution caused by dystocia, RP and the metritis complex influences to some degree the pulsatile secretion of LH and the lifespan of the corpus luteum (14). Micro-organisms in the uterus, uterine trauma and/or inadequate peripartum immune system are all associated with a delay in uterine involution (8).

RP and metritis have less impact on repeat breeder status. However, they should not be neglected for two reasons. The first is that retained placenta increases the risk of developing metritis (15). The finding demonstrated that 29% of cases of retained placenta were followed by metritis complex which is in line with the results of another study that found 25-50% of retained placentas were associated with metritis (16). The second reason is that the lactational incidence of metritis complex is greater than that of dystocia. Considering its greater incidence and its effect on reproduction (RB categorization), globally speaking metritis complex is actually more problematic than dystocia.

As shown above, uterine insults such as dystocia, RP, metritis complex and endometritis are clearly related to decreased fertility in cows. However, despite the existing association between postpartum disorders and RB, many cows not exposed to postpartum uterine conditions during early parity also ended up in the RB group. It is clear that the repeat breeder syndrome is not just associated with postpartum disorders. Based on the present study, there is a high baseline risk of becoming a RB in cows that are not exposed to postpartum disorders: 20.4% (76,715/376,307) of cows with no postpartum disorders became RB versus 26.4% (11,108/42,076) of cows with postpartum disorders. Given the overall lactational incidence of

postpartum disorders (total PPP) is 10% (**Table 1**), the population attributable risk (PAR) for RB cows associated with uterine disorders is only 0.6% ( $(26.4\% - 20.4\%) * 10\%$ ).

Clearly, other risk factors influence a cow's reproductive prognosis. In addition to uterine abnormalities, metabolic (milk fever, ketosis) and ovarian pathologies can also disturb the cow's normal fertility. Such pathologies (for example, cysts) may, through various different mechanisms, limit the number of estrous cycles before the recommended insemination period. These processes have a negative impact on reproductive indices like the interval between calving and first insemination, chance of conception during first breeding, the interval between calving and successful insemination, and number of inseminations (17, 18). All of these conditions, as well as external factors such as management strategies, represent confounding factors in the present study.

In terms of prevention, it appears that the absence of postpartum uterine disorders in the entire population of dairy cows in Quebec would decrease the absolute odds of becoming a repeat breeder by only 0.6% (population attributable risk). Clearly, risk factors, other than postpartum uterine conditions, need to be considered when trying to understand the problem of repeat breeding.

The results concerning parity are not surprising. The factors affecting reproduction in cows of greater parity include increased milk production (3), negative energy balance (3), embryonic mortality (19) and the incidence of reproductive disorders such as metritis (5, 20). There is currently little information on the relationship between milk production and fertility, the pathophysiology of postpartum disorders, and the aging of the reproductive tract and its capacity to support embryonic establishment.

The most important cause of culling dairy cows is reproduction (21). However, postpartum disorders and an increase in parity are associated with inferior reproductive performance, which in turn increases the odds of being categorized a RB and thus indirectly increases the odds of being culled. The relationship between postpartum disorders and culling is primarily mediated by RB status. Parity, however, remains an important risk factor for culling in RB cows. The aging of cows and their reproductive systems probably involves more complex and permanent uterine changes than the effect of postpartum disorders alone. Furthermore, an

increase in parity not only brings reproductive problems but also serious locomotive, mammary and metabolic disorders, an effect that could confound our results.

#### LIMITATIONS OF THE STUDY

The lactational incidence of postpartum disorders reported in this study suffers from the limitations inherent to retrospective observational studies. It is difficult to compare these results with those of other scientific studies for several reasons: no identification of the diagnostic methods used in studies, variation in the definitions for reproductive conditions, variation in the postpartum period targeted, and variation in the genetic criteria to identify the cow population. The data suffer from a lack of precision, as is often the case with observational retrospective studies. This limitation is predominantly due to the diversity of observers. However, to avoid confusion related to diagnosis and to simplify matters, the study combines three postpartum disorders into the metritis complex: metritis (acute/chronic), endometritis, and purulent discharge. In addition to endometritis, cows with obvious reproductive disorders like acute and chronic metritis should have been noted and included in the analysis. Cases of purulent discharges were also considered to be part of the complex, and they include all cases of infection or inflammation of the reproductive tract suspected by producers, without being confirmed diagnosed by a veterinarian.

Given the limitations cited above and the fact that postpartum disorders may be subrepresented in the databank, the study may underestimate differences in the reproductive performance of cows with and without reproductive problems.

#### CONCLUSION

Postpartum uterine status is critical for a cow's reproduction and, indirectly, survival in the herd. The results of the present study show that postpartum disorders negatively affect the fertility of dairy cows and increase their odds of requiring multiple inseminations (4 and more) and of eventually being culled. Despite the importance of the effects of dystocia, RP and metritis complex on reproduction, there were in fact many cows in the repeat breeder group who did not have postpartum uterine disorders. The other causes of

repeat breeding need to be investigated. Finally, parity number is an important risk factor for being categorized a RB and for being culled. A variety of factors associated with advanced age are associated with reproductive inefficiency and involuntary culling.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

This research was made possible by access to dairy health records (DS@HR, 2725 boul. Casavant ouest, St-Hyacinthe, Québec, J2S 0E5). We wish to thank Guy Beauchamp (Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal) and Dr. Bousquet (Alliance Boviteq LAB). Funding for this research was provided by the Quebec Nature and Technology Research Fund (FQRNT), Alliance Boviteq LAB (19320, grand rang St-François, St-Hyacinthe, Québec, J2T 5H1) and Pfizer (17300, autoroute Transcanadienne, Kirkland, Québec, H9J 2M5).

**TABLE 1: Lactational incidence of postpartum reproductive problems (PPP) according to parity on 418 383 lactations between 2000 and 2006.**

	<u>Parity</u>				<u>Total Frequency</u>	
	1	2	3	4+	Total	References
<b>Dystocia (%)</b>	<b>1.3<sup>a</sup></b>	<b>0.8<sup>b</sup></b>	<b>0.7<sup>b</sup></b>	<b>0.8<sup>b</sup></b>	<b>0.9</b>	<b>2.1<sup>1</sup></b>
N	1801	816	489	782	3888	
<b>RP (%)</b>	<b>3.1<sup>a</sup></b>	<b>4.1<sup>b</sup></b>	<b>4.8<sup>c</sup></b>	<b>5.9<sup>d</sup></b>	<b>4.3</b>	<b>8.6<sup>2</sup></b>
N	4 256	4374	3461	5839	17,930	
<b>Metritis complex (%)</b>	<b>6.6<sup>a</sup></b>	<b>5.8<sup>b</sup></b>	<b>5.8<sup>b</sup></b>	<b>6.9<sup>c</sup></b>	<b>6.3</b>	<b>10.1<sup>2</sup></b>
N	9167	6205	4205	6904	26,481	

<sup>a b c d</sup>: Two different letters on the same line indicate a significant difference between the frequencies ( $p < 0.05$ ).

<sup>1</sup> Lactational incidence: 39,727 Ayrshire cows in 1993 (22).

<sup>2</sup> Median lactational incidence according to the analysis of several articles published between 1979 and 1995 (28)

**TABLE 2: Results of logistic regression model of Repeat Breeder cows from Quebec data base of 418 383 lactations between 2000 and 2006. Odds ratios are present for repeat breeders cows and classify according to postpartum reproductive problem and parity.**

Postpartum problem <sup>a</sup>	Odds ratio	<u>Repeat breeders</u>	P value
		Confidence interval	
Dystocia	<b>1.44</b>	1,37-1.51	<0.0001
RP	<b>1.13</b>	1.10-1.17	<0.0001
Metritis complex	<b>1.22</b>	1.19-1.25	<0.0001
<b>Parity<sup>ab</sup></b>			
<b>2</b>	<b>1.18</b>	1.16-1.20	<0.0001
<b>3</b>	<b>1.24</b>	1.21-1.26	<0.0001
<b>4+</b>	<b>1.42</b>	1.39-1.45	<0.0001

Multivariate analysis with herd as the random effect. Dependent variable of interest: Status of cow (repeat breeder versus control). <sup>a</sup> Effect of postpartum problem (presence versus absence). <sup>ab</sup> Effect of lactation with respect to the first lactation. **Repeat breeder:** Cow with at least three unsuccessful AI attempts during one lactation.

**TABLE 3: Proportion of Culling (%) for control and repeat breeder cows from Quebec database of 418 383 lactations between 2000 and 2006**

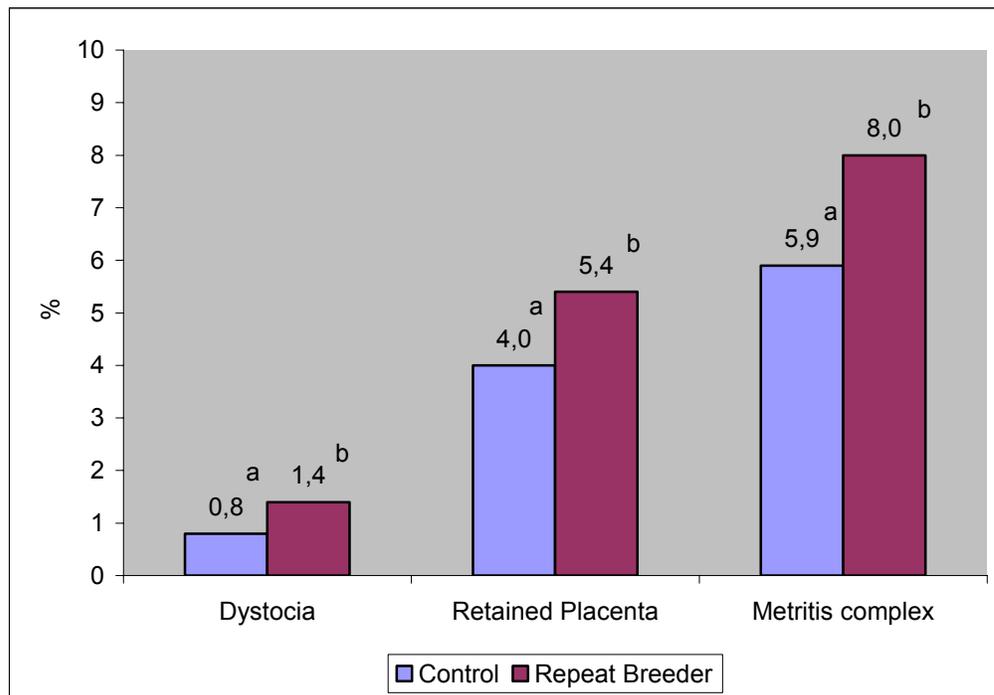
	<b>Control</b>	<b>Repeat breeder</b>
<b>Not culled</b>	303,743 91.9% <sup>a</sup>	56,901 64.8% <sup>a</sup>
<b>Culled</b>	26,817 8.1% <sup>a</sup>	30,922 35.2% <sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Percentage calculated by column. **Control:** Cow that became pregnant in three or fewer inseminations. **Repeat breeder:** Cow with at least three unsuccessful AI attempts during one lactation.

**TABLE 4: Logistic regression presenting effect of postpartum reproductive problems and parity on culling for the group of repeat breeder cows (N = 87,823 RB cows) from Quebec database between 2000 and 2006.**

Postpartum problem <sup>a</sup>	Odds ratio	Culled cows	
		Confidence interval	P value
Dystocia	1.12	1.04-1.21	0.0018
RP	1.07	1.03-1.11	0.0002
Metritis complex	1.10	1.07-1.14	<0.0001
<b>Parity<sup>ab</sup></b>			
2	1.24	1.20-1.28	<0.0001
3	1.39	1.35-1.43	<0.0001
4 +	1.67	1.62-1.71	<0.0001

Multivariate analysis with herd as the random effect. Dependent variable of interest: Status of cow (repeat breeder versus control). <sup>a</sup> Effect of postpartum problem (presence versus absence). <sup>ab</sup> Effect of lactation with respect to the first lactation. **Repeat breeder:** Cow with at least three unsuccessful AI attempts during one lactation.



**Figure 1: Proportion of control and repeat breeder cows with each postpartum disorder.**

<sup>a,b</sup>: Proportions labelled with different letters are significantly different ( $p < 0.0001$ ).

**Control:** Cow that became pregnant in three or fewer inseminations.

**Repeat breeder:** Cow with at least three unsuccessful AI attempts during the same lactation.

**Dystocia:** Groups together interventions such as cesarean section, fetotomy, forced extraction by the veterinarian, forced extraction by the breeder and observations of abnormal calf presentation.

**Retained placenta:** The placental membranes are not expelled within 24 hours after calving.

**Metritis complex:** Groups together acute/chronic metritis, endometritis and purulent discharge from the vulva.

## Références

1. McDougall S. Reproduction performance and management of dairy cattle. *J Reprod Dev* 2006;52 (1): 185-194.
2. Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Wooliams JA, and Lamming GE. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal Science* 2000;70: 487-501.
3. Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* 2001;84 (6): 1277-1293.
4. Levine HD. The Repeat Breeder Cow. *Bovine Practitioner* 1999;33: 97-105.
5. Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, and de Kruif A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 2000;53 (4): 841-857.
6. Coleman DA, Thayne WV, and Dailey RA. Factors affecting reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 1985;68 (7): 1793-1803.
7. Erb HN, Smith RD, Oltenu PA, et al. Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. *J Dairy Sci* 1985;68 (12): 3337-3349.
8. Bell MJ and Roberts DJ. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. *Theriogenology* 2007;68 (7): 1074-1079.
9. Erb HN and Martin SW. Age, breed and seasonal patterns in the occurrence of ten dairy cow diseases: a case control study. *Can J Comp Med* 1978;42 (1): 1-9.
10. Sandals WC, Curtis RA, Cote JF, and Martin SW. The effect of retained placenta and metritis complex on reproductive performance in dairy cattle -- a case control study. *Can Vet J* 1979;20 (5): 131-135.
11. Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 2007;68 (4): 549-559.
12. Correa MT, Erb H, and Scarlett J. Path analysis for seven postpartum disorders of Holstein cows. *J Dairy Sci* 1993;76 (5): 1305-1312.
13. Ball PJH and Peters AR. *Reproduction in cattle*. 3rd ed. Oxford, UK: Blackwell Pub., 2004:vi, 242.
14. Butler WR and Smith RD. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1989;72 (3): 767-783.
15. Laven RA and Peters AR. Bovine retained placenta: aetiology, pathogenesis and economic loss. *Vet Rec* 1996;139 (19): 465-471.

16. LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J* 2008;176 (1): 102-114.
17. Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61: 449-457.
18. Vanholder T, Opsomer G, and de Kruif A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 2006;46 (2): 105-119.
19. Ball PJ. The relationship of age and stage of gestation to the incidence of embryo death in dairy cattle. *Res Vet Sci* 1978;25 (1): 120-122.
20. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002;85 (9): 2223-2236.
21. Gröhn YT and Rajala-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61: 605-614.
22. Rajala PJ and Grohn YT. Disease occurrence and risk factor analysis in Finnish Ayrshire cows. *Acta Vet Scand* 1998;39 (1): 1-13.

# Identification de marqueurs physiques et biochimiques de la condition utérine de la vache Repeat Breeder

A. Bonneville-Hébert\*, R. Lefebvre\*, D. Bousquet°

\*Département de Sciences Cliniques, faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 7C6.

° Alliance Boviteq, 19320 Grand rang St-François, St-Hyacinthe, Québec, Canada, J2T 5H1

Corresponding Author: A. Bonneville-Hébert

Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Quebec, Canada J2S 7C6.

**Mots clés :** *Repeat Breeder*, biochimie utérine, bactériologie utérine, cytologie endométriale, vaginoscopie, échographie, vaches laitières.

## RÉSUMÉ

Un environnement utérin sous optimal, en début de période de reproduction, contribue aux problèmes de fertilité chez la vache. L'hypothèse de cette étude réside dans le fait que des changements utérins physiques et biochimiques présents à la fin de la période d'attente volontaire (PAV) pourraient être associés au syndrome Repeat Breeder. L'objectif principal vise à déterminer et comparer différents marqueurs utérins entre le groupe de vaches capables de concevoir avec trois inséminations artificielles et moins (Contrôles) et le groupe Repeat Breeder (RB) avec un minimum de trois inséminations et plus sans gestation. Les paramètres étudiés sont la vaginoscopie, l'examen transrectal et échographique du système reproducteur, la présence d'estérases leucocytaires, la bactériologie et la biochimie du liquide utérin, la cytologie endométriale et le profil de progestérone sérique au jour 7 du cycle oestral. Une régression logistique a été réalisée comme modèle statistique. L'analyse identifie la bactériologie du liquide utérin comme marqueur de la condition RB. Une bactériologie positive du liquide utérin augmente de 9.70 fois le risque de devenir RB ( $P = 0.08$ ). Les résultats démontrent aussi une bonne concordance entre le test d'estérases leucocytaires et la bactériologie utérine (Kappa: 0.51). Concernant les variables relatives au dossier animal, la production laitière ressort comme un facteur de risque significatif de la RB (Contrôles:  $9384 \pm 1954$  kg et RB :  $11298 \pm 1536$  kg). Pour chaque kg de production laitière de plus, le risque de devenir RB s'accroît de 0.1% ( $P = 0.10$ ).

## MOTS CLÉS

*Repeat Breeder*, biochimie utérine, bactériologie utérine, cytologie endométriale, vaginoscopie, échographie, vaches laitières.

## ABRÉVIATIONS

Repeat Breeder (RB), période d'attente volontaire (PAV), Lactate déshydrogénase (LDH), Créatinine Kinase (cK), Insémination artificielle (IA), jours en lait (JEL), Rapport de Cote (RC)

## INTRODUCTION

Chez la vache, l'importance du milieu utérin entre 50 et 70 jours en lait (JEL), au moment des premières inséminations, peut avoir un impact important sur le futur reproducteur et indirectement sur la réforme de la vache. L'inflammation, la présence de micro-organismes et/ou l'altération biochimique au niveau de l'utérus peuvent créer un environnement inadéquat pour l'arrivée des spermatozoïdes et/ou de l'embryon et ainsi favoriser l'échec reproducteur.

Parmi les causes de l'échec reproducteur chez la vache, la mortalité embryonnaire est un élément important (1). Un milieu utérin adéquat, lors des premiers jours de séjour de l'embryon dans l'utérus (J5 à 7), est indispensable et démontré comme étant un facteur de réussite chez l'espèce bovine lors de transferts embryonnaires (2). Chez les vaches hautes productrices, les mortalités embryonnaires surviendraient avant le 8<sup>ième</sup> jour (1, 3). Des modifications métaboliques (4), alimentaires (5-8), hormonales (9), immunologiques (10) et infectieuses (11) peuvent être à l'origine de changements du milieu utérin et responsables en partie des problèmes de reproduction. Une multitude de tests cliniques existent pour identifier ces changements ou anomalies. En voici des exemples. 1) La vaginoscopie: la présence de pus à l'examen vaginoscopique entre 27 et 33 JEL post-partum, ou suite à l'examen transrectal, diminue les chances de conception de 25 % ( $P = 0,02$ ) (12). 2) L'échographie: la présence de liquide intra-utérin entre 20 et 47 jours post-partum, est entre autres un indice d'endométrite (13) et est significativement associée avec une réduction des performances reproductrices (14). 3) La bactériologie du milieu utérin: les infections, telles que l'endométrite et la métrite post-partum, lorsque persistantes, touchent environ 10 à 15 % du cheptel laitier et réduisent l'efficacité reproductive future (13, 15-17). 4) La cytologie endométriale: une cytologie positive ( $>18$  % neutrophiles) entre 20 et 33 JEL et ( $>10$  % neutrophiles) entre 34-47 JEL est associée significativement à des performances reproductives réduites, c'est-à-dire à un risque relatif de gestation diminué de 41% ( $P = 0.001$ ) et 44 % ( $P = 0.0004$ ) respectivement, comparée aux vaches avec cytologie négative (14).

D'autres tests, moins courants, pourraient potentiellement être d'intérêt en reproduction. La détection et quantification de l'activité des estérases leucocytaires, en médecine humaine, est employé pour divers liquides corporels comme l'urine, le liquide pleural et le liquide cébrospinal et permet un diagnostic rapide d'infection (18). Par contre, son usage sur le liquide utérin est méconnu. Peu de données sont disponibles dans la littérature sur la biochimie du liquide utérin. Cependant, une altération de l'urée (19), du glucose (4, 20, 21) et des protéines (20, 21) ont été rapportées chez les vaches RB.

L'hypothèse de cette étude réside dans le fait que des changements utérins physiques et biochimiques sont présents à la fin de la période d'attente volontaire (PAV) et sont associés au syndrome RB. L'objectif principal vise à déterminer et comparer différents marqueurs utérins entre le groupe de vaches capables de concevoir avec trois inséminations artificielles et moins (Contrôles) et le groupe RB (trois inséminations artificielles (IA) et plus sans gestation). L'approche utilisée pour évaluer la condition utérine, lors du début de la période d'insémination et le retour à la cyclicité normale, est réalisée par le biais des sécrétions utérines récoltées environ à 60 jours en lait (JEL) et au jour 7 du cycle œstral.

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

La présente étude cohorte a été réalisée auprès d'un troupeau Holstein Élite de 45 vaches en lactation maintenues en stabulation attachées et traites deux fois par jour. La production laitière annuelle, au moment de l'étude, s'élevait en moyenne à 10 600 kg/vache. La ration alimentaire était composée d'ensilage de maïs et de luzerne avec une portion individuelle de suppléments, concentrés et minéraux balancés mensuellement selon la production laitière de la vache. Un suivi vétérinaire du troupeau était réalisé mensuellement. Le troupeau est vacciné, une fois par année, à l'aide du vaccin Cattle Master®: CM4 LP5 (Pfizer Animal Health Inc., NY, U.S.A) composé de virus vivants modifiés et tués (rhinotrachéite bovine, diarrhée à virus type 1 et 2, parainfluenza-3 et virus respiratoire syncytial bovin) en plus de l'ajout de bactérines de leptospira (canicola – grippotyphosa – hardjo – icterohaemorrhagiae - pomona).

Les vaches sélectionnées dans l'étude sont âgées de 2 à 8 ans (entre 1 et 6 lactations). Vingt-quatre vaches vélées entre mars 2008 et janvier 2009 ont été échantillonnées. Lors du suivi cohorte, sept vaches ont été retirées de l'étude. Les raisons sont: la vente (n=1), la réforme (n=1), la mortalité (n=1) et les vaches misent sur protocoles de suroovulation (n=4). De ce fait, 17 vaches furent échantillonnées pour les analyses de comparaisons entre groupes (Contrôle vs Repeat Breeder).

L'absence d'anomalie morphologique congénitale ou acquise au niveau du système reproducteur a été confirmée pour chaque vache incluse dans le projet vers 45 JEL. Une injection intramusculaire de 5 ml de prostaglandines (Lutalyse®; dinoprost tromethamine, Pfizer Animal Health Inc, NY, U.S.A), utilisée pour induire une chaleur entre 50 et 70 jours en lactation, se base sur la palpation transrectale d'un CL3. Un suivi par palpation transrectale combiné à l'examen ultrasonographique des ovaires, à intervalle de 1 à 2 jours, était réalisé afin d'identifier le moment de l'ovulation. Sept (7) jours après l'ovulation, une évaluation complète du tractus reproducteur était effectuée.

Les groupes contrôle (n = 9) et RB (entre 4 et 11 IA; n =8) sont définies selon les critères énoncés ci-après. D'une part, il y a les animaux contrôles qui connaissent un succès reproducteur après trois tentatives (inséminations artificielles) et moins et, d'autre part, les vaches RB, qui présentent un minimum de trois échecs reproducteurs consécutifs. La catégorisation des animaux a été accomplie à la fin du projet en raison du modèle de l'étude.

#### **DESCRIPTION DES INTERVENTIONS**

Le comité d'éthique de l'utilisation des animaux de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Montréal a approuvé le protocole de cette étude (# Projet: Rech-1432). Les examens cliniques sur les animaux ont été entrepris au jour 7 du cycle oestral en fin de PAV soit environ 60 JEL. Les examens suivants furent réalisés dans l'ordre énoncé: vaginoscopie, examen transrectal manuel et échographique, prélèvement d'un échantillon de liquide par lavage utérin (technique standard de récolte d'embryons (22)) et

prélèvement d'un échantillon de sang dans un tube sec BD Vacutainer de 10ml (Franklin Lakes NJ USA; 10ml).

Les écoulements vaginaux identifiés à la **vaginoscopie** ont été classés selon un pointage de 0 à 2: 0 = normal, aucun écoulement, 1= présence de mucus avec  $\leq 50$  % pus et 2 = présence de mucus avec  $\geq 50$  % pus (23). Les données considérées comme positives dans l'étude sont les résultats 1 et 2.

Les structures ovariennes, la présence de liquide à l'intérieur de l'utérus et du vagin ainsi que l'aspect du col et de l'utérus ont été confirmés par **l'examen transrectal et échographique**. Des images échographiques (Aloka 500, sonde linéaire 7.5 MHz) ont été mémorisées dans un appareil numérique aux fins de caractérisation de l'apparence échogénique de l'utérus. Les paramètres du gain et de la profondeur des images échographiques ont été standardisés et préprogrammés au début de chaque examen. Le programme Image J 1.41 (Image Processing and Analysis in Java) a permis de calculer l'aire et la valeur des pixels (grade de coloration noir - blanc: 0 = noir ; 255 = blanc) des portions d'images sélectionnées. À l'aide de la fonction de tracé libre du logiciel Image J, une aire prédéterminée était sélectionnée sur chaque image, soit le premier centimètre longitudinal de la corne utérine ipsilatérale à l'ovulation, segment 1 de la corne utérine Ginther (24). La lumière et la paroi utérine étaient comprises dans l'aire choisie.

Ensuite, une récolte de liquide utérin a été réalisée selon la méthode standard de récolte d'embryons à petit volume (20 ml) à l'aide de saline stérile isotonique (Chlorure de sodium à 0,9% USP, Injectable; Baxter Mississauga ON L4Z 3Y4). La localisation du bout du cathéter utérin était à l'extrémité de la corne *ispilatérale* à l'ovulation, plus précisément au niveau du segment 5 (24). Ce dernier était maintenu grâce au gonflement d'un ballonnet à l'aide de saline stérile. Trente secondes séparaient le moment d'infusion du liquide et de la récolte. La récolte du liquide était effectuée à l'aide de légers massages de la corne utérine. Une fois la cueillette terminée, l'échantillon de liquide utérin fut séparé pour quatre analyses à savoir :

**Analyse sur bâtonnet pour la présence des estérases leucocytaires:** (Multistix® 8SG; Bayer HealthCare Toronto (Ontario)). L'enzyme estérase relâchée par les cellules PMN réagit avec un élément estérifié chimique sur le bâtonnet. La réaction provoque un changement de couleur. La zone réactive a été

comparée à une échelle colorimétrique afin de déterminer la présence des estérases leucocytaires (sensibilité de 5 à 15 leucocytes par champs à fort grossissement). Les différents grades sur l'échelle colorimétrique sont les suivants: Négatif – Trace – Faible – Moyen – Fort. Les données considérées comme positives dans l'étude furent celles-ci: trace, faible, moyen et fort.

**Analyse bactériologie aérobie standard** (Laboratoire de bactériologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Qc) Canada). Cette dernière a été réalisée à partir d'un écouvillon de transport (BBL™ Culture Swab™, Becton, Dickinson France S.A. 38800 Le Pont de Clair, France). La récolte de liquide utérin a été réalisée le plus stérilement possible. Cependant, aucun dispositif n'était pris pour protéger le cathéter entre l'entrée de la vulve et l'utérus. Dans cette étude, la croissance de bactéries sur la gélose était considérée comme un résultat positif.

**Biochimie du liquide utérin:** L'échantillon a été centrifugé à 1200 RPM (Rotations Par Minute) ce qui équivaut à une force centrifuge de 289.79g à 4 degrés Celsius durant 10 minutes, environ 30 minutes après la récolte du liquide utérin à la ferme. Quatre (4) ml de l'échantillon centrifugé fut prélevé et envoyé pour analyse biochimique (Laboratoire de biochimie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec) Canada). L'appareil utilisé était un Beckman Dx 600 (Beckman Coulter Inc., Fullerton). Les éléments sélectionnés étaient l'urée, le glucose, les protéines, la créatinine kinase (cK) et le lactate déshydrogénase (LDH).

**Cytologie endométriale:** Après centrifugation, le culot du liquide utérin était utilisé pour effectuer un frottis sur lame. Les échantillons cytologiques ont été fixés et colorés à l'aide des solutions Diff Quik (Diff Quik; Hemal Stain Co. Inc.; Danbury, CT, USA). Dix champs microscopiques à 40X ont été examinés de façon aléatoire, par la même personne pour chaque lame, sans savoir la provenance des échantillons. Le pourcentage de neutrophiles fut déterminé ultérieurement par rapport au décompte des cellules totales. Dans la présente étude, la présence de neutrophiles  $\geq 2\%$  dans l'utérus, en fin de période d'attente volontaire, était considérée comme une valeur positive.

Finalement, l'échantillon de sang entier a servi pour l'analyse de la concentration de la progestérone sérique par immunodosage compétitif séquentiel à l'aide de l'appareil IMMUNOLITE 1000. La sensibilité analytique du test est de 0.2 ng/ml.

Le transport des échantillons entre la ferme et le laboratoire était effectué sur glace. Chaque échantillon était transmis au laboratoire dans l'heure suivant la récolte. Après chaque examen et récolte d'échantillons, la vache était induite en chaleurs à l'aide de prostaglandines (Lutalyse®; dinoprost tromethamine, sterile solution, Pfizer Animal Health Inc, NY, U.S.A).

Les données concernant l'âge, le nombre de lactations, la production laitière, le nombre de jours en lait (JEL) à la première IA et à la IA fécondante, l'historique des problèmes post-partum ainsi que le nombre d'IA lors de la lactation présente et précédente ont été récupérées à partir du logiciel DSA laitier (Dossier de Santé Animale: DS@HR, 2725 boul. Ouest Casavant, St-Hyacinthe, QC, J2S 0E5).

#### **ANALYSES STATISTIQUES**

La portion descriptive des données et l'analyse complète ont été effectuées à partir du logiciel S.A.S (Statistical Analysis System) version 9.1. Une analyse à plusieurs étapes a été utilisée. Une régression logistique pour chaque variable séparément a préalablement été réalisée. Seules les variables associées au statut reproducteur avec un  $P < 0.15$  ont été incluses dans le modèle final. Les rapports de cote ont été calculés pour déterminer le niveau d'effet de chaque variable sur le statut reproducteur. En raison de la puissance de cette étude, la valeur de  $P$  considérée comme significative pour le modèle final, se définit comme étant  $p < 0,10$ .

#### **RÉSULTATS**

Les résultats des tests dichotomiques et catégoriques sont présentés dans **le Tableau 1**. Dans cette étude, en fin de PAV, 18 % ( $n = 3$ ) des sujets ont été identifiés comme positifs à la vaginoscopie (score 1 et 2 = +) et 12 % ( $n=2$ ) lors de l'examen échographique (liquide intra-utérin présent) respectivement. Une

concordance significative est retrouvée entre ces deux tests ( $Kappa = 0.63$   $P = 0.02$ ). Toutefois, considérant le statut reproducteur comme variable dépendante, aucune valeur significative de ces deux tests n'a pu être mise en évidence. En termes d'examen échographique, l'indice d'échogénicité utérine était aussi calculé et aucune différence significative n'a été retrouvée entre le groupe Contrôle ( $93 \pm 10$  unités) et RB ( $96 \pm 3$  unités).

La récolte de liquide utérin a été réalisée dans 100 % des cas entre 48 et 81 JEL pour une moyenne de 60 JEL dans les deux groupes (Contrôle :  $60 \pm 10$  JEL ; RB :  $60 \pm 6$  JEL). La quantité moyenne de liquide récupérée sur un volume total de 20 ml est de 14 ml. Selon les tests sur le liquide utérin: vingt-quatre pour cent (24%) des sujets ( $n = 4$ ) étaient positifs à la présence d'estérase intra-utérine. Un test d'estérase positif a toujours été en association avec l'identification d'une bactériologie du liquide intra-utérin positive. La concordance entre les deux tests était bonne ( $Kappa : 0.51$ ). Toutefois, aucun des tests d'estérase positif n'est associé avec une vaginoscopie, échographie et/ ou cytologie positives. Suivant les analyses de la présente étude, le test d'estérase leucocytaire n'a aucune valeur significative considérant le statut reproducteur comme variable dépendante.

Une bactériologie positive du liquide utérin ( $n=8$ ) en fin PAV augmente significativement de 9.70 fois le risque ( $RC : 9.70$  ;  $P = 0.08$ ) d'être une vache RB. Les bactéries retrouvées dans le liquide utérin pour chaque groupe de vaches (contrôles et RB) de même que le nombre de répétitions sont identifiées dans le **Tableau 2**.

Les données concernant les paramètres biochimiques du liquide utérin sont présentées dans les **Tableau 3 et 4**. Aucune valeur ne nous informe significativement sur le statut reproducteur. Cependant, une association linéaire (coefficient de Pearson:  $0.96$   $P < .0001$ ) existe entre les valeurs de LDH et de cK (**Figure 1**). D'autres associations existent entre les protéines et la LDH (coefficient de Pearson:  $0.71$   $P < 0.001$ ) et les protéines et la ck (coefficient de Pearson:  $0.66$   $P < 0.0002$ ).

La majorité des lames cytologiques 88% ( $n= 15/17$ ) présentent un décompte de cellules polymorphonucléaires (PMN) en dessous de 2 %. Les deux seules lames avec 2% et 6% de PMN

appartiennent toutefois à des vaches devenues RB et ayant expérimenté une dystocie. Une des deux vaches positive à la cytologie (PMN 2%) avait une bactériologie positive à *Streptococcus bovis*.

Quatre vaches (16 %), dont deux RB, ont présenté des anomalies ovulatoires (défaut d'ovulation) confirmées par méthode échographique lors des suivis quotidiens en période peri-oestrale. Ces animaux ont quand même fait partie du projet. Toutefois, la récolte d'échantillons était réalisée au jours 11 après l'injection de prostaglandines malgré l'absence d'ovulation. De plus, sur ces quatre (4) vaches, trois (3) sont identifiées comme positives à la bactériologie. Les moyennes de concentration de progestérone sérique J7 entre les Contrôles et RB ne diffèrent cependant pas (Contrôle:  $2.9 \pm 1.8$  ng/ml et RB :  $2.4 \pm 1.9$  ng/ml).

Concernant les données récupérées à partir du dossier animal du logiciel DSA laitier et en considérant la puissance de cette étude, la production laitière (contrôles:  $9384 \pm 1954$  Kg et RB:  $11298 \pm 1536$  Kg) est un facteur de risque significatif ( $P = 0.10$ ) de la RB dans ce troupeau. Les RB produisent plus de lait que les Contrôles. Pour chaque kilo de lait supplémentaire produit, le rapport de cote augmente de 0.1%, suggérant une augmentation de 0.1% du risque de devenir une vache à IA multiples.

L'âge, le nombre de lactations et la présence des problèmes post-partum ne sont pas significativement différents entre les deux groupes. Aucune différence n'est retrouvée entre le nombre de JEL à la première IA pour les deux groupes (contrôle:  $73 \pm 8$  JEL versus RB:  $69 \pm 6$  JEL). Cependant, les RB ont significativement ( $P = 0.10$ ) une moyenne de JEL à l'IA fécondante supérieure soit de  $285 \pm 95$  JEL versus le groupe contrôle avec  $105 \pm 34$  JEL (**Figure 2**). Finalement, cinq vaches Repeat breeder (# 10, 11, 14, 16 et 17 : **Tableau 1 et 3**) ont eu un transfert d'embryon thérapeutique après plusieurs IA et sur ces dernières, 40% ( $n = 2$ , #11 et #14 : **Tableau 1 et 3**) sont éventuellement devenues gestantes en raison de cette intervention.

## DISCUSSION

Un environnement utérin sous optimal en début de période de reproduction contribue aux problèmes de fertilité et est associé au syndrome Repeat Breeder chez la vache. L'importance de la qualité du milieu

utérin lors des premiers jours de l'embryon dans l'utérus (J5-7) est indispensable et pourrait expliquer le grand nombre d'embryons (> 40%) perdus durant la période préimplantatoire (25). Chez l'humain, les perturbations du milieu utérin durant cette fenêtre de développement embryonnaire sont associées au diabète, maladies cardiaques et prématurité (25). Quatre jours après la fécondation, l'embryon bovin baigne dans l'utérus, complètement libre de toutes attaches. Sa survie et son développement dépendent exclusivement des nutriments du liquide utérin sécrété par l'endomètre. Tenant compte de ces considérations, l'analyse du liquide utérin au J7 devient critique pour comprendre l'étiologie du syndrome Repeat Breeder.

La littérature rapporte qu'environ 10 à 15 % du cheptel laitier serait aux prises avec des infections / inflammations persistantes en fin de PAV. Dans la présente étude, l'examen vaginoscopique (18%) échographique (12%) et cytologique (12%) de l'utérus chez les vaches le démontre. Par contre, ces tests ne sont pas indicateurs de la condition RB. On aurait cru s'attendre à ce que la présence de liquide intra-utérin ou intra vaginal (J7), visualisé à l'aide de l'appareil échographique ou du vaginoscope, respectivement en fin de PAV, soient des indicateurs de mauvaises performances reproductrices tout comme il est démontré dans d'autres études (26), (14). L'induction d'une chaleur à l'aide d'une injection de prostaglandines, provoquant ainsi la vidange de l'utérus, a possiblement été favorable à la condition utérine des vaches évaluées par la suite. Dans les troupeaux de vaches laitières, l'utilisation de plus en plus courante de protocoles de synchronisation utilisant deux prostaglandines en début de lactation (exemple: présynch) réduit possiblement l'incidence des infections utérines en fin de PAV. Dans la présente étude, la résolution spontanée d'une infection utérine en fin de PAV est aussi possible. De plus, les pathologies utérines en période post-partum ne représentent qu'une portion des causes potentielles du syndrome Repeat Breeder (référence premier article du mémoire).

Un autre test potentiellement intéressant pour identifier une inflammation au niveau de l'utérus pourrait être la détection des estérases leucocytaires. Cette méthode est utilisée couramment en médecine humaine afin de diagnostiquer rapidement une infection dans différents liquides corporels (27). Par contre, son utilisation

dans le liquide utérin chez l'espèce bovine est encore méconnue. Son usage en termes d'outil de dépistage de l'endométrite serait intéressant en raison de la rapidité des résultats. En définissant l'endométrite avec un point seuil de 5.5 % de PMN à partir de la cytologie endométriale, le test d'estérase aurait une sensibilité et une spécificité de 96% et 98% respectivement (28). Un pourcentage inférieur de PMN pourrait possiblement provenir de bris vasculaires causés par les manipulations lors d'échantillonnages utérins sans impliquer la présence d'un phénomène inflammatoire au niveau de l'endomètre utérin. Malgré l'absence de valeur significative en termes de statut reproducteur dans cette étude, le test d'estérase détient une bonne concordance avec les résultats de bactériologie du liquide utérin (Kappa : 0.51). Sachant que la présence de bactéries à l'intérieur de l'utérus en fin de PAV ressort comme un facteur de risque de la vache RB, des études supplémentaires sur la pertinence de l'usage du test d'estérase en pratique sont d'autant plus appropriées. Les résultats positifs retrouvés au test d'estérase ne sont pas corrélés avec ceux de la vaginoscopie, de l'échographie, et de la cytologie. Des informations différentes sont certainement véhiculées pour chacun des tests. Concernant la bactériologie, la présence de plusieurs bactériologies négatives (n=9) suivant la technique de récolte de liquide utérin (méthode standard de récolte d'embryons) confirme un faible risque de contamination de la flore utérine. *Escherichia coli* fait partie des bactéries retrouvées, lors de cette étude, dans le groupe contrôle. Ce dernier est le seul agent pathogène identifié chez les deux sujets positifs. Les bactéries considérées comme pathogènes demeurent celles qui ont déjà été associées avec de l'infertilité et/ou ont été associées avec des lésions endométriales à savoir *Arcanobacterium pyogenes* (29-31), *Escherichia coli* (30, 31), *Streptococcus spp*, et *Staphylococcus spp*. De plus, trois bactériologies positives étaient associées à trois vaches anovulatoires durant l'expérience. Les bactéries retrouvées pour ces trois vaches étaient *Staphylococcus spp* (n= 2) et *Escherichia coli* (n = 1). Deux vaches ont été échantillonnées une deuxième fois, soit une fois catégorisée RB (après 3 IA sans gestation). Les deux nouveaux échantillons de liquide utérin étaient positifs à la bactériologie tout comme la première fois. Par contre, les agents bactériens étaient différents (*Streptococcus bovis* - *Escherichia coli* ; *Staphylococcus spp* - *Bacillus*). Il pourrait être spéculé que les vaches positives à l'examen bactériologique

du liquide utérin en fin de période d'attente volontaire ont possiblement une défense immunitaire hypothéquée et pourrait être plus propices aux infections intra-utérines en période post-partum et lors de l'insémination artificielle. Ceci expliquerait la persistance de résultats positifs à la bactériologie du liquide utérin (2<sup>e</sup> échantillonnage) chez deux sujets RB dans cette étude. De plus, ces dernières étaient de fortes productrices (12 386 Kg et 11 947 Kg).

La biochimie du liquide utérin ne nous permet pas de caractériser plus précisément le syndrome RB. Le dialogue entre l'embryon et l'utérus n'est pas le seul facteur responsable de la réussite ou l'échec en reproduction. Dans cette étude, aucune différence significative n'est observée pour les concentrations d'urée, de glucose, de protéines, de cK et de LDH. Kenny et al. (2002) ont démontré qu'une augmentation systémique importante d'ammoniac et d'urée n'était pas nécessairement associée à une augmentation de ces molécules dans le microenvironnement de l'oviducte et à une perturbation du développement embryonnaire (32). Il semblerait que l'urée fragiliserait la survie de l'embryon et celui de l'ovocyte (33). Les deux vaches RB avec une concentration d'urée intra-utérine supérieure (#13 et 14) ont demandé 6 et 9 IA respectivement avant d'être déclarées gestantes. Un deuxième échantillon, sur la vache #13 après cinq inséminations, a été prélevé et la concentration d'urée intra-utérine était toujours élevée (4.44mmol/L). Malgré tout, quatre jours plus tard à l'échantillonnage, faisant suite à l'administration de prostaglandines, l'IA était un succès. Un avortement chez la vache #14 a cependant été rapporté après la 5<sup>e</sup> IA. Bode et al suggère qu'un haut niveau d'urée plasmatique chez la vache laitière avant le jour 7 du cycle est délétère pour la viabilité de l'embryon (19).

Les concentrations de protéines totales seraient plus basses dans le liquide utérin des animaux du groupe RB que du groupe normal,  $114 \pm 1.48$  ug/ml versus  $166 \pm 6.45$  ug/ml respectivement (21). Par contre, relativement aux résultats d'une autre étude (9), aucune différence significative dans la concentration des protéines intra-utérines entre les groupes de vaches (normale:  $11.5 \pm 2.3$  mg (J5), RB :  $6.7 \pm 5.4$  mg (J5)) et les jours du cycle oestral (J0-15) n'existerait. Par contre, les concentrations de protéines retrouvées dans le liquide utérin de ces deux études sont différentes de celles de l'étude ci-présente (normale: 0.30g/L ou

300 ug/ml, RB: 0.41g/L ou 410 ug/ml ; concentration (mg) totale moyenne des deux groupes : normale = 4.26 mg et RB = 5.89 mg).

Pour ce qui est du glucose, aucune différence significative n'a été mesurée entre le groupe RB ( $0.15 \pm 0.05$  mM/L) et celui des vaches du groupe Contrôle ( $0.17 \pm 0.07$  mM/L). Les concentrations du glucose dans le liquide utérin sont toutefois plus basses que celles rapportées par (34) et (4). Hugentobler rapportait des concentrations de glucose variant entre 3.78 et 4.54 mM chez des taures. Les concentrations de glucose dans le liquide utérin étaient d'environ 1.5 fois plus basse que celles mesurées dans le plasma. Dans la présente étude, les niveaux sanguins n'ont pas été évalués et la récolte de liquide utérin s'étendait sur une durée de 30 secondes versus 3 heures dans l'étude de Hugentobler. Les concentrations de glucose intra-utérines en diestrus dans l'étude de Lamothe (4) pour les vaches fertiles et infertiles étaient de 1.46 mM/L ou 146 mg/100ml. Une concentration de glucose supérieure devrait être retrouvée dans l'utérus au jour 7 du cycle oestral étant donné la capacité de l'embryon au stade de développement morula - blastocyste à métaboliser le glucose à l'aide des enzymes hexokinase et pyruvate kinase. La dilution des composantes utérines dans le liquide de lavage est à considérer en comparaison des autres études.

Des données, jusqu'à maintenant non explorées, dans le liquide utérin ont été découvertes soit la présence intra-utérine et l'association entre la cK et la LDH. Cette dernière aurait une fonction importante au niveau du tractus reproducteur concernant les besoins de l'embryon (35). Cette enzyme est associée au métabolisme du glucose en phase anaérobique pour la conversion du pyruvate en lactate (35). Une élévation de LDH et de CK peut-être également observée lors de désordres hémolytiques (36). Toutefois, n'excluant pas le fait que la LDH est présente au niveau de l'utérus et que son action est importante pour l'embryon, les quantités de cette enzyme relâchée par les globules rouges hémolysés dans le liquide de prélèvement pourraient dissimuler les quantités réelles de LDH propres à l'utérus et rendre impossible l'interprétation de son importance en terme de fertilité bovine. Toutefois, le liquide utérin récupéré était clair pour chacun des échantillons de cette étude.

En accord avec des résultats de recherches antérieures, la cytologie endométriale, à partir d'un faible volume de liquide de lavage utérin, ne refléterait possiblement pas adéquatement le degré d'inflammation de l'endomètre (37). La mauvaise association pourrait découler de la présence de débris dans les spécimens cytologiques, de l'effet de dilution, de la centrifugation de l'échantillon, du type de micro-organismes retrouvés dans l'utérus et de la durée de l'infection (37). Les cas d'inflammations réelles sont probablement sous-estimés (37) et expliqueraient un plus grand nombre de cas où la bactériologie était positive sans cytologie positive. Les deux résultats positifs de cytologie endométriale dans cette étude appartiennent à des vaches devenues RB et ayant expérimenté une dystocie. Les dommages infligés à l'utérus par l'événement de dystocie expliquent possiblement les résultats de cytologie chez ces deux sujets. Enfin, l'absence de corrélation entre la bactériologie et la cytologie endométriale peut s'expliquer par la présence d'endométrites causées par des bactéries anaérobiques seulement et/ou une contamination de l'échantillon lors de la technique de prélèvement. La contamination est toutefois une cause peu probable étant donné le petit nombre de cas avec des résultats bactériologiques positifs dans le groupe contrôle.

Les quatre premiers jours suivant l'ovulation, la concentration de progestérone (P4) est basse, alors qu'à partir du 5<sup>e</sup> jour, elle atteint des niveaux sanguins détectables. Aucune différence n'est retrouvée entre les moyennes de progestérone sérique au jour 7 du cycle oestral, en fin de PAV, entre les groupes contrôle et RB. Cependant, dans la présente étude, seize pour cent (16%) des vaches avaient des anomalies de cycle et sur ce pourcentage, 75% avait une bactériologie positive. En accord avec la présente étude, l'incidence d'anoestrus, basée sur des études mesurant les niveaux de progestérone dans le lait, serait entre 11 et 22 % en Angleterre et Hollande (17, 38). Le lien unissant l'infection utérine et l'infertilité s'explique par différents mécanismes impliquant l'axe reproducteur (hypothalamo-hypophysaire) (13). D'une part, des lésions endométriales perturberaient la fonction reproductrice (39). De l'autre, l'infection utérine influencerait négativement le cycle ovarien. Des anomalies de cycles tels que les kystes ovariens, l'anoestrus persistant et les phases lutéales prolongées expliqueraient les échecs subséquents de reproduction (17, 30). Il a été démontré que les produits libérés par les bactéries perturbent la sécrétion de la *GnRH* et de la *LH* de même

qu'ils réduisent la sensibilité de la glande pituitaire aux pulsations de la *GnRH* provenant de l'hypothalamus (40).

La production laitière est un facteur de risque. La forte production lactée demande une ingestion de matière sèche supérieure à la normale. L'augmentation du métabolisme va de soit avec cette condition et parallèlement une augmentation du catabolisme des hormones stéroïdiennes comme l'oestrogène et la progestérone est envisageable (41).

Le manque de puissance de l'étude empêche possiblement d'observer des différences au niveau des autres variables déjà confirmées comme étant des facteurs de risque de la RB soit le nombre de lactations et les problèmes utérins post-partum. La composante multifactorielle du syndrome Repeat Breeder, l'incidence des facteurs de risque tel que les problèmes post-partum ( $\pm 10\%$ ) et la réforme concernant la reproduction compliquent les études réalisées avec peu de sujets expérimentaux.

Finalement, le transfert d'embryons thérapeutiques permet d'amener un embryon de bonne qualité dans un environnement utérin jugé adéquat et de surpasser la période critique des premiers jours de développement. Dans cette étude, 40% (2/5) des vaches Repeat Breeder ont réussi à concevoir après un transfert d'embryons thérapeutiques. L'environnement utérin de ces vaches devait donc être approprié lors du transfert d'embryons pour le maintien d'une gestation. À noter que les deux vaches qui ont conçu suivant cette intervention avaient une bactériologie du liquide utérin positive à la fin de la période d'attente volontaire, expliquant possiblement les premiers échecs de conception.

## **CONCLUSION**

Le liquide utérin reflète le microenvironnement de l'utérus par la capacité de l'endomètre à favoriser un milieu optimum pour le développement embryonnaire. La présente étude a caractérisé différents marqueurs physiques et biochimiques du milieu utérin *in vivo*, en fin de PAV et au jour 7 du cycle œstral, comme éléments diagnostiques des compétences reproductives des vaches laitières. Parmi les paramètres utérins étudiés, l'analyse bactériologique du milieu utérin s'est révélée un élément diagnostique révélateur lors de

l'examen des vaches RB. Un environnement utérin contaminé en début de période de reproduction contribue au phénomène de l'infertilité chez les RB.

**Tableau 1 :** Distribution des résultats des tests dichotomiques et catégoriques selon les groupes de vaches contrôles ( n = 9) et Repeat Breeder (n = 8).

#	(Contrôle / Repeat Breeder)	Âge	L	PPP	Liquide in utero	Vaginoscopie	Cytologie	Estérases	Bactériologie
1	C	3	2	Métrite	N	P	N	N	N
2	C	8	6	Saine	N	N	N	N	N
3	C	3	1	Métrite	N	N	N	N	N
4	C	2	1	Assistance	N	N	N	N	N
5	C	5	3	Saine	N	N	N	N	N
6	C	4	2	RP	N	N	N	N	N
7	C	2	1	Métrite	N	N	N	N	N
8	C	2	1	Saine	P	P	N	N	P
9	C	5	3	Saine	N	N	N	P	P
10	RB	4	2	Dystocie	N	N	P	N	N
11	RB	2	1	Métrite	N	N	N	N	P
12	RB	4	2	Assistance	N	N	N	P	P
13	RB	7	5	Dystocie	P	P	P	N	P
14	RB	3	2	Assistance	N	N	N	P	P
15	RB	6	3	Saine	N	N	N	P	P
16	RB	4	2	Assistance	N	N	N	N	N
17	RB	2	1	Métrite	N	N	N	N	P

**Légende :** C : Groupe Contrôles /RB : Groupe Repeat Breeder / PPP : Problèmes post-partum /Liquide in utéro : Liquide retrouvé dans l'utérus J7 à l'échographie, P = liquide présent, N = Aucun liquide / Vaginoscopie : P = Score 1 et 2, N = Négatif / Cytologie : P =  $\geq 2\%$  de PMN, N= Négatif / Estérases : P = Traces et grades supérieurs, N= Négatif / Bactériologie : P = Croissance de bactéries aérobiques, N = Aucune croissance sur gélose aérobie.

**Tableau 2 :** Identification des bactéries aérobiques retrouvées dans le liquide utérin, après la méthode de lavage utérin avec saline stérile, selon les groupes de vaches contrôles (n = 9) et Repeat Breeder (n = 8)

Groupe	Bactéries pathogènes (Nombre de répétitions)	Contaminants (Nombre de répétitions)
Contrôles	<i>Escherichia coli</i> (2),	<i>Bacillus</i> (1)
Repeat Breeder	<i>Arcanobacterium pyogenes</i> (2) <i>Staphylococcus spp</i> (4), <i>Streptococcus bovis</i> (1)	<i>Enterococcus spp</i> (2)

**Bactéries pathogènes:** Les bactéries considérées comme pathogènes demeurent celles qui ont déjà été associées avec de l'infertilité et/ou provoquant des lésions endométriales.

**Contaminants:** Bacillus et Enterococcus sont rarement associés à un processus infectieux au niveau du système reproducteur chez les animaux. Leur isolement, la plupart du temps, résulte d'une contamination (peau, environnement) surtout lorsque ces derniers sont retrouvés en petite quantité et/ou avec d'autres agents bactériens (culture mixte).

**Tableau 3 :** Concentration des paramètres biochimiques retrouvés dans le liquide utérin au J7 du cycle oestral selon les groupes de vaches contrôles ( n = 9) et Repeat Breeder (n = 8)

#	Statut	MI	[Urée]	[Glucose]	[Ck]	[Protéines]	[LDH]
	Contrôle / Repeat Breeder		mmol/L	mmol/L	U/L	g/L	U/L
1	C	8	0,30	0,20	155	0,03	64
2	C	12	0,30	0,10	1643	0,15	516
3	C	13	0,30	0,10	862	0,36	626
4	C	13	0,30	0,20	1489	0,70	662
5	C	11	0,36	0,10	26	0,06	13
6	C	15	0,30	0,10	543	0,19	303
7	C	16	0,36	0,30	1230	0,91	568
8	C	15	0,30	0,20	199	0,13	119
9	C	15	0,36	0,20	102	0,16	63
10	RB	13	0,57	0,20	2993	0,86	1480
11	RB	14	0,45	0,10	1356	0,79	672
12	RB	15	0,52	0,20	508	0,83	355
13	RB	15	2,89	0,10	88	0,09	50
14	RB	15	0,85	0,20	298	0,34	258
15	RB	15	0,30	0,10	368	0,29	243
16	RB	15	0,30	0,10	115	0,06	38
17	RB	15	0,30	0,20	446	0,04	228

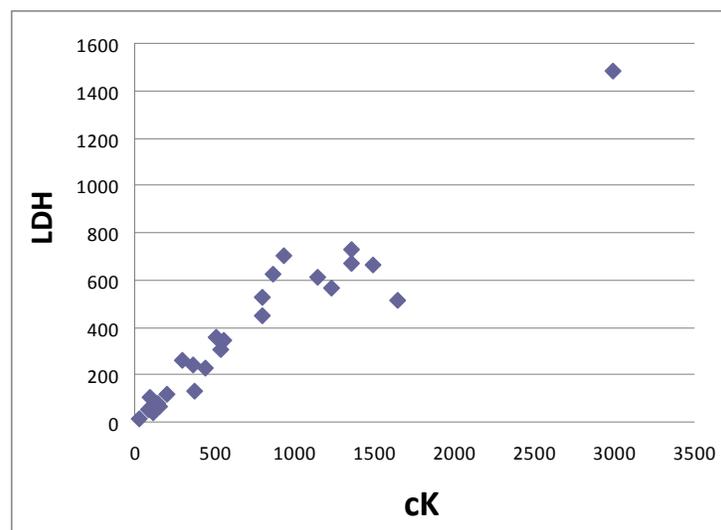
Légende: [] les concentrations sont rapportées par litre

**Tableau 4 :** Distribution des moyennes et écarts type ( ) des données de biochimie du liquide utérin récolté au jour 7 du cycle oestral chez les vaches contrôles (n = 9) et RB (n = 8).

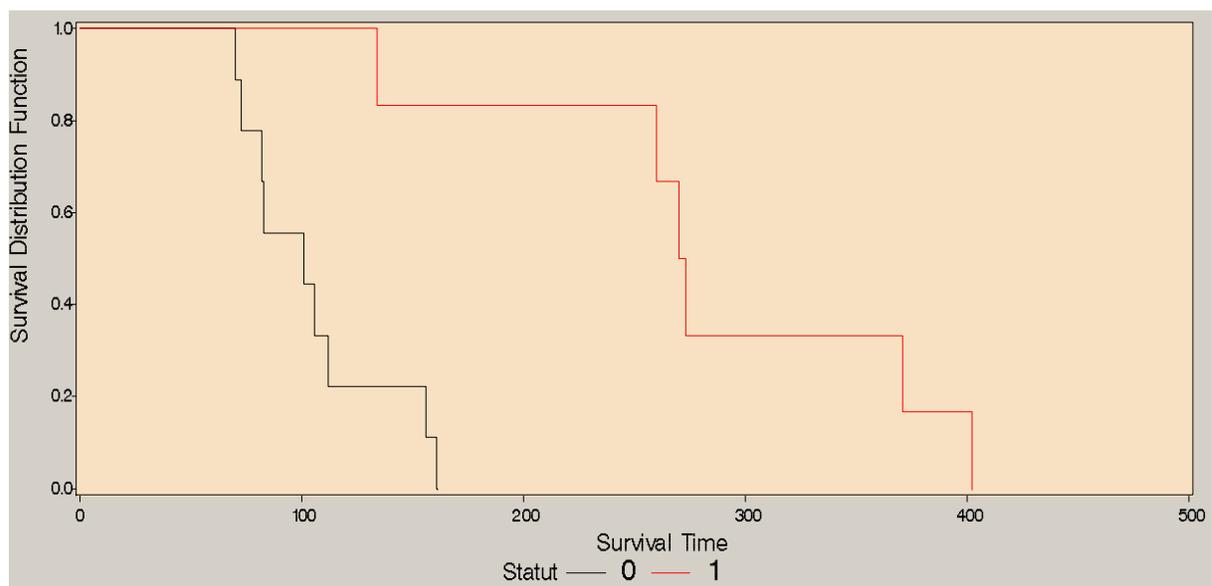
BIOCHIMIE	CONTRÔLES	RB	P
URÉE mmol/L	<b>0.32 (± 0.03)</b>	<b>0.77 (± 0.88)</b>	<b>0.19</b>
GLUCOSE mmol/L	<b>0.17 (± 0.07)</b>	<b>0.15 (± 0.05)</b>	<b>0.59</b>
PROTÉINES g/L	<b>0.30 (± 0,30)</b>	<b>0.41 (± 0.36)</b>	<b>0.50</b>
CK U/L	<b>694 (± 633)</b>	<b>771(± 981)</b>	<b>0.85</b>
LDH U/L	<b>326 (± 269)</b>	<b>416 (± 473)</b>	<b>0.65</b>

**Contrôle:** vache avec succès reproducteur après trois tentatives (IA et ou transferts embryonnaires) et moins.

**RB:** vache Repeat Breeder avec trois échecs reproducteurs consécutifs suivant trois IA.



**Figure 1 .** Corrélation entre les valeurs de créatinine kinase (cK) et de lactate déshydrogénase (LDH)



**Figure 2.** Courbe de survie: intervalle entre le vêlage et l'insémination fécondante pour les vaches contrôles (en noir) et RB (en rouge).

La courbe de survie démontre la différence entre les intervalles vêlage, IA fécondante entre les deux groupes de vaches. **(0)**: Groupe Contrôle: gestante avec 3 inséminations artificielles et moins. **(1)**: Groupe RB: vache Repeat Breeder avec trois échecs reproducteurs consécutifs suivant trois IA

## Références

1. Diskin MG and Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim* 2008;43 Suppl 2: 260-267.
2. Albiñ A, Gustafsson H, and Rodriguez-Martinez H. Maternal influence on the early development of asynchronously transferred bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 1991;24: 25-35.
3. Inskip EK and Dailey RA. Embryonic death in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2005;21 (2): 437-461.
4. Lamothe P, Guay P, and Tremblay A. [Blood glucose and endometrial glucose secretion in 2 groups of cows one which is affected by infertility sine materia]. *Can Vet J* 1972;13 (2): 29-32.
5. Jordan ER, Chapman TE, Holtan DW, and Swanson LV. Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 1983;66 (9): 1854-1862.
6. Elrod CC, Van Amburgh M, and Butler WR. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J Anim Sci* 1993;71 (3): 702-706.
7. Lafi SQ and Kaneene JB. Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. I. Epidemiological modeling. *Prev Vet Med* 1992;14: 87-98.
8. Butler WR. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1998;81 (9): 2533-2539.
9. Guise MB and Gwazdauskas FC. Profiles of uterine protein in flushings and progesterone in plasma of normal and repeat-breeding dairy cattle. *J Dairy Sci* 1987;70 (12): 2635-2641.
10. Gilbert RO, Grohn YT, Miller PM, and Hoffman DJ. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 1993;36 (1): 75-82.
11. Kirkbride CA. Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma infections of bovine genitalia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1987;3 (3): 575-591.
12. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002;85 (9): 2223-2236.
13. Sheldon M, Williams EJ, and Herath S. Infection, Immunity and Reproduction. *Journal of British Cattle Veterinary Association: Cattle Practice* 2007;15: 43-45.
14. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2004;62 (1-2): 9-23.
15. Lewis GS. Uterine health and disorders. *J Dairy Sci* 1997;80 (5): 984-994.

16. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, and Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 2002;123 (6): 837-845.
17. Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, and de Kruif A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 2000;53 (4): 841-857.
18. Triger DR and Smith JW. Survival of urinary leucocytes. *J Clin Pathol* 1966;19 (5): 443-447.
19. Bode M.L., Gilbert R.O, and W.R. B. Effect of high plasma urea nitrogen levels on bovine embryo quality and development. *J Dairy Sci* 2001;84 (supp 1): 116.
20. Bugalia NS, Sharma RD, Biswas RK, and Chauhan FS. Biochemical constituents of endometrium in fertile and repeat breeder cows. *Arch Exp Veterinarmed* 1988;42 (1): 96-99.
21. Ayalon N. A review of embryonic mortality in cattle. *J Reprod Fertil* 1978;54 (2): 483-493.
22. Ball PJH and Peters AR. *Reproduction in cattle*. 3rd ed. Oxford, UK: Blackwell Pub., 2004:vi, 242.
23. Runciman DJ, Anderson GA, Malmo J, and Davis GM. Use of postpartum vaginoscopic (visual vaginal) examination of dairy cows for the diagnosis of endometritis and the association of endometritis with reduced reproductive performance. *Aust Vet J* 2008;86 (6): 205-213.
24. Ginther OJ. *Ultrasonic imaging and animal reproduction*. Cross Plains, Wisc.: Equiservices Publishing, 1995.
25. Olivier N, Jacquierey A, FH; B, and JE; H. The effect of maternal nutrition around the time of conception on the health of the offspring. *J Reprod Fertil* 2007;Suppl. 64: 397-410.
26. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, and Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006;65 (8): 1516-1530.
27. Rerknimitr R, Rungsangmanoon W, Kongkam P, and Kullavanijaya P. Efficacy of leukocyte esterase dipstick test as a rapid test in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol* 2006;12 (44): 7183-7187.
28. Santos NR, Roman HB, and Gilbert RO. The use of leukocyte esterase reagent strips for diagnosis of subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology* 2006;66: 666.
29. Studer E and Morrow DA. Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture, and endometrial biopsy. *J Am Vet Med Assoc* 1978;172 (4): 489-494.
30. Mateus L, da Costa LL, Bernardo F, and Silva JR. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2002;37 (1): 31-35.

31. Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, et al. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 2005;63 (1): 102-117.
32. Kenny DA, Humpherson PG, Leese HJ, et al. Effect of elevated systemic concentrations of ammonia and urea on the metabolite and ionic composition of oviductal fluid in cattle. *Biol Reprod* 2002;66: 1797-1804.
33. Ocon OM and Hansen PJ. Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. *J Dairy Sci* 2003;86 (4): 1194-1200.
34. Hugentobler SA, Humpherson PG, Leese HJ, Sreenan JM, and Morris DG. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Mol Reprod Dev* 2008;75 (3): 496-503.
35. Bousquet D, Lamothe P, and Guay P. L.D.H. and L.D.H. isoenzymes of the intra-uterine secretions of the cow during the estrous cycle. *Theriogenology* 1976;5 (4): 189-196.
36. Smith BP. Large animal internal medicine. 3rd ed. St. Louis ; Toronto: Mosby, 2002:liii, 1735.
37. LeBlanc MM, Magsig J, and Stromberg AJ. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 2007;68 (3): 403-412.
38. Lamming GE and Darwash AO. The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Anim Reprod Sci* 1998;52 (3): 175-190.
39. Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 2007;68 (4): 549-559.
40. Karsch FJ, Battaglia DF, Breen KM, Debus N, and Harris TG. Mechanisms for ovarian cycle disruption by immune/inflammatory stress. *Stress* 2002;5 (2): 101-112.
41. Walter H. Johnson. Kyste folliculaire chez les bovins: Une revue. *Le Médecine Vétérinaire du Québec* 2006-2007;36 (4): 107-111.

## Discussion générale

Plusieurs éléments interviennent et compliquent l'identification ainsi que la résolution des problèmes de fertilité des vaches RB. Entre autres, les problèmes post-partum (dystocie, rétention placentaire et complexe métrite) ainsi que l'augmentation du nombre de lactations ont définitivement été identifiés comme facteurs de risque des problèmes de fertilité. Toutefois, considérant l'incidence des PPP ( $\pm 10\%$ ) et la proportion de vaches RB sans histoire de difficultés post-partum, il semble donc que les pathologies utérines ne représentent qu'une petite portion des causes potentielles du syndrome Repeat Breeder. Ainsi, suivant ces résultats, il aurait été intéressant de s'interroger sur d'autres facteurs de risques affectant les performances reproductrices comme par exemple, les maladies métaboliques (fièvre vitulaire, acétonémie), les problèmes ovariens (kyste, anoestrus prolongé) les problèmes locomoteurs et la mammite en début de lactation. L'importante quantité de données (418 383 lactations), utilisées dans la première partie de ce projet, aurait pu nous aider à comprendre l'importance à grande échelle de ces problèmes sur le futur reproducteur des vaches laitières. De plus, avec du recul, afin de mieux quantifier l'impact économique des facteurs de risque choisis (les problèmes utérins post-partum et le nombre de lactations), une meilleure définition des performances reproductrices sous optimales au Québec aurait été nécessaire autre que la Repeat Breeder. L'utilisation de la définition RB, dans cette étude à savoir «vache qui présente minimum trois échecs reproducteurs consécutifs suivant trois inséminations artificielles», n'est peut-être pas la plus appropriée pour discuter des problèmes de performance reproductrice. Cette définition de "Repeat Breeder", établie il y a plusieurs années dans un contexte d'élevage tout à fait différent du nôtre à ce jour (2009), sert encore de référence aujourd'hui dans les analyses d'infertilités. Son utilisation, tout au cours du mémoire, se base sur la définition la plus fréquemment retrouvée dans les articles scientifiques. Toutefois, la terminologie RB n'est pas précise et n'implique pas *sine qua non* une condition pathologique chez la vache. Il apparaît important de saisir la différence notable existant entre une vache RB à 170 JEL (3 saillies à 40 jours d'intervalles entre les saillies et avec PAV à 60 JEL) et une vache RB à 300 JEL (3 saillies à 100 jours d'intervalles entre les saillies et avec une PAV à 60 JEL). Ces dernières ne représentent pas la même situation et n'impliquent nécessairement pas les mêmes facteurs de risque. Suite aux constats de la présente étude, le terme *Repeat Breeder* ne témoigne donc pas vraiment de la réalité des problèmes sévères de reproduction. La durée de temps d'inactivité reproductrice (JEL ouverts) identifie plus un facteur déterminant des problèmes de reproduction que le nombre d'IA en soi chez la vache laitière. En conséquence, le fait qu'une vache non gestante excède plus de 120 JEL aurait été plus adéquat pour

identifier les vaches avec reproduction inefficace. Un élément de plus à considérer pour entraîner une réflexion plus avancée.

Suivant les résultats de la deuxième portion de projet, l'infection utérine, en début de période de reproduction, compromet le rendement reproducteur des vaches laitières. L'usage de la bactériologie utérine aérobie sur un échantillon de lavage utérin semble prometteur. Toutefois, l'usage de ce test n'est pas très commode dans la pratique quotidienne des médecins vétérinaires d'aujourd'hui. De plus, une bactériologie aérobie et anaérobie aurait été plus juste de la flore microbienne de l'environnement utérin. Pour des raisons économiques et selon les résultats des études scientifiques antérieures, seulement la culture aérobie a été choisie.

Des tests, autres que la bactériologie utérine, moins sensibles mais du moins plus rapides existent afin de diagnostiquer une infection utérine. C'est le cas de l'appareil échographique. Dans un contexte global, suivant les résultats de cette recherche et des autres articles scientifiques à ce sujet, l'échographie utérine est une méthode rapide et non invasive pour conclure à une infection utérine. De plus, elle permet l'évaluation complète du système reproducteur (utérus et ovaires) augmentant ainsi son importance côté pratique. La fonction ovarienne est très importante et influence beaucoup les performances reproductrices des vaches. Ce volet aurait été intéressant à développer dans la portion de projet ci-présent. Des examens séquentiels par échographies combinées à des profils hormonaux de progestérone plasmatique, durant le cycle œstral, auraient permis de mieux évaluer le cycle œstral des vaches de la deuxième portion d'étude. Les coûts élevés engendrés par le test de quantification de la progestérone systémique ont limité son utilisation au moment du prélèvement.

Parmi les autres tests cliniques en lien avec le diagnostic de l'infection utérine, la détection des estérases leucocytaires dans le liquide utérin semble prometteuse. La puissance de la présente étude était la principale limite. Des études supplémentaires sur la pertinence de la détection des estérases dans le liquide utérin sont demandées. Lors de récolte d'échantillons, l'usage d'une cytobrosse plutôt qu'un lavage utérin serait plus adéquat. La rapidité d'exécution et la simplicité de préparation et d'interprétation des lames cytologiques lors de cytobrosses en comparaison avec le lavage utérin sont des avantages de la technique. De plus, une gaine de protection lors de prélèvement par cytobrosse est disponible ce qui diminue la contamination des échantillons par la flore vaginale. Son usage lors de lavage utérin est difficilement réalisable.

Bref, les deux parties de projet dans ce mémoire se sont penchées sur des facteurs de risque des problèmes de reproduction actuels tels les problèmes utérins, le nombre de lactations et l'infection utérine. L'ajout de facteurs de risque aux problèmes de fertilité en dehors des conditions utérines à savoir la mammite, les problèmes métaboliques et les problèmes locomoteurs auraient été fort intéressants à traiter. Par contre, la puissance de la deuxième portion d'étude n'était pas suffisante pour l'intégration de ces

derniers. Le dossier de santé animal (présence de problèmes post-partum, nombre de lactations) et l'examen clinique de l'animal (examen externe de la région périnéale, échographie, bactériologie utérine, cytologie endométriale, détection des estérases leucocytaires) s'avèrent des outils cliniques utiles afin de nous aider à découvrir les facteurs de risque possible des mauvaises performances reproductrices.

Finalement, considérant les résultats globaux, il pourrait être spéculé que le facteur le plus déterminant en terme de performance reproductrice et en association avec le système reproducteur provient de l'efficacité et de la rapidité de l'endomètre à rétablir l'environnement utérin adéquat pour le début de la période de reproduction. Les problèmes post-partum et l'âge peuvent retardés le processus d'involution utérine, de même que la présence d'une infection utérine en début de lactation. L'usage de prostaglandines durant la période d'attente volontaire peut possiblement accélérer la période d'involution utérine, faciliter la vidange utérine, et ainsi raccourcir l'intervalle entre le vêlage et le moment où l'utérus est propice pour la première insémination. Un regard sur les différences de performances reproductrices possibles entre les troupeaux avec utilisation de deux prostaglandines en période d'attente volontaire avant la période d'insémination (exemple : pré-synch) versus les troupeaux sans protocole d'injections avant cette période serait intéressant.

## Conclusion générale

L'inefficacité reproductive des vaches "Repeat Breeder" occasionne une problématique économique dans le monde de l'industrie laitière. L'accroissement des connaissances des outils de mesure et des facteurs de risque causant des problèmes d'infertilité chez la vache laitière permettrait d'être plus performant lors de diagnostics d'infertilité de même que dans le choix de la thérapeutique adaptée à la condition.

Dans l'étude présente, les problèmes post-partum sont confirmés, encore une fois, dans la liste des facteurs de risque de la «Repeat Breeder». Toutefois, son impact global sur la population demeure minime dû à la faible incidence de ces derniers. L'augmentation du nombre de parités apparaît aussi comme facteur de risque majeur des problèmes de fécondité ainsi que pour le choix de réforme.

Côté clinique, un seul marqueur de la condition utérine se démarque dans le diagnostic de la condition «Repeat Breeder» en fin de PAV: la bactériologie du liquide utérin. La biochimie utérine et la concentration de progestérone J7 se révèlent normales en fin de PAV chez les vaches RB supportant le transfert d'embryons thérapeutiques comme technique curative appropriée pour la condition.

## Bibliographie

1. McDougall S. Reproduction performance and management of dairy cattle. *J Reprod Dev* 2006;52 (1): 185-194.
2. Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Wooliams JA, and Lamming GE. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Animal Science* 2000;70: 487-501.
3. Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* 2001;84 (6): 1277-1293.
4. Levine HD. The Repeat Breeder Cow. *Bovine Practitioner* 1999;33: 97-105.
5. Demetrio DG, Santos RM, Demetrio CG, and Vasconcelos JL. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2007;90 (11): 5073-5082.
6. Chebel RC, Santos JE, Reynolds JP, Cerri RL, Juchem SO, and Overton M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004;84 (3-4): 239-255.
7. Rowson LE, Lawson RA, Moor RM, and Baker AA. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. *J Reprod Fertil* 1972;28 (3): 427-431.
8. Sreenan JM and Beehan D. Egg transfer in the cow: pregnancy rate and egg survival. *J Reprod Fertil* 1974;41 (2): 497-499.
9. Albiñ A, Gustafsson H, and Rodriguez-Martinez H. Maternal influence on the early development of asynchronously transferred bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 1991;24: 25-35.
10. Lamothe P, Guay P, and Tremblay A. [Blood glucose and endometrial glucose secretion in 2 groups of cows one which is affected by infertility sine materia]. *Can Vet J* 1972;13 (2): 29-32.
11. Bazer FW. Uterine protein secretions: Relationship to development of the conceptus. *J Anim Sci* 1975;41 (5): 1376-1382.
12. Roberts GP and Parker JM. Macromolecular components of the luminal fluid from the bovine uterus. *J Reprod Fertil* 1974;40 (2): 291-303.
13. Wiebold JL. Embryonic mortality and the uterine environment in first-service lactating dairy cows. *J Reprod Fertil* 1988;84 (2): 393-399.
14. Guise MB and Gwazdauskas FC. Profiles of uterine protein in flushings and progesterone in plasma of normal and repeat-breeding dairy cattle. *J Dairy Sci* 1987;70 (12): 2635-2641.

15. Jordan ER, Chapman TE, Holtan DW, and Swanson LV. Relationship of dietary crude protein to composition of uterine secretions and blood in high-producing postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 1983;66 (9): 1854-1862.
16. Elrod CC, Van Amburgh M, and Butler WR. Alterations of pH in response to increased dietary protein in cattle are unique to the uterus. *J Anim Sci* 1993;71 (3): 702-706.
17. Hugentobler SA, Diskin MG, Leese HJ, et al. Amino acids in oviduct and uterine fluid and blood plasma during the estrous cycle in the bovine. *Mol Reprod Dev* 2007;74 (4): 445-454.
18. Hugentobler SA, Humpherson PG, Leese HJ, Sreenan JM, and Morris DG. Energy substrates in bovine oviduct and uterine fluid and blood plasma during the oestrous cycle. *Mol Reprod Dev* 2008;75 (3): 496-503.
19. Hugentobler SA, Morris DG, Sreenan JM, and Diskin MG. Ion concentrations in oviduct and uterine fluid and blood serum during the estrous cycle in the bovine. *Theriogenology* 2007;68 (4): 538-548.
20. Fenwick MA, Llewellyn S, Fitzpatrick R, et al. Negative energy balance in dairy cows is associated with specific changes in IGF-binding protein expression in the oviduct. *Reproduction* 2008;135 (1): 63-75.
21. Hill J and Gilbert R. Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust Vet J* 2008;86 (8): 312-316.
22. Lafi SQ and Kaneene JB. Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. I. Epidemiological modeling. *Prev Vet Med* 1992;14: 87-98.
23. Butler WR. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1998;81 (9): 2533-2539.
24. Gilbert RO, Grohn YT, Miller PM, and Hoffman DJ. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. *Vet Immunol Immunopathol* 1993;36 (1): 75-82.
25. Kirkbride CA. Mycoplasma, Ureaplasma, and Acholeplasma infections of bovine genitalia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1987;3 (3): 575-591.
26. Erb HN, Smith RD, Oltenacu PA, et al. Path model of reproductive disorders and performance, milk fever, mastitis, milk yield, and culling in Holstein cows. *J Dairy Sci* 1985;68 (12): 3337-3349.
27. Gröhn YT and Rajala-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61: 605-614.
28. Bell MJ and Roberts DJ. The impact of uterine infection on a dairy cow's performance. *Theriogenology* 2007;68 (7): 1074-1079.
29. Coleman DA, Thayne WV, and Dailey RA. Factors affecting reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 1985;68 (7): 1793-1803.

30. Opsomer G, Grohn YT, Hertl J, Coryn M, Deluyker H, and de Kruif A. Risk factors for post partum ovarian dysfunction in high producing dairy cows in Belgium: a field study. *Theriogenology* 2000;53 (4): 841-857.
31. Tenhagen BA, Helmbold A, and Heuwieser W. Effect of various degrees of dystocia in dairy cattle on calf viability, milk production, fertility and culling. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007;54 (2): 98-102.
32. Smith BP. Large animal internal medicine. 4th ed. St. Louis, Mo.: Mosby Elsevier, 2009:xlvi, 1821 p.
33. Ball PJ. The relationship of age and stage of gestation to the incidence of embryo death in dairy cattle. *Res Vet Sci* 1978;25 (1): 120-122.
34. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, et al. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002;85 (9): 2223-2236.
35. Bouchard E and Du Tremblay D. *Portrait Québécois de la reproduction*, 2003.
36. Walter H. Johnson. Kyste folliculaire chez les bovins: Une revue. *Le Médecine Vétérinaire du Québec* 2006-2007;36 (4): 107-111.
37. Garcia-Ispuerto I, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz JL, Nogareda C, and Lopez-Bejar M. Factors affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain. *Theriogenology* 2007;67 (3): 632-638.
38. Leroy JL, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IG, and Bols PE. 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. *Reprod Domest Anim* 2008.
39. Petersson KJ, Gustafsson H, Strandberg E, and Berglund B. Atypical progesterone profiles and fertility in Swedish dairy cows. *J Dairy Sci* 2006;89 (7): 2529-2538.
40. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, et al. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2004;62 (1-2): 9-23.
41. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, et al. The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci* 2002;85 (9): 2237-2249.
42. Fourichon C, Seegers H, and Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology* 2000;53 (9): 1729-1759.
43. Doormaal BV. *La consanguinité au fil du temps*, 32e Symposium sur les Bovins Laitiers. Drummondville: CRAAQ, 2008.
44. Melendez P, Bartolome J, Archbald LF, and Donovan A. The association between lameness, ovarian cysts and fertility in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2003;59 (3-4): 927-937.

45. Dobson H and Smith RF. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci* 2000;60-61: 743-752.
46. Walsh RB, Walton JS, Kelton DF, LeBlanc SJ, Leslie KE, and Duffield TF. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 2007;90 (6): 2788-2796.
47. Intervet International. Compendium of animal reproduction. Netherlands: Intervet, 1993:259.
48. Silva E, Sterry RA, Kolb D, et al. Accuracy of a pregnancy-associated glycoprotein ELISA to determine pregnancy status of lactating dairy cows twenty-seven days after timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2007;90 (10): 4612-4622.
49. Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61: 449-457.
50. Loeffler SH, de Vries MJ, Schukken YH, et al. Use of AI technician scores for body condition, uterine tone and uterine discharge in a model with disease and milk production parameters to predict pregnancy risk at first AI in Holstein dairy cows. *Theriogenology* 1999;51 (7): 1267-1284.
51. Butler WR and Smith RD. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1989;72 (3): 767-783.
52. Gautam G and Nakao T. Prevalence of urovagina and its effects on reproductive performance in Holstein cows. *Theriogenology* 2009;71 (9): 1451-1461.
53. Studer E and Morrow DA. Postpartum evaluation of bovine reproductive potential: comparison of findings from genital tract examination per rectum, uterine culture, and endometrial biopsy. *J Am Vet Med Assoc* 1978;172 (4): 489-494.
54. Senger PL. Pathways to pregnancy and parturition. 2nd ed. Pullman, WA: Current Conceptions, 2003:xv, 368 p.
55. Youngquist RS and Walter RT. Postpartum Uterine Infections, chapter 44; Current therapy in large animal theriogenology edited by Robert S. Youngquist, Walter R. Threlfall. 2nd ed. St. Louis: Saunders, 2007:xxiii, 1061.
56. Griffin JF, Hartigan PJ, and Nunn WR. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. *Theriogenology* 1974;1 (3): 91-106.
57. Bretzlaff K. Rationale for treatment of endometritis in the dairy cow. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1987;3 (3): 593-607.
58. Ginther OJ. Ultrasonic imaging and animal reproduction. Cross Plains, Wisc.: Equiservices Publishing, 1995.

59. Okano A and Tomizuka T. Ultrasonic observation of postpartum uterine involution in the cow. *Theriogenology* 1987;27 (2): 369-376.
60. Sheldon M, Williams EJ, and Herath S. Infection, Immunity and Reproduction. *Journal of British Cattle Veterinary Association: Cattle Practice* 2007;15: 43-45.
61. Mateus L, da Costa LL, Bernardo F, and Silva JR. Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2002;37 (1): 31-35.
62. Descôteaux L, Gnemmi G, and Colloton JD. *Guide pratique d'échographie pour la reproduction des ruminants*. Paris: Éditions Med'com, 2009:239.
63. Perez-Marin CC and Espana F. Oestrus expression and ovarian function in repeat breeder cows, monitored by ultrasonography and progesterone assay. *Reprod Domest Anim* 2007;42 (5): 449-456.
64. Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, et al. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 2005;63 (1): 102-117.
65. Runciman DJ, Anderson GA, Malmo J, and Davis GM. Use of postpartum vaginoscopic (visual vaginal) examination of dairy cows for the diagnosis of endometritis and the association of endometritis with reduced reproductive performance. *Aust Vet J* 2008;86 (6): 205-213.
66. McDougall S, Macaulay R, and Compton C. Association between endometritis diagnosis using a novel intravaginal device and reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 2007;99 (1-2): 9-23.
67. Bondurant RH. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci* 1999;77 Suppl 2: 101-110.
68. Lewis GS. Uterine health and disorders. *J Dairy Sci* 1997;80 (5): 984-994.
69. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Pfeiffer DU, and Dobson H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. *Reproduction* 2002;123 (6): 837-845.
70. Corbeil LB and Bondurant RH. Immunity to bovine reproductive infections. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2001;17 (3): 567-583.
71. Gonzalez HE, Crowell WA, Caudle AB, and Thompson FN. Morphometric studies of the bovine uterus: microscopic lesions and retrospective reproductive history. *Am J Vet Res* 1985;46 (12): 2588-2595.
72. Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, et al. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 2007;68 (4): 549-559.

73. Karsch FJ, Battaglia DF, Breen KM, Debus N, and Harris TG. Mechanisms for ovarian cycle disruption by immune/inflammatory stress. *Stress* 2002;5 (2): 101-112.
74. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, et al. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J* 2005;46 (3): 255-259.
75. LeBlanc MM, Magsig J, and Stromberg AJ. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology* 2007;68 (3): 403-412.
76. Riddle WT, LeBlanc MM, and Stromberg AJ. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology* 2007;68 (3): 395-402.
77. Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, and Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 2008;69 (6): 714-723.
78. Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, and Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006;65 (8): 1516-1530.
79. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, and Erb H. Incidence of endometritis and effects on reproductive performance of dairy cows (Abstract). *Theriogenology* 1998;49: 251.
80. Bonnett BN, Martin SW, Gannon VP, Miller RB, and Etherington WG. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can J Vet Res* 1991;55 (2): 168-173.
81. Ohtani S, Okuda K, Nishimura K, and Mohri S. Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology* 1993;39 (5): 1033-1042.
82. Debois CHW and Manspeaker JE. Endometrial Biopsy of the Bovine, Page 424-426 in *Current therapy in theriogenology* [2nd ed]. ed. Philadelphia ; Toronto: Saunders, 1986:xxiv, 1143p.
83. Bonnett BN, Miller RB, Etherington WG, Martin SW, and Johnson WH. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. *Can J Vet Res* 1991;55 (2): 155-161.
84. Shaham-Albalancy A, Nyska A, Kaim M, Rosenberg M, Folman Y, and Wolfenson D. Delayed effect of progesterone on endometrial morphology in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 1997;48 (2-4): 159-174.
85. Del Vecchio RP, Matsas DJ, Fortin S, Sponenberg DP, and Lewis GS. Spontaneous uterine infections are associated with elevated prostaglandin F(2)alpha metabolite concentrations in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 1994;41 (2): 413-421.
86. Zaayer D and van der Horst CJ. Non-fertility in cows: treatment with PGF and investigation of uterine biopsies. *Cytobios* 1986;45 (180): 55-70.

87. Pope WF. Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biol Reprod* 1988;39 (5): 999-1003.
88. Shelton K, Gayerie De Abreu MF, Hunter MG, Parkinson TJ, and Lamming GE. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *J Reprod Fertil* 1990;90 (1): 1-10.
89. Claus R, Karg H, Zwiauer D, von Butler I, Pirchner F, and Rattenberger E. Analysis of factors influencing reproductive performance of the dairy cow by progesterone assay in milk-fat. *Br Vet J* 1983;139 (1): 29-37.
90. Sreenan JM and Diskin MG. Early embryonic mortality in the cow: its relationship with progesterone concentration. *Vet Rec* 1983;112 (22): 517-521.
91. Lamming GE and Darwash AO. The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Anim Reprod Sci* 1998;52 (3): 175-190.
92. Darwash AO, Lamming GE, and Woolliams JA. Estimation of genetic variation in the interval from calving to postpartum ovulation of dairy cows. *J Dairy Sci* 1997;80 (6): 1227-1234.
93. Rerknimitr R, Rungsangmanoon W, Kongkam P, and Kullavanijaya P. Efficacy of leukocyte esterase dipstick test as a rapid test in diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol* 2006;12 (44): 7183-7187.
94. Triger DR and Smith JW. Survival of urinary leucocytes. *J Clin Pathol* 1966;19 (5): 443-447.
95. Schmauder S, Weber F, Kiossis E, and Bollwein H. Cyclic changes in endometrial echotexture of cows using a computer-assisted program for the analysis of first- and second-order grey level statistics of B-Mode ultrasound images. *Anim Reprod Sci* 2008;106 (1-2): 153-161.
96. Schillo KK. *The reproductive physiology of mammals : from farm to field and beyond*. Clifton Park, N.Y.: Delmar Cengage Learning, 2009:xviii, 462 p.
97. Spencer TE and Bazer FW. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. *J Anim Sci* 2004;82 E-Suppl: E4-13.
98. Beier HM. Oviducal and uterine fluids. *J Reprod Fertil* 1974;37 (1): 221-237.
99. Thibault C and Levasseur M-C. *La Reproduction chez les mammifères et l'homme*. Nouv. éd. ent. ref. ed. Paris: INRA : Ellipses, 2001:928 p., 928 p. de pl.
100. Bousquet D, Lamothe P, and Guay P. [Enzymatic profile of uterine secretions of cows during estrous cycle]. *Can J Comp Med* 1976;40 (2): 198-201.
101. Ayalon N. A review of embryonic mortality in cattle. *J Reprod Fertil* 1978;54 (2): 483-493.
102. Bugalia NS, Sharma RD, Biswas RK, and Chauhan FS. Biochemical constituents of endometrium in fertile and repeat breeder cows. *Arch Exp Veterinarmed* 1988;42 (1): 96-99.
103. Ocon OM and Hansen PJ. Disruption of bovine oocytes and preimplantation embryos by urea and acidic pH. *J Dairy Sci* 2003;86 (4): 1194-1200.

104. Bode M.L., Gilbert R.O, and W.R. B. Effect of high plasma urea nitrogen levels on bovine embryo quality and development. *J Dairy Sci* 2001;84 (supp 1): 116.
105. Hugentobler S, Morris DG, Kane MT, and Sreenan JM. In situ oviduct and uterine pH in cattle. *Theriogenology* 2004;61 (7-8): 1419-1427.
106. P. Guérin, E.Gallois, S. Croteau, et al. Techniques de récolte et aminogrammes des liquides tubaire et folliculaire chez les femelles domestiques. *Rev Med Vet* 1995;146 (12): 805-814.
107. Guay P and Lamothe P. [Biochemical study of the genital secretions of sterile bovine females presenting normal estrus cycles]. *Can J Comp Med* 1969;33 (2): 93-97.
108. Lamothe P and Guay P. [Electrolytes in bovine intrauterine secretions in infertility sine material]. *Can J Comp Med* 1970;34 (3): 167-176.
109. Young FM, Luderer WB, and Rodgers RJ. The antioxidant beta-carotene prevents covalent cross-linking between cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 and its electron donor, adrenodoxin, in bovine luteal cells. *Mol Cell Endocrinol* 1995;109 (1): 113-118.
110. Liberis V, Tsikouras P, Christos Z, et al. The contribution of hysteroscopy to the detection malignancy in symptomatic postmenopausal women. *Minim Invasive Ther Allied Technol* 2010.