Diagnostic de gestation : une nouvelle méthode non invasive permettant d'estimer le potentiel de prolificité pendant la gestation de la lapine

R. ROBERT[1], K. BEBIN[2], V. LOUSSOUARN[1], P. DOBE[1], D. GARDAN-SALMON[2], N. DESTOMBES[3], C. BRIENS[2],

[1]EUROLAP – Le Germillan - 35140 Gosné, France
[2] DELTAVIT Groupe CCPA- ZA du Bois de Teillay - 35150 Janzé, France.
[3]TERRENA – La Noëlle - 44150 Ancenis, France.

Résumé : L'objectif de cette étude est d'explorer une nouvelle méthode pour dénombrer les fœtus à 15 jours de gestation et de comparer ce nombre à l'observation directe des ampoules fœtales après autopsie de ces mêmes lapines. Cette nouvelle méthode non invasive fait appel à un scanner de haute précision couplé à une analyse d'images multidimensionnelle. Quarante lapines Hyla, au 15ème jour de gestation, sont scannées vivantes, puis autopsiées pour compter le nombre de corps jaunes et d'ampoules fœtales. L'analyse d'image permet de compter précisément le nombre d'ampoules fœtales : 14,43 ampoules par lapine visualisées au scanner contre 14,40 ampoules par lapine à l'autopsie, soit l'erreur d'une ampoule au scanner sur 577 observées. Par contre, le scanner ne permet ni de compter les corps jaunes, ni d'examiner le contenu des ampoules fœtales (vide ou retard de développement). Le scanner permet donc de chiffrer précisément le nombre d'embryons implantés et la viabilité fœtale tardive mais pas les pertes avant implantation (ovules pondus non fécondés et mortalité embryonnaire précoce). Actuellement, cette technique reste coûteuse mais offre des perspectives intéressantes pour des études sur la reproduction ou la génétique, car elle préserve les animaux.

Abstract: The objective of this study was to explore a new method of counting the fetuses at 15 days of gestation in rabbit does and to compare this method to direct observation of implanted embryos after autopsy. This new non-invasive method uses a high precision scanner coupled with a multidimensional image analysis. Forty 15 days pregnant Hyla rabbits does were scanned with this technique. They were then autopsied to count the corpora lutea, implanted embryos and viable embryos. The image analysis allows accurate counting of the number of implanted embryos: 14.43 implanted embryos per doe were visualized with the scanner versus 14.40 implanted embryos per doe counted with the autopsy method. However, the scanner method does not allow counting of corpora lutea nor investigating fetus development. Therefore, scanner method authorizes precise counting of implanted embryos and late fetal viability but do not allow estimation of early losses before implantation (lack of fertilization or early embryonic death). Currently, this technique is still expensive but, as a non-invasive method, it offers interesting prospects on reproduction or genetic studies.

Introduction

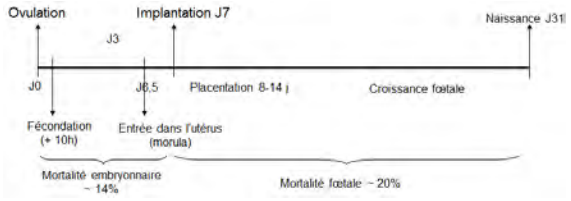
La prolificité fait partie des facteurs clés de réussite de l'élevage de lapins. En recherche il est donc nécessaire de connaître et comprendre les composantes de cette prolificité, de l'ovulation à la mise-bas.

La chronologie des différentes étapes de l'ovulation jusqu'à la mise-bas est présentée sur la figure 1 (Laborda-Vidal 2011, Llobat-Bordes 2012, Caron *et al.*, 2012). Pour une meilleure compréhension des pertes embryonnaires et fœtales, un suivi de la gestation par une méthode non invasive serait nécessaire. Aujourd'hui, plusieurs méthodes ont déjà été testées. L'autopsie est une méthode qui permet de caractériser de manière fiable et exhaustive le développement des embryons, des fœtus et des annexes embryonnaires à un stade déterminé. Cependant cette méthode ne permet pas de connaître la taille de portée à la naissance puisque les animaux sont sacrifiés.

D'autres méthodes ont fait leurs preuves : l'endoscopie et l'échographie. L'endoscopie est intéressante pour la détermination du taux d'ovulation et taux d'implantation sans affecter la survie embryonnaire et sans sacrifice des lapines (Theau-Clément et Bolet, 1987). Elle a également permis d'étudier la relation entre le nombre de fœtus, la taille de portée et le poids des lapereaux à la naissance (Bolet *et al.*, 1990). Cependant, la technique est chirurgicale et nécessite une anesthésie des lapines. L'échographie a été utilisée dans un premier temps pour un diagnostic précoce de gestation (Tainturier *et al.*, 1986 ; Ypsilantis et Saratsis, 1999), ensuite pour caractériser le développement embryonnaire et fœtal (Caron *et al.*, 2012 ; Chavatte-Palmer *et al.*, 2005 ; Layssol-Lamour *et al.*, 2009). Cette méthode est fiable pour les mesures sur de petits nombres de fœtus, elle l'est moins lorsqu'il s'agit de dénombrer précisément un grand nombre de fœtus (≥6 ; Chavatte-Palmer *et al.*, 2005) ou de différencier

leur présence dans les cornes utérines droite ou gauche (Layssol-Lamour *et al.*, 2009). De plus, l'échographie nécessite de tondre les animaux et de réaliser une contention dorsale contraignante pour ces derniers.

Figure 1. Mortalité embryonnaire au cours de la gestation chez la lapine (Laborda-Vidal 2011 et Llobat-Bordes 2012)



L'objectif de cette étude est de proposer une alternative non invasive (tomodensitométrie à rayons X, scanner) à ces méthodes pour compter les fœtus à 15 jours de gestation et comparer ce nombre à l'observation directe des ampoules fœtales après autopsie de ces mêmes lapines.

1. Matériel et méthodes

1.1. Animaux et technique d'insémination.

Quarante lapines multipares allaitantes de souche Hyla sont inséminées 11 jours après la mise-bas. Cinquante-quatre heures avant l'insémination, une injection sous cutanée de 25 UI de PMSG est réalisée. Au moment de l'insémination, une injection de 0,2ml de Réceptal est réalisée pour provoquer l'ovulation.

1.2. Mode d'alimentation et lumière

Les femelles sont alimentées à v olonté avec le même aliment (2500 kcal ED, 17,5 PB).

Une stimulation lumineuse est appliquée avec un passage de 12 à 16h d'éclairement quotidien, 7 jours avant, jusqu'à 7 jours après l'insémination. Le retour progressif à 16h se fait sur 2 jours à raison de 2h/jour.

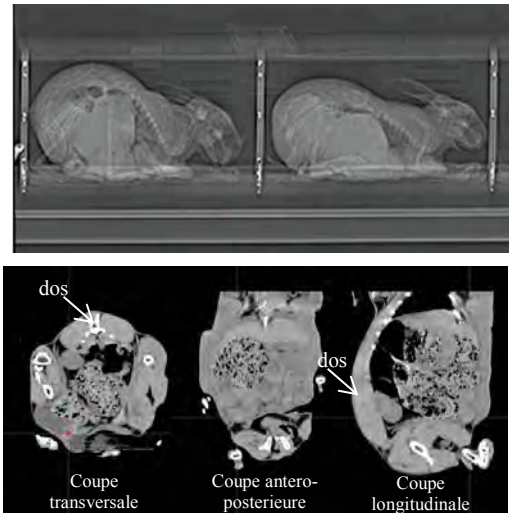
1.3. Observations au scanner

A 14 j ours de gestation, les lapines sont pesées et palpées pour réaliser un premier diagnostic de gestation.

Ces 40 lapines de poids homogènes et ayant un diagnostic de gestation positif sont passées au scanner le lendemain, 15 jours après l'insémination (S.A.R.L. IMAGE ET). Les rayons X envoyés par le scanner traversent les organes et sont plus moins arrêtés en fonction de la densité de ces derniers. Cela permet d'obtenir une image en 3 dimensions après traitement informatique.

Pour le passage au scanner les lapines sont placées dans une boîte en bois opaque (obscurité rassurante) contenant quatre cellules individuelles permettant le passage simultané de quatre animaux. Chaque cellule est un espace confiné qui limite au maximum leurs mouvements. En effet, les animaux doivent être immobiles pendant le passage au scanner. Les lapines étant placées les unes derrière les autres, un topogramme (radiographie de repérage permettant de réaliser les 4 champs d'acquisition) est réalisé en première étape (Figure 2). Dans un second temps, 4 séries spiralées (= 1 série de prises d'images pour chaque femelle) en haute résolution sont réalisées pour obtenir les images en coupe fine de chaque animal. La construction des images en direct est réalisée, permettant de vérifier l'immobilité des animaux pendant la procédure. Un passage pour 4 femelles dure en moyenne 15 minutes. Enfin, l'analyse des images a été faite en double lecture par 2 imageurs pour confronter les opinions.

Figure 2. Radiographie des lapines par rayon X, vue générale (a), et coupes (b)



(a)

(b)

1.4. Sacrifice et autopsie des animaux

Pour étudier la précision de l'observation au scanner, les 40 femelles sont ensuite transportées au laboratoire DELTAVIT pour autopsie et diagnostic de gestation afin de dénombrer et évaluer la viabilité des fœtus. Différentes mesures ont été réalisées : nombre de corps jaunes permettant de déterminer le nombre d'ovules pondus, nombre de vésicules embryonnaires correspondant aux nombres d'embryons implantés et nombre de fœtus viables et non viables (Figure 3).

Figure 3. Illustrations des observations réalisées à l'autopsie : ovaire pour comptage des corps jaunes (a), utérus gestants isolés permettant de

distinguer et compter les ampoules fœtales (b), fœtus viable à 1 5j de gestation (c) et ampoule hémorragique et fœtus non viable à 15j de gestation (d).

(a)

(b)

(c)

(d)

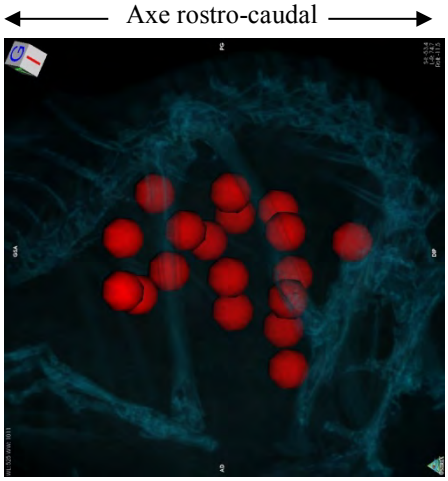
1.5. Analyse statistique.

Un test non paramétrique de Kruskall-Wallis a permis de comparer les dénombrements effectués au scanner et après autopsie des lapines. Le seuil de signification est de 5%.

2. Résultats et discussion

L'analyse d'image permet de visualiser en 3 dimensions et de compter précisément le nombre d'ampoules fœtales formées à 15 jours de gestation. (Figure 4).

Figure 4. Vue en 3 dimensions des ampoules fœtales reconstituées par analyse d'image.



La double lecture pour l'analyse des images a mis en évidence une seule divergence pour une ampoule (soit un total de 577 *vs* 578 ampoules fœtales en fonction de l'imageur).

Lors des autopsies 576 a mpoules fœtales sont dénombrées soit 1 voire 2 ampoules de moins que lors de l'analyses des images (soit 0,2%). Ces erreurs de lecture peuvent s'expliquer par une confusion entre une ampoule fœtale et un artefact digestif. De plus, le scanner ne permet pas de différencier les ampoules contenant un fœtus viable, des ampoules vides ou avec un fœtus non viable. Seules 10 ampoules ont été considérées comme suspectes au scanner alors qu'après ouverture des ampoules au laboratoire, 39 ampoules ont été observées soit vides soit avec un fœtus non viable (Tableau 1).

L'observation des données moyennes par lapine corrobore l'analyse globale, à savoir que le scanner permet de détecter précisément le nombre d'ampoules fœtales mais ne détecte pas les ampoules vides ou fœtus non viables (Tableau 2).

Tableau 1. Comparaison du dénombrement des ampoules fœtales par scanner ou après autopsie.

	Ampoules fœtales	Dont Ampoules suspectes	Dont Ampoules vides et fœtus non viables
Scanner	577	10	
Autopsie	576		39
p	*0,998*		

Tableau 2. Comparaison du nombre moyen d'embryons implantés (ampoules fœtales) et de fœtus non viables à 15 jours de gestation observés par scanner ou autopsie.

	Ampoules fœtales		Ampoules suspectes		Ampoules vides et fœtus non viables	
	moyenne	*et*	*moyenne*	*et*	*moyenne*	*et*
Scanner	14,43	*2,159*	0,25	*0,630*		
Autopsie	14,40	*2,318*			0,975	*1,343*
p	*0,989*					

L'analyse individuelle permet de déterminer que 82,5% des comptages d'ampoules au contenu anormal sont exacts et 17,5% présentent une erreur de 1 à 3 ampoules par lapine (Tableau 3). 7 lapines présentaient des ampoules suspectes au scanner, celles-ci présentant toutes des ampoules vides ou fœtus non viables à l'autopsie.

Tableau 3. Précision individuelle du comptage d'ampoule.

Différence Ampoules Scanner-Ampoules Autopsie	-1	0	1	3
Nb lapines	4	33	2	1
% lapines	10	82,5	5	2,5

En comparaison avec l'échographie, le scanner est moins contraignant pour la contention des animaux (Chavatte-Palmer *et al.*, 2005), plus rapide (15 minutes pour 4 lapines *versus* 10 minutes par lapine ; Caron *et al.*, 2012) et plus précis pour le dénombrement des ampoules fœtales (Chavatte-Palmer *et al.*, 2005). Cependant, l'échographie apporte de nombreuses informations quant au développement du fœtus et de ses organes (Caron *et al.*, 2012 ; Chavatte-Palmer *et al.*, 2005).
Le scanner ne permet pas de compter le nombre de corps jaunes (taux d'ovulation), les ampoules vides, et de distinguer les fœtus viables des non viables à 15j de gestation (mortalité fœtale précoce). Seule l'autopsie et l'endoscopie des animaux permettent d'avoir accès à ces composantes de la taille de portée.

Conclusion

Cette méthode non invasive est précise pour déterminer le nombre d'ampoules fœtales développées à 15 jours de gestation. Il est ainsi possible de déterminer la viabilité fœtale après implantation par comparaison avec les lapereaux nés totaux, ce qu'interdit la technique par autopsie. Cependant, cette technique d'imagerie n'autorise ni le comptage des corps jaunes, ni la qualification du contenu des ampoules fœtales : elle ne permet donc pas de déterminer le taux d'ovulation et la viabilité embryonnaire précoce contrairement à l'autopsie ou l'endoscopie. Scanner, endoscopie et autopsie sont donc complémentaires dans l'étude des composantes de la prolificité : autopsie et endoscopie pour le nombre d'ovules pondus et l'évaluation des pertes embryonnaires de la fécondation à 15 jours de gestation, le scanner pour déterminer le nombre d'embryons implantés et la viabilité fœtale après implantation. Le choix de la méthode est à mettre en relation avec l'axe de recherche souhaité. Actuellement, la technique d'imagerie médicale reste coûteuse mais son intérêt principal réside dans la préservation des animaux. Le scanner aura donc une place dans les études interdisciplinaires (génétique, reproduction, nutrition, pathologie, thérapeutique…) sur les composantes de la prolificité.

Remerciements

Nous remercions C. Tavernier et Y. Richaudeau d'IMAGE ET pour leurs conseils et leur expertise. Nous remercions également l'équipe du laboratoire DELTAVIT pour la réalisation des autopsies et l'équipe de l'élevage EUROLAP de Belleville[s]/Vie pour son implication dans le suivi des femelles.

Références

BOLET G., ESPARBIE J., FALIERES J., 1990. Relations entre le nombre de fœtus par corneutérine, la taille de portée à la naissanceet la croissance pondérale des lapereaux. *Annales Zootechnie*, 45, 185-200.

CARON M., BENCHARIF D., BRIAND L., TAINTURIER D., 2012.Diagnostic et suivi de la gestation chez la lapine par échographie avec une sonde de 12.5 MHz. *Revue Méd. Vét.*, 163, 6, 309-315.

CHAVATTE-PALMERC., LAIGREP.,SIMONOFF E., CHESNE P., CHALLAH M., RENARD J.P., 2005. Caractérisation de la croissance fœtale *in utero* par échographie chez la lapine. In : *11èmes Journées de la recherche cunicole*, Paris.

LABORDA-VIDAL P., 2011. Selection for ovulation rate in rabbits.*Tesisdoctoral.*UniversidadPolitécnica de Valencia.

LLOBAT-BORDES D., 2012. Estudio de los factoresmaterno-embrionarios que determinan la fertilidad y prolificidad en unalinea de conejoseleccionadaporvelocidad de crecimiento. *Tesisdoctoral.*UniversidadPolitécnica de Valencia.

LAYSSOL-LAMOURC., HURTAUD J.,SALEIL G., LAPERRUQUE F., TIRCAZES A., RUESCHE J., BOLET G., 2009. Suivi par échographie et sacrifice à J28 du développement embryonnaire et fœtal dans deux lignées de lapins sélectionnées sur l'homogénéité du poids des lapereaux à la naissance. In : *13èmes Journées de la recherche cunicole*, Le Mans.

TAINTURIER D.,FIENI F., ESCOUFLAIRE P., 1986. Diagnostic de la gestation chez la lapine par échotomographie. *Revue Méd.Vét*, 137, 3, 163-167.

THEAU-CLEMENTM., BOLET G., 1987.Mesure du taux d'ovulation par coelioscopie chez la lapine. *Reprod.Nutr.Develop.*, 27, 701-705.

YPSILANTIS P., SARATSIS P., 1999. Early pregnancy diagnosis in the rabbit by real time ultrasonography.*World Rabbit Science*, 7, 2, 95-99.