

EFFETS DE DEUX MODELES NUTRITIONNELS DEPUIS LA NAISSANCE SUR L'AGE DE L'APPARITION DE LA PUBERTE CHEZ LE CHEVAL DE SPORT

Par :

GUILLAUME D.¹; FLEURANCE G.²; DONABEDIAN M.³; ROBERT C.⁴; ARNAUD G.²; LEVEAU M.¹,
CHESNEAU D.¹, OTTOGALLI M.¹, SCHNEIDER J.¹, MARTIN-ROSSET W.³

¹ UMR 6175 INRA/CNRS/Université F. Rabelais de Tours/Haras Nationaux, 37380 Nouzilly, France

² Haras Nationaux, Station Expérimentale 19370 Chamberet, France

³ Centre de Recherche de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genes Champanelle, France

⁴ ENV Alfort, 94704 Maisons Alfort, France

*adresse actuelle : INRA centre de Clermont-Ferrand/Theix 63122 Saint Genes Champanelle

Résumé :

Chez les chevaux, la puberté survient vers 15 mois, mais avec une très forte variabilité. L'inactivité hivernale de reproduction masque l'apparition de la puberté, même si le sujet est potentiellement pubère. Les apports nutritionnels sont réputés avoir un effet sur la croissance et l'inactivité saisonnière. L'objectif de ce travail est donc d'estimer l'impact des apports nutritionnels sur l'âge de l'apparition de la puberté. Vingt trois poulains ont reçu, soit un niveau d'apports nutritionnels modéré (NM), soit un niveau d'apports élevé (NH) (Fleurance *et al* 2006) : 6 males (M) et 5 femelles (F) dans le lot NM et 5 M, 6 F dans le lot NH. Les plasmas sanguins ont été récoltés chaque mois, pendant la 1^{ère} année puis toutes les semaines. La progestérone a été dosée chez les F, la testostérone chez les M dans le but de déterminer l'âge à la puberté. Les F sont considérées comme pubères à la première ovulation; les M lorsque la testostérone dépasse 0,5 ng/ml pendant 4 prélèvements consécutifs. LH, GH et oestrogènes ont été également dosés. Les 6 F NH ont eu leur 1^{ère} ovulation à 393 ± 11 jours. Quatre F du NM ont leur 1^{ère} ovulation entre mai et juin à 415 ± 1 jours, la 5^{ème} F NM en avril de la 3^{ème} année à 700 jours. Ces résultats sont confirmés par les dosages de LH. La date moyenne de la puberté n'apparaît pas significativement différente entre les 2 lots. La testostérone et les œstrogènes ont des taux plus élevés chez les M-NH que chez les M-NM. La puberté survient à 529 ± 57 jours pour les M-NH et à 754 ± 30 jours pour les M-NM. Les taux de eGH sont supérieurs chez les NM par rapport à ceux du NH. Seule une pouliche du lot NM a sa puberté retardée d'une année en raison de l'effet de la saison. Pour les M l'effet du niveau des apports nutritionnels sur l'âge de la puberté est important et est systématiquement retardé d'un an en raison de l'effet de la saison sur le lot NM.

Mots-clés : chevaux, puberté, nutrition, hormones sexuelles

Summary :

In horses, puberty occurs around 15 months but with a large variability. The winter reproduction inactivity prevents the occurrence of puberty whereas the subject is potentially pubescent. Growth and seasonal inactivity are known to be affected by feeding level. The aim of this work was to estimate the effect of feeding level on the date of puberty. 23 saddle foals were fed either a moderate feeding level (ML) or a high feeding level (HL) (see Fleurance *et al* 2006 in this meeting): 6 males (M), 5 Females (F) in ML group and 5 M, 6 F in HL group. Plasma samples were collected monthly during the first year of life and weekly after. Assays of progesterone on F and testosterone on M were carried out in order to determine the age of puberty. F were considered pubescent at their first ovulation and M when concentrations of testosterone exceeded 0.5 ng/ml for 4 consecutive blood samples. LH, GH and oestrogens were also assayed. The 6 HL-F had their first ovulation at 393 ± 11 days of age. Four F of the ML group had their first ovulation from May to June of the first year at 415 ± 1 days, the 5th ML-F in April of the 2nd year at 700 days. These results are confirmed by LH assays. The date of puberty between the 2 groups does not appear statistically significant. The testosterone and oestrogens rates are higher for the HL-M than for the ML-M. The puberty occurred at 529 ± 57 days and 754 ± 30 days for the HL and ML groups respectively. The eGH rates were higher in ML than HL group. Only one filly of the group ML had its puberty delayed of one year due to the season effect. For the M, the effect of the feeding level on the age of puberty is important. In addition, the age of puberty is systematically delayed for one year by the season effect in the ML group.

Key-words: horses, puberty, nutrition, sexual Hormones

Introduction

Le poulain grandit très rapidement et atteint 80 % de sa taille adulte à la fin de sa première année (revue de Martin-Rosset 2001). Chez les équins très peu de laboratoires ont étudié la puberté ; en effet celle-ci intervient nettement avant l'âge auquel on souhaite mettre à la reproduction les chevaux de sport ou de course, à l'exception, peut être, des chevaux lourds élevés de façon extensive. La puberté a un déterminisme neuroendocrine et de nombreux points communs avec le déterminisme de la saison sexuelle. Elle survient quand le poulain a atteint 80 à 90 % de sa taille adulte, quand le développement des tissu adipeux a commencé. Comme chez l'enfant, la vitesse de croissance en taille diminue progressivement jusqu'à la puberté. A ce moment là, la vitesse de croissance s'accélère pendant quelques mois pour rapidement s'annuler. Chez les poulains femelles la date de la puberté correspond à celle de la première ovulation constatée par dosage de progestérone. Chez les poulains mâles, c'est un processus plus continu où l'élévation des taux de gonadotrophines précède celles des stéroïdes. Le critère le plus fiable semble être lorsque le nombre de spermatozoïdes éjaculés atteint 50 millions qui est précédé d'environ 1 mois par une brusque élévation de testostérone (Naden *et al* 1990). Ces 50 millions sont à comparer au 1 à 5 milliards de spermatozoïdes éjaculés par un jeune étalon entre 2 et 3 ans (Squires *et al* 1979).

Tableau 1 : Age de la puberté chez les poulains d'après différents auteurs

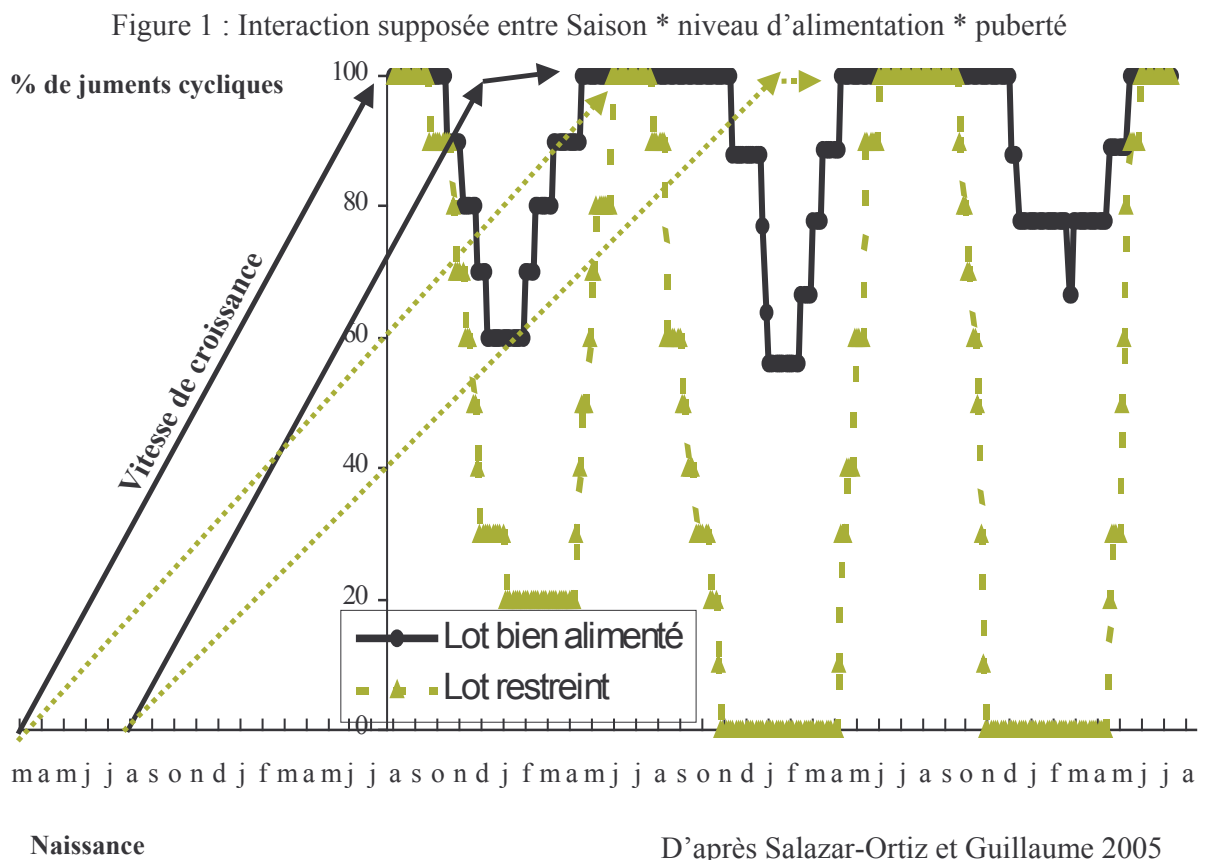
Auteurs	Sexe	Race	critère	Moment ou Age puberté
Skelton <i>et al</i> 1991	♀	Australian Stock Horses	Augmentation de P ₄	13,1 mois n= 4
Wesson et Ginther 1980	♀	Ponettes nées en Avril nées en Juin-sept	Augmentation de P ₄	Fin mai 13,5 mois n=6 11,2 mois n=5
Nogueira <i>et al</i> 1997	♀	Thoroughbred horses	Augmentation de P ₄	14,2 ± 1 mois n = 4
Camillo <i>et al</i> 2002	♀	Haflinger nées en hiver nées au printemps	Augmentation de P ₄	n = 8 14,0 mois 11,9 mois
Guillaume 1995 (com.per.)	♀	Welsh nées en Automne	Augmentation de P ₄	9,65 ± 0,2 mois n= 7 22,03 mois n=1
Naden <i>et al</i> 1990	♂	Quarter Horses	50 . 10 ⁶ spz/éjaculation	De 12,9 à 22,3 mois n=15
Melo <i>et al</i> 1998	♂	Pantaniero Horses	Fin de la période infantile	14.4 mois n=26
Skinner et Bowen 1968	♂	Welsh	Apparition des spz	11.5 à 14.5 mois n=4

(Progestérone : P₄, Spermatozoïdes : spz)

Dans les deux sexes, une très forte variabilité de l'âge à la puberté est observée. Cette variabilité peut s'expliquer par la saison de reproduction et la vitesse de croissance, dépendantes toutes deux du niveau des apports alimentaires. L'âge à la puberté classiquement admis est situé entre 12 et 18 mois. Il semble que des poulains bien nourris (au maximum de leur capacité de croissance) peuvent être potentiellement pubères vers 8 mois. Cette puberté ne pourra être observée que si elle survient pendant la fenêtre permise par le mécanisme de régulation de la saison de la reproduction (voir figure 1). Ainsi, une pouliche née au printemps pourra présenter sa 1ère ovulation au printemps suivant, vers 12 mois ; au contraire, une pouliche née en hiver présentera sa première ovulation non pas à la saison de reproduction suivante mais à son 2^{ème} printemps, à plus de 16 mois. Ce décalage dans l'apparition de la puberté, lié à la saison, peut être amplifié par le niveau des apports nutritionnels des pouliches. En effet, la fenêtre permise par le mécanisme de régulation de la saison de la reproduction est beaucoup plus étroite chez les juments maigres (Salazar-Ortiz *et al* 2005). Par contre un traitement de type photostimulation ne permet pas d'avancer la première ovulation des pouliches (Wesson et Ginther 1982). Il est donc clair que le jeune cheval doit être potentiellement pubère pour être sensible à l'effet saison.

Figure 1 : Les courbes représentent le % de juments adultes cycliques durant 3 ans (d'après Salazar-Ortiz et Guillaume, 2005). Les juments ayant une alimentation restreinte (ligne pointillée) présentent une inactivité ovarienne hivernale systématique et longue. Dans ce lot la "fenêtre" pendant laquelle les ovulations sont permises est donc de courte durée. Une pouliche née au printemps et bien alimentée aura donc, une croissance rapide et sera potentiellement pubère pendant la saison de reproduction qui suit sa naissance. Par contre une pouliche également bien alimentée mais née en été ou en automne sera potentiellement pubère pendant la phase d'inactivité et devra donc attendre la saison de reproduction suivante pour sa 1^{ère} ovulation. Une pouliche née au printemps et mal alimentée aura donc, une croissance lente et sera potentiellement pubère pendant l'inactivité ovarienne qui suit son premier anniversaire ; elle devra donc attendre la saison de reproduction suivante pour sa 1^{ère} ovulation. Une pouliche également mal alimentée mais née en été ou en automne sera potentiellement pubère pendant la saison de reproduction qui suit son deuxième anniversaire.

Figure 1: The curves show the % of cyclic mares during 3 years (Salazar-Ortiz and Guillaume, 2005). The mares with a restrained food (dotted line) have a systematic and durable winter ovarian inactivity. In this group the "window" in which the ovulations can take place is short. A filly born in spring and well fed, with quick growth will be potentially pubert during the next breeding season. Another filly born in summer or in autumn and well fed will potentially be pubert during the winter inactivity phase and had to wait the following breeding season. A restrained filly born in spring will be potentially pubert during the winter inactivity phase and will wait for the following breeding season. For the last case, a restrained filly born in summer or in autumn will be potentially pubert during the next breeding season.



Enfin, et ce malgré l'absence d'étude prenant en compte l'état nutritionnel, nous pouvons supposer l'existence d'un mécanisme comparable chez les mâles. Un poulain mâle ayant un apport alimentaire plus faible sera potentiellement pubère plus tardivement. La variation de l'âge à la puberté peut donc être considérable.

Il est clair que puberté et croissance interagissent entre elles : la croissance potentialise la puberté et la puberté stimule puis inhibe la croissance.

Pour l'action de la croissance sur la puberté, il semble que la leptine soit un des nombreux facteurs métaboliques qui permettent l'initiation de la puberté (Foster *et al* 1999). La leptine est l'hormone sécrétée par le tissu adipeux ; ses concentrations plasmatiques sont proportionnelles à l'état corporel du cheval (Buff *et al* 2002).

Inversement, pour l'action de la puberté sur la croissance, cette question n'a été abordée que très récemment, et seul un parallélisme entre ostéocytes et chondrocytes permet de suspecter le rôle des œstrogènes. Le rôle des œstrogènes a en effet été particulièrement étudié en vue de traiter l'ostéoporose primaire de la femme. Des données récentes confirment le rôle clé des œstrogènes. Le traitement d'enfants atteints de "central precocious puberty" consiste à bloquer celle-ci par des agonistes de GnRH. Lampit *et al* (2002) ont démontré que, durant cette thérapie, une vitesse de croissance normale est rétablie par une faible dose (8 µg/j) d'œstrogènes équin conjugués. Le Raloxifene est un modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes. Il agit comme un agoniste des œstrogènes sur la densité osseuse, mais comme un antagoniste des œstrogènes sur les tissus mammaires et utérins. Des lapines ovariectomisées et immatures sont traitées pendant 4 semaines avec du cypionate d'estradiol (E2), du raloxifene ou le véhicule. Le raloxifene agit comme un agoniste d'œstrogène sur le cartilage de conjugaison, accélérant sa sénescence et la fusion diaphyse-épiphyse (Nilsson 2003). Chez le jeune rat, Sibonga *et al* (2002) ont mis en évidence qu'avec des doses pharmacologiques le 2-Methoxyestradiol, un métabolite du 17beta-estradiol, inhibe l'élongation osseuse en réduisant le nombre de chondrocytes en cours de multiplication dans le cartilage de conjugaison et en accélérant l'apoptose des chondrocytes différenciés. Chez l'adolescent comme chez le poulain la croissance pubertaire semble jouer un rôle prédominant dans l'apparition des lésions d'ostéochondrose. Chez les poulains la même fenêtre de susceptibilité avant 11 mois existe et semble déterminée par le statut métabolique des chondrocytes (Barneveld et Van Weeren 1999).

En raison de la forte liaison entre croissance et puberté, notre objectif dans cette expérience est de mettre en évidence l'effet de l'alimentation sur l'apparition de la puberté chez des pouliches et des poulains. Par contre, les corrélations probables entre les taux hormonaux entre eux et la croissance n'ont pas été abordées.

1. Matériels et Méthodes

1.1. Animaux

Trente neuf animaux de races SF et AA ont été alimentés de 0 à 12 mois selon deux modèles nutritionnels décrits dans la communication de Fleurance *et al* 2006 (ce congrès) pour permettre aux animaux de réaliser une croissance maximale (NH) ou modérée (NM) selon INRA 1990. 16 animaux ont été euthanasiés pour étudier le statut ostéo-articulaire (Donabédian *et al* 2006, ce congrès). 22 animaux ont été mis à l'herbe de 12 à 18 mois en séparant Mâles (M) et Femelles (F). Les chargements (nombre animaux/ha) ont été ajustés pour permettre à 11 animaux NH et 11 animaux NM de réaliser encore une croissance maximale ou modérée respectivement. A partir de 18 mois les 11 animaux NH et les 11 animaux NM ont été rentrés en stabulation pour recevoir respectivement un niveau d'alimentation élevé (NH) ou modéré (NM) selon INRA 1990 pour leur permettre de maintenir une croissance maximale ou modérée respectivement jusqu'à la dernière prise de sang réalisée en Novembre 2005. Les 22 animaux sont nés entre le 26 mars et le 9 juin 2002. Six mâles nés en moyenne le 21 avril ± 7 jours et 5 femelles nées en moyenne le 22 avril ± 11 jours ont donc réalisé une croissance modérée (NM) ; 5 mâles nés en moyenne le 13 mai ± 9 jours et 6 femelles nées en moyenne le 7 mai ± 5 jours ont réalisé une croissance élevée (NH).

1.2. Prélèvements et dosages hormonaux

Les plasmas sanguins ont été récoltés (Vacutainer® héparinés Vecton-Dixon) sur les 22 animaux chaque mois pendant la première année, puis toutes les semaines jusqu'à la constatation de la puberté.

La progestérone a été dosée chez les femelles, par une méthode semi-quantitative (Terqui et Thimonier, 1974) pour déterminer la succession ou l'absence des cycles ovulatoires. Les juments étaient considérées en phase lutéale si la progestérone plasmatique était supérieure à 1 ng/ml, pendant au moins deux prélèvements successifs, ces taux étant généralement atteints 24 à 48 heures après l'ovulation (Palmer et Jousset 1975). Cette fréquence de prélèvements sanguins permet de schématiser l'activité ovulatoire des femelles en utilisant la succession ou l'arrêt des phases lutéales (Thimonier 2000).

La testostérone a été dosée chez les mâles dans le but de déterminer l'âge à la puberté. Le dosage est un dosage R.I.A. sans extraction. Ce dosage a récemment été validé sur le plasma de cheval (Bretin 2003). L'anticorps croise principalement avec la dihydrotestostérone (43%), l'andostènediol (4%), l'andostènedione (4%) et l'andostanediol (3%). Les coefficients de variation intra et inter dosages sont inférieurs à 10%. La limite de quantification est de 0.125 ng/ml. La corrélation entre le dosage avec extraction précédemment validé et celui-ci sans extraction est de 98%.

La LH et les œstrogènes totaux ont été dosés suivant des méthodes radio immunologiques préalablement décrites (Guillaume *et al* 2002 pour LH; Guillaume *et al* 2003 pour œstrogènes totaux). Pour les femelles, les

dosages ont été effectués uniquement sur les prises de sang précédant la première ovulation et sur la prise de sang suivant celle-ci ; pour les mâles sur l'ensemble des prises de sang.

La GH a également été dosée par une méthode radio immunologique décrite dans ce symposium (Guillaume *et al* 2006). L'ensemble des prélèvements a été dosé dans un seul dosage dont la variabilité intra dosage est pour chacune des 3 références internes inférieure à 10%.

Les femelles ont été considérées comme pubères à la première ovulation. Pour les mâles, un critère a priori a été choisi au vu des dosages hormonaux. Un mâle est considéré comme pubère lorsque la testostérone dépasse 0,5 ng/ml pendant 4 prélèvements consécutifs. La concentration de 0,5 ng/ml correspond à la plus basse concentration observée, dans notre dosage, sur des plasmas collectés en hiver sur des étalons adultes fertiles.

1.3. Analyse statistique

La comparaison statistique de l'âge à la puberté a été effectuée par une analyse de variance (SAS, procédure GLM).

Les concentrations hormonales (après transformation log) ont été comparés par une analyse de variance en données répétées réalisée avec le logiciel SAS (procédure GLM). Le modèle prend en compte les facteurs simples suivants : l'animal hiérarchisé dans le facteur traitement, l'intervalle de temps et les interactions appropriées.

2. Résultats

2.1. Femelles

Les courbes individuelles de progestérone des 11 pouliches sont présentées dans la figure 2. La courbe au haut du graphe provient d'une pouliche NM qui a dû être euthanasiée suite à une fracture accidentelle. Cette pouliche qui est la plus jeune de son lot, n'a pas présenté de cycle durant la première saison de reproduction, il n'a pas été tenu compte de ce résultat dans les statistiques. Les 6 femelles du lot NH ont leur 1^{ère} ovulation regroupée sur 2 mois, à un âge moyen de $392,7 \pm 11$ jours. Les 5 femelles du lot NM ont leur 1^{ère} ovulation dispersée sur 11 mois : 4 femelles de mai à juin de la 1^{ère} année, la 5^{ème} femelle nommée "Piscum" en avril de la 2^{ème} année soit une date moyenne sur les 5 femelles du lot de $472,2 \pm 57$ jours. Piscum est née l'avant dernière de son lot. La différence de date de la puberté entre les deux lots n'apparaît pas statistiquement significative ($p=0,09$).

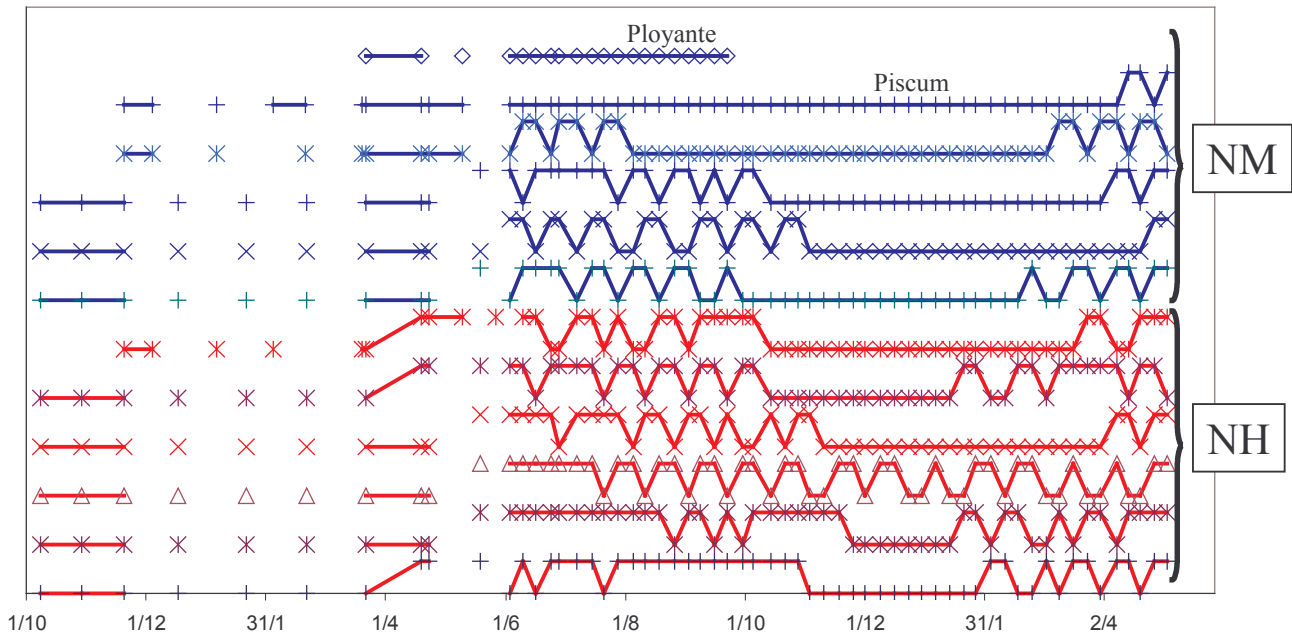
Au cours de l'hiver, où les pouliches atteignent deux ans, il est à noter qu'une pouliche du lot NH ne présente pas d'inactivité. Sur les femelles cycliques au cours de la première saison sexuelle et présentant une inactivité ovarienne hivernale, les dates moyennes du dernier taux élevé de progestérone sont dans le lot NH le 24 novembre $\pm 8,5$ jours et dans le lot NM le 20/9 ± 20 jours et les dates moyennes de la première ovulation de 20 février $\pm 16,5$ jours et 25 mars $\pm 11,5$ jours. Ces différences entre lots étant trop faibles, elles n'apparaissent pas significatives ($p=0,15$ et $p=0,13$ respectivement). Par contre la durée de l'inactivité qui est de 118 ± 20 jours dans le lot NH et de 186 ± 14 jours dans le lot NM, apparaît significativement différente d'un lot à l'autre ($p=0,03$).

Chez toutes les femelles, la montée d'œstrogènes précède la première ovulation comme chez une jument adulte. La jument Piscum présente un pic d'œstrogènes lors de sa première saison de reproduction qui n'est pas suivie par une ovulation.

Figure 2 : Chacune des courbes représente, pour chaque pouliche, l'alternance des phases lutéales et de croissance folliculaire ou d'inactivité ovarienne hivernale.

Figure 2: Each curve present, for each filly, the alternation of luteal phases and follicular growth phase or winter ovarian inactivity.

Figure 2 : courbe individuelle de progestérone



Un important accroissement des taux de LH est constaté avant la première ovulation. Il est à noter que la jument Piscum ne présente pas de pic de LH lors de sa première saison de reproduction mais un pic avant sa première ovulation lors de la saison de reproduction suivante.

2.2. Mâles

Les courbes moyennes de testostérone des 2 lots de poulains mâles sont présentées dans la figure 3. Les taux de testostérone entre 6 mois et 2 ans des mâles sont deux fois plus élevés chez les mâles du lot NH que chez les mâles du lot NM ($0,42 \pm 0,02$ ng/ml vs $0,23 \pm 0,02$ ng/ml $p < 0,0001$). Cette différence est également très forte au cours de leur première saison sexuelle, entre 11 mois et 19 mois ($0,38 \pm 0,02$ ng/ml vs $0,17 \pm 0,01$ ng/ml $p < 0,0001$ respectivement pour les lots NH et NM). Les 6/6 poulains du lot NH peuvent être considérés comme pubères avec une date moyenne de puberté au 23 novembre ± 53 jours soit à $17,3 \pm 1,9$ mois. Pour les mâles du niveau NM, la puberté survient en moyenne le 14 mai ± 34 jours à $24,7 \pm 1,0$ mois. Pour le poulain "Paradis Corrézien", le critère de puberté (taux plasmatique de testostérone supérieur à 0,5 ng/ml) n'a jamais été atteint; pour la comparaison statistique, la date de la dernière prise de sang lui a été arbitrairement affectée. La différence entre les deux lots est hautement significative ($p=0,01$).

Les courbes moyennes d'estrogènes des 2 lots sont présentées dans la figure 4. Dans chaque lot les courbes individuelles sont très semblables entre elles. Chez les NH, les taux montent très progressivement à partir de début juin, lorsque les poulains ont 1 an, puis beaucoup plus brutalement vers fin novembre. Le même type de courbe est observé chez les mâles du lot NM mais avec des taux moindres. La différence globale sur les concentrations d'œstrogènes plasmatiques, entre les deux lots est très significative ($p < 0,0001$).

Figure 3 : Les 2 courbes représentent la moyenne (\pm S.E.M.) pour chacun des 2 lots des taux de testostérone pour les poulains mâles.

Figure 3: The 2 curves show, for each group of males, the mean (\pm S.E.M.) of testosterone rate

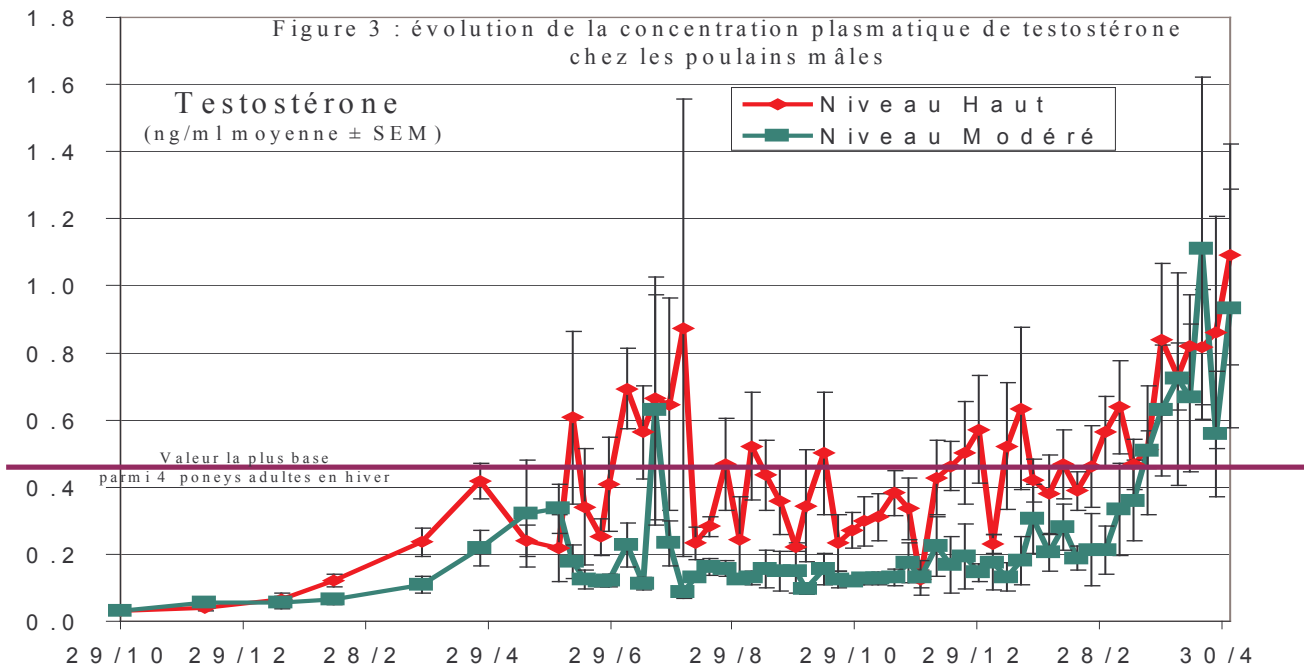
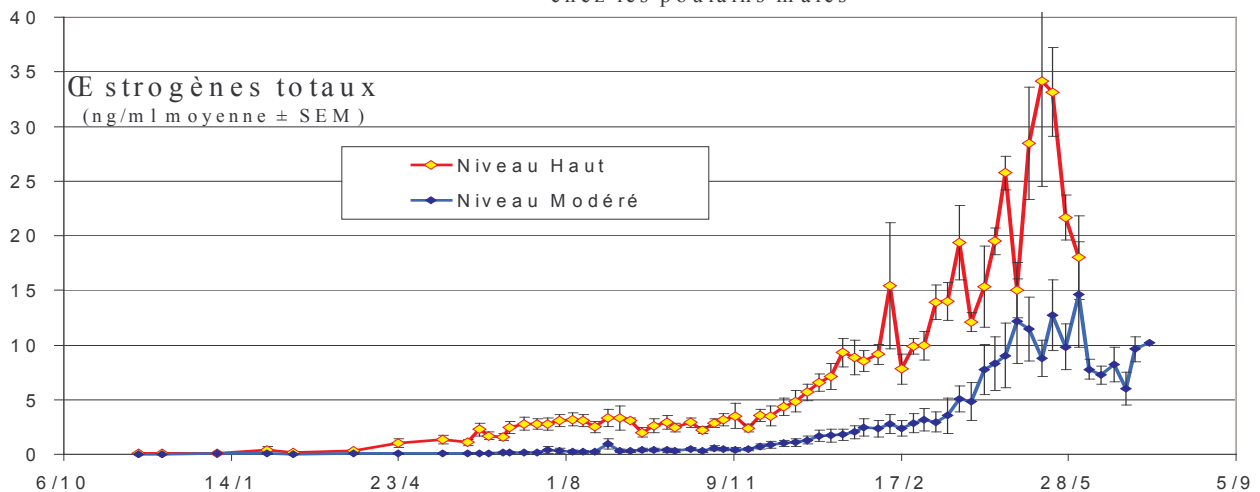


Figure 4 : Les 2 courbes représentent la moyenne (\pm S.E.M.) pour chacun des 2 lots des taux de oestrogènes totaux pour les poulains mâles.

Figure 4: The 2 curves show, for each group of males, the mean (\pm S.E.M.) of total oestrogen's rate

Figure 4 : évolution de la concentration plasmatique d'oestrogènes totaux chez les poulains mâles

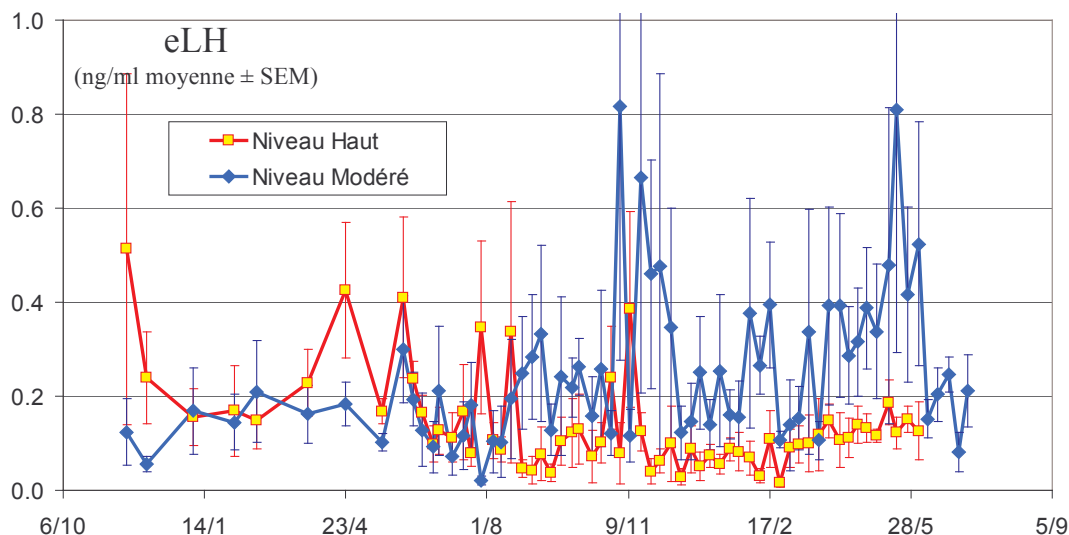


Les courbes moyennes de LH des 2 lots sont présentées dans la figure 5. Jusqu'à la puberté du lot NH, c'est ce lot qui présente les taux les plus importants. Puis, dans ce lot, passé la puberté les taux de LH s'effondrent, alors qu'ils augmentent dans le lot NM. Pour l'étude statistique, analyse de variance sur un modèle en données répétées, deux périodes ont été prises en considération, avant et après le 1^{er} janvier quand les poulains commencent leur 2^{ème} année. Les deux périodes et les deux lots ne diffèrent pas entre eux par contre l'effet de l'interaction lot*période est significatif ($p < 0.0001$). Dans le lot NH, la première période présente des taux de LH plus bas que dans la seconde ($p = 0,016$). Ces taux sont inversés dans le lot NM ($p = 0,0001$).

Figure 5 : Les 2 courbes représentent la moyenne (\pm S.E.M.) pour chacun des 2 lots des taux de eLH pour les poulains mâles.

Figure 5: The 2 curves show, for each group of males, the mean (\pm S.E.M.) of eLH rate.

Figure 5 : évolution de la concentration plasmatique de LH chez les poulains mâles



Les relations inter-variables entre les taux hormonaux et les courbes de croissance n'ont pas été abordées ici, néanmoins la figure 6 présente les taux des différentes hormones sexuelles de 2 poulains mâles caractéristiques de chaque lot. Chez ces 2 poulains, la LH présente une nette élévation des taux avant la montée des taux de testostérone et d'œstrogènes caractéristiques de la puberté. Chez l'ensemble des poulains du lot NH, les taux d'œstrogènes présentent un plateau au cours de leur première année, avant de rejoindre des taux d'adulte lors de la deuxième saison sexuelle.

Les taux de eGH présentés dans la figure 7 sont plus élevés ($p=0.0002$) chez les NM que chez les NH et plus élevés chez les femelles que chez les mâles ($p<0.0001$), l'interaction des traitements avec les sexes est significative ($p=0.048$) : les femelles NH ont des taux significativement inférieurs ($p<0.0001$) à tous les autres lots (mâles-NH, mâles-NM et femelles-NM).

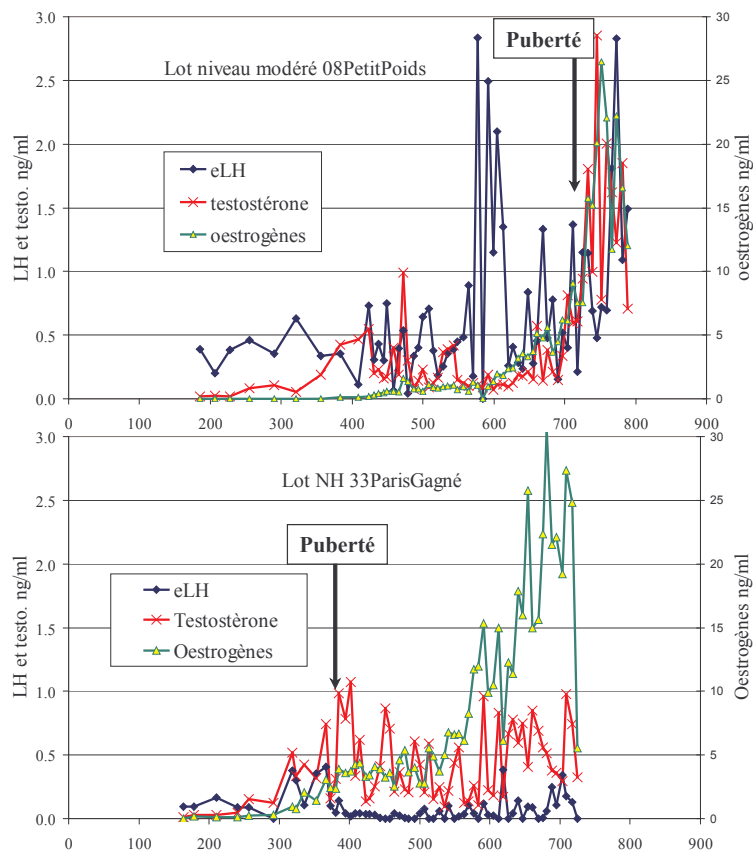
3. Discussion et conclusion

Dans les deux sexes, l'âge moyen à la puberté observé dans cette expérience est cohérent avec celui observé par les autres auteurs (Skelton *et al* 1991, Wesson et Ginther 1980, Nogueira *et al* 1997, Camillo *et al* 2002, Guillaume *et al* 1995, Naden *et al* 1990, Melo *et al* 1998, Skinner et Bowen 1968).

Figure 6 : Les 2 graphes représentent pour un poulain mâle caractéristique de chaque lot l'évolution des taux de eLH, testostérone et oestrogènes totaux.

Figure 6: The 2 graphs show for one characteristic male of each group the eLH, testosterone and oestrogen's rates.

Figure 6 : évolution de la concentration plasmatique de LH, testostérone et oestrogènes totaux chez 2 poulains mâles, en fonction de leur âge en jours



Chez les femelles, seulement deux pouliches, Piscum et Poyante, du lot NM n'ont pas présenté leur puberté lors de leur première saison sexuelle; c'était les 2 plus jeunes pouliches de l'expérience. Donc, ce report de la puberté d'un an, en raison de l'effet saison, ne peut pas être attribué avec certitude à l'état nutritionnel ou à l'âge. Globalement, l'âge à la puberté n'apparaît pas différent entre les 2 lots. Les femelles du lot NM ont probablement eu un niveau d'alimentation légèrement supérieur à celui induisant systématiquement un retard de puberté d'un an provoqué par l'effet saison.

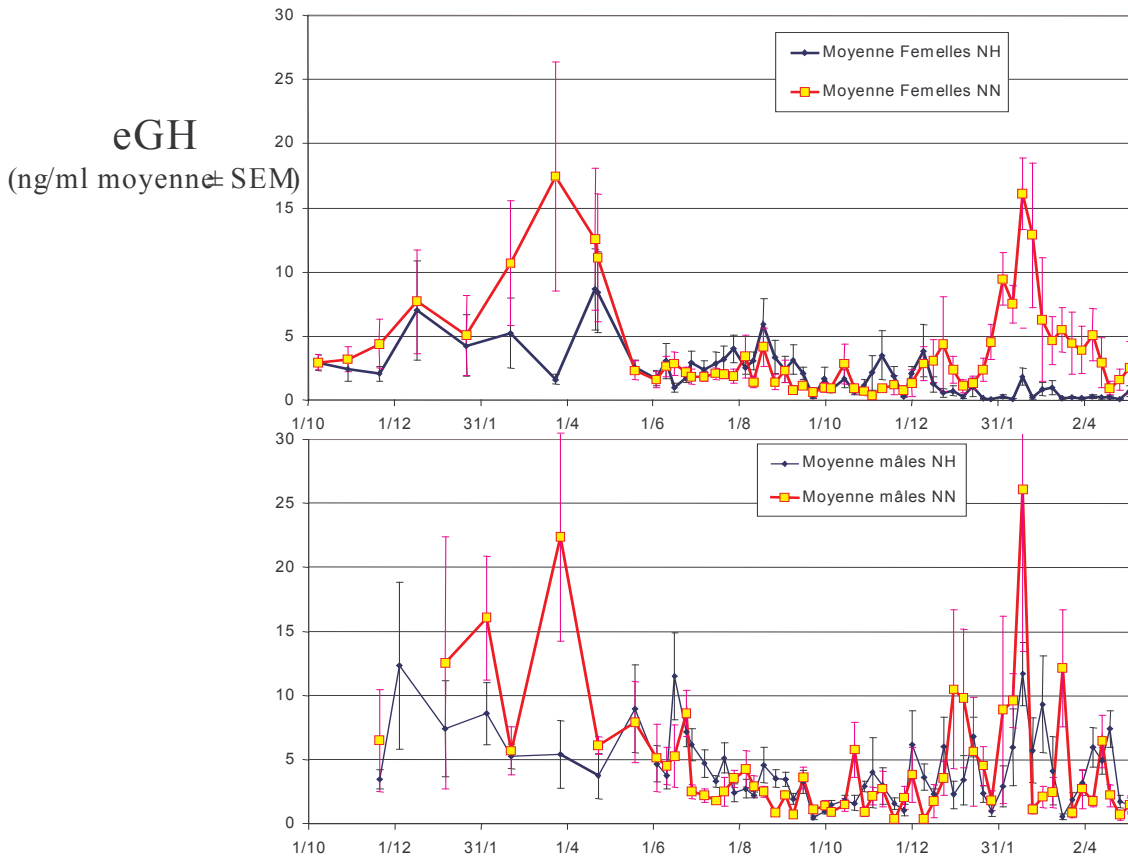
Chez les mâles, contrairement aux femelles la puberté apparaît de façon très progressive. Le seul critère absolu pour déterminer l'âge à la puberté serait la fertilité. Ce critère n'est malheureusement pas utilisable dans la pratique. Le critère choisi, basé sur les taux de testostérone supérieur à 0,5 ng/ml est relativement imparfait en raison de la présence de pics de sécrétion. Ce critère est néanmoins cohérent avec les autres critères hormonaux : taux de LH et d'oestrogènes. L'effet du niveau d'alimentation sur l'âge de la puberté des mâles, estimée par les taux de testostérone, apparaît très important puisque tous les poulains du lot NM ont présenté leur puberté retardée d'une saison sexuelle. Les taux hormonaux dans les deux lots n'évoluent pas de façon semblable. Dans le lot NH, la montée des taux de LH précédant la montée des taux de testostérone, semble plus faible que dans le lot NM. Dans le lot NH, les taux d'oestrogènes montent dès la puberté puis présentent un plateau durant presque un an avant de monter de façon très brutale pour rejoindre les taux très importants caractéristiques des mâles adultes de cette espèce. Les montées des taux de testostérone et d'oestrogènes sont approximativement synchrones ; ceci semble venir du fait que chez les Equidés les cellules de Leydig et de Sertoli expriment l'aromatase P_{450} transformant les androgènes en oestrogènes (Sipahutar *et al* 2003). Chez le mâle, l'installation de la puberté, d'un point de vue hormonal semble très progressive. Ceci est à rapprocher des transformations tissulaires survenant au niveau du testicule, au moment de la puberté, caractéristiques de cette espèce (Clemmons *et al* 1995; Staub *et al* 2002). La présence d'un plateau de sécrétion des oestrogènes chez les NH, avant la forte montée de ceux-ci au début de la seconde saison de reproduction, semble indiquer que la puberté dans ce lot s'est effectuée en deux étapes : une étape d'initiation lors de la 1ère saison sexuelle, puis un fonctionnement plus proche de celui de

l'adulte lors de la 2^{ème} saison sexuelle. Ce plateau serait probablement à relier aux troubles de l'ossification rapportés par Donabedian *et al* 2006 (dans ce congrès). Cela conforterait les résultats obtenus par Lemazurier *et al* (2002) qui observe une corrélation significative entre les taux d'œstrogènes totaux et des marqueurs de l'activité osseuse (osteocalcine, hydroxyproline, alcaline phosphatase).

Figure 7 : Les 2 courbes représentent la moyenne (\pm S.E.M.) pour chacun des 2 lots des taux de eGH totaux pour les poulains femelles dans le graphe du haut, pour les poulains mâles dans le graphe du bas.

Figure 7: The 2 curve show, for each group, the mean (\pm S.E.M.) of total eGH rate.

Figure 7 : évolution de la concentration plasmatique de GH chez les poulains femelles et mâles



Les taux de eGH chez le cheval adulte sont très fortement influencés par le niveau d'alimentation via le rétrocontrôle des IGFs (voir dans ce congrès, Guillaume *et al* 2006). La différence observée entre les deux lots, au cours des deux hivers et printemps successifs, atteste bien de l'effet de la différence du niveau des apports alimentaires entre ces deux lots. En revanche les taux de sécrétion sont très proches au cours de l'intervalle été-automne. Cet intervalle correspond à la période de pâturage où les deux niveaux de croissance ont été pourtant maintenus en mettant en œuvre deux chargements au pâturage bien différenciés pour offrir des quantités d'herbe différentes. Les différences de niveau d'apports alimentaires à long terme devraient se traduire par des taux de leptine très différents d'un lot à l'autre. Cette hormone, pour des raisons techniques, n'a pu être dosée pour cet article. Or cette hormone est une des principales clés du signal métabolique permettant d'induire la puberté (Foster *et al* 1999).

Remerciements

Les auteurs tiennent particulièrement à remercier : l'équipe des installations de la station expérimentale des Haras Nationaux de Chamberet pour la conduite d'élevage des poulains au cours de l'étude ainsi que Dr A.F. Parlow (NIH-NHPP USA) pour les standards de eLH et de eGH, Dr Y. Combarous (INRA PRC) pour la fourniture de l'anticorps Anti-eCG.

Bibliographie

- Barneveld A, Van Weeren PR, 1999. Conclusions regarding the influence of exercise on the development of the equine musculoskeletal system with special reference to osteochondrosis. *Equine Vet J Suppl.* 1999 Nov;(31):112-9. Review.
- Bretin T. 2003. Validation d'un dosage radioimmunologique direct de testostérone chez le cheval. Mémoire de BTS "Anabiothec" PRC INRA 37380 Nouzilly.
- Buff PR, Dodds AC, Morrison CD, Whitley NC, McFadin EL, Daniel JA, Djiane J, Keisler DH, 2002. Leptin in horses: tissue localisation and relationship between peripheral concentrations of leptin and body condition. *J.Anim. Sci* 80:2943-2948.
- Camillo F., Vannozi I., Rota A., Panzani D., Illuzy A., Guillaume D., 2002. Age at puberty, cyclicity, clinical response to PGF₂ and hCG and GnRH and embryo recovery rate in yearling mares. 8th International Symposium on Equine Reproduction, Colorado USA. *Theriogenology* 6642, Abst; 627.
- Clemmons AJ, Thompson DL Jr, Johnson L. 1995. Local initiation of spermatogenesis in the horse. *Biol Reprod*, 52: 1258-1267
- Donabedian M, Robert C, Fleurance G, Perona G, Trillaud-Geyl C, Lepage O, Bergero D, Léger S, Martin-Rosset W. 2006. Effets de deux modèles nutritionnels sur le statut osteoarticulaire du cheval de sport au cours de la première année postnatale. In 32^{ème} Journée de la Recherche Equine, 1 mars, Paris, édition : Les Haras Nationaux 16 rue Claude Bernard 75231 Paris Cedex; (ce congrès).
- Fleurance G, Donabédian M, Perona G, Trillaud-Geyl C, Léger S, Robert C, Bergero D, Lepage O, Martin-Rosset W. 2006. Effet de deux modèles nutritionnels sur la croissance et le développement au cours de la première année postnatale du cheval de sport. In 32^{ème} Journée de la Recherche Equine, 1 mars, Paris, Edition : Les Haras Nationaux 16 rue Claude Bernard 75231 Paris Cedex; (ce congrès).
- Foster DL, Olster DH, 1985 Effect of restricted nutrition on puberty in the lam: patterns of tonic luteinizing hormone (LH) and competency of the LH surge system. *Endocrinology* 116: 375-381.
- Foster DL, Nagatani S. 1999. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction : role in timing puberty. *Biology of reproduction* 60:205-215
- 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 mare. *Reprod Nutr Dev* 42:251-64.
- Guillaume D, Chavatte-Palmer P, Combarous Y, Duchamp G, Martinat N, Nagy P, Daels PF, 2003. Induced lactation with a dopamine antagonist in mares: different responses between ovariectomized and intact mares. *Reprod Domest Anim* 38:394-400.
- Guillaume D, Palmer E, Thimonier J. 1995 Effect of a quick alternation of long days and short days on young mares cyclicity. (Communication. personnelle).
- Guillaume D, Salazar-Ortiz J, Chesneau D, Popot MA, Leveau M. 2006. Taux circulants de l'hormone de croissance chez le cheval adulte. 32^{ème} Journée de la Recherche Equine, 1 mars, Paris, édition : Les Haras Nationaux 16 rue Claude Bernard 75231 Paris Cedex; (ce congrès).
- INRA 1990. Alimentation des chevaux. Ed W Martin-Rosset , INRA Editions, Paris, 232.
- Lampit M, Golander A, Guttmann H, Hochberg Z, 2002. Estrogen mini-dose replacement during GnRH agonist therapy in central precocious puberty: a pilot study. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism* 87:687-690
- Lemazurier E, Toquet MP, Fortier G, Séralini GE, 2002. Sex steroids in serum of prepubertal male and female horses and correlation with bone characteristics. *Steroids* 67: 361-369.
- Martin-Rosset W., 2001 Croissance osseuse chez le cheval. In 27^{ème} Journée Recherche Equine Paris, 7 mars, Ed. Haras Nationaux, Paris, 73 – 100.
- Melo MIV, Sereno JRB, Henry M, Cassali GD. 1998. Peripuberal sexual development of Pantaneiro stallions. *Theriogenology* 50: 727-737.
- Naden J, Amann RP, Squires EL, 1990, Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* 88: 167-176
- Nilsson O, Falk J, Ritzen M, Baron J, Sävendahl L. 2003 Raloxifene acts as an estrogen agonist on the rabbit growth plate. *Endocrinology* 144: 1481-1485

Nogueira GP, Barnabe RC, Verreschi ITN, 1997. Puberty and Growth rate in Thoroughbred Fillies. *Theriogenology* 48: 581-588.

Palmer E, Jousset B, 1975. Urinary Oestrogen and Plasma Progesterone Levels in Non-Pregnant Mares. *Journal of Reproduction and Fertility* .Suppl. 23:213-221.

Salazar-Ortiz J., Guillaume D 2005. La date de la première ovulation annuelle de la jument, peut-elle être avancée en agissant sur la ration alimentaire à partir de l'automne ? 31^{ème} Journée de la Recherche Equine, 2 mars, Paris, édition : Les Haras Nationaux 16 rue Claude Bernard 75231 Paris Cedex; 69-81.

Sibonga JD, Sommer U, Turner RT. 2002 Evidence that 2-methoxyestradiol suppresses proliferation and accelerates apoptosis in normal rat growth plate chondrocytes. *J Cancer Res Clin Oncol* 128: 477-483

Sipahutar H, Soudaine P, Moslemi S Plainfossé B Séralini GE. 2003 Immunolocalisation of aromatase in Stallion leydig Cells and seminiferous tubules. *Journals of Histochemistry* 51:311-318

Skelton KV, Dowsett KF, McMeniman NP, 1991. Ovarian activity in fillies treated with anabolic steroids prior to the onset of puberty. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 44: 351-356.

Skinner JD, Bowen J, 1968. Puberty in the Welsh Stallion *Journal of Reproduction and Fertility* 16: 133-135.

Squires EL, Pickett BW, Amann RP. 1979. Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 27: 7-12.

Staub C, Heninger NL, Donnelly CL, Forrest DW, Blanchard TL, Love CC, Varner DD Johnson L. 2002. Apoptosis during the initiation of equine spermatogenesis. *Theriogenology* 58: 367-371.

Terqui M, Thimonier J, 1974. New rapid radioimmunologic method for estimation of plasma progesterone. Application to early diagnosis of gestation in the ewe and goat. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 279:1109-12.

Thimonier J, 2000. Progesterone Level Analysis for the Determination of the Physiological Status of Female Farm Animals. *Productions Animales* 13(3): 177-183.

Wesson JA, Ginther OJ, 1980. Puberty in the female Pony: Reproduction behavior, ovulation and plasma gonadotrophin concentrations. *Biology of Reproduction* 977-986.

Wesson JA, Ginther OJ, 1981. Influence of season and age on reproductive activity in Pony mares on the basis of a slaughterhouse survey. *Journal of Animal Science* 52: 119-129.

Wesson JA, Ginther OJ, 1982. Influence of photoperiod on puberty in the femal Pony. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 32: 269-274.

Yeton SM, Foster DL, 1985 Alternate photoperiods time puberty in the female lambe. *Endocrinology* 116: 2090-2097.