



42^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 17 mars 2016

Odeurs sexuelles chez les équidés : l'avis de l'étalon

D. Guillaume¹, C. Moussu¹, L. Le Neün¹, D. Chesneau¹, F. Reigner², Y. Gaudé², F. Cuir³, F. De Geoffroy³, S. Lavenant⁴, C. Briant⁴, M. Keller¹.

¹ Neuroendocrinologie des interactions et comportements sexuels, Physiologie de la Reproduction et des Comportements : INRA, CNRS, Université de Tours, IFCE 37380 Nouzilly.

² UEPAO, INRA, 37380 Nouzilly.

³ Ecole Supérieure du Cheval et de l'Équitation, site du Pin, IFCE

⁴ Site d'Amboise IFCE

daniel.guillaume@tours.inra.fr

Résumé

Les étalons montrent une diminution de la libido en hiver. Notre objectif est d'essayer de stimuler cette libido par des odeurs spécifiques. Quatre types d'urines (recueillies sur des juments en œstrus ou en anœstrus, des étalons et des hongres) ou des odeurs de molécules odorantes de synthèse (préalablement publiées comme stimulantes) ont été présentées à différents étalons pendant l'hiver, lors de 3 types de tests. Pendant le test dit de « présentation », la durée du comportement de flehmen est plus importante après la présentation des 4 types d'urines qu'après la présentation d'eau ou d'odeurs chimiques. Pour le test de choix, la seule différence a été observée entre l'urine de jument en œstrus et l'eau. Pendant le test de monte, la latence de l'éjaculation a été réduite par l'application dans la narine de l'étalon d'urine de jument en œstrus *vs* l'urine de jument en anœstrus ou de l'eau.

Mots clés : Chevaux, flehmens, comportement sexuel, odeurs, phéromones

Summary

Stallions show a decreased libido in winter. Our aims are to try to stimulate this libido by specific odours. Urines, collected from Welsh Pony mares, stallions and geldings, or artificial odours (previously published), were presented to stallions or geldings in different sniffing tests during winter. During the presenting test, 9 different odours were presented to the 12 stallions. The duration of the flehmens behaviour is longer after the presentation of odours coming from stallion, gelding, anœstrus mare and œstrus mare urines than after water or chemical odours. During the choice test, on the stallions' behaviours, we can separate only water from œstrus urine. During the mating test, the latency to ejaculation on a phantom was significantly reduced by spreading, in the nostril of the stallion, urine from œstrus mare *in comparison to* urine from anœstrus mare or water.

Keys words: Horses, flehmens, sexual behavior, odors, pheromones.



1 Introduction

1.1 Le saisonnement de la reproduction chez les équins

L'effet de la saison sur la reproduction des juments est drastique, la majorité d'entre elles arrête d'ovuler de novembre à mai (dans l'hémisphère Nord) (Salazard-Ortiz *et al.* 2011), mais chez les étalons cet effet n'est pas aussi important. Pickett *et al.* (1976) ont observé chez les étalons Quarter Horse, que le volume de l'éjaculat, le nombre de spermatozoïdes et le pourcentage de gel diminuent significativement en hiver. Mais l'effet majeur de la saison est une importante diminution de la libido en hiver. La libido de l'étalon est estimée par le délai (en secondes) entre la présentation de la jument à l'étalon et la saillie et/ou le nombre de sauts par éjaculation. La libido de l'étalon semble être améliorée par une photostimulation (Thompson *et al.* 1977). Cette observation sur la saisonnalité de la libido des étalons a été confirmée dans nos installations expérimentales sur des chevaux de selle et poneys par Magistrini *et al.* (1987). Pour les juments, la saisonnalité de la reproduction est renforcée par le facteur nutritionnel (Salazard-Ortiz *et al.* 2011). Cet aspect métabolique est probablement aussi important pour la saisonnalité de la libido de l'étalon. Or, dans des conditions de terrain, les étalons de sport sont plus disponibles pour la collecte des spermatozoïdes en hiver avant les compétitions. En outre, la congélabilité des spermatozoïdes semble être plus facile en hiver qu'en été. Cela est probablement dû aux faibles quantités de gel dans le sperme en hiver (Pickett *et al.* 1976; Magistrini *et al.* 1987). Mais en hiver, lors de la collecte de spermatozoïdes pour l'insémination artificielle (AI) la libido des étalons peut être insuffisante, ce qui entraîne un temps d'attente important pour obtenir l'éjaculation, en particulier pour les jeunes chevaux ou les chevaux fatigués ou stressés. Dans ce cas, le seul traitement préconisé est l'injection de GnRH, qui induit temporairement une augmentation de testostérone (voir Stout 2005). En pratique, certains éleveurs utilisent de l'urine de jument en chaleurs, collectée lors de l'été précédent puis conservée congelée. Ils badigeonnent cette urine sur le mannequin de récolte. Néanmoins, cette méthode reste empirique et n'a pas été scientifiquement testée ou validée.

1.2 Le flehmen chez les chevaux

Le flehmen existe chez toutes les espèces d'ongulés étudiées (Vyas *et al.* 2012). Ce comportement consiste à lever la tête, le nez vers le ciel et à retrousser la lèvre supérieure. Cette expression faciale est suivie par la production de 1 à 3 ml de sécrétions nasales. Ces sécrétions nasales proviennent d'après Lindsay *et al.* (1983) probablement de la *lamina-propria* du conduit de l'organe voméronasal. Chez les chevaux, les deux sexes présentent ce comportement, mais il est très rare chez les juments et fréquent chez les étalons. En effet, le flehmen est un comportement faisant partie du répertoire du mâle lors de la saillie. Il est réalisé de façon quasi systématique après flairage de la zone urogénitale de la jument, avant une éventuelle saillie. Il apparaît chez les poulains mâles et femelles, au début de la vie vers 1 à 4 semaines (Crowell-Davis & Houpt 1985). Chez les juments adultes, les comportements mâles comme les chevauchements et les flehmens peuvent être observés et sont associés à un niveau élevé de testostérone plasmatique (Gastal *et al.* 2007). Ce comportement anormal est probablement pathologique. Par ailleurs, les progestatifs tels que l'altrénogest (Regumate®) suppriment ce comportement chez le jeune étalon et le diminuent chez les étalons âgés. Ces traitements sont utilisés (particulièrement aux USA) dans les courses de chevaux ou au début du dressage du jeune cheval pour réprimer les comportements indésirables (Stout 2005). Le flehmen est classiquement interprété comme destiné à améliorer l'accession des molécules odorantes vers l'organe voméronasal. Chez les rongeurs, le système olfactif principal et l'organe voméronasal interagissent dans le contrôle du comportement sexuel (Keller *et al.* 2009), mais ceci n'est pas établi chez les chevaux. Chez les étalons, en présence de juments, le taux de flehmen semble varier avec les cycles œstraux des juments (Stahlbaum et Houpt 1989). Cependant, à proximité de la jument, pour déterminer si elle est en œstrus ou non, l'étalon privilégie le comportement d'acceptation de la jument à son odeur (Briant *et al.* 2013).

1.3 Les objectifs expérimentaux

Notre objectif est de stimuler la libido de l'étalon, à contre saison, en hiver, en utilisant des odeurs provenant de la jument ou éventuellement de molécules odorantes de synthèse. Ce concept a déjà été démontré chez d'autres espèces. Par exemple : chez les bovins des molécules odorantes caractéristiques de l'œstrus de la vache permettent de stimuler la libido des taureaux d'insémination artificielle (IA) (Le Danvic *et al.* 2015).

La libido chez les mâles est classiquement estimée par la latence de l'éjaculation sur un mannequin de récolte, ce qui constitue un test relativement lourd à mettre en place. Nous avons donc choisi de faire une première sélection des substrats susceptibles de stimuler la libido, à partir de l'expression du comportement de flehmen. Nous avons choisi d'utiliser l'urine plutôt que les crottins, car l'urine est relativement plus facile à analyser. Les expériences ont été réalisées pendant les jours courts hivernaux, car c'est à cette période qu'il peut y avoir besoin de stimuler les étalons, leur libido étant diminuée.



L'objectif de la première expérience était de tester les odeurs, une par une, sur le comportement de flehmen des étalons et des hongres. L'objectif de la deuxième expérience était de déterminer si, au cours d'un test de choix, les étalons pouvaient exprimer une préférence entre 2 odeurs, qui n'avaient pas été discriminées sur la durée des flehmens lors de la première expérience. L'objectif de la troisième expérience était de démontrer que, au cours d'une collecte de semence pour l'IA, la latence de l'éjaculation pouvait être diminuée avec l'utilisation de l'urine de jument.

2 Matériels et méthodes

2.1 animaux et conditions expérimentales

Les expériences ont été menées :

- sur les étalons poneys Welsh du troupeau expérimental de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Nouzilly (INRA, latitude 47,54 ° N) en conformité avec les exigences nationales en matière d'éthique en expérimentation animale,
- sur des étalons de l'Ecole supérieure du cheval et de l'équitation de l'Institut Français du Cheval et de l'Equitation (IFCE) – site du Pin, (latitude 48,75 ° N),
- sur des hongres de l'IFCE du site d'Amboise (latitude 47,41 ° N).

Ces tests sont non-invasifs (au plus un échantillon de sang a été prélevé). Il n'a donc pas été fait de demande aux comités d'éthique en expérimentation animales de la Normandie et du Centre.

A Nouzilly, les 6 étalons poneys Welsh étaient âgés de $5,85 \pm 0,54$ ans. Au Pin, 13 étalons (12 chevaux de selle et 1 poney Pottok) étaient âgés de $15,7 \pm 1,34$ ans. A Amboise, l'âge des 10 hongres Anglo-arabes était de $5,85 \pm 0,54$ ans et l'âge à la castration était de $1,7 \pm 0,2$ ans (de 1 an à 3 ans).

Les substrats odorants étaient soit des urines (urines de juments en anœstrus, en œstrus, d'étalons, de hongres), soit des odeurs artificielles (mélanges d'acides gras et les 3 crésols), soit un contrôle négatif constitué par l'eau habituellement bue par les chevaux.

Les urines de juments ont été recueillies sur des juments poney du troupeau de l'INRA, soit à l'aide d'une sonde urinaire (diamètre 8 mm, longueur 40cm, Vygon®) insérée dans l'urètre, soit lors de miction naturelle. L'urine a ensuite été rapidement répartie dans des flacons de verre puis congelée sur de la glace carbonique et conservée à -20°C. Les urines de juments en œstrus ont été recueillies en été, lorsque les juments étaient en période d'activité ovarienne, le moment de la collecte étant défini sur la base d'échographies ovariennes quotidiennes. Les urines de juments en anœstrus ont été recueillies en décembre, lorsque ces juments étaient en période d'inactivité ovarienne hivernale. Les urines de mâles ont été recueillies en été et en hiver sur les étalons poneys Welsh. Les urines de hongres ont été recueillies en été sur des poneys Welsh. Les urines d'étalons et de hongres ont été obtenues lors de mictions naturelles. Lors des collectes d'urines des prises de sang ont été effectuées pour doser LH et testostérone. De plus, 4 composés artificiels ont été testés :

- un mélange de 5 acides gras, qui semble être caractéristique de l'œstrus de femelles et qui induit l'érection chez des rats mâles Brown Norway (Nielsen *et al.* 2011). Ces acides gras ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich (Saint Ouen Fallavier, France). La densité de ces acides étant proche de 1, la concentration des solutions utilisées était de : 100 µl, 33 µl, 120 µl, 11 µl et 16 µl pour 1 L d'eau pure (eau Milli Q® obtenue avec un système Millipore) pour respectivement l'acide propanoïque, l'acide 2-méthylpropanoïque, l'acide butanoïque, l'acide 3-méthylbutanoïque et l'acide Pentanoïque.
- le p-crésol qui semble aussi plus présent dans l'urine de jument en œstrus que dans l'urine de diœstrus (Mozuraitis *et al.* 2012) et qui semble induire l'érection chez les étalons (Buda *et al.* 2012).
- les isomères o et m-crésol (à la même concentration).

Ces crésols, obtenus également auprès de Sigma, sont préparés comme le mélange d'acides gras à 130 µg/ml.

Pour les expériences 1 et 2, les odeurs ont été présentées sous une grille en inox. Après chauffage à environ 35° C, 5 ml de liquide odorant ont été répartis sur une gaze chirurgicale, posée dans une boîte de Pétri, elle-même posée sous la grille de présentation (un carré de 18 x 18 cm avec 16 trous / cm², chaque trou ayant un diamètre de 1,5 mm).

Pour l'expérience 3, 5 ml de liquide odorant ont été directement badigeonnés dans les narines des étalons à l'aide d'une gaze.

Des prélèvements de sang ont été réalisés à la veine jugulaire, à la fin de chaque test. La collecte de sang a été limitée à un échantillon à la fin de l'expérience de manière à ne pas influencer le comportement des chevaux.



2.1.1 Expérience 1 : tests de présentation individuelle des odeurs : effet sur le comportement des flehmen

Les tests de présentation ont été effectués pour les étalons au Pin, en janvier et pour les hongres à Amboise début avril. Dans les 2 écuries, les chevaux étaient détenus dans des grands boxes d'environ 4x5 m avec du foin *ad libitum*. Ils avaient reçu leur repas de concentré environ 1 heure avant le début de l'épreuve.

Au Pin, les 9 odeurs ainsi que le contrôle négatif ont été présentés avec la boîte à odeurs à chacun des 13 étalons dans un ordre aléatoire (schéma en carré latin). Pour les 10 hongres à Amboise seuls les 4 types d'urines et le contrôle négatif ont été utilisés dans un schéma expérimental semblable.

2.1.2 Expérience 2 : tests de choix entre 2 odeurs : effet sur le comportement de flehmen

Les tests de choix ont été réalisés à l'INRA de Nouzilly sur 6 étalons Welsh. Chaque étalon poney a été conduit dans une salle complètement fermée de 32,5m², située dans un bâtiment à environ 300 m de son écurie. Cette salle est symétrique et présente 2 portes sur 2 murs opposés. Les boîtes de présentation des odeurs ont été fixées au sol à la base de deux murs de façon symétrique. Deux cercles rouges d'un diamètre de 1 et 2m, centrés sur les boîtes à odeurs ont été dessinés sur le sol. Quelques semaines avant le test, les étalons avaient subi une phase d'habituation à ce bâtiment, lors de laquelle ils avaient mangé des granulés à côté des boîtes à odeurs. Pour chaque test, une odeur était mise dans chacune des 2 boîtes, juste avant l'entrée de l'étalon. Celui-ci était ensuite lâché vers le centre de la pièce par l'animalier qui sortait par la porte opposée. Pendant le test, les étalons ont été filmés et observés avec une caméra filmant sur 360° d'angle, ayant une émission Wi-Fi et fixée à 2,3 m de haut. La durée de l'essai était de 15 min. Six couples d'odeurs ont été testés pour cette expérience (5 couples dont les 2 odeurs ne semblaient pas être différenciées par le comportement de flehmen dans les tests de présentation de l'expérience effectuée au Pin et un couple d'odeurs contrôle pour lequel nous pouvions espérer que l'étalon exprimerait sa préférence pour l'une d'entre elles. Ces 6 couples d'odeurs étaient: 1) urine de jument en œstrus / urine de jument en anœstrus, 2) urine de jument en œstrus / urine d'étalon, 3) urine d'étalon / urine de hongre, 4) mélange d'acides gras / eau 5) p-crésol / o-crésol et 6) couple contrôle : urine jument en œstrus / eau. Dans le but d'éviter un effet d'apprentissage pour un même étalon, l'odeur qui, dans le couple, semblait être *a priori* la plus attractive a été placée la première fois à droite, puis à gauche et ainsi de suite.

2.1.3 Expérience 3 : effet des odeurs sur la latence de l'éjaculation.

Cette expérience a été effectuée à Nouzilly sur 6 étalons poneys Welsh. Chaque étalon étant dans son box, 5 ml de liquide odorant ont été badigeonnés directement dans ses narines à l'aide d'une gaze. L'étalon a été maintenu dans son box pendant 3 mn puis conduit dans le hangar de monte, situé à une distance de quelques mètres de son box. L'étalon était ensuite récolté sans présence de jument comme il a été précédemment décrit (Haras nationaux 2015). Le test se terminait soit au moment de l'éjaculation, soit au bout d'un temps limite de 10 min. Pendant toute la durée du test les étalons ont été filmés. Au cours de cette expérience, 3 odeurs ont été testées, à 3 dates différentes, selon un schéma expérimental en carré latin (dans lequel chaque étalon renifle chaque odeur). Ces odeurs étaient : urines de jument en œstrus ou en anœstrus et eau.

Sur le sang collecté, la testostérone et la LH ont été dosées par des « Radio-Immuno-Assays » directs développés dans notre laboratoire. Pour la testostérone, la limite de quantification est de 0,125 ng / ml. La variabilité de ce dosage pour une référence à 0,5 ng / ml était de 4%. Le dosage de la LH a été précédemment décrit (Guillaume *et al.*, 2002). La variabilité de cet essai, pour une référence à 1,7 ng / ml, était de 17%.

2.2 Analyse des données

Pour l'analyse des films, deux expérimentateurs ont visionné les enregistrements sans avoir connaissance des odeurs présentées aux chevaux. Ils ont travaillé, de façon autonome avec deux méthodes différentes. Un expérimentateur utilise un chronomètre manuel et note l'action de l'étalon et sa durée. L'autre expérimentateur utilise une application spécifique sur le logiciel Excel. Cette application permet de noter le moment où l'étalon (ou le hongre) change de comportement. Une base de données des actions successives de l'étalon est ainsi créée. Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC 27513, USA). La corrélation entre les résultats obtenus par les deux expérimentateurs a été estimée. Le nombre et la durée de chaque comportement et les latences d'un comportement spécifique ont été testés après transformation logarithmique sur la moyenne des résultats obtenus par les deux expérimentateurs. Lorsque le comportement n'a pas été observé lors de l'essai, la latence a été mise arbitrairement au maximum de la durée du test (par exemple, dans le test de monte si un étalon poney n'a pas éjaculé sur le mannequin, la latence était de 10 min). Les logarithmes de la durée ou de la latence des comportements ont été comparés par analyse de variance en utilisant la procédure « general lineaire modele » (GLM). La procédure spécifique pour un carré latin a été adaptée à partir Dagnelie (1998). Le terme d'erreur pour l'effet du traitement est l'interaction traitement * étalon. Pour le test de choix, avant l'analyse principale, il a été vérifié que le temps



passé à gauche de la caméra par les étalons n'est pas significativement différent du temps passé à droite. Pour ce test, la réponse comportementale globale des étalons au couple des 2 odeurs prises ensemble (par exemple somme des durées de flehmen sur l'odeur d'œstrus et sur l'odeur de diœstrus) a été considérée avant l'analyse de chaque odeur du couple.

Les résultats sont présentés comme moyenne arithmétique \pm SEM.

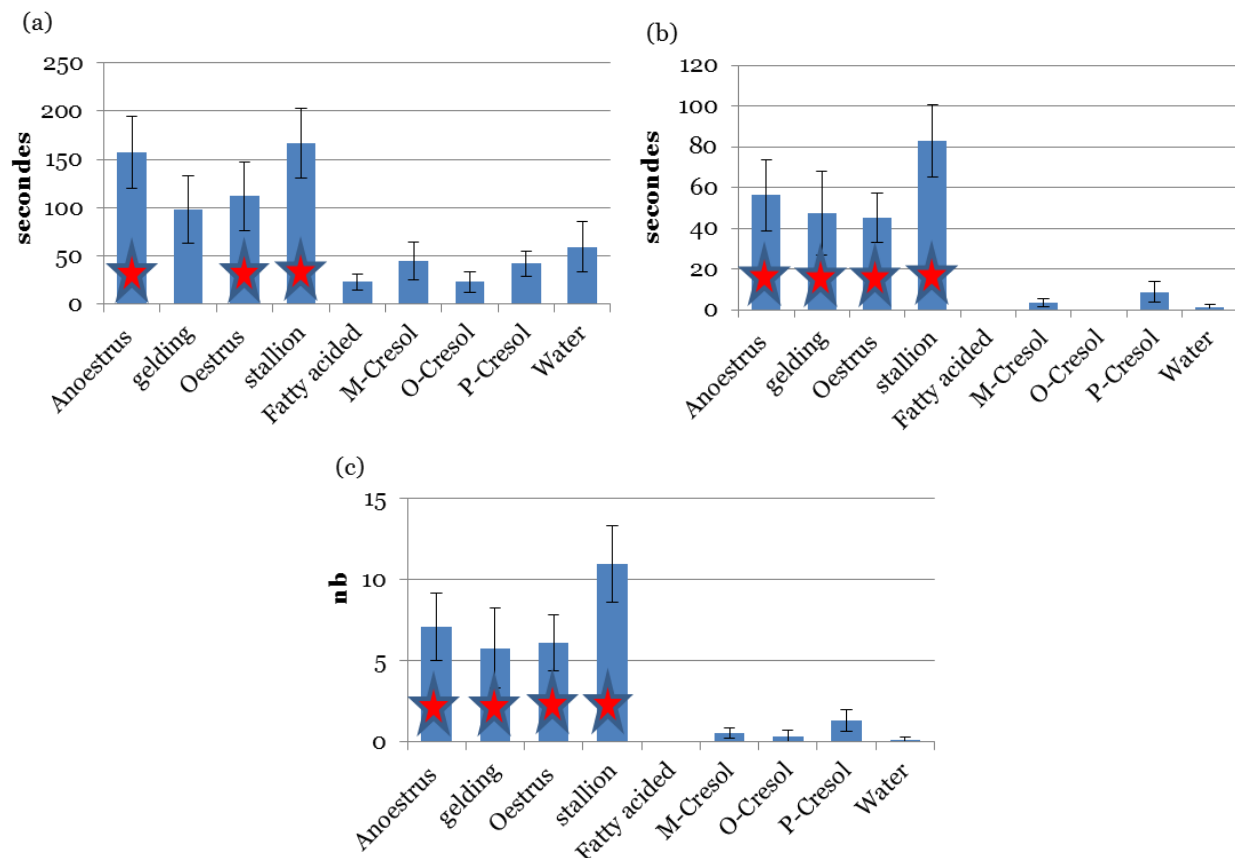
3 Résultats

3.1 Expérience 1 : présentation individuelle des odeurs

Au Pin, un étalon poney n'a jamais été intéressé par les différentes odeurs et est resté, tout le temps, à la fenêtre de son boxe ; il a donc été écarté de l'analyse statistique. Pour les autres chevaux, les résultats obtenus sur l'analyse des films par les 2 expérimentateurs avec 2 méthodes différentes sont corrélés. Ainsi, pour la durée de reniflement, la durée de flehmen et le nombre de flehmens, les coefficients de corrélation sont respectivement $r = 0,84$ ($p < 0,0001$), $r = 0,97$ ($p < 0,0001$), $r = 0,97$ ($p < 0,0001$). Ainsi, l'ANOVA a été réalisée sur la moyenne des résultats des 2 expérimentateurs. Les résultats sont présentés sur la figure I. Les 4 urines sont discriminées de l'eau, mais pas discriminées entre elles par contre les solutions des molécules de synthèse ne sont pas discriminées de l'eau.

Figure I : (a) durée de reniflement, (b) durée des flehmens et (c) nombre de flehmens selon les odeurs présentées

Figure I: (a) sniffing duration, (b) flehmen duration and (c) flehmen number according to the presented odour



L'effet global du traitement est significatif $p < 0,0001$. Les étoiles indiquent que l'effet du traitement est significativement différent de l'effet de l'eau.

The global effect of the treatment is significant $p < 0,0001$. The stars indicated that the effect of the treatment was significantly different from water.

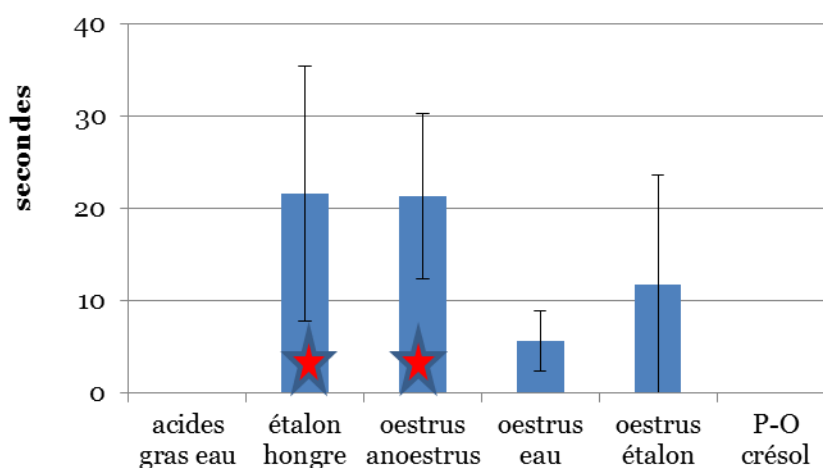


A Amboise, certains des 10 hongres ont également produit la séquence comportementale : reniflement-flehmen, mais en fréquence très faible comparativement aux étalons du Pin. En conséquence, la différence entre les traitements n'est pas significative pour les 2 principales variables observées (l'effet global des traitements sur la durée de reniflement et la durée de flehmens est respectivement, $p = 0,9$ et $p = 0,3$).

3.2 Expérience 2 : tests de choix entre 2 odeurs

Pour ce test, nous avons dans un premier temps, pour chaque choix, additionné les comportements observés avec chacune de 2 odeurs. Ainsi, la réponse comportementale globale des étalons en terme de durée de flehmen ressort significativement différente entre les couples d'urine de différents types et les couples de solutions artificielles. Les résultats pour la durée des flehmens sont présentés sur la figure II. Le seul couple d'odeurs qui ait été significativement différencié par les étalons lors du test de choix est le couple témoin jument en œstrus/eau ($5,66 \pm 3,25$ s vs 0 s pour respectivement la durée de flehmen sur l'urine de jument en œstrus et sur l'eau).

Figure II : durée des flehmens selon les odeurs présentées
 Figure II: flehmen duration according to the presented odour



Effet global du traitement $p=0,048$

Les étoiles indiquent que l'effet du traitement est significativement différent de l'effet du couple acides gras-eau.

Global effect of the treatment $p=0,048$

The stars indicated that the effect of the treatment was significantly different from the couple fatty acids -water

3.3 Expérience 3 : test de monte

Lorsque l'urine est badigeonnée à l'intérieur de la première narine, l'étalon fait immédiatement un flehmen. Lors de ce flehmen, la narine est complètement fermée entre la lèvre supérieure et la partie supérieure de la narine. Ce qui rend difficile l'application du substrat dans la seconde narine. Les données recueillies au cours de l'analyse du film par les deux expérimentateurs sont fortement corrélées (le minimum de corrélation a été obtenu sur la durée des flehmens dans le hangar de monte : $r = 0,62$ avec $p = 0,006$).

Les principaux paramètres mesurés et leur signification statistique sont présentés dans le tableau 1. L'urine fournie par des juments en anœstrus ou par des juments en œstrus induit une plus longue durée de flehmen que l'eau, mais seule l'urine de juments en œstrus induit l'érection chez les 3 étalons les plus âgés dans leurs boxes et une diminution de la latence de l'érection, de la monte sur le mannequin et de l'éjaculation.

Tableau 1 : Nombre, durée et latence des comportements des 6 étalons poneys Welsh lors du test de monte.
Table 1: Number, duration and latency of Welsh pony stallions' behaviors during mating test.

		Nombre ou temps en secondes \pm SEM			Effet global du traitement
		urine d'Œstrus	urine d'Anœstrus	eau	
dans le box de l'étalon	latence des flehmens	3,2 \pm 1 ^a	2,0 \pm 0,8 ^a	78,8 \pm 35 ^b	p=0,008
	nb de flehmens	10,6 \pm 1,8 ^a	9,2 \pm ^a	1,75 \pm 0,9 ^b	p<0,0001
	durée des flehmens	74,75 \pm 16,5 ^a	50,7 \pm 8,7 ^a	4,2 \pm 2,25 ^b	p<0,0001
	latence des érections	104,0 \pm 26,15 ^a	180 \pm 0 ^b	180 \pm 0 ^b	p=0,013
	durée des érections	47,8 \pm 22,8 ^a	0 \pm 0 ^b	0 \pm 0 ^b	p=0,032
dans le hangar de monte	nb des flehmens	8,25 \pm 4,5 ^a	5 \pm 0,7 ^{ab}	1 \pm 0,7 ^b	p=0,043
	durée des flehmens	23,8 \pm 13 ^a	26,6 \pm 6,9 ^a	3,3 \pm 2,1 ^b	p=0,022
	latence des érections	179,1 \pm 92,3 ^a	460,0 \pm 89,9 ^b	424,9 \pm 89 ^b	p=0,026
	nb d'étalons/6 montant sur le mannequin	5	2	2	
	latence de saut sur le mannequin	239,25 \pm 113,9 ^a	472,4 \pm 82,7 ^b	461,2 \pm 89,75 ^b	p=0,019
	nb d'étalons/6 présentant une éjaculation en 10 min	4	2	2	
	latence de l'éjaculation	269,7 \pm 109,9 ^a	471,3 \pm 82,2 ^b	496,4 \pm 68,9 ^b	p=0,018

Sur la même ligne, des exposants différents indiquent que les effets du traitement sont différents au seuil de 5%. La latence de saut sur le mannequin et la latence d'éjaculation sont arbitrairement portées à 10 min pour les étalons n'ayant pas eu ces comportements.

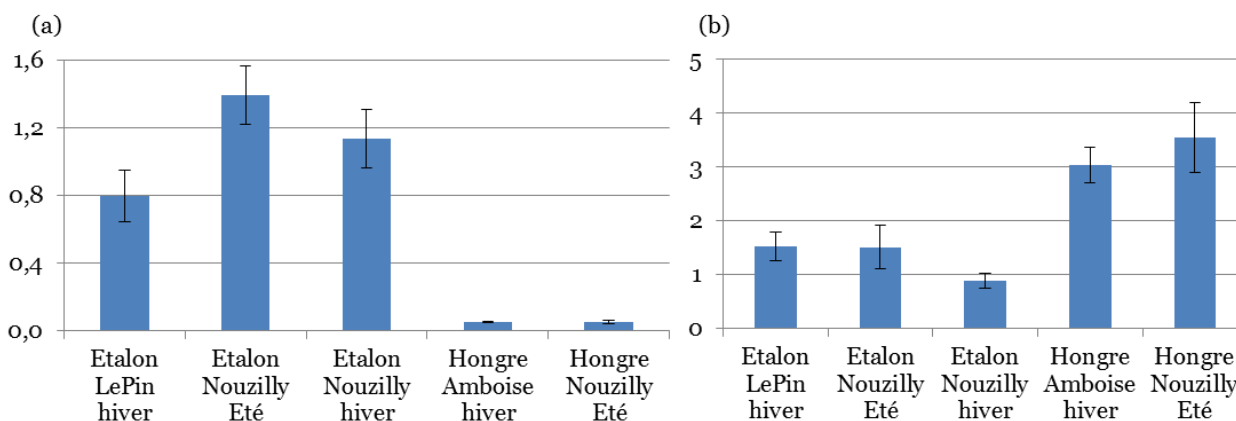
On a same line, different upper script letters indicate that the effects of treatment are different at 5%. The latency of matting and the latency of ejaculation are arbitrary put at 10 min for the stallions which had not done these behaviors.

3.4 Bilan hormonal

Les moyennes arithmétiques des taux de testostérone et de LH sont présentés sur la figure III : Chez les hongres du haras d'Amboise ou de l'INRA, les taux de testostérone sont indétectables et les taux de LH extrêmement élevés. A l'inverse, chez les étalons les taux de testostérone sont importants, supérieurs à 0,5 ng/ml dans presque tous les cas et les taux de LH sont notablement plus faibles que chez les hongres. Sur les étalons poney de Nouzilly, les taux de LH et testostérone sont plus élevés en été qu'en hiver.

Figure III : (a) Testostérone plasmatique des étalons et des hongres, (b) eLH plasmatique des étalons et des hongres

Figure III: (a) Plasma testosterone for stallions and geldings, (b) Plasma eLH for stallions and geldings





4 Discussion

Le flehmen joue incontestablement un rôle dans la reconnaissance de l'odeur d'un animal de la même espèce (étalon, hongre ou jument), par l'étalon. Le flehmen semble donc être un prérequis à la stimulation de la libido chez l'étalon par une odeur. Les hongres présentent ce comportement mais de façon beaucoup moins intense que les étalons. Ceci confirme le rôle de la testostérone, et plus généralement de l'état physiologique, dans le maintien de ce comportement spécifique tout au long de la vie. Il est à noter que l'étalon poney Pottock du Pin qui n'a jamais été intéressé par les différentes odeurs, présente des taux très bas de testostérone et de LH (0,34 ng/ml et 0,3 ng/ml respectivement). Ceci signe un effet saison important pour cet étalon et justifie son retrait pour le traitement statistique. Sur les 12 autres étalons du Pin, les durées et les nombres de flehmens et reniflements sont nettement supérieurs pour les différentes urines que pour les solutions de molécules artificielles ou l'eau. Ceci laisse supposer que ces solutions n'auront pas d'effet stimulant sur la libido des étalons et est en contradiction avec les résultats de Buda *et al.* (2012) obtenus avec le p-crésol rajouté à des substrats de jument en dioestrus. Par contre, il n'y a pas de différence entre les 4 types d'urines sur les comportements observés.

Lors du test de choix, les étalons ne manifestent pas de préférence entre les différents couples d'odeurs à l'exception du couple d'odeurs témoin : urine de jument en œstrus / eau. Lorsque les données obtenues globalement avec les 2 odeurs du couple sont additionnées, la durée des flehmens est plus longue avec les couples d'urines qu'avec le couple acides gras/eau. Cependant cette durée totale est inférieure à la durée de flehmen obtenue sur une seule odeur avec les étalons du Pin. Il semble que cela soit due à un stress d'isolement, mais la race et la conduite particulière du troupeau de poneys ne sont pas à exclure et ce malgré une phase d'habituation avant l'expérience. Néanmoins, les résultats sont en adéquation avec ceux du Pin.

Lors du test de monte, les durées des comportements de reniflement-flehmen sont similaires, que ce soit avec de l'urine de juments en œstrus ou en anœstrus et sont significativement plus longues qu'avec de l'eau. Les résultats des tests précédents sont donc confirmés : dans les conditions de nos expériences, le comportement de flehmen ne permet pas de différencier par sa durée, les différents types d'urines d'équidés. Par contre les latences à l'érection, au saut sur le mannequin et à l'éjaculation sont significativement diminuées après l'application de l'urine de jument en œstrus par rapport à l'urine de jument en anœstrus ou l'eau. Cela confirme la tendance observée par Briant *et al.* (2013) avec les crottins. Pour la latence de la monte sur le mannequin et de l'éjaculation, il est à prendre en considération que ce résultat est dû au fait que le nombre d'étalons ayant présenté le comportement en moins de 10 mn est supérieur après le traitement avec de l'urine de jument en œstrus. De plus, le temps mis à la récolte de l'étalon peut être globalement influencé par la pratique de la personne qui tient l'étalon et par celle qui manipule le vagin artificiel. Les interactions personnelles entre l'étalon et les personnes qui le manipulant peuvent également agir sur la latence à l'éjaculation. Ce résultat n'est probablement pas généralisable à toutes les races : par exemple les étalons des races de trait, moins réactives ou exprimant un effet saison marqué ont, peut-être, une libido plus difficile à stimuler que nos poneys Welsh. Cet effet ne semble utilisable que pendant l'hiver lorsque la libido de l'étalon est faible, en liaison avec la photopériode. Le conditionnement préalable de l'étalon, avec ou sans jument peut également influencer sa vitesse d'éjaculation sur le mannequin. Ce résultat préliminaire demande donc à être vérifié sur un grand nombre d'étalons.

Le flehmen est un comportement qui se maintient à l'âge adulte, quasiment uniquement chez l'étalon et qui semble permettre la reconnaissance des odeurs d'un individu de la même espèce, quel que soit son statut sexuel (Hothersall *et al.* 2010 ; Marinier *et al.* 1988). Par contre, sous réserve d'une validation de ces premiers résultats sur un grand nombre d'animaux, seules les odeurs de jument en œstrus stimulent la libido de l'étalon de manière à diminuer le temps mis à la récolte sur le mannequin.

Remerciements

Les auteurs tiennent particulièrement à remercier le personnel du laboratoire des dosages hormonaux de la PRC représenté par Mme AL Laine, pour le dosage de testostérone, l'équipe des animaliers de l'UEPAO pour les soins apportés aux poneys Welsh Nouzilly, à Mlle Julie Courbe pour les soins apportés aux étalons du Pin ainsi qu'à toute l'équipe du haras d'Amboise.

Références bibliographiques

Briant, C., Bouakkaz, A., Gaude, Y., Couty, I., Guillaume, D., Yvon, J.M., Maurin Y., Nielsen B., Rampin O., Magistrini M. 2013. Do stallions recognize the oestrous state by smelling the odor of mares. EAAP Book of Abstracts (64th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. 26-30 August, Nantes) (19) p:123

Buda, V., Mozuraitis, R., Kutra, J., Borg-Karlson, A.K., 2012. P-Cresol: a sex pheromone component identified from the oestrus urine of mares. *Journal of Chemical Ecology* 38, 811-813.



- Crowell-Davis, S., Houpt, K.A., 1985. The ontogeny of flehmen in horses. *Animal Behaviour* 33, 739-745
- Dagnelie P 1998. *Statistique théorique et appliquée Tome 2 Inférence statistique à une et à deux dimensions*. Edition : De Boeck & Larcier S.A. 1998 département De Boeck Université Paris, Bruxelles.
- Gastal. M.O., Gastal, E.L., Beg, M.A., Ginther, O.J., 2007. Elevated plasma testosterone concentrations during stallion-like sexual behavior in mares (*Equus caballus*). *Hormones and Behavior*. 52, 205-210.
- Guillaume, D., Bruneau, B., Briant, C. 2002. Comparison of the effects of two GnRH antagonists on LH and FSH secretion, follicular growth and ovulation in the mares. *Reproduction Nutrition Développement* 42, 251-264.
- Haras nationaux 2014. *Insémination artificielle équine* Edition IFCE. Saumur France
- Hothersall, B., Harris, P., Sörtoft, L., Nicol, C.J., 2010. Discrimination between conspecific odour samples in the horse (*Equus caballus*). *Applied Animal Behaviour Science* 126, 37-44
- Keller M, Baum MJ, Brock O, Brennan PA, Bakker J. 2009. The main and the accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behavioural Brain Research* 200, 268-276.
- Le Danvic, C., Gérard, O., Sellem, E., Ponsart, C., Chemineau, C., Humblot, P., Nagnan-Le Meillour, P., 2015. Enhancing bull sexual behavior using estrus-specific molecules identified in cow urine *Review Article Theriogenology*, 83, 1381-1388
- Magistrini M., Chanteloube Ph., Palmer E. (1987) Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J.Reprod.Fert.* (IVth International Symposium on Equine Reproduction, 24-29 Aout 1986, Calgary (Canada).) Suppl.35, 127-133.
- Marinier SL, Alexander AJ, Waring GH. 1988. Flehmen Behaviour in the domestic horse: Discrimination of conspecific odours. *Applied Animal Behaviour Science* 19, 227-237
- Mozuraitis R, Buda V, Kutra J, Borg-Karlson AK. 2012 p- and m-cresols emitted from estrous urine are reliable volatile chemical markers of ovulation in mares. *Animal Reproduction Science* 130, 51-56.
- Nielsen BL, Jérôme N, Saint-Albin A, Thonat C, Briant C, Boué F, Rampin O, Maurin Y. 2011 A mixture of odorant molecules potentially indicating oestrus in mammals elicits penile erections in male rats. *Behavioural Brain Research* 225, 584-589.
- Pickett BW, Faulkner LC, Seidel GE Jr, Berndtson WE, Voss JL 1976 Reproductive physiology of the stallion. VI. Seminal and behavioral characteristics. *Journal of Animal Sciences* 43, 617-25
- Stahlbaum CC, Houpt KA 1989. The role of Flehmen response in the behavioral repertoire of the stallions. *Physiology & Behavior* 45, 1207-1214.
- Stout TA 2005. Modulating reproductive activity in stallions: a review. *Animal Reproduction Sciences* 89:93-103. Review.
- Thompson DL Jr, Pickett BW, Berndtson WE, Voss JL, Mett TM. 1977 Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behavior and concentrations of LH and testosterone in serum. *Journal of Animal Sciences* 44, 656-64
- Vyas S, Briant C, Chemineau P, Le Danvic C, Nagnan-Le Meillour P 2012. Oestrus pheromones in farm mammals, with special reference to cow. *Indian Journal of Animal Sciences* 82, 256-267.