



44^{ème} Journée de la Recherche Équine
Jeudi 15 mars 2018

Induction de l'ovulation chez la jument par le beta-Nerve Growth Factor

F. Reigner¹, P. Barrière¹, T. Blard¹, M. Bouvier¹, F. Derouin², A. Duittoz²

¹ Unité Expérimentale Animale de l'Orfrasière (UEPAO) – Centre INRA Val de Loire – 37380 Nouzilly

² Physiologie de la Reproduction et des Comportements (PRC) INRA U85, CNRS UMR7247, Université de Tours, IFCE – Centre INRA Val de Loire – 37380 Nouzilly

Résumé

Le beta Nerve Growth Factor (β -NGF) est un facteur de croissance impliqué dans la croissance, la survie et la prolifération des neurones. Récemment, le β -NGF a été identifié comme étant l'Ovulation Inducing Factor (OIF) chez l'alpaga. L'effet du β -NGF sur l'ovulation implique une augmentation de la sécrétion de la Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). Par des approches *in vitro* chez la souris, nous avons aussi montré que le β -NGF augmente l'activité électrique spontanée des neurones à GnRH, suggérant que ce mécanisme pourrait être conservé chez des espèces à ovulation spontanée. Dans l'étude présentée ici, nous avons testé l'hypothèse que le β -NGF pourrait déclencher l'ovulation chez la jument. Nous avons testé le β -NGF dans un protocole d'induction d'ovulation chez six ponettes de race Welsh. Nous avons montré que l'administration de β -NGF 1,5 μ g/kg induisait l'ovulation avec un délai moyen de 3,6 jours, soit un jour de plus que chez les ponettes induites par le Chorulon[®]. Ce délai plus long pourrait être dû au mécanisme d'action du β -NGF qui agirait à l'étage hypothalamique alors que le Chorulon[®] agit directement sur l'ovaire.

Mots clés : Jument, ovulation, β -NGF, hCG, GnRH

Summary

Beta Nerve Growth Factor (β -NGF) is a growth factor involved in neuronal axon growth, survival and proliferation. It was recently discovered that β -NGF; the main protein in Alpaca's seminal plasma is the Ovulation Inducing Factor (OIF). The effect of β -NGF involves the stimulation of Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) secretion leading to the pre-ovulatory Luteinizing Hormone (LH) surge. Electrophysiological recordings from mouse GnRH neurones maintained *in vitro* showed that β -NGF stimulated spontaneous electrical activity. These results suggest that β -NGF could be effective in species with spontaneous ovulation. Thus, we hypothesize that β -NGF could induce ovulation in mares. In the present study, we tested β -NGF in an ovulation induction protocol in Welsh pony mares. Administration of β -NGF 1.5 μ g/kg induced ovulation within 3.6 days, one day more than with Chorulon[®]. This longer delay could be attributed to the fact that β -NGF acts at the hypothalamic level whereas Chorulon[®] acts directly on the ovary.

Key-words: Mare, Ovulation, β -NGF, hCG, GnRH



Introduction

Chez les mammifères, le modèle couramment accepté d'induction de l'ovulation prévoit une augmentation de la sécrétion de Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) qui conduit à un pic pré-ovulatoire de GnRH. Celui-ci va entraîner un pic de sécrétion de l'hormone hypophysaire gonadotrope Luteinizing Hormone (LH) responsable de la maturation du follicule et de l'ovulation (pour revue Duittoz & Prévot, 2015). L'initiation du pic pré-ovulatoire de GnRH est provoquée par l'action d'un neuropeptide hypothalamique, la kisspeptine (Kp). Néanmoins ce modèle ne correspond pas à ce qui est observé chez certaines espèces de mammifères dites « à ovulation provoquée ». En effet, chez les mammifères, on distingue les espèces à ovulation spontanée, chez qui l'ovulation est déclenchée spontanément au cours de l'oestrus même en l'absence de congénères mâle, et les espèces à ovulation provoquée où le follicule préovulatoire persiste ainsi que le comportement d'oestrus jusqu'à l'accouplement avec le mâle. Chez l'alpaga et d'autres camélidés comme le dromadaire, l'ovulation est induite lors de l'accouplement par un facteur présent dans le liquide séminal, le beta-Nerve Growth Factor (β -NGF), qui va stimuler la sécrétion de GnRH (Silva *et al.*, 2011, Ratto *et al.*, 2012, Kershaw-Young *et al.*, 2012.).

Notre hypothèse de travail est que chez les espèces à ovulation spontanée, le système à Kp jouerait un rôle principal dans le contrôle de l'ovulation, mais que le système impliquant le β -NGF serait toujours présent et fonctionnel. Le cas particulier de l'espèce équine offre un modèle d'étude intéressant. En effet, chez cette espèce, la Kp, bien qu'efficace pour stimuler la sécrétion de LH et FSH, est inefficace pour induire l'ovulation même à des doses 100 fois supérieures (Decourt *et al.*, 2014, Duittoz *et al.*, 2017). L'espèce équine, bien qu'étant classée dans les espèces à ovulation spontanée, présente des caractéristiques qui suggèrent qu'elle puisse avoir un statut intermédiaire.

La maîtrise du moment de l'ovulation permet d'optimiser l'insémination des juments. La durée de l'oestrus qui précède l'ovulation est en moyenne quatre jours chez les juments et cinq jours chez les ponettes, mais une grande variabilité existe (deux à dix jours). Il est donc impossible de prévoir le moment de l'ovulation en se basant seulement sur des critères comportementaux. Le suivi échographique hebdomadaire permet de détecter l'ovulation *a posteriori*, mais c'est une méthode lourde et coûteuse qui n'est pas abordable pour de nombreux éleveurs. L'induction de l'ovulation est donc une étape importante pour augmenter les chances de réussite de l'insémination. Actuellement, seuls trois produits ont une AMM (autorisation de mise sur le marché) chez la jument. Nous les classons selon leur mode d'action.

- Les agonistes de la gonadotropin releasing hormone (GnRH) :

Le Receptal[®] et l'Ovuplant[®] agissent en amont de l'hypophyse pour stimuler la sécrétion endogène de lueine luteinizing hormone (eLH) et ainsi provoquer l'ovulation. Le Receptal[®] est administré par voie intramusculaire (IM), intra-veineuse (IV) ou sous cutanée (SC), lorsque le follicule dominant atteint un diamètre de 33-35 mm. Deux protocoles sont recommandés par l'IFCE : quatre injections intraveineuses (IV) toutes les douze heures ou trois injections IV toutes les six heures. L'Ovuplant[®] est un implant qui doit être posé en sous cutané, en général au niveau vulvaire, mais il est recommandé de retirer l'implant après l'ovulation car il y a un risque de prolonger la durée du cycle en absence de fécondation. L'ovulation est obtenue en 40-43h. L'utilisation de ces deux spécialités commerciales demande beaucoup de manipulations des animaux (injections multiples ou pose et dépose d'implant). Compte tenu de ces divers inconvénients, de nombreux éleveurs et vétérinaires se sont tournés vers une spécialité humaine, le Supréfact[®], dont le principe actif, la buséréline, est le même que pour le Receptal[®]. Le Supréfact[®] utilisé en une seule injection IV à forte dose (0,5 mg), s'est avéré aussi efficace que les autres spécialités vétérinaires (Lévy & Duchamp, 2007). Son coût était beaucoup moins élevé que ses équivalents vétérinaires, mais sa commercialisation en médecine humaine a été arrêtée en 2016.

- Les gonadotropines :

Elles agissent directement sur les ovaires. Le Chorulon[®] est une spécialité humaine dont le principe actif est la human Chorionic Gonadotropine (hCG) qui présente une activité de type LH. Elle est administrée en injection unique par voie IV (1000-1500 UI) et induit l'ovulation dans les 36-38 heures. Son inconvénient majeur est qu'en tant qu'hormone d'origine humaine, elle va induire une réaction immunitaire chez la jument qui entraîne la production d'anticorps neutralisants. Il est recommandé de n'utiliser le Chorulon[®] qu'une seule fois par saison de reproduction.

Ainsi, actuellement, les éleveurs et les vétérinaires ne disposent d'aucun traitement d'induction de l'ovulation chez la jument facile à utiliser et utilisable de façon répétée durant la saison de reproduction. Il est donc souhaitable d'identifier de nouvelles stratégies pour faire face à cette difficulté.



L'objectif scientifique de cette étude était de démontrer que le β -NGF pouvait induire l'ovulation chez la ponette.

1 Matériel et Méthodes

1.1 Animaux

Six ponettes de race Welsh et de poids moyen 341 ± 15 kg (moyenne \pm erreur standard de la moyenne) ont été utilisées dans un dispositif en carré latin avec deux répétitions et un facteur à trois modalités. Toutes les expériences ont été réalisées entre mai et août 2017. Les animaux étaient hébergés en stabulation durant la journée avec paille et eau à volonté et au pré durant la nuit.

1.2 Traitements

Chaque animal recevait les trois traitements selon un ordre tiré au hasard. La modalité "cycle naturel" correspond au témoin négatif où les ponettes sont suivies à partir d'une taille de follicule de 33 mm de diamètre jusqu'à l'ovulation, sans recevoir de traitement inducteur. La modalité "hCG" correspond au témoin positif où les ponettes reçoivent une injection IV de 1500 UI Chorulon®. La modalité " β -NGF" correspond au traitement à tester. Les animaux reçoivent une injection IM de $1,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ de β -NGF. Le β -NGF injecté est la forme humaine recombinante produite à partir de la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary), un modèle de cellules de mammifères, qui permet de synthétiser les protéines recombinantes en conservant les caractéristiques de protéines de mammifères (glycosylation etc...) qui sont indispensables à leur fonction (SinaBiological, Pékin, Chine).

1.3 Suivi échographique

Les ponettes étaient échographiées tous les matins grâce à un échographe Exapad couplé à une sonde linéaire rectale 7,5MHz (ECM, Angoulême, France). Lorsque le diamètre du follicule dominant atteignait 33 mm (entre 33 et 36 mm), le traitement était administré en fonction du tirage au sort. La croissance folliculaire ainsi que l'état de la muqueuse utérine (œdème) étaient suivis tous les jours pendant 48h puis trois fois par jour jusqu'à l'ovulation (8h, 12h, 17h).

1.4 Lutéolyse

Cinq jours après ovulation, les ponettes recevaient une injection IM de Cloprostenol (Estrumate® 125 μg , voie IM). Le suivi échographique reprenait quatre jours après.

1.5 Analyse statistique

L'ensemble de nos analyses statistiques a été réalisé sous le logiciel R version 3.3.2 (RStudio, 2015) à l'aide des packages *lme4*, *car*, *lsmeans* et *GraphR*. Les variables "temps entre l'injection et l'ovulation", « diamètre du follicule à l'ovulation », « diamètre du follicule à l'induction » ont été analysées avec des modèles de type Linear Model Mixte (LMM). Pour chacun de ces modèles l'effet du traitement a été testé. La variable « individu » a été considérée comme une variable à effet aléatoire. La normalité des variables a été vérifiée avec la méthode des *qq plot* et l'homoscédasticité des variables a été testée à l'aide d'un test de Levene. L'ensemble de ces vérifications nous a permis de valider les conditions d'utilisation du modèle évoqué précédemment. Enfin des tests post hoc de Tukey ont été réalisés pour détecter précisément les différences entre les traitements.

2 Résultats

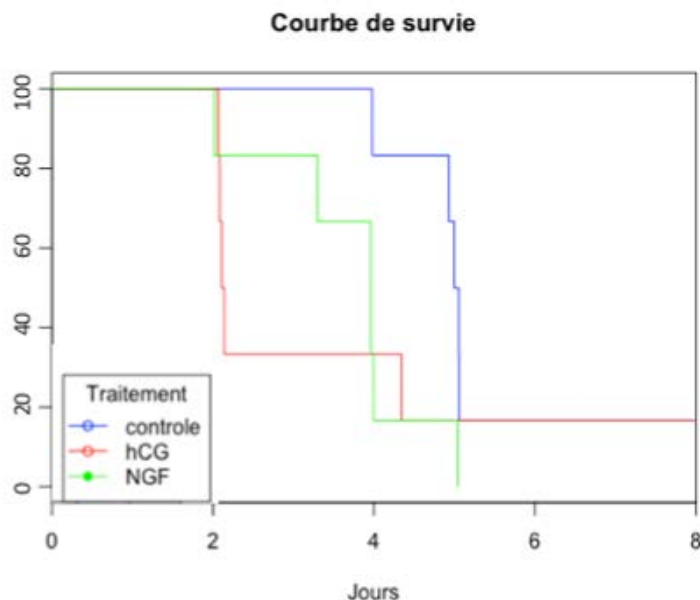
Tous les résultats sont exprimés en : moyenne \pm erreur standard. La taille moyenne du follicule au moment de l'induction était de $34,1 \pm 0,5$ mm, sans différence significative entre les groupes. L'intervalle entre l'injection de β -NGF et l'ovulation est de $3,6 \pm 0,4$ jours, cinq ponettes sur six ont répondu. L'injection d'hCG a permis d'obtenir l'ovulation en $2,5 \pm 0,4$ jours mais n'a marché que dans quatre cycles sur six. En effet, une ponette n'a pas ovulé plus rapidement qu'en cycle naturel et une autre a développé un follicule lutéinisé. Pour les cycles naturels, l'intervalle entre le jour où le follicule mesure 33-35mm et l'ovulation est de $5,7 \pm 0,9$ jours (figure I). L'analyse de variance montre un effet global des traitements d'induction sur l'ovulation par rapport aux cycles naturels ($p \leq 0,01$), l'analyse post-hoc montre un effet significatif du Chorulon® (hCG) sur le délai de l'ovulation par rapport aux cycles naturels ($p \leq 0,001$) et une tendance pour le β -NGF ($p = 0,063$).



Par contre il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le délai induction-ovulation induit par le Chorulon® et celui induit par le β -NGF ($p=0,39$) (figures I et II).

Figure I : Représentation en courbe de survie du pourcentage de ponette n'ayant pas ovulé en fonction du temps et des traitements.

Figure I: Survival plot representing the percentage of mares having not ovulated

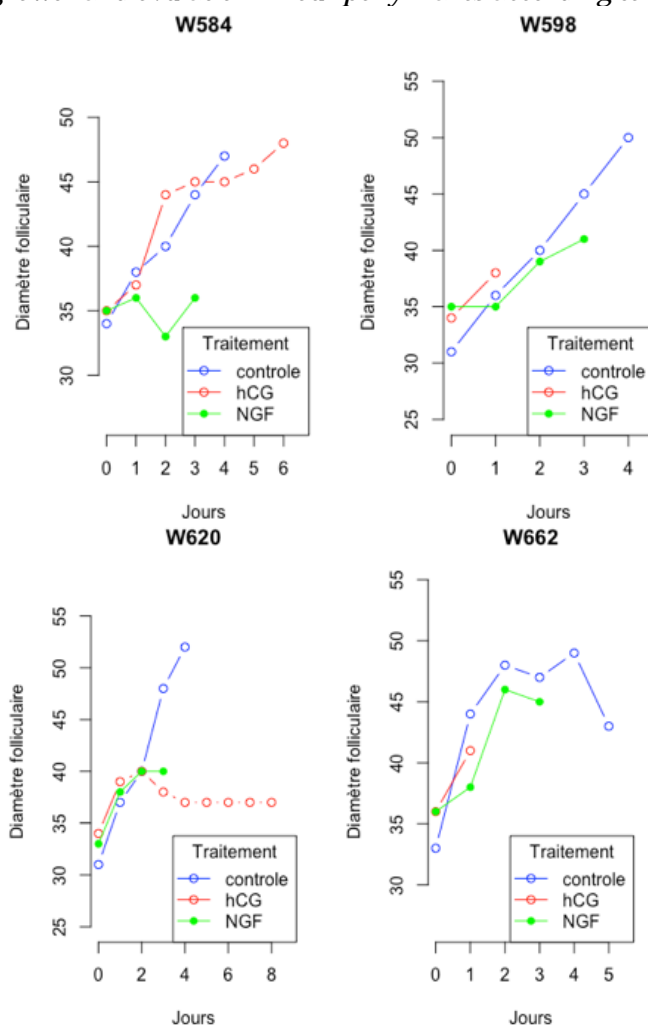


Cette représentation en courbe de survie permet de visualiser le moment de l'ovulation après traitement (Jour 0). Les traitements hCG (Chorulon®) et β -NGF induisent l'ovulation avant l'ovulation spontanée (contrôle). A noter l'absence d'ovulation pour une ponette après Chorulon® (hCG) alors qu'elle ovulé spontanément, et a ovulé en 48h avec le β -NGF (numéro W620).

Le diamètre moyen du follicule lors de l'ovulation était de $47,5 \pm 1,5$ mm pour les cycles naturels, $39,6 \pm 1,4$ mm pour les cycles induits par le Chorulon®, et $40,0 \pm 1,3$ mm pour les cycles induits par β -NGF. Il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les diamètres à l'ovulation pour les cycles induits par le Chorulon® (hCG) ou au β -NGF ($p=0,97$), mais il y a une différence statistiquement significative de diamètre à l'ovulation entre les cycles induits par le Chorulon® ($p \leq 0,001$) et le β -NGF ($p \leq 0,001$) et les cycles naturels (figure III et table 1).

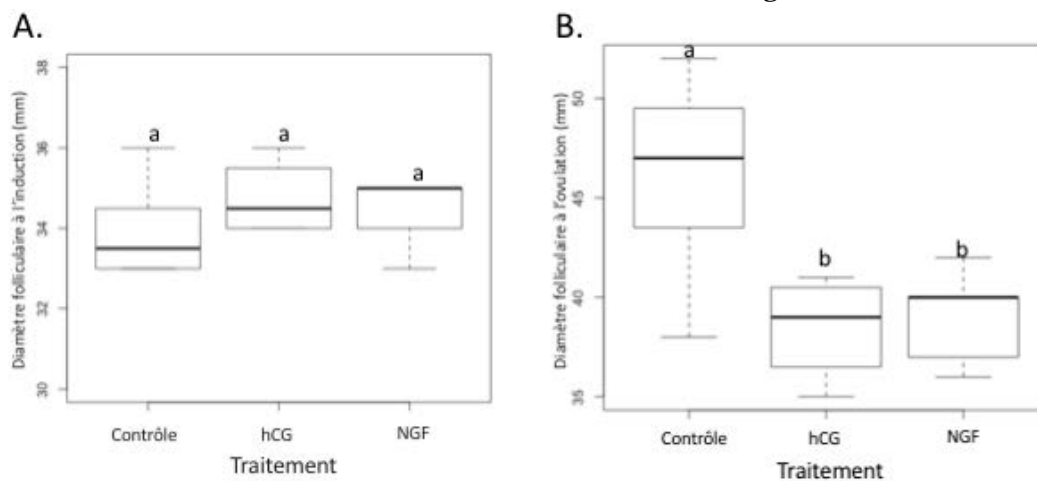


Figure II : Croissance folliculaire et ovulation pour quatre ponettes selon les trois modalités de traitement.
 Figure II: Follicular growth and ovulation in four pony mares according to treatment's modalities



Ces traces individuelles montrent les réponses de quatre ponettes aux trois modalités de traitement. La ponette W620 a eu un follicule lutéinisé suite à l'injection de Chorulon.

Figure III : Diamètre folliculaire à l'induction et à l'ovulation selon les trois modalités de traitement.
 Figure III: Follicular diameter at induction and ovulation according to treatment's modalities



A. Représentation en boîte à moustache du diamètre du follicule dominant au moment de l'induction pour les cycles traités par l'hCG (Chorulon) et par le β -NGF, ou bien le jour correspondant à J0 avec un follicule entre 33 et 36 mm pour les cycles contrôles. Les mêmes lettres indiquent des valeurs non statistiquement différentes. B. Représentation en boîte à moustache du diamètre du follicule dominant



mesuré avant la constatation de l'ovulation pour les cycles traités selon les trois modalités. Les lettres différentes indiquent des valeurs statistiquement différentes.

Tableau 1 : Valeurs des diamètres folliculaires à l'induction, à l'ovulation et du délai entre induction-ovulation selon les modalités de traitement

Table 1: Follicular diameters at induction and ovulation and interval induction-ovulation according to treatment 's modalities

	Diamètre folliculaire à l'induction ou au jour de référence (mm)	Diamètre folliculaire à l'ovulation (mm)	Délai jusqu'à l'ovulation (jours)
Cycle naturel	31,3 ± 1,6 ^a	47,5 ± 1,5 ^a	5,7 ± 0,9 ^a
hCG (Chorulon [®])	34,6 ± 0,3 ^a	39,6 ± 1,4 ^b	2,3 ± 0,3 ^b
β-NGF	34,6 ± 0,4 ^a	40,0 ± 1,3 ^b	3,6 ± 0,4 ^{a,b}

Tableau récapitulatif des résultats : diamètre du follicule dominant au moment de l'induction ou bien pour les cycles contrôle, diamètre du follicule au jour pris comme référence pour calculer le délai jusqu'à l'ovulation, diamètre du follicule dominant mesuré avant l'ovulation (mm), délai écoulé entre l'induction et l'ovulation (jours). Des lettres différentes signifient des valeurs statistiquement différentes (moyenne ± écart standard de la moyenne)

3 Discussion - Conclusion

Ces résultats montrent que le β-NGF est capable d'induire l'ovulation chez la jument. La dose utilisée de 500µg par ponette, soit environ 1,5µg/kg, est une dose dix fois inférieure à celle qui a été utilisée chez l'alpaga (Ratto *et al.*, 2012). Chez cette espèce les auteurs ont injecté directement du plasma séminal par voie IM, la concentration moyenne en β-NGF par ml de plasma séminal permet de retrouver la dose équivalente utilisée. Nous avons choisi la dose de 1,5µg/kg et la voie IM à partir de données obtenues pharmacologiques *in vitro* et de données pharmacocinétique par voie IV *in vivo*. L'analyse pharmacocinétique du β-NGF administré par voie IV montre une demi-vie de moins de cinq minutes, nous avons alors choisi la voie IM pour l'essai d'induction de l'ovulation. L'étude pharmacologique *in vitro* de l'effet du β-NGF sur l'activité électrique des neurones à GnRH de souris montre que le récepteur basse affinité P75^{NTR} du β-NGF est impliqué. La concentration efficace qui permet d'obtenir 50% de l'effet maximal (EC50) est de 75nM (Pinet-Charvet *et al.*, 2015). Le dosage du β-NGF en cinétique après administration IM nous permettra de savoir si des valeurs proches de l'EC50 sont obtenues et pendant combien de temps.

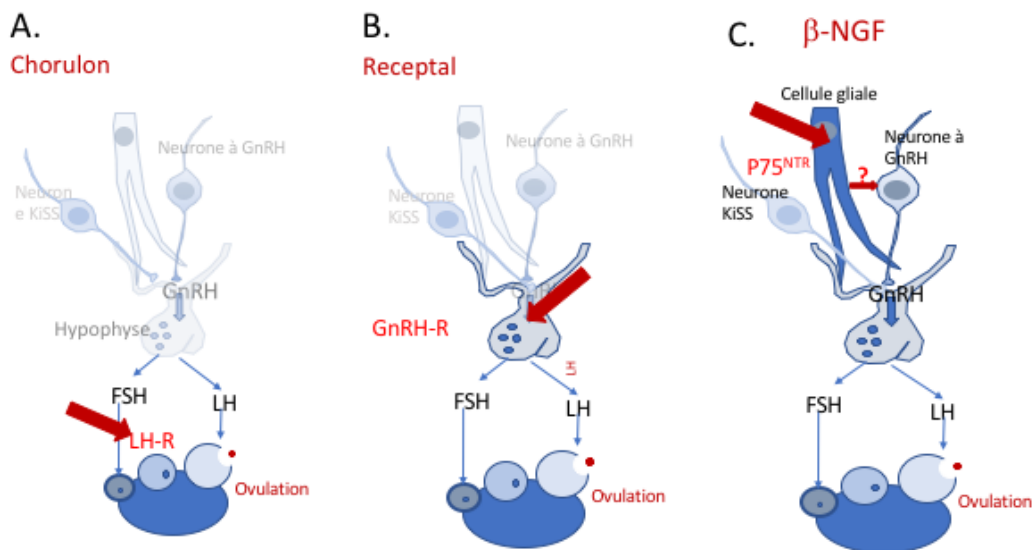
La taille du follicule avant ovulation chez les juments induites au β-NGF est la même que celle chez les juments induites par l'hCG. Elle est significativement inférieure à la taille du follicule avant l'ovulation chez ces mêmes juments lors d'un cycle naturel au cours de la même période. Ce résultat montre que le β-NGF a bien eu un effet d'induction de l'ovulation.

Le délai entre l'induction et l'ovulation chez les juments traitées par le β-NGF est de 3,6 jours soit un jour de plus que chez les juments traitées au Chorulon[®] (hCG). Ce délai plus long peut s'expliquer par le mécanisme d'action du β-NGF. En effet, elle agit au niveau cérébral en stimulant la sécrétion endogène de GnRH, qui va à son tour stimuler la sécrétion endogène de LH, alors que l'hCG remplace la sécrétion endogène de LH. Les résultats obtenus chez la souris suggèrent que le β-NGF agit sur des cellules gliales du microenvironnement des terminaisons des neurones à GnRH. Le facteur glial qui agit sur les neurones à GnRH n'est pas connu, mais de nombreuses études ont montré l'importance des cellules gliales dans la régulation de l'activité des réseaux neuronaux (Duittoz 2014 pour revue, Pinet-Charvet *et al.*, 2015) (figure IV).



Figure IV : Schéma résumant les modes d'actions du β -NGF et de l'hCG (Chorulon) sur l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique

Figure IV: Schematic representation of mechanisms involved in β -NGF and hCG (Chorulon) actions on hypothalamo-hypophysio-gonadic axis



Représentation schématique des niveaux d'action sur l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique des traitements d'induction de l'ovulation. A. Le Chorulon (hCG) agit directement sur les récepteurs à la LH (LH-R) sur le follicule dominant de l'ovaire en court-circuitant l'hypophyse et l'hypothalamus. Le Receptal, un agoniste GnRH, agit sur les récepteurs au GnRH au niveau hypophysaire et provoque un pic de sécrétion de LH qui va entraîner l'ovulation par une action sur le follicule. C. Le β -NGF agirait via des récepteurs de type P75^{NTR} exprimés par le microenvironnement glial des neurones à GnRH. Les cellules gliales agirait sur les neurones à GnRH en favorisant la sécrétion de GnRH ce qui va stimuler un pic endogène de LH et l'ovulation.

Le mode d'action du β -NGF représente un nouveau paradigme pour l'induction de l'ovulation. Les traitements actuels d'induction de l'ovulation reposent sur l'utilisation d'hormones ou de molécules synthétiques à activité hormonale à fortes doses qui entraînent une stimulation supra-physiologique pouvant conduire à des échecs liés à la désensibilisation des récepteurs. Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats sur un plus grand nombre d'animaux, de déterminer la dose et la voie optimales et de rechercher des agonistes spécifiques.

En conclusion, la signalisation du β -NGF représente une piste intéressante pour d'induire l'ovulation chez la jument, mais aussi chez d'autres espèces, en respectant la physiologie par une stimulation hypothalamique de la sécrétion endogène de GnRH.

Remerciements

Les auteurs souhaitent remercier l'IFCE pour son soutien financier du programme NOVO, l'INRA, le CNRS et l'université de Tours, pour le soutien matériel et humain.

Les auteurs souhaitent tout particulièrement remercier Yvan Gaude, Thierry Gascogne, Aurélie Meunier de l'UEPAO pour leurs soins attentifs aux animaux, Stéphanie Martinet de la PRC pour son aide technique.

Les auteurs souhaitent remercier aussi les Docteurs Catherine Viguié et Béatrice Roques pour leur analyse des données pharmacocinétiques IV.



Références

- Decourt C, Caraty A, Briant C, Guillaume D, Lomet D, Chesneau D, Lardic L, Duchamp G, Reigner F, Monget P, Dufourny L, Beltramo M, Dardente H. (2014) Acute injection and chronic perfusion of kisspeptin elicit gonadotropins release but fail to trigger ovulation in the mare. *Biology of Reproduction*. 90(2): 36.
- Duittoz A. (2013) Sécrétion pulsatile de GnRH et synchronisation neuronale. *Médecine Clinique Endocrinologie et Diabète*. 62: 1-7.
- Duittoz AH (2014) La plasticité neurogliale des réseaux neuroendocrines. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 167 (1): 71-78.
- Duittoz, A.H, Cognié, J., Decourt C., Derouin, F., Forestier A., Lecompte F., Bouakkaz A., Reigner F. (2017) The horse: an unexpected animal model for (unexpected) neuroendocrinology. In *Model Animals in Neuroendocrinology: from Worm to Mouse to Man. Master Class series. In press*.
- Duittoz AH & Prévot V (2014) Gonadotropin hormone relasing hormone (GnRH): structure, développement des neurones à GnRH, neuroanatomie et sécrétion. *La reproduction animale et humaine. 3^{ème} édition. Editeurs Saint-Dizier M et Chastant-Maillard S. Editeur Quaé, Paris*
- Kershaw-Young, C. M., Druart, X., Vaughan, J., & Maxwell, W. M. C. (2012). β -Nerve growth factor is a major component of alpaca seminal plasma and induces ovulation in female alpacas. *Reproduction Fertility and Development*. 24(8): 1093–1097
- 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.
- Pinet-Charvet C, Duittoz A. (2015) \square -NGF regulates GnRH neurones activity. *Joint meeting of the Société de Neuroendocrinologie Française and British Society of Neuroendocrinology, 10-13 September Lille France*
- Pinet-Charvet, C., Geller, S., Desrozières, E., Ottogalli, M., Lomet, D., Georgelin, C., et al. (2016). GnRH Episodic Secretion is altered by pharmacological blockade of gap junctions: possible involvement of glial cells. *Endocrinology*, 157(1): 304–322.
- Ratto, M. H., Leduc, Y. A., Valderrama, X. P., van Straaten, K. E., Delbaere, L. T. J., Pierson, R. A., & Adams, G. P. (2012). The nerve of ovulation-inducing factor in semen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(37): 15042–15047.
- Silva, M. E., Smulders, J. P., Guerra, M., Valderrama, X. P., Letelier, C., Adams, G. P., & Ratto, M. H. (2011). Cetrorelix suppresses the preovulatory LH surge and ovulation induced by ovulation-inducing factor (OIF) present in llama seminal plasma. *Reproduction Biology Endocrinology*. 9: 74-83.