

Essais de maîtrise du cycle chez la jument, avec le kisspeptide

Par :

▪ C. Decourt, Y. Merzouki, A. Bouakkaz, G. Duchamp, B. Bruneau, A. Caraty, C. Briant

▪ Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA-CNRS-Université François Rabelais de Tours-Haras nationaux, 37380 Nouzilly, France

Résumé

En élevage équin, la prédiction du moment de l'ovulation est une des étapes indispensables pour optimiser la fécondation. Pour cela, différents traitements sont actuellement commercialisés, mais ne donnent pas entière satisfaction. L'utilisation d'une nouvelle molécule, le kisspeptide, semble être un bon candidat pour la maîtrise du cycle dans l'espèce équine. L'objectif de cette étude était de tester les effets d'une administration intra-veineuse (i.v.) continue de kisspeptide sur la sécrétion de LH, à différents moments de la phase folliculaire, afin de déterminer le moment le plus propice pour l'application d'un traitement permettant une synchronisation des ovulations. Ces effets sont meilleurs en début et en milieu de phase folliculaire plutôt qu'en fin de phase folliculaire. Il était ensuite nécessaire de choisir une dose minimale optimale afin d'éviter une éventuelle désensibilisation des récepteurs, et de minimiser le coût. Cette dose a été par la suite administrée de façon continue, par voie i.v., pendant toute la durée de la phase folliculaire jusqu'à l'ovulation, et a semble t'il permit une meilleure synchronisation des ovulations.

Mots clés : Kisspeptide, ovulation, jument, gonadotropines

Summary

The prediction of ovulation is one of the necessary steps to maximize fertilization in breeding systems. To achieve this, various treatments already exist, but don't give a complete satisfaction. The use of a new molecule, so called kisspeptin, seems to be a good candidate for the mare's reproduction management. The aim of this study was to test the effect of a continuous intravenous administration of kisspeptin on LH secretion at different stages of the follicular phase; this in order to determine the best time to apply a treatment to synchronize ovulations. The effects are greater at the beginning and the middle of the follicular phase in comparison with the end of the follicular phase. Then, it was necessary to choose a minimum dose to avoid a possible desensitization of the receptors, and minimize cost. This dose was subsequently administered continuously intravenously throughout the duration of a cycle since the early follicular phase, and seems to trigger a better synchronization of ovulations.

Key-words : kisspeptin, ovulation, mare, gonadotropin

Introduction

La maîtrise du cycle chez la jument est un enjeu économique majeur. Il existe une grande variabilité dans la durée du cycle et la prédiction de l'ovulation est difficile. Les éleveurs sont demandeurs de nouveaux traitements moins contraignants, moins chers, plus efficaces.

Depuis quelques années, nous étudions dans notre laboratoire les effets du kisspeptide chez la brebis. Cette molécule considérée comme clé dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadotrope, permet en effet d'induire un cycle complet chez la brebis cyclique comme chez la brebis en anoestrus. Ainsi, chez la brebis cyclique, une administration i.v. continue (30 heures après le retrait des implants de progestérone) est capable de synchroniser les pics pré-ovulatoires de LH, et les ovulations, à l'heure près chez toutes les brebis traitées, alors que les pics sont observés sur un intervalle de 24 heures chez les brebis témoins. Chez la brebis en anoestrus, une administration i.v. continue de kisspeptide induit une croissance folliculaire et un pic pré-ovulatoire de LH 28 heures après le début du traitement ainsi qu'une ovulation (Caraty et al., 2007).

Dans l'espèce équine, cette molécule n'a été que très peu étudiée jusqu'à présent. Une injection i.v. unique de kisspeptide induit une augmentation de la sécrétion de LH de courte durée (4h) chez la jument en diestrus. Cependant cette injection unique n'induit pas l'ovulation chez des juments en oestrus, présentant un follicule préovulatoire de 35-40mm (Magee et al., 2009).

Nous avons dans un premier temps vérifié la présence du kisspeptide dans le cerveau des juments au moment de l'ovulation (Decourt et al., 2008). Nous avons ensuite entrepris d'étudier les effets du kisspeptide sur le cycle de la jument afin de rechercher des applications potentielles. Il était tout d'abord nécessaire d'étudier les effets d'une administration i.v. continue de kisspeptide sur la sécrétion de LH et ce à différents moments de la phase folliculaire afin de définir le moment le plus propice pour administrer le traitement.

1. Matériels et méthodes

Les expériences ont été réalisées sur des ponettes Welsh du troupeau expérimental de l'INRA de Nouzilly, pendant la période de cyclicité (avril-septembre).

Expérience 1 : Cette expérience avait pour objectif de déterminer si une administration i.v. continue de kisspeptide avait un effet différentiel sur la sécrétion de la LH, en fonction du stade du cycle.

Douze ponettes en phase lutéale reçoivent une injection de prostaglandines (6 jours après ovulation) afin de détruire le corps jaune. Sur la base d'un suivi échographique, les ponettes sont réparties en 3 lots correspondant à 3 périodes de la phase folliculaire :

- ✓ Début de phase folliculaire (n=4)
- ✓ Milieu de phase folliculaire (n=4)
- ✓ Fin de phase folliculaire (n=4)

Le jour de l'expérimentation, les ponettes reçoivent une administration i.v. continue d'une solution physiologique pendant 3 heures, puis d'une solution de kisspeptide (dose A) pendant 6 heures. Des prélèvements sanguins sériés (toutes les 15 min) sont réalisés durant les 9 heures de l'expérimentation. Les concentrations plasmatiques de LH sont déterminées par dosage radio-immunologique (RIA).

Expérience 2 : Cette expérience consistait à tester différentes doses de kisspeptide afin de déterminer une dose efficace optimale.

Seize ponettes en phase lutéale reçoivent une injection de prostaglandines (6 jours après ovulation). Le lendemain (début de phase folliculaire) les ponettes sont réparties dans un des 4 groupes :

- ✓ Groupe 1 : dose A (n=4)
- ✓ Groupe 2 : dose A/2 (n=4)
- ✓ Groupe 3 : dose A/6 (n=4)
- ✓ Groupe 4 : dose A/12 (n=4)

Chaque ponette reçoit une administration i.v. continue d'une solution physiologique pendant 1 heure, puis d'une solution d'une des 4 doses de kisspeptide pendant 3 heures. Des prélèvements sanguins sériés (toutes les 10 min) sont réalisés durant les 4 heures de l'expérimentation. Les concentrations plasmatiques de LH sont déterminées par dosage radio-immunologique (RIA).

Expérience 3 : Cette expérience avait pour objectif d'administrer le kisspeptide pendant un cycle, dans le but de synchroniser les ovulations.

Quatorze ponettes en phase lutéale reçoivent une injection de prostaglandines (6 jours après ovulation). Le lendemain de l'injection de prostaglandines (début de phase folliculaire) les ponettes sont réparties aléatoirement dans le groupe traitées (n=7) ou témoins (n=7).

Les ponettes reçoivent une administration i.v. continue soit de solution physiologique (témoins), soit d'une solution de kisspeptide à la dose A/6 (traitées) pendant toute la durée de la phase folliculaire (depuis le lendemain de l'injection de prostaglandines jusqu'à ovulation). Des prélèvements sanguins bi-

quotidiens sont réalisés pendant toute la durée de l'expérience et jusqu'à 5 jours après ovulation. Les concentrations plasmatiques de LH sont déterminées par dosage radio-immunologique (RIA).

Un suivi échographique quotidien est réalisé afin d'étudier l'évolution de la croissance des follicules, et de déterminer la date précise de l'ovulation.

Présentation des résultats et tests statistiques :

Expérience 1 : Pour chaque stade de la phase folliculaire, les concentrations de LH ont été regroupées en 3 périodes : période 0 = moyenne des concentrations en LH obtenues lors des 3 premières heures d'administration de solution physiologique, période 1 = moyenne des concentrations obtenues lors des 3 premières heures d'administration de kisspeptide, période 2 = moyenne des concentrations obtenues lors des 3 heures suivantes d'administration de kisspeptide.

Expérience 2 : Pour chacune des doses testées, les concentrations de LH ont été regroupées en 4 périodes : période 0 = moyenne des concentrations en LH obtenues lors de la première heure d'administration de solution physiologique, période 1 = moyenne des concentrations obtenues lors de la première heure d'administration de kisspeptide, période 2 = moyenne des concentrations obtenues lors de la deuxième heure d'administration de kisspeptide, période 3 = moyenne des concentrations obtenues lors de la dernière heure d'administration de kisspeptide. Pour les périodes 1, 2 et 3, le niveau de base moyen (=période 0) a été soustrait.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec des tests exacts non-paramétriques (StatXact 5 software, Cytel Software Corporation, Cambridge, MA, USA). Les différences ont été considérées significatives pour $p < 0,05$.

Pour chaque phase : la moyenne des concentrations de LH a été comparée entre les 3 périodes de 3 heures avec un test de Friedman. Si ce test était significatif, la montée de LH entre les périodes 0 et 2 a été évaluée avec un test de Page.

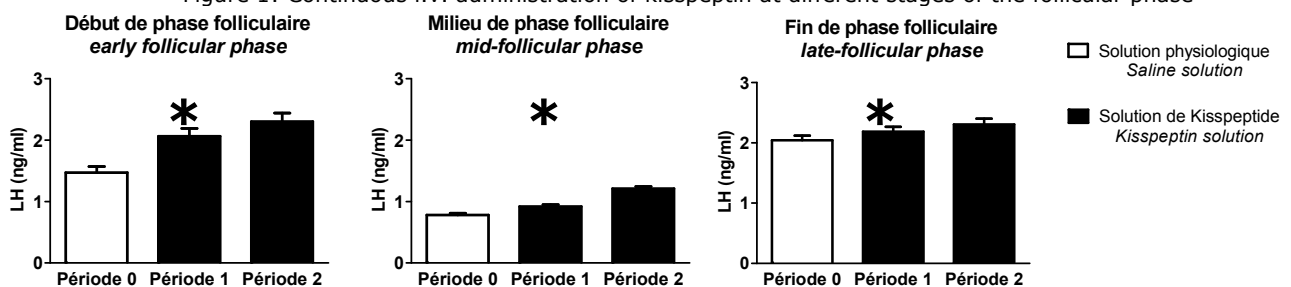
Pour chaque dose : la moyenne des concentrations de LH a été comparée entre les 4 périodes de 1 heure avec un test de Friedman. Si ce test était significatif, la montée de LH entre les périodes 0 et 3 a été évaluée avec un test de Page.

2. Résultats

2.1. Expérience 1 : Administration de kisspeptide à différents moments de la phase folliculaire.

Suite à une administration i.v. continue de kisspeptide, les concentrations plasmatiques de LH augmentent de façon significative à tous les stades de la phase folliculaire ($p < 0,05$). Cependant, les effets sont moins importants en fin de phase folliculaire.

Figure 1 : administration i.v. continue de kisspeptide à différents moments de la phase folliculaire
Figure 1: Continuous i.v. administration of kisspeptin at different stages of the follicular phase



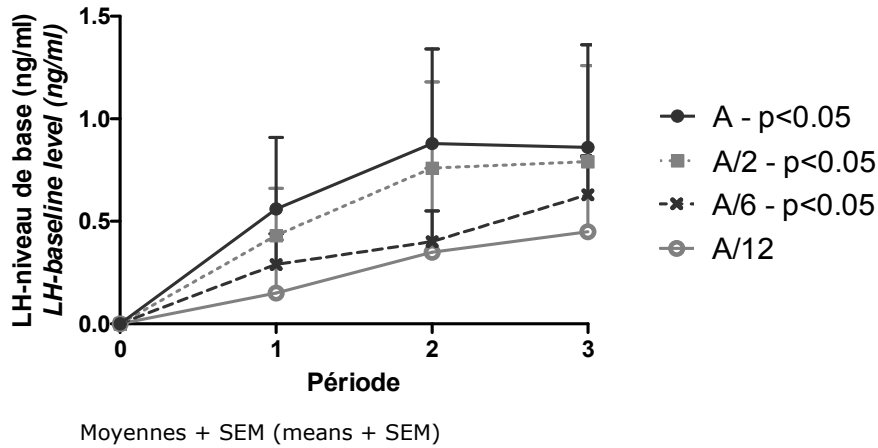
Moyennes + SEM (means + SEM) * $p < 0.05$

2.2. Expérience 2 : Détermination d'une dose efficace optimale en début de phase folliculaire.

Une augmentation significative des concentrations de LH est observée seulement pour les doses A, A/2 et A/6 ($p < 0,05$). La dose A/6 permet une augmentation progressive des taux de LH pendant toute la durée de l'administration.

C. Decourt et al.

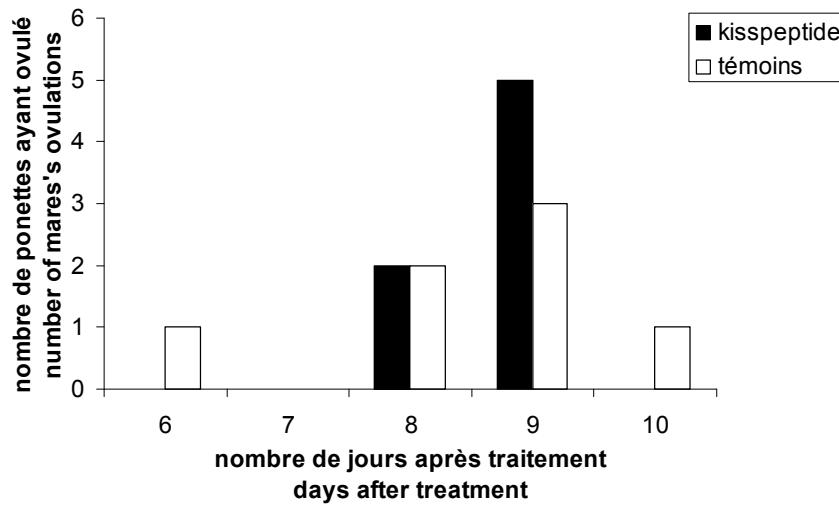
Figure 2 : administration i.v. continue de différentes doses de kisspeptide
Figure 2 : Continuous i.v. administration of different doses of kisspeptin



2.3. Expérience 3 : Administration de kisspeptide au cours d'un cycle

Suite à une administration i.v. continue de kisspeptide (dose A/6) depuis le lendemain de l'injection de prostaglandines jusqu'à ovulation, les ponettes traitées ont ovulé en moyenne $8,7 \pm 0,2$ jours après le début du traitement, versus $8,4 \pm 0,4$ jours pour les ponettes témoins. Les ovulations semblent mieux regroupées pour les ponettes traitées.

Figure 3 : distribution des ovulations
Figure 3 : Distribution of ovulations



3. Discussion/Conclusion

Nos résultats ont montré qu'une administration i.v. continue de kisspeptide avait un effet plus important sur la sécrétion de LH en début et en milieu de phase folliculaire. Afin de faciliter la mise en œuvre d'un traitement potentiel sur le terrain, les études ultérieures ont été réalisées en début de phase folliculaire (le lendemain de l'injection de prostaglandines). Nous avons donc déterminé une dose optimale efficace c'est-à-dire permettant une stimulation progressive et prolongée de la LH tout en limitant les risques de désensibilisation des récepteurs. Cette dose optimale administrée par la suite au cours d'un cycle a semble t'il permis une meilleure synchronisation des ovulations. Les dosages RIA des gonadotrophines (LH et FSH) et des stéroïdes (oestrogènes et progestérone) sont en cours. Ils nous permettront de préciser les effets obtenus. Nous pourrons ensuite établir une stratégie afin d'améliorer ce traitement pour 1) induire toute des ovulations le même jour et 2) disposer d'une forme d'administration utilisable sur le terrain.

Remerciements

Nous remercions la coopérative d'élevage URCEO, l'ANRT et les Haras nationaux pour leur soutien financier dans le cadre de cette thèse CIFRE. Nous remercions également toute l'équipe de l'unité expérimentale équine de Nouzilly pour son aide précieuse lors des différentes expériences.

Références

Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Said, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148, 5258-5267.

Decourt, C., Tillet, Y., Caraty, A., Franceschini, I., Briant, C., 2008. Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system. *J Chem Neuroanat* 36, 131-137.

Magee, C., Foradori, C.D., Bruemmer, J.E., Arreguin-Arevalo, J.A., McCue, P.M., Handa, R.J., Squires, E.L., Clay, C.M., 2009. Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology* 150, 2813-2821.