

Ejection du lait induite par $\text{PGF}_{2\alpha}$ pendant les deux premiers mois qui suivent l'insémination des vaches. Applications à un diagnostic de gravidité

J. LABUSSIÈRE, Ph. THOMAS, J. F. COMBAUD, F. A. de la CHEVALERIE
avec la collaboration technique de C. HIARD, Y. GAUCHET, J. LE BAIL, E. SIROUX

Laboratoire de la Traite, I.N.R.A.,
65, rue de Saint-Brieuc, 35042 Rennes Cedex, France.

Summary. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ induced milk ejection in cows during the first two post-insemination months. Application to pregnancy diagnosis.

Milk ejection after intrajugular injection of 256 μg of a synthetic $\text{PGF}_{2\alpha}$ analogue (Dinolytic, Upjohn) was measured every 2 days until D60 in 7 pregnant cows and until D25 in 5 non pregnant inseminated cows (trial 1). There was a very close correlation (r around + 0.98) between the values of the 3 parameters used to characterize milk ejection, *i. e.* amplitude of intramammary pressure deflection, surface area under the pressure curve, alveolar milk volume collected by a teat probe. In the two groups of animals, these values behaved similarly until D15 with a sudden increase between D2 and D7. From D15 they decreased abruptly in females where insemination had failed while they still remained at a high level until D25 (then decreasing until D60) in those presumed to be pregnant (fig. 2).

These responses were assumed to result from the release of luteal oxytocin and it is suggested that a single injection of 256 μg of Dinolytic on D20, together with milk ejection control using a teat probe, would be a rapid, little expensive method for the farmer (without risks of luteolysis) (trial 2 and fig. 3) to distinguish between pregnant and non pregnant cows.

Introduction.

Il est maintenant bien établi que le corps jaune de très nombreuses espèces peut sécréter, stocker et libérer de l'ocytocine (cf. revue de Wathes *et al.*, 1986 ou de Labussière, Eyi Ngui et Combaud, 1986) et il est probable que l'enchaînement des rétrocontrôles positifs et réciproques entre les pulses d'ocytocine lutéale et ceux des prostaglandines $F_{2\alpha}$ utérines, conduit à la lutéolyse (Fairclough *et al.*, 1984 ; Schallenberger *et al.*, 1984 ; Moore *et al.*, 1986 ; Sheldrick et Flint, 1986 ; Hooper, Watkins et Thorburn, 1986).

Si l'installation du corps jaune de gestation se traduit dans toutes les espèces par le maintien de la progestéronémie au niveau existant en fin de phase lutéale des femelles cycliques, il ne semble, par contre, pas en être de même pour

l'ocytocinémie. En effet, chez la brebis, on observe vers J12, J13, un effondrement brutal des concentrations plasmatiques (et tissulaires) puis (après une remontée provisoire entre J15 et J18 (Sheldrick et Flint, 1981, 1983 ; Hooper et Thorburn, 1987) une diminution lente et progressive qui atteint le seuil de sensibilité du dosage aux environs du 30^e jour (Sheldrick et Flint, 1983 ; Schams et Lahlou Kassi, 1984 ; Flint et Sheldrick, 1986 ; Hopper et Thorburn, 1987).

Chez la vache, on sait simplement qu'en milieu de gestation les concentrations d'ocytocine par gramme de tissu lutéal sont au minimum 100 fois plus faibles que celles observées vers le 10^e jour (Wathes, Swann et Pickering, 1984 ; Schams *et al.*, 1983) mais nous ne disposons pas d'informations intermédiaires, en particulier 3 semaines après l'insémination lorsque la présence d'un corps jaune fonctionnel permet de présumer une gravidité. Comme l'évaluation radio-immunologique de l'ocytocine en vue d'un diagnostic comporte autant d'inconvénients que celle de la progestérone (délais trop longs pour obtenir les résultats, prix élevés, etc...), il nous a paru utile de rechercher une méthode plus pratique directement utilisable par les éleveurs et permettant de leur donner une réponse immédiate.

Ce « test » pourrait faire appel aux propriétés qu'ont les prostaglandines $F_{2\alpha}$ de provoquer une éjection du lait lorsqu'elles sont injectées dans la veine jugulaire de la vache (Labussière *et al.*, 1982) ou de la brebis (Labussière *et al.*, 1983). Les réponses mammaires alors obtenues sont en effet synchrones d'une augmentation de l'ocytocinémie (Labussière *et al.*, 1988) et elles disparaissent toujours après ovariectomie (Labussière, Eyi Ngui et Combaud, 1986) ou après occlusion provisoire des artères et veines ovariennes (Labussière et Combaud, résultats non publiés).

On connaît maintenant très bien chez la brebis comment les déflexions de pression intramammaire induites par $PGF_{2\alpha}$ évoluent au cours du cycle ou au cours des 60 premiers jours de la gestation (Labussière, Combaud et de la Chevalerie, 1988) et nous avons pu montrer la similitude existant avec les changements de l'ocytocinémie cités précédemment.

Par contre, dans l'espèce bovine, les seules informations dont nous disposons en matière d'éjection du lait concernent les femelles cycliques (Labussière *et al.*, 1982). Ce travail vise donc principalement à décrire les variations des réponses chez des vaches inséminées afin de pouvoir ultérieurement discriminer précocement celles qui sont gestantes ou non (essai n° 1).

Il a également pour objet de s'assurer que la dose de $PGF_{2\alpha}$ utilisée pour faire ce diagnostic est inoffensive et qu'elle n'a pas d'effets lutéolytiques (essai n° 2).

Matériel et méthodes

1) *Essai n° 1 : Evolution de l'éjection du lait induite par $PGF_{2\alpha}$ au cours des 2 premiers mois post-insémination.*

a) *Présentation générale de l'essai n° 1.* — L'essai n° 1 porte sur 12 vaches laitières FFPN × Holstein, inséminées 56 h après l'arrêt d'un traitement progestatif

de maîtrise des chaleurs et de l'ovulation (Chupin, Pelot et Mauléon, 1980) qui débute vers la fin du 2^e mois post-partum. Le jour d'apparition de l'œstrus étant par convention appelé J0, chacune des 12 vaches reçoit tous les 2 jours (avant la traite du soir) entre J-1 et J25 une injection intrajugulaire de 256 µg de Dinolytic (§ b) qui est un analogue synthétique de PGF_{2α}. Les effets de cette injection sont appréciés en mesurant simultanément les volumes de lait alvéolaire recueillis grâce à une canule placée préalablement dans le trayon arrière droit (§ c) et les variations de pression intramammaire du quartier avant droit selon la méthode déjà décrite par Labussière *et al.* (1982). La figure 1 présente les 2 paramètres retenus pour quantifier ces variations (amplitude maximale de la déflexion et surface de la courbe de réponse en 10 min T).

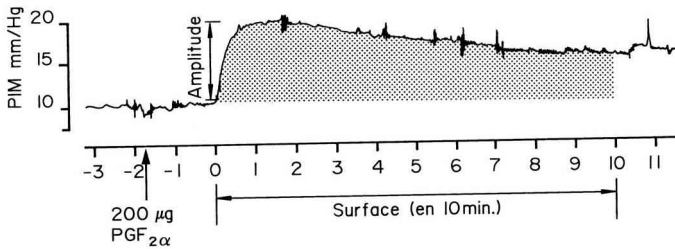


FIG. 1. — Présentation des 2 paramètres retenus pour mesurer les variations de pression intramammaire. L'amplitude maximale est exprimée en mm/Hg ; la surface de réponse en 10 min est exprimée en cm² et déterminée à l'aide d'un planimètre.

A partir de J25, les injections de PGF_{2α} sont interrompues sur les 5 vaches « vides » qui sont revenues en chaleurs et sont poursuivies tous les 3 à 5 jours jusqu'à la fin du 2^e mois chez les 7 vaches présumées gestantes.

Enfin, au cours de la matinée qui précède chaque injection de PGF_{2α} une prise de sang est effectuée dans la veine jugulaire de chaque animal et après centrifugation (3 000 t/min) le plasma est prélevé puis congelé à -20 °C en vue du dosage radioimmunologique de la progestérone (Saumande, 1984, communication personnelle).

b) *Pose des cathéters permanents dans la veine jugulaire et modalités d'injection de PGF_{2α}* — Afin de faciliter les injections, un cathéter de polyéthylène (PE — 90 — Becton et Dickinson) est introduit sur une longueur de 30 cm environ dans la veine jugulaire droite de chaque animal préalablement tranquilisé (Calmivet — Vétoquinol) une demi-heure avant l'intervention. Cette introduction est réalisée quelques jours avant le premier enregistrement grâce à une aiguille siliconée (Ø 20 mm). Le cathéter est maintenu extériorisé sur la peau de l'animal par deux sutures (Fléxidène 6 — Laboratoire Bruneau) et reste ainsi en place pendant toute la durée de l'essai (25 jours ou 2 mois).

L'obturation est assurée par un mandrin de nylon dans le cathéter préalablement rempli de 0,3 à 0,7 ml d'une solution anticoagulante d'héparine (1 000 UI/ml — Laboratoires Choay).

Les 256 µg de Dinolytic (sel de Trométhamine de PGF_{2α}; Upjohn) sont injectés dans 2 ml de ClNa 0,9 % stérilisé et sont immédiatement « poussés » par un volume équivalent de la solution « véhicule » afin qu'il ne subsiste pas de PGF_{2α} dans le cathéter.

c) *Récolte et mesure du lait alvéolaire.* — Une canule métallique stérile de 10 cm (sonde trayeuse cone international 6 % à verrou, Crépin) est délicatement introduite dans le trayon arrière droit préalablement nettoyé (1) au savon iodé (Vétédine, Vétquinol) et à l'alcool à 95°. Elle permet l'évacuation immédiate du lait citernal, puis après l'administration des 256 µg de Dinolytic, l'éjection du lait alvéolaire qui est recueilli et mesuré (en ml) à l'aide d'une éprouvette graduée.

2) *Essai n° 2 : Vérification de l'innocuité de l'injection intrajugulaire de 256 µg de Dinolytic.*

Sur 54 vaches inséminées après observation des chaleurs induites (J0 : apparition de l'œstrus) 36 sont présumées gestantes (2) au vu des résultats quotidiens de dosage de progestérone. Ces 36 vaches sont réparties en 2 lots qui à J20 (ou exceptionnellement à J21) reçoivent une injection intrajugulaire :
— soit de 2 ml d'une solution de NaCl 0,9 % contenant 256 µg de Dinolytic (lot A : 20 animaux, stade d'injection $20,37 \pm 0,11$ jours) ;
— soit de 2 ml de la solution « véhicule » de NaCl 0,9 % (lot B : 16 animaux, stade d'injection : $20,50 \pm 0,12$ jours).

Le volume de lait alvéolaire recueilli à la suite de ces injections est mesuré comme il a été indiqué au paragraphe c pour l'essai 1.

L'évaluation quotidienne de la progestéronémie jugulaire (qui a débuté à J0) est poursuivie sur chaque vache jusqu'à J34 afin de contrôler pendant 2 semaines les éventuels effets lutéolytiques de l'administration de PGF_{2α}. Les échantillons de sang sont prélevés à l'aide d'un vacutainer hépariné et sont centrifugés, stockés et dosés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (1^{er} essai).

Résultats.

Essai n° 1.

Les figures 2A, 2B, 2C indiquent qu'après injection de 256 µg de Dinolytic, l'amplitude maximale de pression intramammaire, la surface sous la courbe pendant les 10 premières minutes de réponse et le volume de lait alvéolaire

(1) Le nettoyage ne doit induire aucune décharge d'OT post-hypophysaire qui interférerait avec celle de l'OT lutéale.

(2) 18 vaches inséminées sont donc considérées comme « vides » ; parmi celles-ci, 15 sont revenues en chaleurs après une phase lutéale normale et 3 ne présentent jamais, après l'insémination, des taux de progestérone qui dépassent nettement le seuil de sensibilité du dosage.

expulsé, évoluent d'une façon identique chez les vaches gestantes et non gestantes pendant les 15 premiers jours qui suivent l'insémination.

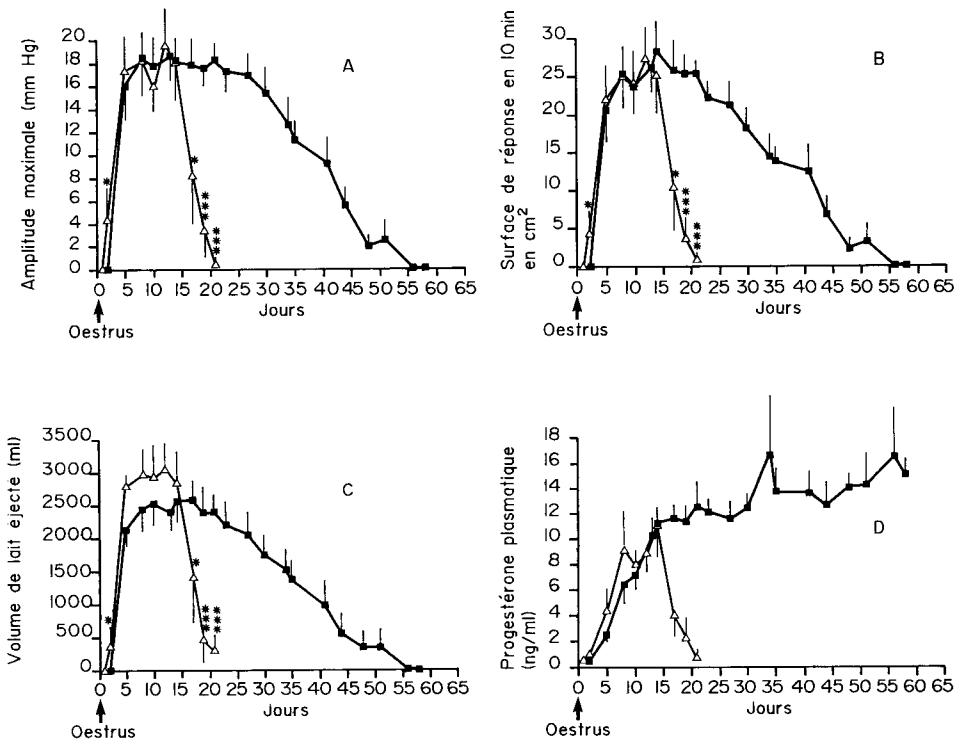


FIG. 2. — Variations de l'éjection du lait induite par l'injection intrajugulaire de 256 µg de Dinolytic et évolution de la progestérone plasmatique chez 7 vaches gestantes (■—■) et 5 vaches non gestantes (—△—△).

A — Amplitude maximale de déflexion (mm/Hg) ; B — Surface de réponse en 10 min (cm²) ; C — Volume de lait alvéolaire recueilli à l'aide d'une sonde trayeuse (ml) ; D — Progestérone plasmatique (ng/ml).

A partir de ce stade, les valeurs de ces 3 paramètres (permettant de caractériser l'ampleur de l'éjection lactée) baissent rapidement chez les non-gestantes et deviennent proches de zéro à J20 alors qu'elles se maintiennent encore élevées chez les femelles gravides pendant au moins une semaine. Ce n'est qu'au-delà de J25 que l'on observe chez ces dernières une lente diminution des réponses qui disparaissent un peu avant la fin du 2^e mois de gestation. L'analyse de variance indique que pour chacun des 3 paramètres ⁽¹⁾ la différence entre les 2 catégories de vaches devient significative dès le stade J16 et l'examen des courbes des figures 2A, 2B et 2C, révèle qu'à J20, l'éjection du lait provoquée par

⁽¹⁾ Ceux-ci sont très étroitement corrélés : r voisin de + 0,98.

PGF₂ devrait permettre de discriminer les vaches porteuses ou non d'un corps jaune avec autant d'efficacité qu'en faisant appel à la progestéronémie dont l'évolution classique est présentée à la figure 2D.

Essai n° 2.

L'administration intrajugulaire de 256 µg de Dinolytic ne semble pas suffisante pour provoquer la lutéolyse puisque :

1° la progestéronémie n'est pas sensiblement modifiée pendant les 2 semaines qui suivent l'injection réalisée à J20,37 ± 0,11 (cf. fig. 3) ;

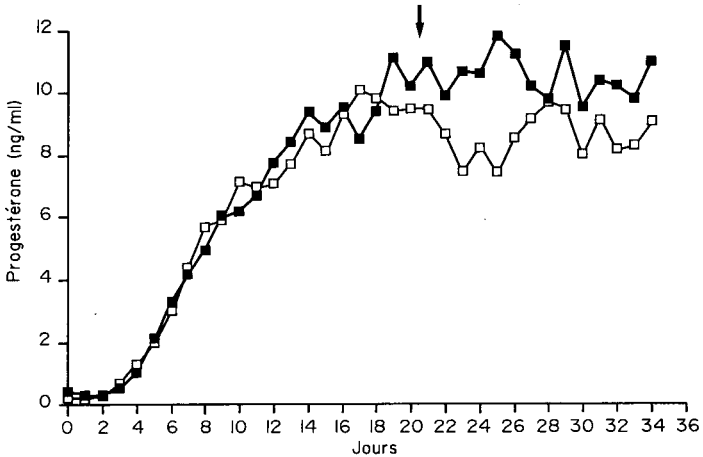


FIG. 3. — Effets de l'injection intrajugulaire de 256 µg de Dinolytic ou d'un volume équivalent (2 ml) de la solution « véhicule » de NaCl 0,9 % sur la progestéronémie de vaches gestantes. 20 vaches recevant le Dinolytic à J20,37 ± 0,11 (—■—■—) ; 16 vaches recevant uniquement les 2 ml de ClNa 0,9 % à J20,50 ± 0,12. (—□—□—) ↓ moment de l'injection.

2° les 20 vaches traitées possèdent encore toutes un corps jaune fonctionnel à J34 ;

3° l'injection à J20,50 ± 0,12, des 2 ml de la solution « véhicule » (NaCl 0,9 %) aux 16 vaches témoin a été par contre paradoxalement suivie de 4 retours en chaleurs (2 à J23, 1 à J26, 1 à J32) qui se traduisent par une diminution de la moyenne des taux de progestérone plasmatique (fig. 3).

Discussion.

Labussière, Combaud et de la Chevalerie (1988) ont précédemment montré qu'à partir de J12 chez la brebis gestante (comme chez la brebis cyclique) l'injection intrajugulaire de 200 µg de Dinolytic devient beaucoup moins efficace pour induire une éjection du lait et une augmentation de la pression intramammaire. Alors qu'à J17, les femelles cycliques sont totalement réfractaires à PGF_{2α},

on constate au contraire que l'installation de la gestation entraîne une reprise transitoire des réponses entre J15 et J20, avant leur lente régression et leur totale disparition au-delà du 1^{er} mois.

Il importe de rappeler à ce sujet que cette évolution est très semblable à celle des concentrations d'ocytocine dans le corps jaune et dans le plasma (Sheldrick et Flint, 1983 ; Schams et Lalhouchi, 1984 ; Hooper et Thorburn, 1987) et l'on peut donc supposer que l'administration de la faible dose de prostaglandine permet une investigation « physiologique » des conditions de stockage et de libération hormonale.

Chez la vache, l'absence de référence sur l'évolution des niveaux d'ocytocine tissulaires et sanguins au cours des premiers jours de la gestation ne nous permet pas encore de tirer des conclusions analogues sur la validité de notre méthodologie et il est possible que dans l'espèce bovine la dose de 256 μ g de Dinolytic ne soit pas parfaitement appropriée pour mettre en évidence les variations de réserves d'ocytocine lutéales.

En effet, si ce traitement ne provoque plus aucune éjection du lait chez les vaches cycliques pendant les 3 ou 4 jours périœstraux, il n'entraîne par contre aucune diminution des réponses chez les vaches gestantes (et *a fortiori* aucune « reprise transitoire ») comme cela avait été observé chez les brebis gravides. C'est ainsi que les valeurs des 3 paramètres choisis pour caractériser cette éjection, se maintiennent aux niveaux atteints entre J7 et J17 au moins jusqu'à J25. Ce n'est qu'à partir de ce stade que débute une lente diminution qui se prolonge jusqu'à la fin du 2^e mois (soit environ 3 semaines de plus que chez les ovins).

Dans le cas des vaches laitières, ces observations ouvrent donc, des perspectives intéressantes en vue d'un test de gestation immédiatement utilisable par l'éleveur. Les excellentes corrélations entre le volume de lait recueilli après administration de PGF_{2 α} et les paramètres caractérisant la pression intramammaire (r voisin de 0,98) évitent l'utilisation d'une chaîne d'enregistrement coûteuse et « fragile » au profit d'une simple canule facile à placer dans l'un des trayons ; l'implantation de ceux-ci au point le plus bas de la citerne permet (contrairement à la brebis) de drainer facilement le lait qui s'y trouve et la faible dose de prostaglandines F_{2 α} , utilisée, offre le double avantage de réduire au strict minimum les frais de diagnostic et de garantir l'éleveur contre les risques de lutéolyse.

Le choix du stade J20 (ou J21) paraît être le plus approprié car il est suffisamment précoce chez les vaches qui se révèlent non gestantes pour faire à nouveau appel à l'inséminateur dans les délais opportuns pour réussir une fécondation sans anomalies.

Les travaux que nous poursuivons à cet égard sur des effectifs plus importants que ceux des essais 1 et 2 (Labussière *et al.*, 1988) indiquent que les animaux chez lesquels on constate à J20 un écoulement lacté au niveau de la sonde trayeuse, présentent tous à ce stade, un taux de progestérone plasmatique élevé (au moins supérieur à 3 ng/ml) alors que l'absence d'écoulement est toujours associée à une faible progestéronémie ne dépassant jamais 0,5 ng/ml. Ainsi, les données préliminaires dont nous disposons actuellement indiquent qu'à l'aide de cette technique simple, rapide (réponse immédiate) et très économique (coût inférieur à 20 centimes) il devrait être possible au stade J20, de faire la

discrimination entre les vaches très certainement « vides » et celles présumées « pleines » avec autant de précision que lors de la recherche radioimmunologique de la progestérone dans le sang ou immuno-enzymatique dans le lait (kits colorés).

Reçu en décembre 1987.

Accepté en mars 1988.

Remerciements. — Nous tenons à remercier M. Cochaud (I.N.R.A., Bressonvilliers) et M. André (I.N.R.A., Nouzilly) pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée lors de la réalisation de ce travail.

Références

- CHUPIN D., PELOT J., MAULÉON P., 1980. Control of time of oestrus, LH peak and ovulation with progestagen, prostaglandin and PMSG in dairy cows. *9^e int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., Madrid*, **4**, 144-147.
- FAIRCLOUGH R. J., MOORE L. G., PETERSON A. J., WATKINS W. B., 1984. Effect of oxytocin on plasma concentration of 13, 14 dihydro-15-keto prostaglandin F and the oxytocin-associated neurophysin during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol. Reprod.*, **31**, 36-43.
- FLINT A. P. F., SHELDRIK E. L., 1986. Ovarian oxytocin and the maternal recognition of pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, **76**, 831-839.
- HOOPER S. B., WATKINS W. B., THORBURN G. D., 1986. Oxytocin, oxytocin-associated neurophysin and prostaglandin $F_{2\alpha}$ concentrations in the utero-ovarian vein of pregnant and non-pregnant sheep. *Endocrinology*, **119**, 2590-2597.
- HOOPER S. B., THORBURN G. D., 1987. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ and oxytocin release during persistence of the corpus luteum in sheep. *Acta. endocr.*, **115**, 469-477.
- LABUSSIÈRE J., PHILIBERT C., COMBAUD J. F., DOTCHEWSKI D., 1982. Etude de l'efficacité de $PGF_{2\alpha}$ sur l'éjection du lait au cours du cycle sexuel de la vache. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **22**, 49-63.
- LABUSSIÈRE J., PHILIBERT C., DOTCHEWSKI D., COMBAUD J. F., de la CHEVALERIE F. A., BERNABÉ J., 1983. Effets des prostaglandines $F_{2\alpha}$ sur l'éjection du lait de la brebis. Variations au cours du cycle sexuel. *Proceed. III^e Symp. Int. Ordeño Mecánico de Pequeños Rumiantes*, **64-80**. Sever Cuesta Edit. Prado 10 Valladolid.
- LABUSSIÈRE J., EYI NGUI V., COMBAUD J. F., 1986. Effets des prostaglandines $F_{2\alpha}$ sur l'éjection du lait de la brebis. Conséquences de l'ovariectomie accompagnée ou non d'une complémentation œstroprogestative. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, **26**, 933-942.
- LABUSSIÈRE J., COMBAUD J. F., de la CHEVALERIE F. A., 1988. Milk ejection induce by $PGF_{2\alpha}$ on cyclic and pregnant ewes. *Reprod. Nutr. Develop.*, **28**, 541-552.
- LABUSSIÈRE J., LACROIX M. C., COMBAUD J. F., THOMAS P., 1988. Résultats non encore publiés.
- MOORE L. G., CHOY V. J., ELLIOT R. L., WATKINS W. B., 1986. Evidence for the pulsatile release of $PGF_{2\alpha}$ inducing the release of ovarian oxytocin during luteolysis in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, **76**, 159-166.
- SCHALLENBERGER E., SCHAMS D., BULLERMANN B., WALTERS D. L., 1984. Pulsatile secretion of gonadotrophins, ovarian steroids and ovarian oxytocin during prostaglandin-induced regression of the corpus luteum in the cow. *J. Reprod. Fert.*, **71**, 493-501.
- SCHAMS D., WALTERS D. L., SCHALLENBERGER E., BULLERMANN B., KARG H., 1983. Ovarian oxytocin in the cow. *Acta. endocr.*, suppl. 253, 147.
- SCHAMS D., LAHLOU-KASSI A., 1984. Circulating concentrations of oxytocin during pregnancy in ewes. *Act. Endocr.*, **106**, 277-281.

- SHELDRIK E. L., FLINT A. P. F., 1981. Circulating concentrations of oxytocin during the oestrus cycle and early pregnancy in sheep. *Prostaglandins*, **22**, 631-636.
- SHELDRIK E. L., FLINT A. P. F., 1983. Luteal concentrations of oxytocin decline during early pregnancy in the ewes. *J. Reprod. Fert.*, **68**, 477-480.
- SHELDRIK E. L., FLINT A. P. F., 1986. Transient uterine refractoriness administration in ewes. *J. Reprod. Fert.*, **77**, 523-559.
- WATHES D. C., SWANN R. W., PICKERING B. T., 1984. Variations in oxytocin, vasopressin and neurophysin concentrations in the bovine ovary during the oestrous cycle and pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, **71**, 551-557.
- WATHES D. C., SWANN R. W., PORTER D. G., PICKERING B. T., 1986. Oxytocin as an ovarian hormone. In *Neurobiology of oxytocin. Current Topics in Neuroendocrinology*, **6**, 129-152.
-