

L'injection journalière d'un agoniste de GnRH restaure la fonction de reproduction chez des étalons castrés à long terme par une immunisation anti-GnRH

Par :

▪ M. Vidament¹, B. Ferry², A.L. Laine¹, L. Wimmel³, F. Miszczak⁴, D. Burger⁵, C. Briant¹, C. Decourt¹, A. Caraty¹
▪ ¹INRA, UMR0085, PRC, INRA, CNRS, Université de Tours, Les Haras nationaux, F -37380 Nouzilly

² La Jumenterie des Haras nationaux, F -61310 Exmes

³ Station Expérimentale des Haras nationaux, F - 19140 Chamberet

⁴ Laboratoire Franck Duncombe, F -14053 Caen Cedex 4⁵
Haras National d'Avenches, Les Longs Prés, CP191, CH-1580 Avenches, Suisse

Résumé

Sur 8 étalons de terrain excréteurs du virus de l'artérite à virus dans leur sperme et immunisés 2 fois avec un vaccin anti-GnRH (Equity ND) (année n) pour déprimer temporairement leur niveau de testostérone, 7 étalons ont arrêté leur portage viral dans les 8 mois. Toutefois 3 d'entre eux ont présenté un niveau anormalement bas en testostérone ($\leq 0,2$ ng/ml) plus de 30 mois post-immunisation, ce qui les a empêchés de réaliser une saison de monte normale l'année n+1. Entre 18 et 24 mois post-immunisation, ces étalons ont reçu une ou plusieurs injections isolées de 0,1 microg/kg d'un agoniste de GnRH, la buséréline (Suprefact, ND) en IM. La concentration en testostérone est alors montée entre 0,9 et 1,8 ng/ml 2 à 6 h après injection, avec retour au niveau de base en 24 h. Pendant l'année n+2, les étalons ont reçu une injection journalière de buséréline, à la même dose, de 2 mois avant le début de monte jusqu'à la fin de la monte. La libido, la qualité /quantité des spermatozoïdes et la fertilité ont été normales et/ou conformes aux performances avant immunisation anti-GnRH. Ce traitement de substitution a permis de remédier temporairement à un des risques majeurs de ce type de castration vaccinale: son aspect irréversible ou très long-terme sur certains individus.

Mots clés : Castration hormonale, Buséréline, Analogue GnRH, Equin, Cheval, Fertilité, Spermatozoïdes, Sperme

Summary

Eight field stallions shedding the virus of EAV (equine viral arteritis) in their sperm were immunized twice against GnRH 1 month apart with Equity TM (year n) to depress testosterone for a few months. Seven out of 8 stopped their viral excretion before the 9th month, however 3 of them still presented a low level of plasmatic testosterone ($\leq 0,2$ ng/ml) more than 30 months post-immunization. This prevented them to achieve a normal breeding season year n+1. Between 18 and 24 months post-immunization, these 3 stallions received one or more single injections of 0,1 microg/kg buserelin IM (Suprefact, TM), a GnRH agonist. Then, their testosterone concentration increased (0,9 to 1,8 ng/ml) 2-6 h after injection and decreased with a return to basal level in 24 h. During year n+2, these stallions were injected daily with that dose of buserelin from 2 months before breeding season until the end of this season. Libido, semen quality, semen quantity and fertility were normal and/or similar to pre-immunization values. This hormonal substitution has permitted to restore reproductive functions temporarily in these stallions and to solve a problem inherent to these kind of immunization: long term or permanent reproductive suppression in some individuals.

Key-words : Hormonal castration, Buserelin, GnRH-analogue, Equine, Horse, Fertility, Spermatozoa, Sperm

Introduction

Les propriétaires d'étalons seraient très intéressés par la possibilité de les castrer temporairement de manière efficace et réversible, notamment pour des facilités de gestion de ce type particulier d'animaux. Pour cela, il faut pouvoir contrôler au moins une des hormones de la reproduction. Dans le cerveau, la libération pulsatile (= discontinue, par petits pics) de GnRH par l'hypothalamus régule la libération des hormones LH et FSH par l'hypophyse. La LH se lie aux cellules de Leydig du testicule et stimule la production de testostérone. La FSH stimule la production et la libération de facteurs nécessaires à la spermatogénèse (= fabrication des spermatozoïdes) (Roser, 1997). Différentes possibilités de castration temporaire ont été proposées chez le cheval. Elles passent principalement par un contrôle de GnRH soit par l'immunisation anti-GnRH, soit par l'administration d'antagonistes de GnRH (revues de Stout 2004, 2005, Fortier *et al.* 2006).

Parmi les nombreuses études sur les effets de l'immunisation anti-GnRH sur le contrôle de la fonction de reproduction dans différentes espèces, les unes présentent des résultats tout à fait intéressants d'efficacité associés à une bonne réversibilité ; d'autres montrent des résultats plus variables et moins fiables, du fait de variations individuelles assez marquées avec la possibilité de castration non réversible sur quelques individus (revue de Thompson, 2000 ; Gokdal *et al.*, 2009). En 2001, un vaccin anti-GnRH conçu pour le cheval (Equity ND,) et produit par la même compagnie (Pfizer Animal Health, Australia) que le vaccin anti-GnRH Improvac (ND) conçu pour les porcins (voir article en français de Prunier & Bonneau, 2006), a été commercialisé en Australie et en Nouvelle Zélande avec comme indication le contrôle des chaleurs des juments. L'efficacité de ce vaccin pour cet usage a été testée par Imboden *et al.* (2006), Elhay *et al.* (2007) et Card *et al.* (2007). Chez l'étalon, après 3 injections, ce vaccin diminue fortement la testostérone et la production de semence chez la majorité des étalons pendant au moins 6 mois (Janett *et al.*, 2009).

Improvac et Equity ont été utilisés par Burger *et al.* 2006 (étude complétée par Ferry *et al.* 2008 et Burger *et al.* 2010) sur des étalons européens porteurs sains du virus de l'artérite. La majorité d'entre eux s'est débarrassée de leur virus et a repris une activité de reproduction normale 1 an après l'immunisation. Toutefois un traitement vaccinal comporte toujours le risque d'une réponse très variable entre les individus : réponse trop faible ou trop forte. Et en effet, certains étalons immunisés de la série évoquée au-dessus n'ont pas repris une fonction de reproduction normale plus d'un an après cette immunisation. Nous nous sommes donc posés la question de savoir s'il était possible de leur apporter un traitement de substitution, en attendant une reprise spontanée et hypothétique de leur sécrétion de GnRH. Dans ce cas, dans les autres espèces, les traitements de substitution testés chez le mâle ou la femelle avec plus ou moins de succès ont été : agonistes de GnRH ou FSH ou LH ou hCG (qui a un effet LH) (Gokdal *et al.* 2009). Pour ces étalons, nous avons choisi d'utiliser la buséreline, agoniste de GnRH, pour plusieurs raisons. D'une part, cette substance a un effet chez la jument et chez l'étalon. Chez la jument, son injection, dans certaines conditions, induit l'ovulation, en augmentant le niveau de LH (Barrier-Battut *et al.* 2001, Levy *et al.* 2007, Duchamp *et al.* 2007). Chez l'étalon hors saison de monte, elle a un effet positif sur la libido et un peu sur la qualité de la semence, lors d'un traitement de 6 semaines (Sieme *et al.* 2004). D'autre part, la buséreline a une structure très différente de celle de GnRH et avait peu de chances d'être liée aux anticorps anti-GnRH, provenant de l'immunisation.

L'hypothèse de ce travail a donc été que, chez des étalons dont la fonction de reproduction était inhibée à long terme par une immunisation anti-GnRH, il serait possible de la restaurer en faisant des injections régulières de buséreline, agoniste de GnRH.

Pour cela, nous avons :

- mesuré l'effet d'une seule injection de buséreline sur des étalons sains non immunisés car il n'y avait pas de données précises chez l'étalon sur l'efficacité de cette substance
- quantifié le nombre d'étalons immunisés avec Equity ND et ne reprenant pas une fonction de reproduction normale au bout de 12, voire 24 ou 36 mois
- proposé pour certains de ces étalons immunocastrés un traitement de substitution avec la buséreline

1. Incidence de l'immunocastration à long terme

En France, sur une 1^{ère} série de 8 étalons porteurs du virus de l'artérite et immunisés avec Equity ND (Laboratoire CSL, Pfizer Animal Health, Australia) entre 2002 et début 2007, 7 étalons ont arrêté leur portage viral dans les 8 mois post-vaccination (dépistage par RT-PCR ou qRT-PCR) mais 3 d'entre eux se sont retrouvés avec un niveau anormalement bas en testostérone ($\leq 0,2$ ng/ml) plus d'1 an post-vaccination.

De manière très similaire, sur une 2^{ème} série de 8 étalons français porteurs d'artérite à virus et immunisés en 2008, tous les étalons ont arrêté leur portage viral mais 3 d'entre eux se sont retrouvés avec un niveau anormalement bas en testostérone ($\leq 0,2$ ng/ml) plus d'1 an post-vaccination.

Les étalons de ces 2 séries avaient été immunisés par 2 injections à 1 mois d'intervalle de 200 microg d'Equity ND par voie intra-musculaire.

2. Effet d'une ou de plusieurs injections de buséréline

2.1. Matériel et méthodes communs

2.1.1. Injection de buséréline, agoniste de GnRH

La buséréline a été utilisée soit en injection isolée (comme test), soit en traitement journalier sur plusieurs jours ou mois. Les étalons ont reçu 10 microg/100 kg de buséréline, soit 0,01 ml /100 kg de Suprefact ND (laboratoire Aventis) par voie intra-musculaire.

2.1.2. Dosages hormonaux

Tous les étalons concernés par ces études ont été suivis majoritairement par le biais de dosages hormonaux. La testostérone plasmatique a été dosée par dosage RIA (radio-immuno assay) sans extraction (Laboratoire des Dosages Hormonaux, PRC, INRA Nouzilly). La LH et la FSH ont été dosées également par dosage RIA.

2.2. Effet d'une injection de buséréline sur des étalons sains

Cette expérimentation a été réalisée afin de connaître les effets sur des étalons sains non immunisés d'une seule injection de buséréline pendant la saison de monte sur leurs niveaux de LH, de FSH et de testostérone plasmatiques.

2.2.1. Matériel et méthodes

En mai, 6 étalons poneys sains (4 à 23 ans) ont reçu une seule injection de buséréline à 10h30, le matin. Des prises de sang ont été réalisées 30 minutes avant et juste avant l'injection (pour connaître le niveau de base), puis 2, 6, 12, 24, 30 et 48 h post-injection.

2.2.2. Résultats

L'injection de buséréline (Figure I) :

- a entraîné une élévation de LH dès 2 h avec un maximum à 6 h, le niveau de base est retrouvé en 12 à 20 h,
- a entraîné un pic de FSH en 2 h et un retour à la normale en 12 à 20 h
- a modifié plus profondément le niveau de testostérone plasmatique, avec une élévation à 2 h, un pic à 6 h, suivis d'une lente diminution avec retour au niveau basal en 48 h seulement

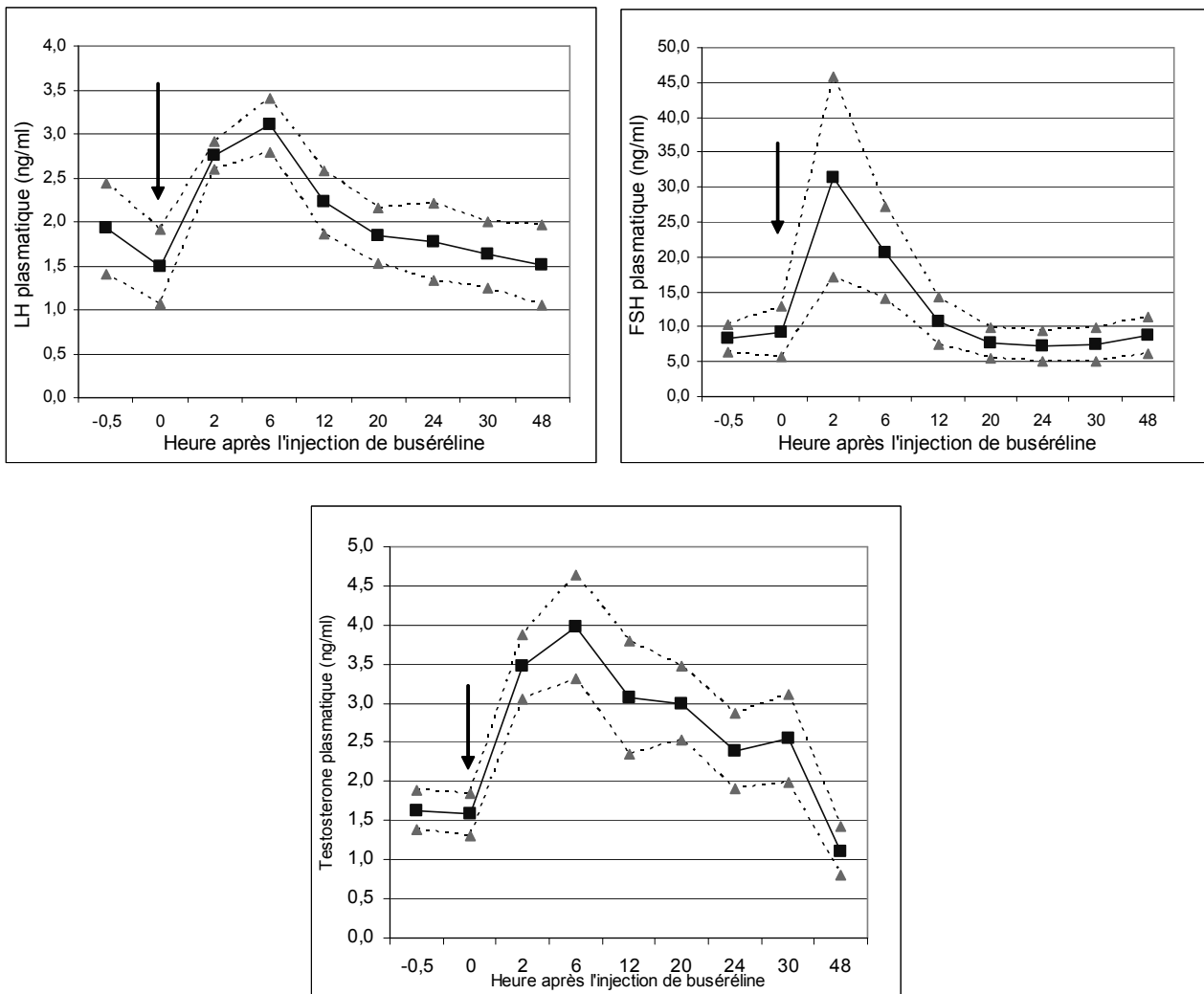
2.3. Effet d'une ou de plusieurs injections de buséréline sur des étalons de terrain immunocastrés

Le traitement de substitution a été utilisé sur les 3 étalons de la 1^{ère} série (voir paragraphe 1) qui n'avaient pas retrouvé un taux normal de testostérone plus d'1 an après vaccination. Il s'agit des étalons G, H et I décrits dans la publication de Ferry *et al.* 2008 et rebaptisés ici A, B et C.

2.3.1. Matériel et méthodes

Les étalons ont été immunisés avec Equity ND, l'année n. Une année et demi a été nécessaire pour se rendre à l'évidence que la spermatogénèse de ces 3 étalons ne « repartait » pas normalement (Tableau 1). Pendant la 2^{ème} année (année n + 1), différents dosages du niveau de base, tests à la buséréline et traitements journaliers à la buséréline de 2 mois minimum ont été réalisés. La saison de monte de l'année n+2 a été gérée de la façon suivante. Deux mois avant la date espérée de début de la monte, un traitement journalier à base de buséréline a été initié, puis le traitement a été poursuivi pendant toute la monte. L'étalon A a eu l'année de monte n+3 gérée également de cette façon.

Figure I : Concentrations plasmatiques de LH, FSH et testostérone avant et après 1 seule injection intra-musculaire de 10 microg/100 kg de buséreline, en mai, matérialisée par une flèche verticale. (moyenne des valeurs de 6 étalons normaux (ligne pleine) +- sem (lignes en pointillés))
 Figure I: Plasmatic LH, FSH and testosterone values before and after a single injection of buserelin in may (10 microg/100 kg intra-musculary) (mean from 6 intact normal stallions +- sem)



L'heure d'injection a été soit 10 h, soit entre 7 à 8 h le matin au moment de la distribution du 1^{er} repas. Les étalons A et C ont toujours reçu la dose recommandée. Pour l'étalon B, une dose beaucoup plus élevée a été utilisée pendant l'année n+1 de mai à juillet : 170 microg/100 kg. Un test (dose isolée) avec une dose normale a pu être réalisé au mois d'août suivant. Le traitement pour la monte n+2 a pratiquement été fait à la dose recommandée (Tableau 1).

Des dosages hormonaux ont été réalisés dans différentes situations :

- soit sans aucune stimulation, ce qui a permis de suivre le niveau de base
- soit après 1 injection isolée de buséreline (= test à la buséreline), en essayant d'avoir des prises de sang au moment de l'injection (0 h), puis 2, 6 et 24 h après
- soit lors d'un traitement journalier de buséreline, en essayant d'avoir des prises de sang au moment de l'injection 0 h (0 h=24 h après l'injection du jour d'avant), puis 2, 6 et 24 h après (24 h = 0 h par rapport à l'injection du jour d'après)

Des données ont été relevées concernant la fertilité avant et après vaccination anti-GnRH / traitement à la buséreline, ainsi que sur les caractéristiques du sperme et la taille testiculaire.

Comme il s'agissait d'étalons non expérimentaux et d'accessibilité assez différente, le suivi n'a pas été le même pour tous les étalons, autant pour les dosages hormonaux que pour l'accès aux données de reproduction.

Tableau 1 : Caractéristiques de la reproduction des 3 étalons étudiés avant et après immunisation anti-GnRH puis traitement substitutif avec la buséreléline

Reproduction features of the stallions studied, before and after immunisation against GnRH and substitution treatment with buserelin

	Etalon A	Etalon B	Etalon C
Fertilité par cycle ¹ Fertilité apparente SIRE ² année n - 2	/	62 % (13 juments)	58 % (19 cycles) 67 % (21 juments)
Fertilité par cycle ¹ Fertilité apparente SIRE ² année n - 1	69 % (59 juments)	/	A l'étranger pendant monte 2006
Sperme juste avant l'immunisation anti-GnRH			Février 07 : nombre total spz dans l'éjaculat : 6 à 10 milliards ; 2% de têtes seules.
Date de l'immunisation anti-GnRH (1ère injection)	Juillet 06	Décembre 06	Février 07
Age à l'immunisation anti- GnRH	17 ans	12 ans	14 ans
Année n + 1 sans traitement	Mise à la reproduction : aucune gestation sur environ 10 cycles	Baisse de libido, blessure de la verge, arrêt de la monte	Arrêt de la monte du fait du faible niveau de testostérone et de qualité de la semence
Sperme : année n + 1	Octobre 07: 35 % de têtes seules		Février 08 : nombre total de spz dans l'éjaculat : 2,2 milliards ; 20% de têtes seules
Traitement avec buséreléline ³ pendant 2 mois année n + 1		Après 2 mois avec 1 ml buséreléline journalière (mai à juillet 08): nombre total de spz dans l'éjaculat : 9 milliards ; 1% de têtes seules	De mai à juillet 08 : nombre total de spz dans l'éjaculat passe de 1,3 à 3,4 milliards, le % têtes seules passe de 35 % à 0,5%, augmentation de la taille testiculaire, 3 juments pleines sur 4 cycles à la fin des 2 mois
Année n + 2 : date début du traitement avec buséreléline ³	Décembre 07	Mi-décembre 08 : 0,1 ml puis 0,05 ml à partir de février 09 (car étalon trop « chaud »)	Mars 08
Sperme année n + 2	Mars 08: 2 % têtes seules. Avril 08: nombre total de spz dans l'éjaculat : 6 à 10 milliards		De février 09 à mai 09 : nombre total de spz dans l'éjaculat passe de 2 à 4 milliards, le % têtes seules passe de 25 % à 4%
Fertilité par cycle ¹ année n + 2 sous traitement avec buséreléline ³	≥ 40 % (>= 30 cycles)	≈ 92 % (≈ 12 cycles)	57 % (21 cycles)
Fertilité par cycle ¹ année n + 3 sous traitement avec buséreléline ³	54 % (39 cycles)	/	/

¹ Fertilité par cycle (Nombre de cycles fertiles / nombre de cycles à résultat connu) en IA immédiate et/ou en monte en main

² Fertilité apparente SIRE : (Nombre de mises bas + nombre d'avortements) / nombre de juments saillies

³ Traitement journalier buséreléline : 10 microg (0,01 ml Suprefact ND)/100 kg sauf mention contraire

2.3.2. Résultats

Testostérone plasmatique (voir Figure II pour l'étalon A)

* Niveau de base

La testostérone plasmatique spontanée de ces 3 étalons n'a pratiquement jamais dépassé 0,4 ng/ml dans la période entre 12 et 30 mois post-vaccination et se situe très régulièrement entre 0,1 et 0,3 ng/ml (dans figure II : moments indiqués dans les ovales).

* Test à la buséreline (1 injection isolée à dose normale)

L'étalon A présente une augmentation de son taux de testostérone de 0,2 ng/ml à 0 h à 0,9 ng/ml en 2 h en décembre 07 et octobre 08 (dans figure II : moments indiqués dans les bannières).

Le taux de testostérone de l'étalon B passe de 0,2 à 0 h à 1,8 ng/ml en 2 h, en août 08.

Le taux de testostérone de l'étalon C passe de 0,2 ng/ml à 1,1 ng/ml 2 h après, puis monte de manière continue pendant 48 h jusqu'à 2 ng/ml, en mai 08.

En conclusion, les 3 étalons A, B et C ont tous « répondu » au test buséreline : 0,9 à 1,8 ng/ml en 2 à 6 h avec un retour au niveau antérieur plutôt rapide (plutôt en 24 h qu'en 48 h).

* Traitement journalier à la buséreline de 2 mois ou plus

L'étalon A présente une augmentation du taux de testostérone à 2 h (de 0,8 à 1,8 ng/ml), en diminution à 6 h, et retour au niveau de base en 24 h ou moins, en mars 08, juin 08, février 09, mars 09, juillet 09 (dans figure II : moments indiqués dans les rectangles).

Le taux de testostérone de l'étalon B présente une augmentation en 2 h à partir d'un niveau de base assez élevé, lors d'un traitement journalier à dose très élevée, en juin 08. Lors d'un traitement journalier à dose quasi-normale de buséreline, son taux de testostérone passe de 0,1 ng/ml à 0 h à un pic nettement élevé 6 h post-injection (1,8 ng/ml), puis à un retour au niveau de base en 24 h, en février 09.

Le taux de testostérone de l'étalon C augmente nettement 6 h après l'injection, et le niveau à 24 h (et 0h) est nettement au-dessus de 0,5 ng/ml lors de l'injection suivante, ceci en juin 08, en juillet 08 et en avril 09. Par contre, en fin de traitement (en juillet 08 et en juillet 09), le niveau bas (0,1 à 0,2 ng/ml) est retrouvé rapidement (en 6 à 48 h).

Fertilité et production semence

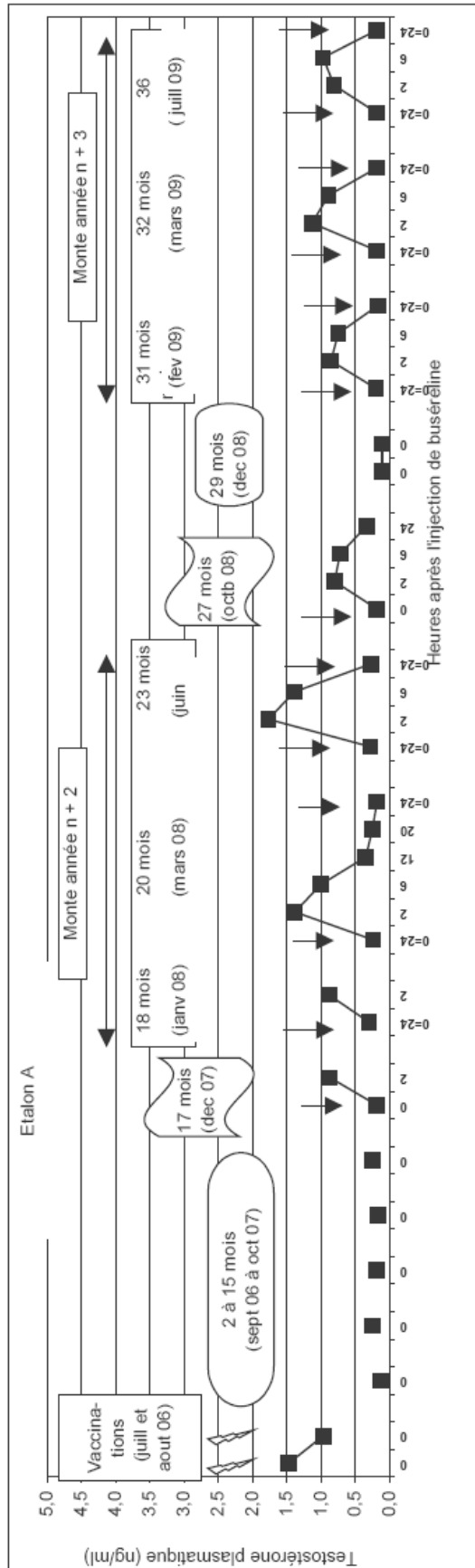
Les données disponibles sur ces étalons sont indiquées dans le tableau 1. Avant vaccination, certaines données sur la fertilité par cycle des 2 étalons A et B n'étaient pas disponibles. La fertilité apparente a donc été reportée dans le tableau 1 mais pour l'étalon A, il peut s'agir d'un mélange de monte en IA de sperme frais et de sperme congelé. Pour les 2 autres étalons, il ne peut s'agir que de monte en main.

Pendant l'année n+1, la monte a été commencée puis arrêtée pour ces 3 étalons. Il a été réalisé différentes mesures de la quantité et de la qualité des spermatozoïdes. Dans les éjaculats de ces étalons, il a été observé un faible nombre total de spermatozoïdes et un fort taux d'anomalies des spermatozoïdes (dont au moins 20% de têtes seules). Les testicules de l'étalon C avaient fortement diminué de volume par rapport à leur taille avant immunisation, aucune donnée n'était disponibles sur la taille testiculaire des étalons A et B.

Après le 1^{er} traitement de 2 mois et plus avec de la buséreline quotidienne, le nombre total de spermatozoïdes dans l'éjaculat a augmenté et le % de têtes seules est passé sous la barre des 1% (étalons A et C). Les testicules de l'étalon C ont bien augmenté de volume. La monte suivante sous buséreline quotidienne s'est passée normalement autant au niveau du comportement, que pour les caractéristiques séminales pour les 3 étalons. Ils ont tous présenté une fertilité normale. Par contre, hors saison, sans traitement, les testicules et le sperme des étalons sont revenus à l'état antérieur avant traitement. L'étalon A vient de terminer sa seconde saison de monte (n + 3) sous traitement de substitution dans les mêmes conditions.

Figure II : Concentration plasmatique de la testostérone de l'étalon A après immunisation contre GnRH (Equity ND) : niveaux de base (dates indiquées dans les ovals en nombre de mois après la 1ère immunisation) et après injections de buséréline isolées (dans les rectangles) ou journalières (dans les croix). Les injections de buséréline sont matérialisées par des flèches verticales.

Plasmatic testosterone concentrations of stallion A after immunization against GnRH (Equity ND) : basal level (time indicated in number of months after the first immunization in ovals) and after injections of buserelin (vertical arrows) either singly (in banners) or daily (in rectangles).



3. Discussion générale - Conclusion

Dans notre étude, les étalons immunisés avec le vaccin anti-GnRH Equity ND et ne récupérant pas spontanément l'ensemble de leur fonction de reproduction 1 an après la 1^{ère} immunisation ont été sensibles à l'action de la buséréline, agoniste de GnRH, pendant la durée des injections. L'hypothèse de départ s'est révélée exacte. En effet, chaque injection de buséréline (que ce soit une injection isolée ou lors d'un traitement journalier) a été suivie d'une élévation de la testostérone plasmatique au-dessus de 0,5 ng/ml pendant quelques heures. De plus, pour l'étalon A, ce traitement a été utilisé lors de 2 saisons de monte sans que le traitement ne perde de son efficacité. Chez l'homme, le traitement de l'hypogonadisme (testicules très petits ne produisant pas de spermatozoïdes) provenant d'un déficit spontané de la sécrétion/libération de GnRH ou de l'hypothalamus se fait soit avec un traitement GnRH délivré de manière pulsatile par une mini-pompe (5 à 20 microg/ 120 min), soit avec les hormones à effet LH et FSH (Zitzmann 2000) pendant 4 mois ou plus. Mais la voie pulsatile est contraignante (port d'une seringue en permanence). Récemment, Iwamoto *et al.* (2009) a décrit le cas d'un homme traité avec succès par administration nasale de buséréline 3 fois par jour. Pour que le traitement de substitution par GnRH ou des agonistes fonctionne, il faut un produit assez différent de la forme de GnRH utilisée pour faire le vaccin pour que les anticorps générés par l'immunisation n'aient pas d'effet, trouver la bonne dose et le bon rythme d'administration, et que l'hypophyse sécrétant LH et FSH soit intacte. On comprend qu'il soit fréquent que le traitement de substitution ne soit pas efficace (chez la brebis, Gokdal *et al.*, 2009). Dans notre étude, comme le traitement a été efficace, on peut conclure que l'agoniste choisi, la dose (10 microg/100 kg), le rythme (1 fois par jour), le moment (le matin) et la voie d'administration (intra-musculaire) ont été adaptés, même si ces facteurs n'ont pas été optimisés les uns par rapport aux autres. La dose choisie (10 microg/100kg) était modérée afin d'essayer d'obtenir des niveaux hormonaux proches des niveaux physiologiques. Le moment choisi pour l'injection a été le matin car, chez l'étalon, le taux de testostérone plasmatique varie dans la journée avec un pic en milieu de journée. Par exemple, des prélèvements réalisés sur 4 étalons expérimentaux de Chamberet ont donné les résultats suivants en concentration de testostérone : 0,71, 0,74 et 0,97 ng/ml à 9h, 10h30 et 12h, respectivement (moyenne de 4 étalons x 6 jours répartis régulièrement sur 3 mois, par heure). La voie intra-musculaire a été choisie car il était souhaitable que la voie d'administration soit commode d'utilisation pour des étalons amenés à recevoir ce traitement tous les jours pendant plusieurs mois. La présentation choisie (Suprefact ND, médicament humain) permettait d'injecter la dose sous un très faible volume et elle avait déjà été utilisée chez la jument avec succès et sans aucun effet secondaire (Levy *et al.* 2007, Duchamp *et al.* 2007). Les injections journalières du produit Suprefact ND n'ont généré aucune réaction locale. Les 3 étalons ont très bien supporté une injection par jour pendant plusieurs mois. Peut-être parce qu'il s'agissait d'injections très peu volumineuses (0,05 ml). Suite à ce traitement, les étalons immunocastrés puis traités à la buséréline ont pu reprendre la monte de manière parfaitement normale, autant au niveau comportemental (2 étalons sur les 3 étaient en monte en main) qu'au niveau du pouvoir fécondant de leurs spermatozoïdes. En effet, la fertilité par cycle des 3 étalons en 2009 a été proche ou au-dessus de 55%, valeur moyenne de la fertilité par chaleur des étalons des Haras nationaux. Ces étalons de valeur ont donc recouvré l'ensemble de leurs fonctions de reproduction, sous traitement de buséréline.

Sur des étalons sains, l'administration d'une dose isolée de buséréline a entraîné une augmentation nette de LH (+ 82%) pendant 2 à 12 h pour 5 étalons sur 6 et de FSH d'amplitude très variable entre les 6 étalons (moyenne + 250%). Ceci a eu pour conséquence une augmentation de la testostérone en 2 à 30 h de + 170%. Cette stimulation a été assez proche dans l'intensité, tout en étant un peu plus longue, que celle décrite en contre-saison par Roser *et al.* (1992) chez l'étalon (aucune référence en saison chez l'étalon, à notre connaissance). Pour cet auteur, l'injection IV de 5 à 100 microg de GnRH (et non d'un agoniste) entraîne une augmentation d'abord de LH (+ 160%) et de FSH (+140%) en 15 à 60 minutes, puis de la testostérone (+ 220%) en 2 h. La LH et de FSH reviennent quasiment au niveau de base en 5 h, ce qui n'est pas le cas de la testostérone qui est encore élevée. Le but de Roser *et al.* (1992) était de trouver la dose minimale capable d'entraîner une réponse en LH et FSH, afin de constituer un test fonctionnel. Dans notre essai, la durée plus longue de stimulation des hormones est certainement liée à l'utilisation de la buséréline, agoniste à forte activité GnRH. Néanmoins, le traitement journalier de buséréline n'a pas entraîné des niveaux hormonaux trop élevés par rapport aux niveaux physiologiques. D'autant plus que les étalons immunisés et traités avec de la buséréline ont eu des réponses hormonales d'intensité et de durée bien moindres que les étalons sains. Le traitement de buséréline a permis de stimuler l'hypophyse en générant des niveaux hormonaux plutôt bas, plus bas que ceux des étalons normaux. Donc les étalons peuvent avoir une spermatogénèse normale, avec seulement un pic journalier de testostérone au-dessus de 0,5 ng/ml pendant quelques heures.

La proportion de chevaux avec un taux très bas de testostérone plasmatique ($\leq 0,2$ ng/ml) plus de 12 mois après immunisation avec le vaccin Equity a été la même dans les 2 séries d'étalons français (37%). Ce résultat est à rapprocher des travaux de Janett *et al.* (2009) où 2 étalons n'avaient pas retrouvé un taux normal de testostérone 12 mois après immunisation sur les 4 qui avaient répondu à l'immunisation avec Equity ND. Mais dans cette étude, les étalons avaient reçu 3 injections de vaccin au lieu de 2. Burger *et al.* (2010) dans une étude sur 27 étalons de terrain immunisés (incluant les 16 étalons français

présentés ici) évaluent à 70% le taux de récupération d'un niveau normal en testostérone à 12 mois. Cette castration long-terme ou permanente post immunisation a déjà été observée dans d'autres espèces, notamment chez le taureau (D'Occhio *et al.* 2001 cité par Gokdal *et al.* 2009). Est-il vraisemblable que cette castration long-terme puisse s'expliquer par une persistance plus importante des anticorps anti-GnRH ? Pour l'étalon A, ces anticorps ont été dosés à différentes périodes avant et après immunisation : ces anticorps se sont trouvés à un niveau plutôt faible (10% de liaison (dilution au 1/200), 15 mois après immunisation), mais deux autres étalons de terrain qui avaient récupéré la totalité de leur fonction de reproduction, présentaient des taux d'anticorps semblables ou plus élevés (16% à 10 mois et 56% à 8 mois). Le titre d'anticorps varie énormément au moment de la réversibilité chez l'étalon (Janett *et al.* 2009) et chez la jument (Imboden *et al.* 2006) et ne peut aider à sa prédiction. Burger *et al.* (2010) ont même observé la persistance des anticorps 6 ans après sur la moitié des étalons immunisés par Janett *et al.* (2009). Une autre hypothèse pour expliquer cette castration à long terme pourrait être une atteinte de l'hypothalamus soit par les anticorps anti-GnRH (Gokdal *et al.*, 2009), soit par une stimulation inappropriée, mais cela n'a jamais été clairement démontré. Chez la jument, 12 mois après la vaccination Equity, la réversibilité n'est pas non plus systématique (Imboden *et al.* 2006, Card *et al.* 2007). Chez la jument, en cas de castration à long terme, un traitement à base de busérelina pourrait-il avoir une certaine efficacité ? Ce n'est pas sûr car les mécanismes hormonaux sont beaucoup plus complexes chez la femelle, du fait de la cyclicité. En conclusion, le risque de castration à long-terme avec le vaccin Equity est loin d'être négligeable. L'utilisation de ce vaccin doit se faire avec raison sur des animaux de valeur. Chez l'étalon, la possibilité de restaurer temporairement la fonction de reproduction avec un traitement de substitution à base de busérelina modère le risque pris.

Remerciements

A toutes les personnes des différents haras, aux vétérinaires et aux différentes personnes dans les laboratoires (Laboratoire Dosages Hormonaux de Nouzilly et Laboratoire Franc Duncombe) et aux installations équinées de l'INRA de Nouzilly (J.M. Yvon et l'équipe de G. Duchamp) qui ont participé à cette étude.

Références bibliographiques

- Barrier-Battut, I., Le Poutre, N., Trocherie, E., Hecht, S., des Raux, AG., Nicaise, J.L., Verin, X., Bertrand, J. Fieni, F., Hoier, R., Renault, A., Egron, L., Tainturier, D., Bruyas, J.F., 2001. Use of buserelin to induce ovulation in the cyclic mare. *Theriogenology* 55 (8):1679-1695 2001
- Burger, D., Janett, F., Vidament, M., Stump, R., Fortier, G., Imboden, I., Thun, R. 2006. Immunization against GnRH in adult stallions: Effects on semen characteristics, behaviour and shedding of equine arteritis virus. *Animal Reproduction Science* 94, 107-111.
- Burger, D., Vidament, M., Janett, F., Sieme, H., Dobretsberger, M., Thun, R. Immunization against GnRH in horses with Improvac™ and Equity™ : Indications, short and long time effects, perspectives In: *Proceedings ICERM* (International Conference for Equine Reproduction Medicine) 22 au 23 janvier 2010, Leipzig
- Card, C., Raz, T., LeHeiget, R., Sibert, G. (2007): GnRH Immunization in Mares: Ovarian Function, Return to Calfing, and Fertility. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP* – Orlando, Florida, 576-577.
- Duchamp, G., Levy, I., Briant, C., Bruneau, B., Caraty, A. 2007. Induction d'ovulation chez la jument : l'injection unique d'une forte dose de busérelina est efficace. *33ème Journée de la Recherche Equine, Les Haras nationaux. 08 mars 2007, Paris p:5-11*
- Elhay, M., Newbold, A., Britton, A., Turkley, P., Dowsett, K., Walker, J. 2007. Suppression of behavioural and physiological oestrus in the mare by vaccination against GnRH. *Aust. Vet. J.* 85, 39-45.
- Ferry, B., Fortier, G., Pronost, S., Burger, D., Vidament, M. 2008. Lutte contre l'artérite virale chez l'étalon: dépistage, vaccination et traitement anti-GnRH. *Journée de la Recherche Equine, Paris, 34ème journée d'étude, 28 février 2008, 195-204.*
- Fortier, G., Vidament, M., Decraene, F., Ferry, B., Daels, P.F. 2002. The effect of GnRH antagonist on testosterone secretion, spermatogenesis and viral excretion in EVA-virus excreting stallions. *Theriogenology* 58 (2-4), 425-427
- Gökdal, O., Atay, O., Ulker, H., Yarali, E., Helva, I.B., Deavila, D.M., Reeves, J.J. 2009. GnRH or eCG treatment fails to restore reproductive function in GnRH immunized ewes. *Anim Reprod Sci.* ;112(3-4):251-60.
- Imboden, I., Janett, F., Burger, D., Crowe, M.A., Hässig, M., Thun, R. 2006. Influence of immunization against GnRH on reproductive cyclicity and estrous behavior in the mare. *Theriogenology* 66, 1866-1875.

- Iwamoto, H., Yoshida, A., Suzuki, H., Tanaka, M., Watanabe, N., Nakamura, T. 2009. A man with hypogonadotropic hypogonadism successfully treated with nasal administration of the low-dose gonadotropin-releasing hormone analog buserelin. *Fertil Steril.* ;92(3):1169
- Janett, F., Stump, R., Burger, D., Thun, R. 2006. Suppression of testicular function and sexual behaviour by vaccination against GnRH (Equity TM) in the adult stallion. *Anim Rep Sc* 115 : 88
- Levy, I., Duchamp, G. 2007. A single subcutaneous administration of buserelin induces ovulation in the mare: field data. *Reproduction in Domestic Animals* 42 (5), 550-554
- McDonnell, S.M., Diehl, N.K., Garcia, M.C., Kenney, R.M. 1989. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) affects precopulatory behavior in testosterone-treated geldings. *Physiology & Behavior* 45 (1):145-149 1989
- Prunier, A., Bonneau, M. 2006. Y a-t-il des alternatives à la castration chirurgicale des porcelets ? *Productions Animales*, 19 (5) : 347-356
- Roser, J.F. 1997. Endocrine basis for testicular function in the stallion *Theriogenology*. 1;48:883-92.
- Roser, J.F., Hughes, J.P. 1992. Dose-response effects of gonadotropin-releasing-hormone on plasma-concentrations of gonadotropins and testosterone in fertile and subfertile stallions. *Journal of Andrology* 13 :543-550 1992
- Sieme, H., Troedsson M.H.T., Weinrich, S., Klug, E. 2004. Influence of exogenous GnRH on sexual behaviour and frozen/thawed semen viability in stallions during the non-breeding season. *Theriogenology* 61, 159-171.
- Stout, T.A.E., Colenbrander, B., 2004. Suppressing reproductive activity in horses using GnRH vaccines, antagonists or agonists. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 633-643.
- Stout, T.A.E. 2005. Modulating reproductive activity in stallions: A review. *Animal Reproduction Science* 89 :93-103.
- Thompson, D.L. 2000. Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). *Animal Reproduction Science* 2;60-61:459-69. Review.
- Zitzmann M, Nieschlag E. 2000. Hormone substitution in male hypogonadism. *Mol Cell Endocrinol.* 161(1-2):73-88. Review