



## Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 12193

**To cite this version :**

Merle, Delphine. *Comparaison de la réponse en termes de sécrétion de LH à la gonadoréline, à la buséréline et à la léciréline chez des génisses Prim'Holstein*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 60 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: [staff-oatao@inp-toulouse.fr](mailto:staff-oatao@inp-toulouse.fr).

# COMPARAISON DE LA RÉPONSE EN TERMES DE SÉCRÉTION DE LH À LA GONADORÉLINE, À LA BUSÉRÉLINE ET À LA LÉCIRÉLINE CHEZ DES GÉNISSES PRIM'HOSTEIN

---

THESE  
pour obtenir le grade de  
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement  
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

*par*

**MERLE Delphine**

Née, le 24 avril 1990 à AUXERRE (89)

---

**Directeur de thèse : Mme Véronique GAYRARD**

---

## JURY

PRESIDENT :

**M. Jean PARINAUD**

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

**Mme Véronique GAYRARD**

**Mme Nicole HAGEN**

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Professeur à l'École Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

**Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt  
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE**

**Directeur** : M. Alain MILON

**PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE**

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

**PROFESSEURS 1° CLASSE**

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

**PROFESSEURS 2° CLASSE**

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

**PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE**

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

**MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE**

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*  
Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*  
Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*  
Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*  
Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*  
M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*  
M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

**MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)**

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*  
Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*  
Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*  
Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*  
Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*  
M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*  
M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*  
M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*  
Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*  
Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*  
M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*  
Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*  
M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*  
M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*  
Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*  
Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*  
M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*  
M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*  
Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*  
M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*  
M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*  
Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*  
Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*  
Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*  
M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*  
Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*  
M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*  
M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*  
Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

**MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS**

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*  
M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*  
Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

**ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS**

- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

# Remerciements

A notre jury de thèse,

**Monsieur le Professeur Jean Parinaud**

Professeur des Universités

*Laboratoire de Biologie de la Reproduction*

*Hôpital Paul de Viguier*

**Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.**

**Hommages respectueux.**

**Madame Véronique Gayrard-Troy**

Professeur à L'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*

**Qui nous fait l'honneur de diriger cette thèse.**

**Pour sa disponibilité et ses conseils tout au long de l'élaboration de ce travail. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de ma respectueuse considération.**

**Madame le Professeur Nicole Hagen-Picard**

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

*Pathologie de la Reproduction*

**Qui a accepté d'être notre assesseur de thèse.**

**Pour sa disponibilité et ses conseils tout au long de l'élaboration de ce travail. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de ma respectueuse considération.**

**Au laboratoire Vétoquinol**, qui a financé une partie de ce travail, pour m'avoir permis de réaliser cette étude, et tout particulièrement à Guillaume Lhermie pour son aide précieuse. Sincères remerciements.

## Dédicaces

A **mes parents**, qui m'ont lancé dans l'aventure, qui m'ont permis de réaliser ce que je voulais depuis toujours, sans s'imposer, à qui je dois le sale caractère sans lequel je ne serais pas là, et qui savent que les dédicaces, ce n'est pas mon fort... Merci.

A **Mathieu et Anne**, mon frère et ma sœur préférés. Que serais-je sans vous ? A **Zoé et Romain** - ma nièce et mon neveu préférés – pour que vous sachiez que les rêves, ça se réalise. A **Alex**, pour rendre ta petite famille heureuse.

A **Papi et Mamie**, je vous aime fort. A **Jean-François, Catherine et Jean-Marc**, merci pour tout.

A la **famille côté Bounan**, cette joyeuse bande de fous et cette ribambelle de cousins qui égayent ma vie. On ne s'ennuie jamais avec vous.

A ma famille d'adoption, **Alice, Christophe, Victor, Aroma, Alex et Dani**. Merci de votre accueil chaleureux.

A **Claire**, pour une amitié qui dure depuis si longtemps et qui, je le sais, n'est pas prête de s'éteindre. Merci pour ta spontanéité, ta joie de vivre, ton débit imbattable, ta naïveté. Impossible d'exprimer tous nos souvenirs en si peu de lignes... J'aime partager des moments avec toi : risquer ma vie à des jeux (combien de doigts ais-je perdu dans des parties sanglantes ?), voyager, discuter, faire la fête, randonner ou boire un coup... Merci. Par pitié, reste fatiguée encore très longtemps, et surtout, raconte nous des histoires.

A **Camille**, ma coloc de toujours. Pour ton soutien en prépa, nos fous rires, nos craquages, les cafés et le Toblerone du dimanche. Pour l'amitié que l'on a partagé dès lors, puis à l'école et, maintenant, dans la vie active. Que dire de plus ? Merci pour ta présence, ta gentillesse, ton incapacité profonde à crier (une petite pensée aux *tuyas*...), pour ta patience et, aussi, pour ta salopette.

A **Clément**. A l'histoire d'amour incomprise entre Froufrou et Gazelle, à ta manière si pointue de regarder les gens, à ta compagnie à l'école et à ton côté grognasse... Mais surtout, au *concept de l'olive*. Bon courage pour l'internat !

A **Tifenn**, Mme Sutton s'il vous plaît ! La Bretonne du South Dakota, curieux mais attachant mélange... A notre road trip Californien, a ton fort gabarit et à mes étagères. A **Landon**, que j'aime et déteste à la fois car tu nous l'as enlevée ! Vivement le mariage français, plein de bonheur à vous deux.

A **Mathieu Baron**, THE Mathieu Baron, M. le Président, le sale Parisien. Vive la Coloc'scopie, les poils, les débats et les nœuds pap', merci pour ton rire communicatif et ta folie. Et, à contrecœur, pour tes petites PIQUES !

A **Simon**, pour ta patience envers Claire qui deviendra proverbiale ! Pour l'Aveyron, la pêche, les bides et, surtout, pour Pedro. Merci !

A **Charlotte**, pour ces années, la bobo et en particulier pour ce lendemain de remise des diplômes... à la désoxyméthylcellulose.

A **Greg**, le géant au grand cœur. Pour ton amour de la bouse, des boums et de la musique. Aux GTV, aux cliniques, aux apéros et à notre colocation partielle. Bravo, en quelques mois tu es presque Toulousain !

A **Chloé** la pouffe écouine, pour ton enthousiasme à toute épreuve et ton rire de folle, bonne chance pour la suite et à très bientôt !

A **Delphine** et **Gwen**, mes poulottes de cœur. Profitez à fond de l'école et de Toulouse ! L'an prochain c'est votre tour... déjà.

A mes amis Palois : **Guillaume, Thomas, Amandine, Christophe, Pauline, Manue, les Camille** et les autres... Aux **Patators**, et en particulier aux frères Slayki. Bon vent à tous, où que vous soyez.

Aux **sales bovins**, grâce à qui ma cinquième année a été à la fois instructive et festive ! Merci en particulier à oohhhh Vincente, Philou, Anaïs et Onya, Fanny, Marguerite, Jérémie, Julie, Elise, et Elsa Simon et Samuel les tutorés. Bon vent à tous et à bientôt j'espère... Merci aux professeurs, et n'oublions pas p'tit Laurent, responsable de la moitié de nos fous rires !

A mes colocs Ensatiens d'adoption, et **Camille** en particulier, t'as pris non ?? Aux autres Ensatiens avec qui j'ai passé de si bons moments. A très bientôt j'espère !

Aux **Morues**, aux grosses, aux moins grosses, et aux grosses refoulées ; à la douche, les zinzins, et cet esprit d'équipe qui fait tout donner. A mes nombreuses chevilles perdues dans la bataille. A Beauvais. Et, à **mes coachs**, Pons, Hugues, Darty, Mathieu, Dugland, Bastien et Rémi, qui ont entretenu ou entretiennent la tradition du meilleur club de l'ENVV. Merci du fond du cœur.

A **mes Docteurs et mes copromos d'inté**, quelle inté éreintante mais parfaite, quel week-end inoubliable et quelle lancée dans la vie étudiante vous m'avez offert ! Merci encore.

A **Clément, Camille, Hugo, Charlotte, Chloé, Flora, Tifenn, Salim et Lucien**, mon groupe de week-end d'inté, mais cette fois-ci, côté docteurs ! A **Gwen, la Rousse, Fanny, Manon, Baptiste, Estelle, Couchouche, Ciska et JB**, côté poulots. Dommage qu'il n'ait pas eu lieu, ce paintball, on maitrisait bien la position !

Au **Jungle**, à vos caractères épatants et différents, et pourtant une si bonne entente pendant toutes ces années. Ne changez rien !

A la **promo Trouillet**, promo tout sauf fantôme dans mon cœur !

Aux **GORs de la Revue 2012**, je suis fière d'avoir participé avec vous à cette folle aventure de stress, d'investissement, de répets, de rires et de nuits blanches !

Au **Cercle**. Impossible de comptabiliser le nombre d'heures que j'ai bien pu y passer ! A midi, au zinzin ou en boum... un pan entier de ma scolarité.

Aux **cliniques vétos qui m'ont accueilli en stage**, Nay, Riom-ès-Montagnes et Varzy en particulier. Merci à **Nicolas** pour ton amitié et pour m'avoir donné plus que jamais envie de travailler, dans la bouse de préférence.

A **toute l'équipe de Montemboeuf et Roumazières**, pour me laisser me jeter au boulot sans toujours savoir comment faire, tout en m'épaulant. Merci de m'avoir fait confiance !

A **Pierre et Simon**, pour votre aide à la réalisation de cette thèse, toujours dans la bonne humeur. Parfaite équipe, merci à vous deux !

A **Félix**, pour une histoire de plus de 7 ans déjà, une succession de marches côte à côte et de coups de gueule, de voyages sur-étudiés et de plans foireux, de soirées film et de randos super champions, de tensions et de compréhension mutuelle muette, de petites piques et d'immenses attentions, de routine et de surprises mais en tout cas, de partage : une tranche de vie, loin d'être terminée. Pour le petit garçon que tu es toujours et que tu resteras, qui m'exaspère et me fait rire à la fois. Pour nos différences si complémentaires parfois, pour nos caractères si dissemblants, mais qui finalement s'accordent. Pour le bonheur si simple de se savoir connue à fond, de ne pas avoir besoin de mentir, de faire semblant.

Vivement qu'on se retrouve ensemble pour de bon, il reste beaucoup à vivre.

## Table des matières

Table des figures .....	11
Table des tableaux.....	11
Liste des principales abréviations utilisées .....	13

## PARTIE I : PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET UTILISATION DES ANALOGUES DE LA GNRH..... 15

### **1. Rappels de physiologie de la reproduction chez la vache..... 15**

#### **1.1. L'axe gonadotrope..... 15**

1.1.1. Hypothalamus et GnRH ..... 15

1.1.2. Hypophyse, LH, FSH et effets ovariens ..... 16

1.1.3. La régulation du couple GnRH-LH..... 18

1.1.3.1. Par l'œstradiol ..... 18

1.1.3.2. Par la progestérogène ..... 19

#### **1.2. La croissance folliculaire..... 20**

1.2.1. Les follicules..... 20

1.2.2. Les vagues de croissance folliculaire..... 21

#### **1.3. Le cycle œstral..... 23**

1.3.1. La phase folliculaire ..... 23

1.3.2. L'ovulation ..... 24

1.3.3. La phase lutéale ..... 28

### **2. Utilisation pratique chez la vache des analogues de la GnRH: la gonadoreline, la buséreline et la léciréline..... 30**

#### **2.1. Caractéristiques des molécules ..... 30**

#### **2.2. Effets sur la sécrétion de LH d'une injection d'analogue de la GnRH en fonction de la phase du cycle œstral..... 30**

2.2.1. En phase folliculaire..... 30

2.2.2. En phase lutéale..... 32

#### **2.3. Utilisations indiquées dans le RCP (Résumé des caractéristiques du Produit) ..... 33**

2.3.1. Traitement des kystes folliculaires (toutes les molécules) ..... 33

2.3.2. Traitement au moment de l'Insémination Artificielle pour les femelles à ovulation nulle ou retardée (toutes les molécules) ..... 34

2.3.3. Traitement de l'anoestrus *post-partum* (buséreline seulement) ..... 35

#### **2.4. Utilisations hors RCP ..... 35**

2.4.1.	Synchronisation des chaleurs sur des femelles cyclées : les protocoles GPG.....	35
2.4.2.	Amélioration de la survie embryonnaire par la GnRH administrée 11 - 14 jours après l'Insémination Artificielle .....	37

## **PARTIE II : MATERIEL ET METHODES..... 38**

### **1. Animaux et conditions expérimentales ..... 38**

#### **1.1. Animaux..... 38**

#### **1.2. Logement et alimentation ..... 38**

#### **1.3. Surveillance des vaches..... 38**

#### **1.4. Pathologies et traitements concomitants..... 39**

### **2. Protocole expérimental ..... 39**

#### **2.1. Analogues de la GnRH utilisés..... 39**

#### **2.2. Schéma expérimental..... 40**

##### **2.2.1. Habituation et pré-synchronisation des chaleurs ..... 40**

##### **2.2.2. Constitution des groupes et définition des séquences ..... 40**

##### **2.2.3. Schéma expérimental d'une période ..... 41**

##### **2.2.4. Chronologie de l'étude expérimentale..... 42**

#### **2.3. Surveillance des chaleurs..... 42**

#### **2.4. Prélèvements et observations ..... 42**

#### **2.5. Dosages hormonaux..... 43**

### **3. Base de données ..... 44**

### **4. Analyses statistiques ..... 44**

## **PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION ..... 46**

### **1. Résultats..... 46**

#### **1.1. Dynamique ovarienne..... 46**

#### **1.2. Effet des différentes GnRH sur les concentrations plasmatiques en LH ..... 47**

### **2. Discussion ..... 51**

#### **2.1. Aspects méthodologiques ..... 51**

#### **2.2. Discussion des résultats..... 52**

#### **2.3. Intérêts et perspectives de l'étude ..... 53**

### Références bibliographiques ..... 56

## Table des figures

<u>Figure 1</u> : Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire et du système porte hypothalamo-hypophysaire .....	16
<u>Figure 2</u> : Contrôle de la stéroïdogénèse par les hormones hypothalamiques dans le follicule préovulatoire bovin (Hansel et Convey, 1983) .....	17
<u>Figure 3</u> : Les vagues de croissance folliculaire, d'après Roche 1996.....	23
<u>Figure 4</u> : Schéma récapitulatif des vagues folliculaires (exemple de 3 vagues par phase folliculaire) et des concentrations hormonales moyennes de LH et progestérone chez la vache au cours des différentes phases du cycle œstral.....	29
<u>Figure 5</u> : Représentation schématique du protocole GPG Ovsynch®.....	36
<u>Figure 6</u> : Chronologie des différentes périodes et des étapes clés de l'étude .....	42
<u>Figure 7</u> : Planning des prélèvements sanguins et des échographies ovariennes effectués au cours d'une période .....	43
<u>Figure 8</u> : Evolution temporelle des concentrations plasmatiques de LH (ng/mL) après une administration intramusculaire de 100 µg de gonadoréline, de léciréline à la dose de 25 et de 50 µg et de 10 µg de buséréline chez 12 génisses Prim'Holstein .....	48
<u>Figure 9</u> : Représentation schématique d'un protocole PreSynch-OvSynch® .....	53

## Table des tableaux

<u>Tableau 1</u> : Caractéristiques des follicules ovariens pré-antraux et antraux chez la vache .....	20
<u>Tableau 2</u> : Synthèse bibliographique concernant les concentrations maximales de LH au pic préovulatoire chez des génisses Holstein en cycles naturels .....	25
<u>Tableau 3</u> : Synthèse bibliographique concernant les concentrations maximales de LH au pic préovulatoire chez des génisses Holstein dont le cycle ovarien est contrôlé.....	26
<u>Tableau 4</u> : Synthèse bibliographique concernant les concentrations maximales de LH au pic préovulatoire chez des vaches Holstein adultes dont le cycle ovarien est contrôlé .....	27
<u>Tableau 5</u> : Synthèse bibliographique concernant les concentrations maximales de LH au pic préovulatoire après injection d'analogues de la GnRH en phase folliculaire chez des vaches ou génisses Holstein dont le cycle ovarien est contrôlé.....	31
<u>Tableau 6</u> : Synthèse bibliographique concernant les concentrations maximales de LH au pic préovulatoire après injection d'analogues de la GnRH en phase lutéale chez des vaches ou génisses laitières .....	33
<u>Tableau 7</u> : Molécule, nom déposé, fabricant, posologie et voie d'administration des traitements analogues de la GnRH utilisés dans l'étude .....	39
<u>Tableau 8</u> : Plan expérimental en carré latin et répartition des génisses et des traitements GnRH en fonction des périodes de l'étude.....	41
<u>Tableau 9</u> : Résultats échographiques obtenus après injection intramusculaire de 100 µg de gonadoréline, de léciréline à la dose de 25 et de 50 µg et de 10 µg de buséréline chez des génisses présentant un follicule de plus de 10 mm de diamètre .....	46

<u>Tableau 10</u> : Valeurs moyennes et écart-type des concentrations plasmatiques maximales en LH obtenues après l'injection intramusculaire de 100 µg de gonadoréline, de léciréline à la dose de 25 et de 50 µg et de 10 µg de buséréline chez des génisses Prim'Holstein .....	49
<u>Tableau 11</u> : Valeur moyenne et écart-type du temps d'occurrence de la concentration plasmatique maximale de LH après injection intramusculaire de 100 µg de gonadoréline, de léciréline à la dose de 25 et de 50 µg et de 10 µg de buséréline chez des génisses Prim'Holstein .....	50
<u>Tableau 12</u> : Aire sous la courbe moyenne des concentrations plasmatiques de LH en fonction du temps après injection intramusculaire de 100 µg de gonadoréline, de léciréline à la dose de 25 et de 50 µg et de 10 µg de buséréline chez des génisses Prim'Holstein .....	50

## Liste des principales abréviations utilisées :

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

CV : Coefficient de Variation

FSH : Follicle Stimulating Hormone

GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormone

IM : Intramusculaire

IV : Intraveineuse

LH : Luteinizing Hormone

PGF2 $\alpha$  : Prostaglandine F2 alpha

RCP : Résumé des Caractéristiques du Produit

SC : Sous-cutané

La maîtrise de l'activité de reproduction est l'élément majeur de la réussite de l'élevage bovin, et particulièrement en système laitier. En effet, avec la sélection génétique, la fertilité des vaches laitières hautes productrices s'est dégradée de façon inversement proportionnelle à leur production laitière. Il est donc difficile mais primordial de maîtriser la reproduction.

Pour cela, il est nécessaire de bien comprendre les bases physiologiques de la reproduction et ses mécanismes de régulation endocrine. L'identification du rôle clé de la GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone) hypothalamique dans le contrôle de la reproduction a conduit à la synthèse d'analogues de la GnRH, parmi lesquels trois sont disponibles en France : la gonadoréline (Cystoréline®), la buséréline (Réceptal®) et la léciréline (Reproréline®). Ces molécules ont été développées pour traiter des dysoovulations ou des kystes, comme indiqué dans les différents Résumés des Caractéristiques du Produit (RCP).

Pour monter le dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) de ces molécules, leur efficacité a été évaluée. Cependant, il n'existe pas à notre connaissance d'étude comparant les effets biologiques de ces différentes molécules entre elles. Dans ce contexte, l'objectif de notre expérimentation était de comparer la réponse à la gonadolibérine, la buséréline et la léciréline en termes de sécrétion de LH (Luteinizing Hormone), ainsi que le suivi échographique des follicules ovariens et de la structure lutéale néoformée. Cette étude avait également comme objectif de tester l'effet de la léciréline à la demi-dose recommandée dans le dossier de mise sur le marché, sur les mêmes critères.

Nous rappellerons dans une première partie les éléments de physiologie de la reproduction de la vache indispensables à la compréhension de l'effet des analogues de la GnRH, ainsi que leurs différentes applications. Dans une deuxième partie, nous présenterons l'expérimentation, et les résultats seront présentés et discutés dans une troisième partie.

# PARTIE I : PHYSIOLOGIE DE LA REPRODUCTION ET UTILISATION DES ANALOGUES DE LA GNRH

## 1. Rappels de physiologie de la reproduction chez la vache

### 1.1. L'axe gonadotrope

L'activité de reproduction est contrôlée chez la vache adulte par l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien.

#### 1.1.1. Hypothalamus et GnRH

L'hypothalamus synthétise des neurohormones appelées hormones hypothalamiques, ayant une action sur l'antéhypophyse (ou adénohypophyse, voir I. 1.1.2. et Figure 1). Il existe deux grandes familles d'hormones hypothalamiques :

- les -RH (Releasing Hormone), ayant pour rôle d'induire la production d'hormones antéhypophysaires
- les -IH (Inhibiting Hormone), qui inhibent la production hormonale antéhypophysaire

Nous ne nous intéresserons ici qu'à la **GnRH** (Gonadotrophin Releasing Hormone ou gonadolibérine), qui stimule la libération hypophysaire de LH (Luteinizing Hormone) et de FSH (Follicle Stimulating Hormone).

La GnRH n'est pas détectable physiologiquement dans la circulation générale ; en effet, elle est directement libérée dans le système porte hypothalamo-hypophysaire, système qui permet son passage direct dans l'hypophyse *via* des capillaires situés entre ces deux organes (vaisseaux porte, voir Figure 1). Ainsi, le sang très concentré en GnRH atteint directement l'hypophyse avant que des dégradations aient pu intervenir.

La sécrétion de GnRH se fait de manière **pulsatile** (un pulse étant un épisode de libération hormonale intense mais bref), et est le modulateur essentiel de la sécrétion de LH. Chaque pulse de GnRH est très bref (il disparaît du sang porte en moins de 5 minutes) et provoque de façon instantanée un pulse de LH dans la circulation générale. La GnRH module de façon moins directe la production de FSH antéhypophysaire (également modulée par des facteurs gonadiques).

Cette sécrétion pulsatile trouve son origine dans la présence d'un **système générateur de pulses**, qui, toutes les 15 à 30 minutes (rythme basal), provoque une libération de GnRH par des neurones hypothalamiques. Cette méthode de signal est très efficace car elle permet d'éviter un bruit de fond éventuel dû à d'autres hormones ou molécules similaires. De plus, elle évite le phénomène de désensibilisation (baisse de réponse liée à un processus d'internalisation des récepteurs associé à une sécrétion hormonale monotone).

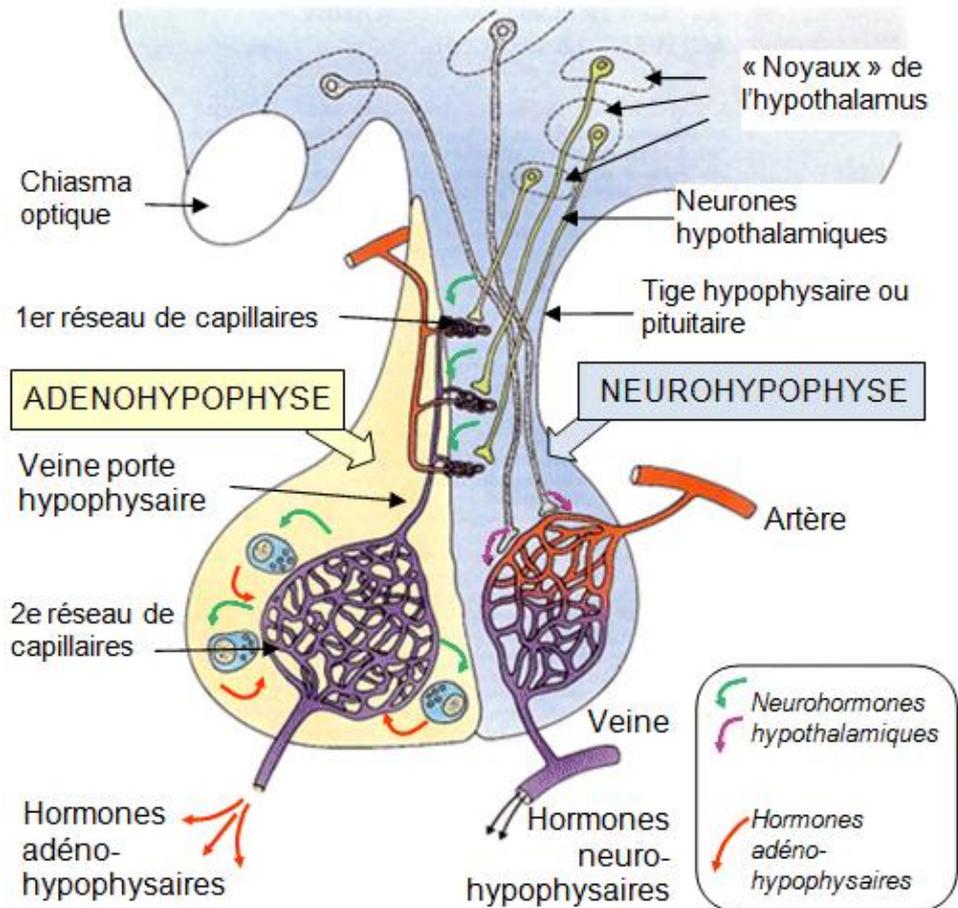


Figure 1: Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire et du système porte hypothalamo-hypophysaire

### 1.1.2. Hypophyse, LH, FSH et effets ovariens

L'hypophyse est localisée sous l'encéphale, dans une dépression osseuse appelée selle turcique. Elle est constituée de deux zones anatomiquement distinctes : l'adénohypophyse (zone glandulaire) et la neurohypophyse (zone nerveuse).

Ce sont les cellules gonadotropes de l'adénohypophyse qui synthétisent les hormones gonadotropes (ou gonadotropines): la **LH** (hormone lutéinisante ou « Luteinizing Hormone ») et la **FSH** (hormone folliculo-stimulante ou « Follicle-Stimulating Hormone »).

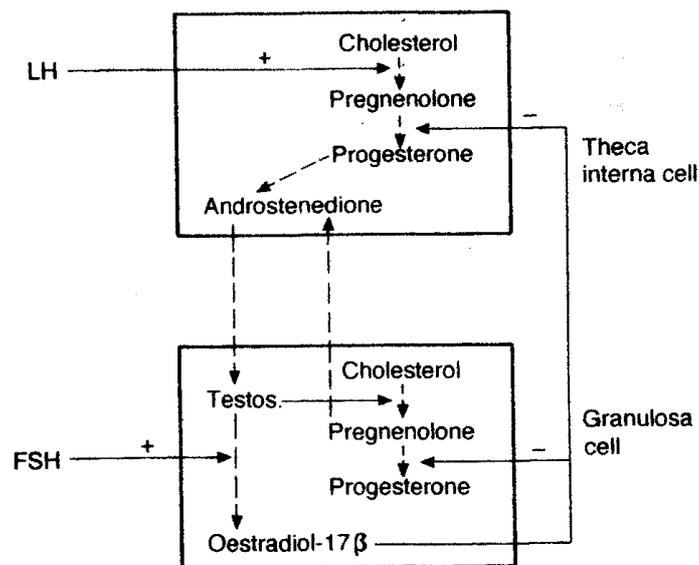
La LH et la FSH appartiennent à la famille des hormones glycoprotéiques et sont constituées d'hétérodimères polypeptidiques glycosylés, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , associées de façon non-covalente. Ces hormones sont libérées dans la circulation générale de façon pulsatile et sont éliminées rapidement, leur demi-vie plasmatique étant respectivement de 30 min et de 2 - 4 heures. C'est la **fréquence des pulses de LH** qui va réguler la fonction de reproduction.

Il existe un **niveau de base**, soit une fréquence basale de pulses de LH et FSH d'amplitude faible (concomitants des pulses de GnRH), qui est **d'environ un pulse toutes les 15 - 30 minutes**. Une baisse ou une augmentation de la fréquence de ces pulses aura une signification biologique. Un pic de grande amplitude et de durée élevée (comme par exemple le pic préovulatoire de LH, voir I. 1.3.2.) sera obtenu par une augmentation très importante de la fréquence des pulses, qui se superposent.

Ces deux gonadotropines vont agir sur les ovaires en **stimulant la stéroïdogénèse**, par les cellules de la thèque et de la granulosa des follicules et les cellules lutéales du corps jaune (voir I. 1.2.1.).

Ces deux hormones ont des cibles et des effets spécifiques (Figure 2) :

- La LH, en se liant à des récepteurs sur les cellules de la **thèque**, stimule la synthèse **d'androgènes et d'œstrogènes**.
- La FSH, en se liant aux cellules de la **granulosa** va provoquer une synthèse **d'œstradiol** à partir des androgènes thécaux, mais va également provoquer de façon retardée l'acquisition de récepteurs spécifiques à la LH.



**Figure 2 :** Représentation schématique du contrôle de la stéroïdogénèse par les hormones hypophysaires dans le follicule préovulatoire bovin (Hansel and Convey, 1983)

### 1.1.3. La régulation du couple GnRH-LH

Ce système performant nécessite une régulation très fine. Il existe plusieurs mécanismes de contrôle endocrinien permettant la régulation du couple GnRH-LH.

#### 1.1.3.1. Par l'œstradiol

##### 1 : Cas général : le rétrocontrôle négatif de l'œstradiol sur l'hypothalamus

C'est le principal mécanisme de régulation de la sécrétion de GnRH par l'œstradiol.

Au cours du cycle, l'œstradiol est produit par les follicules en croissance sous l'action de pulses de LH de faible amplitude mais de fréquence élevée (voir I. 1.2.2.). Un pulse de GnRH et donc un pulse de LH entraîne la synthèse folliculaire d'œstradiol, qui inhibe de façon directe la fréquence des pulses de GnRH (**rétrocontrôle négatif**).

##### 2 : Ovulation : la régulation du pic de LH préovulatoire par l'œstradiolémie :

L'ovulation chez la vache est induite par un pic préovulatoire de LH. La décharge de LH résulte de l'exercice du rétrocontrôle positif de l'œstradiol sur l'hypothalamus. L'œstradiol agit également en augmentant la sensibilité de l'hypophyse à la GnRH. Ces deux mécanismes de régulation sont détaillés ci-dessous.

##### *2.1. : Le **rétrocontrôle positif** de l'œstradiol sur l'hypothalamus :*

Si le contexte hormonal est favorable (progestéronémie basse), une œstradiolémie élevée provoque l'augmentation de la fréquence des pulses de GnRH.

Les neurones à GnRH n'expriment pas le récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ), mais la moitié d'entre eux expriment le récepteur aux œstrogènes  $\beta$  ( $ER\beta$ , Skinner *et al.*, 2005). Il est donc généralement admis que le rétrocontrôle positif de l'œstradiol ne s'exercerait pas directement sur les neurones à GnRH, mais par l'intermédiaire de systèmes neuronaux qui sont sensibles aux stéroïdes, et qui expriment des  $ER\alpha$ .

Parmi les neuromédiateurs impliqués dans la transmission des informations stéroïdiennes aux neurones à GnRH, la voie de signalisation impliquant la kisspeptine (Kiss) et son récepteur, le GPR54, semble être un maillon essentiel de la régulation du couple GnRH - LH. La Kisspeptine appartient à une famille de neuropeptides codés par le gène Kiss-1 (metastatis suppressor gene), codant pour la synthèse d'un peptide de 54 acides aminés (kisspeptide-54). Des travaux réalisés *in vivo* chez le mouton ont montré qu'une administration intracérébrale de Kisspeptine était capable de stimuler la sécrétion et la libération de GnRH dans le liquide cébrospinal (Smith *et al.*, 2008) ainsi que la sécrétion de LH par l'hypophyse (Navarro *et al.*, 2005).

La fréquence élevée des pulses de GnRH provoque en quelques heures le pic de LH.

## 2.2. : La sensibilisation de l'hypophyse à la GnRH induite par l'œstradiol

L'œstradiol induit de plus une **sensibilisation de l'hypophyse à l'action de la GnRH** via des mécanismes d'inhibition ou d'activation de facteurs de transcription (Kowase *et al.*, 2007).

Ainsi, dans un contexte de progestéronémie basse, une œstradiolémie élevée provoque :

- une stimulation importante de la sécrétion de la GnRH (*via* la kisspeptine)
- une sensibilisation de l'hypophyse à l'action de la GnRH,

ce qui provoque l'augmentation de la fréquence des pulses de GnRH et ainsi un pulse de LH très important (préovulatoire).

### 1.1.3.2. Par la progestérone

La **progestérone exerce un effet inhibiteur direct** sur la fréquence des pulses de GnRH (et donc de LH) lors de sa fixation sur les récepteurs hypothalamiques.

De plus, elle exerce un **effet inhibiteur sur la synthèse d'œstradiol** par les follicules en croissance.

Enfin, des facteurs externes tels que le stress, une croissance insuffisante ou encore des stimuli olfactifs sont susceptibles d'intervenir dans la régulation des cycles hormonaux de la vache.

En résumé, la GnRH exerce un rôle clé dans la production des hormones régulatrices des cycles sexuels chez la vache. Elle stimule la sécrétion de FSH et de LH qui régulent la **croissance folliculaire**.

## 1.2. La croissance folliculaire

Dès la vie fœtale se constitue dans les ovaires le **stock de follicules primordiaux** à partir des ovocytes I bloqués au stade prophase de la première division de méiose. A la naissance, un veau femelle possède un stock d'environ 133 000 follicules, et ce stock reste stable jusqu'à environ l'âge de 4 ans. Ensuite, leur nombre décline progressivement et entre 15 et 20 ans, les vaches ne possèdent plus qu'environ 3 000 follicules (Erickson, 1966).

### 1.2.1. Les follicules

Le Tableau 1 présente les caractéristiques des différents follicules observables sur un ovaire, tels qu'ils ont été décrits par Erickson en 1966 (Erickson, 1966).

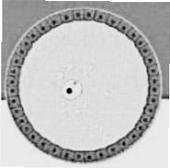
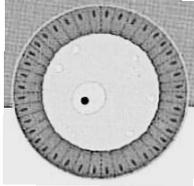
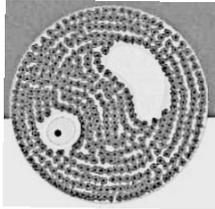
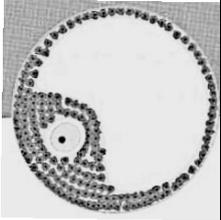
Follicules pré-antraux		Follicules cavitaires = antraux	
Primordial	Primaire	Secondaire	De De Graaf
- Une seule couche de cellules folliculeuses	- Plusieurs couches de cellules folliculeuses (ébauche de la granulosa), la plus interne étant appelée <i>corona radiata</i> ,  - <i>Corona radiata</i> séparée de l'ovocyte par la zone pellucide (couche mucoprotéique)	- Apparition d'une cavité (antrum) - Le stroma ovarien en contact avec le follicule se différencie en thèque interne et externe, séparée de la granulosa par la lame basale - L'ovocyte, la zone pellucide et quelques couches de cellules de la granulosa sont repoussés à un pôle antral, formant le <i>cumulus oophorus</i>	- Préovulatoire
			
0.04 mm	0.15 mm	1 à 10 mm	15 à 20 mm

Tableau 1 : Caractéristiques des follicules ovariens pré-antraux et antraux chez la vache

Prenons la croissance d'un follicule primordial donné.

Chez la vache, **chaque jour**, ce sont de **50 à 80 follicules primordiaux** qui entrent en croissance. Ces follicules grossissent de façon exponentielle au cours du temps. En effet, du stade primordial au stade pré-ovulatoire, la croissance d'un follicule dure 5 mois (Webb *et al.*, 2004), mais le follicule primaire ne met que 40 à 50 jours à se développer en follicule pré-ovulatoire (Lussier *et al.*, 1987). Ainsi, l'ovulation lors d'un cycle œstral est le résultat d'un développement folliculaire ayant débuté de nombreux cycles auparavant.

En ce qui concerne le **contrôle hormonal** de la croissance d'un follicule, il est possible de considérer trois étapes :

- les follicules de moins d'1 mm de diamètre sont actuellement considérés comme indépendants des hormones gonadotropes (LH et FSH) pour leur croissance. Celle-ci consiste en une prolifération simple des cellules folliculeuses sous le contrôle de facteurs de croissance (en particulier l'IGF-1 : Insuline like Growth Factor 1) et endocriniens (insuline, leptine)
- les follicules de diamètre compris entre 1 et 3 mm présentent des récepteurs à la FSH et sont donc sensibles à cette hormone (leur taille augmente avec la fréquence des pulses de FSH), mais ils peuvent tout de même se développer en l'absence de cette hormone (Adams *et al.*, 2008). Les mécanismes de cette croissance sont similaires à ceux décrits précédemment.
- Enfin, la croissance des follicules de plus de 3 mm est rapide (6 - 10 jours) et correspond au développement de l'*antrum*. En parallèle, les cellules folliculeuses se différencient en cellules de la granulosa ou en cellules de la thèque. Ces phénomènes sont alors strictement dépendants des gonadotropines ; en effet la FSH permet la différenciation des cellules de la granulosa tandis que la LH stimule la production de stéroïdes par les cellules de la thèque et de la granulosa (voir I. 1.1.2.).

Nous avons vu les étapes de la croissance d'un follicule primordial jusqu'au stade préovulatoire. Mais il est important de bien comprendre que le follicule parvenant à ce stade constitue une exception, car plus de 99.9 % des follicules en croissance vont entrer en atrophie (régression du follicule par apoptose).

### 1.2.2. Les vagues de croissance folliculaire

Durant toute la vie de la vache (que la femelle soit prépubère, cyclée, durant les premiers mois de gestation ou en *post partum*), et ce quelle que soit la phase du cycle œstral (folliculaire ou lutéale), **le développement folliculaire évolue par vagues de croissance folliculaire**, soit des successions de croissance et régression de plusieurs follicules.

Ces **vagues durent de 7 à 10 jours**, et se succèdent dans le temps de façon ininterrompue. Chacune d'entre elles comprend trois phases de développement folliculaire, observées à l'échographie (voir Figure 3) :

- La première est la phase de recrutement, qui est caractérisée par la **croissance** d'en moyenne **24 follicules secondaires** (de 8 à 41), mesurant au départ environ 3 - 4 mm de diamètre, sur les deux ovaires. Ces follicules sont appelés **follicules recrutés**. Le nombre de follicules recrutés à chaque vague est très variable d'une vache à l'autre, mais est répétable pour un même individu au cours de sa vie (Adams *et al.*, 2008). Cette phase dure en moyenne 2 - 3 jours, quelle que soit la durée de la vague folliculaire (Ginther *et al.*, 1989).  
Elle est précédée d'une augmentation transitoire des concentrations de **FSH**, responsable du recrutement.
- La deuxième phase est celle de sélection ou de déviation. Elle débute lorsque l'un des follicules recrutés atteint 8.5 à 9 mm de diamètre (seuil de déviation), et acquiert alors le premier des **récepteurs à la LH**. Le plus souvent, un seul follicule est sélectionné, mais parfois deux follicules le sont. A partir de ce moment, la croissance de ce ou ces follicule(s) s'accélère, et il est (ou ils sont) appelé(s) **follicule(s) dominant(s)**. Ceux-ci deviennent 2 mm plus gros que les autres follicules recrutés ; c'est la déviation. Cette phase dure 1 à 2 jours en moyenne.  
D'un point de vue hormonal, lors de la croissance folliculaire, les follicules sélectionnés produisent de grandes quantités d'œstradiol et d'inhibine qui, par rétroaction négative (voir I. 1.1.3.1.), entraînent une baisse de fréquence des pulses de FSH. Ainsi, la valeur seuil de FSH pour le recrutement n'est plus atteinte et celui-ci est stoppé.
- La troisième phase, de dominance, est caractérisée par la présence d'un **follicule dominant** (un seul le plus souvent) qui **grossit toujours** malgré la baisse de fréquence des pulses de FSH (car il a développé une dépendance à la LH et une indépendance relative à la FSH), tandis que les autres follicules recrutés, plus petits et FSH-dépendants, entrent en atrophie. Le follicule dominant présente de plus en plus de récepteurs à la LH et sécrète une grande quantité d'œstradiol. Cette phase dure environ 4 - 5 jours.  
Le devenir de ce follicule dominant dépend du contexte hormonal : il peut soit ovuler (et donc libérer l'ovocyte dans l'oviducte adjacent, ce qui peut conduire à sa fécondation) s'il y a une élévation de la concentration sanguine en LH, soit entrer lui-même en atrophie. Cela survient quand la fréquence des pulses de LH reste dans les valeurs basales (un pulse toutes les 3 - 4 heures), ce qui est le cas lorsqu'un corps jaune est encore présent sur un des ovaires (rétrocontrôle négatif de la progestérone sur la GnRH, voir I. 1.1.3.2.). Le follicule va alors perdre ses récepteurs et sa production d'œstradiol baisse.

A la fin de cette vague, l'ovulation ou l'atrophie du follicule dominant permet l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire. Nous détaillerons dans la partie consacrée au pic de LH préovulatoire (I. 1.3.2.) les mécanismes hormonaux de l'ovulation.

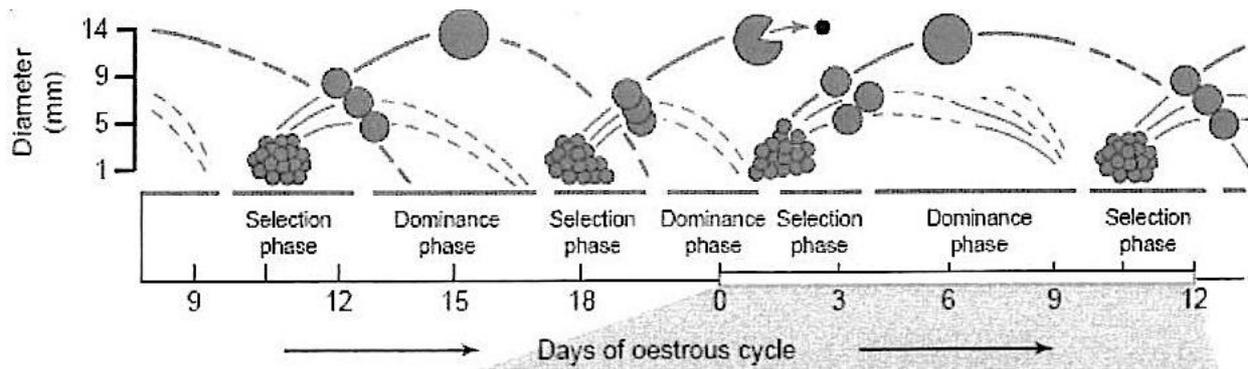


Figure 3 : Les vagues de croissance folliculaire, d'après Roche 1996

Il a été observé que dans plus de 95 % des cycles œstraux chez la vache, **deux** ou **trois vagues** de croissance folliculaire se succèdent, soit une vague tous les 7 - 8 jours pour les vaches à trois vagues (cycle de 21 - 25 jours), et une tous les 9 - 10 jours pour celles à deux vagues (plus souvent chez les génisses, cycle de 18 - 20 jours) (Bleach *et al.*, 2004, Savio *et al.*, 1990b). Pour une vache donnée, on observe une répétabilité de 70 % de la cinétique folliculaire à chaque cycle œstral (Adams *et al.*, 2008).

### 1.3. Le cycle œstral

Pour décrire le cycle œstral, nous considérerons le jour de l'ovulation comme J0.

#### 1.3.1. La phase folliculaire

Au niveau ovarien, la phase folliculaire est celle du développement du follicule ovulatoire, suivie de l'ovulation (J0).

On subdivise cette phase en deux :

- La première phase est celle du proœstrus, elle dure environ **3 jours** (J-3 à J-1) et correspond à :
  - la **régression du corps jaune** du cycle précédent (lutéolyse) par apoptose des cellules lutéales (Zheng *et al.*, 1994). Cette apoptose est due à la fixation sur le corps jaune de prostaglandines F2 alpha (PGF2 $\alpha$ ) sécrétées par l'endomètre de façon pulsatile (pulses de plusieurs heures, pendant 2 - 3 jours), sous l'action de l'ocytocine (produite par les grandes cellules lutéales, voir I. 1.3.3.) (Luck, 1989).
  - le **follicule dominant** (qui deviendra ovulatoire) **grossit** et produit de plus en plus d'œstradiol sous l'effet de l'augmentation de la fréquence des pulses de LH. En effet, on observe une augmentation progressive de cette fréquence, passant d'un pulse de moyenne amplitude toutes les 3 heures à environ un pulse de faible

amplitude par heure (Rahe *et al.*, 1980). Cela est dû à la levée de l'inhibition de la sécrétion de la GnRH par la progestérone dont les concentrations ont chuté après la lutéolyse.

- La deuxième phase est celle de l'œstrus, caractérisée de façon comportementale par **l'acceptation du mâle**. Elle dure de **5 à 18 heures** en moyenne (J-1). Ce comportement particulier est dû à l'augmentation des concentrations plasmatiques en œstradiol (par le follicule dominant). Contrairement aux autres ruminants, la vache n'ovule pas pendant cette phase, mais au début de la phase suivante, soit 12 h après la fin du comportement d'œstrus.

Ce comportement d'acceptation du mâle s'accompagne de modifications au niveau de l'épithélium vaginal et utérin, de modifications chimiques des voies génitales permettant l'activation des spermatozoïdes par capacitation, de contractions myométriales importantes (Rodriguez-Martinez *et al.*, 1987) ainsi que de production d'une glaire translucide et filante (pouvant s'écouler par la vulve lors de l'œstrus) permettant la progression des spermatozoïdes.

A la fin de cette phase, l'appareil génital est apte à la rencontre des gamètes. L'ovulation s'ensuit immédiatement.

### 1.3.2. L'ovulation

C'est la **libération d'un** (ou plus rarement de plusieurs) **ovocyte(s)** après émission du deuxième globule polaire puis rupture du (des) follicule(s) ovulatoire(s), devant mesurer au moins 10 mm (Sartori *et al.*, 2001). Elle marque le passage de la phase folliculaire à la phase lutéale.

D'un point de vue hormonal, l'ovulation est déclenchée suite à **l'élévation brutale et prolongée de la concentration en GnRH portale** (Karsh *et al.*, 1997), provoquant une décharge de gonadotropines (décharge ovulante) : en particulier, on observe un **pic préovulatoire de LH précédant de 24 heures l'ovulation** (succession de pulses de LH à une fréquence très élevée).

Le pic de LH est lui-même déclenché par l'association de deux phénomènes (voir I. 1.1.3.) :

- une concentration plasmatique en œstradiol atteignant un certain seuil
- une progestéronémie basse (moins de 1 ng/mL)

Selon les études et les méthodes de dosage, il est possible de trouver des valeurs des concentrations maximales de LH au moment du pic préovulatoire allant en moyenne de 8 à 67 ng/mL (Tableaux 2, 3 et 4). En 2013, Martin *et al.* ont effectué une revue de 22 études de 1973 à 2010, comprenant des vaches et des génisses de différentes races en chaleurs naturelles ou induites. Ils ont obtenu des valeurs maximales au pic préovulatoire de LH de 10.5 ng/mL en moyenne.

Mais ces valeurs diffèrent dans la bibliographie selon la race, l'âge des animaux étudiés et les conditions de l'étude.

Pour la suite, nous ne détaillerons que les résultats décrits pour la **race Holstein** (utilisée pour notre étude) :

- chez la génisse, en prenant en compte les valeurs décrites dans les tableaux ci-dessous, pondérées par le nombre d'animaux, on obtient :
  - o une valeur moyenne de 13.65 ng/mL, pour celles étudiées en cycles naturels (peu d'études disponibles) (Tableau 2)
  - o une valeur moyenne de 13.08 ng/mL chez celles dont l'ovulation a été induite (Tableau 3)

Le type de cycle ne semble donc pas modifier la concentration sanguine maximale atteinte au cours du pic préovulatoire de LH.

- chez la vache adulte dont le cycle est hormonalement contrôlé, Wolfenson *et al.* (2004) obtiennent une moyenne de 9 ng/mL, soit une valeur significativement inférieure à celle obtenue pour les génisses dans les mêmes conditions (20 ng/mL), tandis que Lucy et Stevenson (1986) obtenaient une valeur moyenne de 13.7 ng/mL, soit une concentration équivalente à celle observée chez les génisses dans les mêmes conditions (15.5 ng/mL). Dans la littérature, la valeur moyenne obtenue (pour les vaches Holstein dont le cycle est contrôlé hormonalement) par synthèse des différentes études est de 10.77 ng/mL, soit une valeur proche de celle des génisses (environ 13 ng/mL) (Tableau 4).

Age et caractéristiques des animaux	Valeur de concentration maximale de LH au pic pré-ovulatoire	Prélèvement	Méthode de dosage	Sensibilité, coefficients de variation (CV) intra et inter-test	Référence bibliographique
13 génisses Holstein de 18 à 24 mois (450-580 kg)	8 ng/mL en moyenne (6-10)	Plasma congelé	RIA de Bolt et al. 1990 avec modification Ginther et al 1999	-0.04 ng/mL -CV : 11.8 % et 12.8 %	Ginther <i>et al.</i> , 2013
6 génisses Holstein	25.9 ng/mL en moyenne (19-35)	Sérum	RIA de Niswender et al 1969	inconnu	Swanson et Hafs, 1971

**Tableau 2 :** Synthèse bibliographique concernant les concentrations maximales de LH au pic préovulatoire chez des génisses Holstein en cycles naturels

Age et caractéristiques des animaux	Valeur de concentration maximale de LH au pic pré-ovulatoire	Prélèvement	Méthode de dosage	Sensibilité, coefficients de variation intra et inter-test	Méthode d'induction de la cyclicité	Référence bibliographique
31 génisses Holstein de 12-18 mois (330-575 kg)	9 ng/mL en moyenne, quel que soit le nombre d'ovulation (8-10.5)	Plasma congelé	RIA de Bolt <i>et al.</i> 1990 avec modification Ginther <i>et al</i> 1999	-0.1 ng/mL -CV : 9.1 % et 5.2 %	-Ablation des follicules de plus de 5 mm à J4 -2 injections de 25 mg de dinoprost tromethamine à 12 h d'intervalle (Lutalyse®) à J6	Palhao <i>et al.</i> , 2009
7 génisses Holstein de 18-36 mois (520-650 kg)	8.8 ± 1 ng/mL	Plasma hépariné congelé	RIA de Bolt <i>et al.</i> 1990 avec modification Ginther <i>et al</i> 1999	-0.16 ng/mL -CV : 16.7 % et 11.6 %	2 injections de 25 mg de dinoprost tromethamine à 12 h d'intervalle à J5-6 (Lutalyse®)	Haughian <i>et al.</i> , 2004
21 génisses Holstein de 13 mois	20 ng/mL en moyenne (ET ou dispersion non fournis)	Plasma congelé	EIA Mutayoba <i>et al.</i> 1990	-7.8 pg/mL -CV : 8.5 % et 10.6 %	2 injections de 500 µg de cloprostenol (Estrumate®) à 12 j d'intervalle	Wolfenson <i>et al.</i> , 2004
11 génisses Holstein d'environ 2 ans (530-680 kg)	13 ng/mL en moyenne (9.5-14.5)	Plasma congelé	RIA de Bolt <i>et al.</i> 1990	-0.18 ng/mL -CV : 8.9 % et 17 %	2 injections de 25 mg de <i>dinoprost tromethamine</i> (Lutalyse®) à 12h d'intervalle	Kulick <i>et al.</i> , 1999
5 génisses Holstein	15.5 ng/mL en moyenne (7.8-25.4)	Sérum congelé	RIA de Skaggs <i>et al.</i> 1985	-42 pg/tube de 2 mL -CV : 17.4 % et 27.5 %	2 injections de 25 mg de <i>cloprostenol</i> (Estrumate®) à 11 jours d'intervalle	Lucy et Stevenson, 1986

**Tableau 3 :** Synthèse bibliographique concernant les concentrations maximales de LH au pic préovulatoire chez des génisses Holstein dont le cycle ovarien est contrôlé

Age et caractéristiques des animaux	Valeur de concentration maximale de LH au pic pré-ovulatoire	Prélèvement	Méthode de dosage	Sensibilité, coefficients de variation intra et inter-test	Méthode d'induction de la cyclicité	Référence bibliographique
19 vaches Holstein, de 2 à 5 lactations, à 77 +/- 7 jours <i>post-partum</i> et produisant 49 +/- 2.4 kg de lait par jour	9 ng/mL (ET ou dispersion non fournis)	Plasma congelé	Test immuno-enzymatique (EIA), Mutayoba <i>et al.</i> 1990	-7.8 pg/mL -CV : 8.5 % et 10.6 %	2 injections de 500 µg de cloprostenol (Estrumate®) à 12 j d'intervalle	Wolfenson <i>et al.</i> , 2004
22 vaches Holstein, multipares et primipares, en lactation (11800 kg par an environ), de 60 à 100 jours <i>post-partum</i>	9.7 ± 1.1 ng/mL	Plasma congelé	EIA de Mutayoba <i>et al.</i> 1990	-7.8 pg/tube de 2 mL -CV : 8.5 % et 10.6 %	-pose d'une spirale imprégnée de progestérone (CIDR®) pendant 9 jours -injection de 500 µg de cloprostenol (Estrumate®) 2 jours avant retrait	Kaim <i>et al.</i> , 2003
30 vaches Holstein multipares, en lactation (environ 9000 kg par an), de 60 à 80 jours <i>post-partum</i>	12 ± 0.8 ng/mL	Plasma hépariné congelé	RIA Rosenberg <i>et al.</i> 1987	CV : 13.9 % et 15.9 %	2 injections de 25 mg de <i>dinoprost tromethamine</i> à 14 jours d'intervalle, encadrant la pose d'une spirale progestéronique PRID®	Rosenberg <i>et al.</i> , 1991
7 vaches Holstein en lactation	13.7 ng/mL (5.3-42.4)	Sérum congelé	RIA de Skaggs <i>et al.</i> 1985	-42 pg/tube de 2 mL -CV : 17.4 % et 27.5 %	2 injections de 25 mg de <i>cloprostenol</i> (Estrumate®) à 11 jours d'intervalle	Lucy and Stevenson, 1986

**Tableau 4 :** Synthèse bibliographique concernant les concentrations maximales de LH au pic préovulatoire chez des vaches Holstein adultes dont le cycle ovarien est contrôlé

L'ovulation se produit grâce à un double effet mécanique et chimique : sous l'effet d'un appel d'eau dû à l'acide hyaluronique produit par les cellules du *cumulus oophorus*, mais également d'une digestion enzymatique (lysosomiale : collagénase et plasmine) de l'apex folliculaire. Ainsi, le follicule qui était saillant et tendu à la surface ovarienne va se rompre, puis se contracter sous l'effet de la chute de pression, et l'ovocyte entouré de sa *corona radiata* est alors expulsé. La méiose reprend lors de la disjonction des cellules de la *corona radiata* et de l'ovocyte (supprimant l'action paracrine inhibitrice de la méiose), et l'ovocyte haploïde se retrouve dans tiers supérieur de l'oviducte, prêt à être fécondé.

Suite à l'ovulation, l'espace anciennement occupé par le follicule préovulatoire va se transformer en corps jaune : c'est le début de la phase lutéale.

### 1.3.3. La phase lutéale

Cette phase est caractérisée par la **formation** puis le **maintien d'un corps jaune ovarien**. Elle correspond à la formation d'un environnement hormonal et physique adapté à une implantation embryonnaire utérine éventuelle.

Elle se décompose également en deux parties :

- Le metœstrus correspond à la **mise en place du corps jaune** résultant de l'ovulation. Cette phase dure **5 - 6 jours** (J1 - J6), et est caractérisée par de profonds remaniements de la zone ayant ovulé : une angiogenèse intense, une prolifération des cellules de la thèque et de la *granulosa* restant après expulsion de l'ovocyte, et leur différenciation (lutéinisation) en petites et grandes cellules lutéales. Les petites cellules lutéales synthétisent de la progestérone sous l'effet de la LH tandis que les grandes cellules lutéales synthétisent de la progestérone (en plus grande quantité et de façon LH-indépendante) mais également de l'ocytocine (Hansel *et al.*, 1991). Cette ocytocine se liant aux cellules endométriales permet en fin de cycle la synthèse de PGF2 $\alpha$  (responsable de la lutéolyse, voir I. 1.3.1.).

Le corps jaune passe au cours de cette phase d'environ 0.5 cm de diamètre à 1.3 cm de diamètre. En parallèle, la sécrétion d'œstradiol est inhibée par la progestérone. Cette hormone inhibe les contractions utérines et favorise l'implantation éventuelle de l'œuf.

- Le dioestrus dure environ **12 jours** (J7 - J19). Le **corps jaune continue de croître** en diamètre jusqu'à environ 2 cm (atteint à J10), et **sécrète** de la **progestérone**. En raison de la rétroaction négative exercée par la progestérone, on observe une diminution de la fréquence des pulses de LH, soit un ou deux pulses de grande amplitude toutes les 6 heures (Rahe *et al.*, 1980).

Dans la littérature, on trouve des valeurs de progestéronémie lors de cette phase allant de 2 à 10 ng/mL (revue de Spicer et Echterkamp, 1986)

S'il n'y a pas fécondation, le corps jaune régresse au 11<sup>e</sup> jour de cette phase (J18) sous l'effet des pulses de PGF2 $\alpha$  produits par les cellules endométriales (début de lutéolyse, voir I. 1.3.1.), et cesse de produire de la progestérone au 12<sup>e</sup> jour (J19 = J-2). Les concentrations plasmatiques en progestérone diminuent alors pour atteindre moins de 1 ng/mL (revue de Spicer and Echternkamp, 1986).

Un nouveau cycle peut reprendre. La régression morphologique de ce corps jaune prendra en revanche plus de temps, le corps jaune en régression est ainsi visible par échographie jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour du cycle suivant.

Remarque : S'il y a fécondation, l'embryon sécrète un signal de reconnaissance qui empêche la régression du corps jaune, le cycle s'interrompt alors (même si des vagues folliculaires ovariennes sont présentes au début de la gestation).

En résumé, la Figure 4 présente un schéma récapitulatif des différentes phases du cycle œstral ainsi que des concentrations hormonales moyennes :

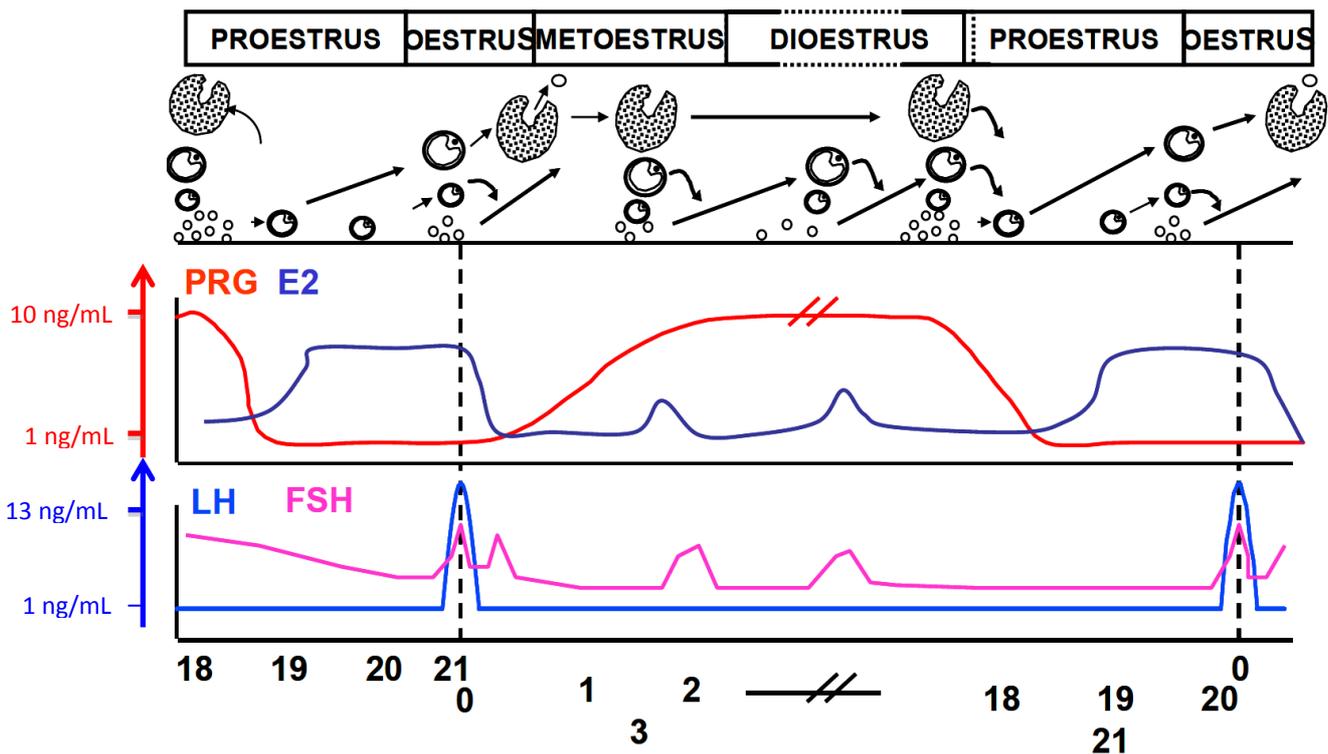


Figure 4 : Schéma récapitulatif des vagues folliculaires (exemple de 3 vagues par phase folliculaire) et des concentrations hormonales moyennes de LH et progestérone chez la vache au cours des différentes phases du cycle œstral

Les bases de la régulation du cycle œstral chez les bovins ayant été abordées, nous présenterons dans la partie suivante une synthèse sur l'utilisation des molécules analogues de la GnRH disponibles en France.

## 2. Utilisation pratique chez la vache des analogues de la GnRH: la gonadoréline, la buséréline et la léciréline

### 2.1. Caractéristiques des molécules

Toutes ces molécules sont des agonistes de la GnRH naturelle (gonadolibérine).

- La **gonadoréline** est un analogue structurel, décapeptide, utilisée sous forme de diacétate ou de diacétate tétrahydrate. Elle est commercialisée par CEVA Santé Animale, sous le nom de Cystoréline®, à la posologie unique de 100 µg. L'AMM a été obtenue en 1981, pour la voie IM (intramusculaire) seulement.
- La **buséréline** est un analogue fonctionnel, nonapeptide, utilisée sous forme d'acétate. Elle est commercialisée par MSD, sous le nom de Réceptal®, à la posologie de 10 µg pour l'induction de l'ovulation et de 20 µg pour le traitement des kystes et de l'anoestrus *post partum*. L'AMM a été obtenue en 1982. L'injection se fait de préférence par voie IM, mais pour une administration unique les voies IV (intraveineuse) et SC (sous-cutanée) peuvent être utilisées.
- La **léciréline** est un analogue fonctionnel, nonapeptide. Elle est utilisée sous forme d'acétate, à la posologie de 50 µg pour l'induction de l'ovulation et 100 µg pour le traitement des kystes ovariens. Elle est commercialisée par Vétoquinol sous le nom de Reproréline®, depuis 2004 (AMM). La voie d'administration est la voie IM.

Aucun temps d'attente lait ou viande n'a été imposé à ces molécules qui sont rapidement dégradées.

### 2.2. Effets sur la sécrétion de LH d'une injection d'analogue de la GnRH en fonction de la phase du cycle œstral

#### 2.2.1. En phase folliculaire

La synthèse des différentes études où le pic de LH a été mesuré après injection de 10 µg de buséréline ou de 100 µg de gonadoréline en **phase folliculaire** (doses AMM pour l'induction de l'ovulation) indique des valeurs de concentrations maximales en LH variant de 9.7 à 101 ng/mL (Tableau 5).

La variabilité de ces valeurs s'explique par la variabilité du moment du cycle où la molécule a été injectée (Rosenberg *et al.*, 1991) :

- Avant le pic de LH spontané : moyenne de 20.55 ng/mL (36 vaches)
- Pendant le pic de LH spontané : moyenne de 101 ng/mL (2 vaches seulement)
- Après le pic de LH spontané : moyenne de 9.7 ng/mL (18 vaches)

Ainsi, si cette injection est réalisée avant ou pendant le pic spontané de LH, les valeurs atteintes sont supérieures à 13 ng/mL (valeur de concentration physiologique au pic de LH, cf infra), et ce pic est *a priori* capable de provoquer une ovulation.

En revanche, si cette injection est trop tardive, la valeur du pic de concentration plasmatique de LH induit est plus faible, car l'hypophyse a déjà sécrété de la LH.

Age et caractéristiques des animaux	Analogue de la GnRH utilisé, dose, voie	Valeur de concentration de LH au pic pré-ovulatoire	Référence bibliographique
32 vaches Holstein multipares, en lactation (environ 9000 kg par an), de 60 à 80 jours <i>post-partum</i>	10 µg de buséréline, 72 heures après retrait de la spirale de progestérone (PRID)	-injection avant le pic de LH spontané : 25.8 ± 2.1 ng/mL (14 vaches) -injection après le pic de LH spontané : 9.7 ± 0.7 ng/mL (18 vaches) -moyenne : 17.75 ng/mL	Rosenberg <i>et al.</i> , 1991
10 vaches Holstein, multipares et primipares, en lactation (11800 kg par an environ)	10 µg de buséréline en IM, dans les 3 heures suivant la détection de l'œstrus	15.5 ± 1.1 ng/mL	Kaim <i>et al.</i> , 2003
6 génisses Holstein de 18-36 mois (520-650 kg)	100 µg de gonadoréline, en IM, le lendemain de la lyse artificielle du corps jaune	17.3 ± 2.8 ng/mL	Haughian <i>et al.</i> , 2004
6 génisses Holstein	100 µg de gonadoréline en IM, le jour de l'IA	- 18.7 ng/mL en moyenne (8.5-33.4) pour les pics de LH GnRH-induits (4 génisses) - 101 ng/mL en moyenne (93 et 109 ng/mL) pour les pics de LH spontanés amplifiés par l'injection de GnRH (2 génisses)	Lucy and Stevenson, 1986
2 vaches Holstein en lactation		22.45 ng/mL en moyenne (22.2 et 22.7 ng/mL)	

**Tableau 5 :** Synthèse bibliographique concernant les concentrations maximales de LH au pic préovulatoire après injection d'analogues de la GnRH en phase folliculaire chez des vaches ou génisses Holstein dont le cycle ovarien est contrôlé

### 2.2.2. En phase lutéale

La synthèse bibliographique des différentes études où le pic de LH a été mesuré après injection de 8 µg de buséréline ou de 50 µg, 100 µg (dose AMM pour l'induction de l'ovulation) ou 200 µg de gonadoréline, en **phase lutéale**, montre des concentrations maximales au moment du pic de LH variant de 4.6 à 23.1 ng/mL (Tableau 6) :

- Pour les doses supérieures ou égales à la dose recommandée dans le dossier d'AMM pour l'induction de l'ovulation (100 ou 200 µg de gonadoréline, 38 vaches) : on obtient une moyenne de 12.17 ng/mL, soit une valeur similaire aux concentrations maximales du pic de LH dans les conditions physiologiques.
- Pour les doses inférieures à la dose recommandée dans le dossier d'AMM :
  - o 50 µg de gonadoréline : moyenne de 7.82 ng/mL (9 vaches)
  - o 8 µg de buséréline : moyenne de 16 ng/mL (4 vaches seulement)

Ces valeurs sont inférieures à celles obtenues lors du pic de LH naturel, mais également moins variables. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi lors de notre étude de comparer l'effet des différents analogues de GnRH sur la sécrétion de LH en phase lutéale du cycle.

Age et caractéristiques des animaux	Analogue de la GnRH utilisé, dose, voie	Valeur de concentration maximale de LH au pic préovulatoire	Référence bibliographique
20 vaches Holstein adultes, tariées et vides (386-489 kg), cycle contrôlé	100 µg de gonadoréline en IM, 6 à 7 jours après l'ovulation	6.6 ± 1.4 ng/mL	Martinez <i>et al.</i> , 2003
10 vaches laitières (race non précisée) en lactation (4 primipares et 6 multipares), 153.1 ± 3.8 jours de lactation, traitées 3 fois par jour, cycle contrôlé	100 µg de gonadoréline, en IM, 6 à 7 jours après ovulation, en présence d'un corps jaune de plus de 1.5 cm	23.1 ± 7.8 ng/mL	Souza <i>et al.</i> , 2009
5 vaches laitières (race non précisée) en lactation (2 primipares et 3 multipares), 153.1 ± 3.8 jours de lactation, traitées 3 fois par jour, cycle contrôlé	50 µg de gonadoréline, en IM, 6 à 7 jours après ovulation, en présence d'un corps jaune de plus de 1.5 cm	10.4 ± 2.3 ng/mL	

12 vaches Holstein en lactation, en cycles naturels, de moins de 7 ans (598 ± 96 kg)	50, 100 ou 200 µg de gonadoréline en IM, en phase lutéale	- valeur moyenne au pic : 4.6 ± 1.2 ; 8.9 ± 4.7 et 16 ± 6.3 ng/mL	Monnoyer <i>et al.</i> , 2004
4 vaches Holstein de 4 à 6 ans, cycle contrôlé	8 µg de buséréline en IM, 5 jours après ovulation	16 ± 2 ng/mL	Rajamahendran <i>et al.</i> , 1998

**Tableau 6 :** Synthèse bibliographique concernant les concentrations maximales de LH au pic préovulatoire après injection d'analogues de la GnRH en phase lutéale chez des vaches ou génisses laitières

### 2.3. Utilisations indiquées dans le RCP (Résumé des caractéristiques du Produit)

#### 2.3.1. Traitement des kystes folliculaires (toutes les molécules)

Un kyste folliculaire est défini comme une structure de type folliculaire à paroi mince ayant un diamètre supérieur ou égal à 25 mm, et persistant pendant 7 à 10 jours en l'absence de corps jaune (Garverick, 1997).

Les étiologies de ces kystes sont mal connues de nos jours.

Etant donné que le kyste folliculaire se comporte comme un follicule dominant, il empêche le recrutement d'autres follicules et l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire (en inhibant la sécrétion de FSH, voir I. 1.2.2.). L'apparition de ces kystes serait due la plupart du temps à une insuffisance de synthèse de GnRH, alors que l'hypophyse présenterait une réponse normale à cette hormone. 10 à 40 % des vaches présenteraient ce syndrome au moins une fois dans leur vie, le plus souvent entre 4 et 8 ans (deuxième à quatrième lactation).

L'utilité de la GnRH dans ce cas est évidente, elle pallie le défaut de sécrétion de LH et, *via* une induction de la sécrétion de LH, provoque la lutéinisation ou la disparition du kyste dans 60 à 100 % des cas selon les études (revu dans Peters A.R. Veterinary clinical application of GnRH-Questions of efficacy, 2005). Cependant, il est important de noter que la régression spontanée des kystes ovariens en *post-partum* peut atteindre 70 %. De plus, la fertilité ultérieure des vaches présentant des kystes reste souvent faible (Tebble *et al.*, 2001).

Dans certains cas, un défaut du nombre de récepteurs folliculaires (et donc kystiques) à la LH serait également en cause, ce qui pourrait expliquer certains échecs de traitement (Wollums and Peters, 1994).

Récemment, Rizzo *et al.* (2011a) ont montré l'intérêt du traitement à une GnRH, la léciréline, par voie épidurale (hors indications du dossier d'AMM). En effet, des récepteurs à la GnRH extra-pituitaires ont été mis en évidence (sur les follicules, les corps jaunes et la moelle épinière), et cette voie allie ainsi la voie systémique et la voie locale, améliorant l'efficacité du traitement (93 % de taux de gestation après 2 inséminations artificielles pour les vaches traitées par voie épidurale *versus* 76 % pour celles traitées par voie IM). Ces résultats ont été confirmés (Rizzo *et al.*, 2011b) et une possible amélioration du traitement par association de la GnRH et du carazolol (bêta-bloquant) a été démontrée.

L'application de ces résultats n'est pas encore possible sur le terrain mais ouvre de nouvelles options thérapeutiques, qui pourraient conduire à une extension des voies d'administration des analogues de la GnRH à la voie épidurale dans le dossier d'AMM.

### 2.3.2. Traitement au moment de l'Insémination Artificielle pour les femelles à ovulation nulle ou retardée (toutes les molécules)

L'administration de GnRH est réalisée en phase folliculaire du cycle.

L'objectif est double :

- induire l'ovulation, en effet l'injection de GnRH provoque une **décharge brutale de LH** plus importante que la décharge naturelle (synthèse bibliographique au I. 2.2.), et ce, dans un délai de 2 jours environ (utile pour les vaches à ovulation retardée)
- favoriser le maintien du corps jaune et augmenter sa capacité à synthétiser de la progestérone, pour favoriser le développement embryonnaire (Larson *et al.*, 1997 ; Maurer and Echternkamp, 1982). En effet, la GnRH injectée pendant la phase folliculaire induit une **différenciation plus importante** des cellules de la granulosa **en grandes cellules lutéales** (voir I. 1.3.3.), qui sécrètent plus de progestérone que les petites cellules lutéales (Mee *et al.*, 1993).

L'intérêt du traitement de GnRH le jour de l'IA pour augmenter le taux de conception n'est pas clair. Peters (Peters, 2005) rapporte que les recherches antérieures sur l'efficacité de ce traitement n'étaient fondées que sur des études manquant de puissance statistique. Seule la méta-analyse de Morgan et Lean (1993) a montré que le taux de gestation après traitement à la GnRH le jour de l'IA était augmenté de 12.5 % chez toutes les vaches, et jusqu'à 22.5 % chez les vaches « repeat breeder » (vaches infertiles à chaleurs régulières ayant eu plus de 3 IA non fécondantes consécutives). Cependant, la revue de Hanzen *et al.* (1996) présente un bilan plus mitigé qui ne permet pas de conclure sur l'intérêt d'une administration systématique de GnRH au moment l'IA. En revanche, chez les femelles « repeat breeders », la GnRH pourrait être indiquée pour augmenter la sécrétion de LH. En effet, ces vaches présentent un pic préovulatoire de LH inférieur à celui des femelles à fertilité normale ( $28 \pm 4$  ng/mL *versus*  $40.7 \pm 3.6$  ng/mL de plasma) (Gustafsson *et al.*, 1986). Il en résulterait une insuffisance lutéale.

### 2.3.3. Traitement de l'anoestrus *post-partum* (buséréline seulement)

L'anoestrus *post-partum* se caractérise par une **absence** ou une **insuffisance** de la **reprise de la pulsativité de la sécrétion de GnRH**. Soit la folliculogénèse est absente ou incomplète, c'est l'anoestrus fonctionnel ; soit il y a folliculogénèse sans ovulation et donc avec persistance du follicule dominant (kyste, voir I. 2.2.1.). Nous ne verrons que le premier cas dans cette partie.

Si cet anoestrus *post-partum*, physiologique au début, se prolonge, il est possible en théorie de stimuler l'activité de folliculogénèse avec la GnRH, à partir du moment où l'hypophyse redevient sensible à cette hormone (7 - 10 jours *post-partum* chez la vache laitière, 20 - 30 jours *post-partum* chez la vache allaitante) (Irvin *et al.*, 1981). Les résultats d'essais cliniques sont cependant décevants, que ce soit pour une administration unique ou répétée de GnRH (Hanzen *et al.*, 1996 ; Hussein *et al.*, 1992 ; Peters *et al.*, 1985 ; Vorstemans and Walton, 1985).

## 2.4. Utilisations hors RCP

### 2.4.1. Synchronisation des chaleurs sur des femelles cyclées : les protocoles GPG

Ce protocole a été mis en place pour contrôler à la fois la vague de croissance folliculaire et la phase lutéale. En effet, avec le protocole prostaglandine F2 alpha (2 injections de PGF2 $\alpha$  à 7 ou 9 jours d'intervalle), le délai de venue en chaleur est parfois variable (2 à 5 jours) et dépend du stade de la vague de croissance auquel est initié le traitement. Le protocole GPA, encore appelé OvSynch® est utilisé essentiellement en Amérique du Nord.

Il est composé de trois phases (Figure 5):

- une première injection de GnRH pour synchroniser le développement folliculaire : on observe une ovulation du follicule dominant (si celui-ci est présent au moment de l'injection). Dans ce cas, on observe l'émergence d'une nouvelle vague de croissance folliculaire, dans les 3 - 4 jours après le traitement (Guibault *et al.*, 1990 ; Peter *et al.*, 1999 ; Twagiramungu *et al.*, 1995).
- 7 jours plus tard, une injection de PGF2 $\alpha$  permet d'induire la **lutéolyse** d'un éventuel corps jaune et de la structure lutéale secondaire formée à partir du follicule ovulé. A ce stade, un follicule dominant est présent et devient préovulatoire (Twagiramungu *et al.*, 1994)
- 48 à 60 heures plus tard, la seconde injection de GnRH avance le pic de LH d'environ 20 heures, et l'amplifie. L'ovulation survient environ 26 heures après cette injection (Silcox *et al.*, 1995).
- 8 à 24 heures plus tard, on réalise une insémination systématique, c'est-à-dire sans observation des chaleurs (intérêt majeur en système laitier)

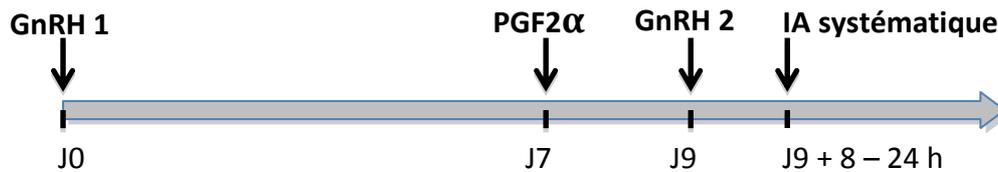


Figure 5 : Représentation schématique du protocole GPG Ovsynch®

La fertilité après insémination systématique est relativement élevée (Peter *et al.*, 1999 ; Pursley *et al.*, 1995 ; Thatcher *et al.*, September 2001 ; Twagiramungu *et al.*, 1992). Cependant, même si ce protocole induit une ovulation synchronisée chez certaines vaches en anoestrus, son efficacité est bien supérieure chez des vaches cyclées (85 % d'induction de cycle synchronisé *versus* 45 %, d'après Constant *et al.*, 2000), et cela se répercute sur le taux de gestation futur (41.7 % *versus* 22.4 % d'après Thatcher *et al.*, 2001). C'est pourquoi son utilisation chez la vache allaitante n'est justifiée que lorsque les taux de cyclicité sont élevés (vêlage d'automne par exemple).

Fricke *et al.* ont montré en 1998 qu'un protocole Ovsynch® utilisant une demi-dose de gonadoréline (50 µg) permet d'obtenir une bonne synchronisation des chaleurs (84 % des vaches) et une bonne fertilité (47.6 % des vaches synchronisées gestantes à 28 jours) ; en effet ces résultats sont comparables à ceux du traitement avec de la gonadoréline à la dose de 100 µg (Fricke *et al.*, 1998). Ce protocole est donc à la fois efficace et économique.

Mais ce protocole présente des limites :

- son efficacité est moindre chez la génisse, probablement en raison de différences dans la dynamique folliculaire (Pursley *et al.*, 1997)
- environ 6 % des vaches laitières viennent en chaleur avant l'administration de PGF2α (Vasconcelos *et al.*, 1999)
- l'ovulation est induite à 7 jours, ce qui est un peu court pour les vaches à deux vagues folliculaires (durant 8 - 11 jours), ce qui conduirait à une dégradation de la fertilité en raison d'une maturation insuffisante du follicule préovulatoire.
- Jemmeson a montré que ce protocole ne serait plus intéressant que les deux injections de prostaglandines à 14 jours d'intervalle (protocole classique) que dans les élevages où la détection des chaleurs est défectueuse, dans les autres élevages il serait moins efficace, et plus cher (Jemmeson, 2000).

#### 2.4.2. Amélioration de la survie embryonnaire par la GnRH administrée 11 - 14 jours après l'Insémination Artificielle

Environ 25 % des embryons bovins ne poursuivent pas leur développement dans les 3 premières semaines de vie (Peters, 1996). Cela peut être dû à une **insuffisance lutéale**, le corps jaune ne produisant pas assez de progestérone pour permettre le maintien de la gestation. Une injection de GnRH 11 - 14 jours après l'IA, au moment de la période de reconnaissance maternelle de la gestation, pourrait permettre de soutenir la sécrétion de progestérone et donc le développement embryonnaire.

Injectée en phase lutéale, la GnRH a un effet **lutéotrope** *via* la LH (augmentation de la production de progestérone, différenciation des cellules folliculaires en grandes cellules lutéales, voir I. 1.3.3.), un effet **lutéoprotecteur** car les grandes cellules sont moins sensibles à la PGF2 $\alpha$  (Mee *et al.*, 1993) et enfin un effet **antilutéolytique**, en provoquant la lutéinisation de follicules secondaires et ainsi faisant chuter la production d'œstrogènes, limitant ainsi l'apparition de récepteurs endométriaux à l'ocytocine (responsable de la production de PGF2 $\alpha$ ).

Les résultats des essais sur l'efficacité de ce traitement sont très variables. La méta-analyse de Peters (Peters, 2005) montre que cela est dû à des effets race, âge, de synchronisation ou non du cycle, de la méthode de diagnostic de gestation, etc. Mais après inclusion de ces variables dans l'analyse statistique, les vaches traitées présentaient une augmentation du taux de gestation très significative (*odds ratio* = 1,33). L'effet de la GnRH post-insémination est particulièrement intéressant dans les conditions d'élevage où la fertilité est dégradée (hautes températures extérieures ou mauvais état général de la vache (Willard *et al.*, 2003)).

Les indications d'utilisation des molécules analogues de la GnRH sont donc nombreuses, et les conséquences technico-économiques importantes. Les caractéristiques pharmacodynamiques, pharmacocinétiques, l'efficacité de ces trois molécules ont été évalués lors de l'établissement des dossiers d'AMM. Cependant, il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude *in vivo* qui compare l'effet de ces différents analogues. C'est pourquoi, nous avons entrepris l'étude qui vise à comparer en termes de sécrétion de LH et de dynamique folliculaire la réponse à trois GnRH, la gonadolibérine, la léciréline et la buséréline.

## **PARTIE II : MATERIEL ET METHODES**

Le premier objectif de notre étude était de comparer l'effet en termes de concentrations plasmatiques de LH d'une injection intramusculaire de trois molécules analogues de la GnRH naturelle (buséréline, gonadoréline et léciréline) à la dose indiquée dans le RCP pour l'induction de l'ovulation. Ensuite, les ovaires ont été suivis quotidiennement afin d'évaluer l'évolution des organites ovariens en réponse à la GnRH. Cette étude avait également pour objectif de tester l'effet d'une demi-dose de léciréline.

### **1. Animaux et conditions expérimentales**

#### **1.1. Animaux**

Cette étude a été réalisée avec 12 génisses de race Prim'Holstein âgées de 15 à 23 mois en mai 2013 (début de l'étude), cyclées, provenant du même élevage : GAEC de l'AZEROU, M. Van de Peer, 11310 SAISSAC.

Elles étaient en bon état général, d'un poids compris entre 260 et 360 kg en mai 2013. Aucune pathologie de l'appareil génital n'a été décelée avant, pendant ou après la période de l'étude.

Le tableau récapitulatif des caractéristiques des animaux, leur identification, âge et poids au cours de l'étude est présenté en Annexe 1.

#### **1.2. Logement et alimentation**

Les génisses ont été entretenues au pré et ont été rentrées au hangar de physiologie de l'ENVT (Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse) pour l'étude.

Elles ont été nourries avec du foin (5 kg de matière brute par génisse et par jour) et de la paille à volonté, avec pour complément 3 kg par génisse et par jour de concentré Brebilac® (RAGT, Plateau central, Rodez) contenant 18 % de protéines. L'eau a été distribuée à volonté.

#### **1.3. Surveillance des vaches**

L'état de santé des vaches a été vérifié quotidiennement par le zootechnicien lors de la distribution de l'aliment. Ces observations ont débuté trois jours avant l'administration de la première GnRH et ont été enregistrées quotidiennement jusqu'à la fin de l'expérimentation animale. Toute anomalie, ainsi que sa relation avec le traitement a été documentée.

## 1.4. Pathologies et traitements concomitants

### Pathologies concomitantes :

Les vaches n'ont reçu aucun traitement pour des pathologies concomitantes dans le mois précédant l'étude et pendant l'étude, à l'exception de la génisse B, qui a présenté du 2 mai au 27 juillet 2013 un abcès ombilical suintant, traité localement par des rinçages quotidiens à la Vétédine Solution® diluée (polyvidone iodée 10 %) après nettoyage de la zone. L'état général de cette génisse n'ayant pas été atteint, elle n'a pas été exclue de l'étude.

### Déparasitage :

Toutes les génisses ont reçu une administration d'Ivomec® D (ivermectine et clorsulon, 10 mL par voie sous cutanée, Merial) et une supplémentation en oligoéléments au cours des deux jours suivant leur arrivée. Pendant l'étude, seule une administration de 30 mL de Butox® 7,5 Pour-on (deltaméthrine, Intervet) a été effectuée.

## 2. Protocole expérimental

### 2.1. Analogues de la GnRH utilisés

Le Tableau 7 récapitule les traitements analogues de la GnRH utilisés.

Principe actif	Nom déposé	Laboratoire	Posologie	Voie d'administration
Acétate tétrahydrate de gonadoreline	Cystoréline®	CEVA Santé Animale	100 µg	Intramusculaire
Acétate de buséréline	Réceptal®	MSD	10 µg	Intramusculaire
Acétate de léciréline	Reproréline®	Vétoquinol	50 µg et 25 µg	Intramusculaire

Tableau 7 : Molécule, nom déposé, fabricant, posologie et voie d'administration des traitements analogues de la GnRH utilisés dans l'étude

## 2.2. Schéma expérimental

### 2.2.1. Habituation et pré-synchronisation des chaleurs

Les génisses ont été habituées à leur nouvel environnement pendant 11 jours après leur arrivée.

#### Pré-synchronisation :

Afin de standardiser leur statut physiologique, les traitements GnRH ont été systématiquement réalisés au jour 6 - 7 du cycle, soit en présence d'un corps jaune mature et d'un follicule de plus de 10 mm de diamètre (fin de la première vague folliculaire).

Pour cela, avant la première période, un dispositif de synchronisation des chaleurs (PRID Delta® 1.55g, CEVA) à base de progestérone a été placé dans le vagin et laissé en place pendant 9 jours, associé à l'administration intramusculaire de cloprosténol au 8<sup>ième</sup> jour (Estrumate®, 2 mL soit 0,5 mg, Intervet) et d'eCG au 9<sup>ième</sup> jour. Après retrait du dispositif intra-vaginal, des follicules de plus de 10 mm de diamètre ont été observés par échographie transrectale dans les trois jours chez toutes les génisses.

### 2.2.2. Constitution des groupes et définition des séquences

Cette étude s'est étendue du 2 mai au 27 juillet 2013. Elle a été divisée en quatre périodes de 17 jours, durant lesquelles les génisses ont reçu les traitements suivants, par voie intramusculaire :

- 100 µg de gonadoréline soit 2 mL de Cystoréline®
- 10 µg de buséréline soit 2.5 mL de Réceptal®
- 50 µg de léciréline soit 2 mL de Reproréline®
- 25 µg de léciréline soit 1 mL de Reproréline®

Le plan expérimental de l'étude a été réalisé sous forme de **carré latin**, afin que toutes les vaches reçoivent tous les traitements (Tableau 8) et afin de s'affranchir en partie de l'effet « vache » (inter-individuel). Pour cela, 4 groupes homogènes en poids de 3 génisses ont été constitués de manière aléatoire.

Une **séquence** a été définie comme la succession ordonnée de 4 périodes (voir Tableau 8).

La génisse L n'a pas été vue en chaleur après l'administration de cloprostenol en fin de période 1 (voir II. 2.2.3.), ce qui n'a pas permis de déterminer le jour J0 du cycle ; elle n'a donc pas été traitée à la gonadoréline lors de la période 2 mais a été ré-introduite dans l'étude pour la période 3.

Lors de l'échographie de contrôle du début de la période 4, cette même génisse L présentait un follicule de 7.8 mm de diamètre (moins de 10 mm), elle n'a donc pas été incluse dans la période 4 (voir II. 2.4.).

	<b>Période 1</b>	<b>Période 2</b>	<b>Période 3</b>	<b>Période 4</b>	
<b>Génisses A, C et F</b>	gonadoréline	léciréline 25 µg	léciréline 50 µg	buséréline	= séquence 1
<b>Génisses G, I et K</b>	léciréline 25 µg	buséréline	gonadoréline	léciréline 50 µg	= séquence 2
<b>Génisses B, E et H</b>	buséréline	léciréline 50 µg	léciréline 25 µg	gonadoréline	= séquence 3
<b>Génisses D, J et L</b>	léciréline 50 µg	gonadoréline	buséréline	léciréline 25 µg	= séquence 4

Tableau 8 : Plan expérimental en carré latin et répartition des génisses et des traitements GnRH en fonction des périodes de l'étude

### 2.2.3. Schéma expérimental d'une période

Une période a une durée de 17 jours. Elle se déroule comme suit (Figure 6) :

- Elle débute par **l'observation d'un comportement de chaleur** chez les génisses. Le jour de début des chaleurs est noté pour chaque génisse et constitue le jour 0 de la période (D0)
- 5 - 6 jours après le début des chaleurs (D5 - 6), c'est à dire au moment optimal pour être en présence d'un gros follicule, on procède à une échographie transrectale des ovaires de toutes les génisses. Si un follicule de plus de 10 mm de diamètre est présent sur l'un des ovaires, la génisse est incluse dans l'étude.
- Le lendemain, **la GnRH est administrée par voie intramusculaire**, (voir II. 2.2.2.). Le jour d'administration de la GnRH est noté J0 (= D6 - D7).
- 7 jours plus tard (D13 - 14 ou J7), on procède à une **lyse du corps jaune** à l'aide d'une injection intramusculaire de cloprostenol (Estrumate®, 2 mL, Intervet, analogue de la PGF2 $\alpha$ ), afin d'initier un nouveau cycle œstral.
- De **nouvelles chaleurs** sont observées 3 - 4 jours plus tard (D16 - 18 ou J10 - 11), et marquent le début de la période suivante. L'observation de celles-ci est une condition d'inclusion des génisses dans la période suivante.

## 2.2.4. Chronologie de l'étude expérimentale

Les 4 périodes se sont succédées dans le temps de manière ininterrompue. La Figure 6 schématise la chronologie de ces différentes périodes.

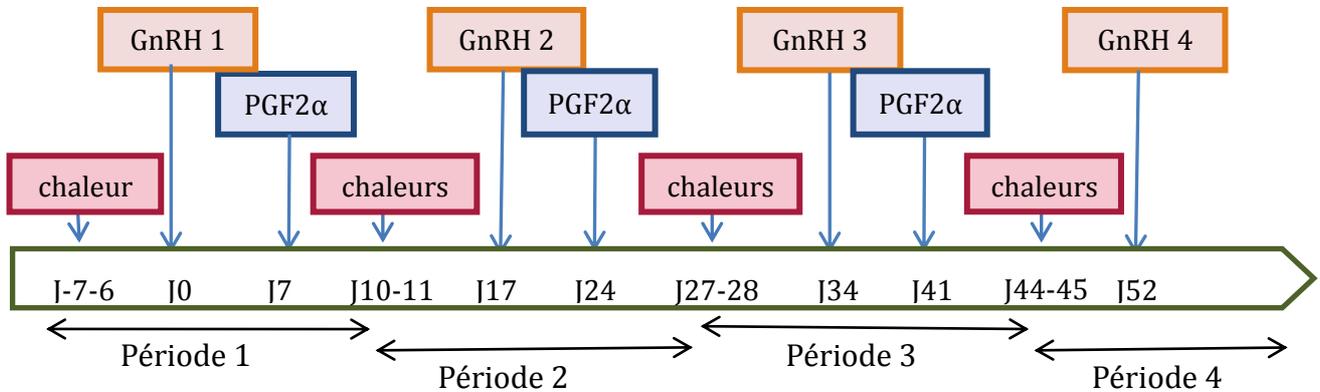


Figure 6 : Chronologie des différentes périodes et des étapes clés de l'étude

## 2.3. Surveillance des chaleurs

L'observation des chaleurs était le point de départ de chacune des périodes. Il a donc été porté une attention particulière à celles-ci, avec des observations de 20 min toutes les 3 à 6 heures pendant une période de 5 jours couvrant la période de plus forte probabilité d'expression des chaleurs (2 - 7 jours après l'administration de PGF2α). De plus, afin de maximiser les chances de détection, des marqueurs de chevauchement (Estrotec™) ont été placés sur la croupe des génisses avant chaque période, virant au rouge lorsque la génisse est chevauchée.

Le signe retenu comme marqueur du début des chaleurs a été **l'acceptation du chevauchement par d'autres génisses**, ou la coloration rouge du marqueur de chevauchement sur la croupe. En l'absence d'observation de ce signe, les chevauchements répétés d'autres génisses, associées à la disparition du follicule préovulatoire, a été pris comme repère de l'œstrus.

## 2.4. Prélèvements et observations

### Echographies transrectales

Des échographies transrectales quotidiennes à l'aide d'un appareil Mylab One® (Hospimedi) et d'une sonde linéaire de 10 MHz ont été réalisées pendant 6 jours, de J-1 (afin de s'assurer de la présence d'un follicule de plus de 10 mm de diamètre) à J4 (afin d'observer les évolutions morphologiques au niveau ovarien). Le diamètre du plus gros follicule a été enregistré.

### Prélèvements sanguins

Ces prélèvements de 2 - 4 mL ont été effectués dans des tubes héparinés en polypropylène de 4 mL, à la veine coccygienne ou jugulaire après nettoyage à l'alcool de la zone, à l'aide d'une aiguille 21 G montée sur un système Vacutainer®. Les échantillons sanguins ont été immédiatement placés dans de la glace, et centrifugés dans les 2 heures suivant le prélèvement à environ 3000 tours/min à 5°C, pendant 10 min. Le plasma séparé a été réparti dans deux fractions aliquotes de plasma de 0.5 mL dans des tubes Eppendorf® en polypropylène de 1.5 mL qui ont été conservées à - 20°C jusqu'au moment de la réalisation du dosage.

Des prélèvements sanguins **pour le dosage de la LH** ont été effectués à J0 :

- un avant l'injection de GnRH
- et aux temps 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h et 6 h après l'injection de GnRH

La Figure 7 présente schématiquement les observations et prélèvements effectués au cours d'une période.

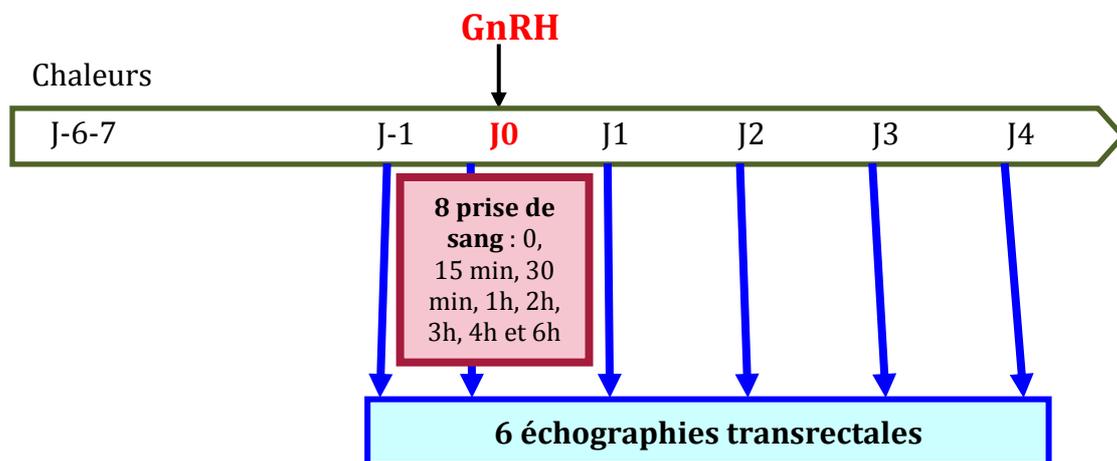


Figure 7: Planning des prélèvements sanguins et des échographies ovariennes effectués au cours d'une période

### **2.5. Dosages hormonaux**

Les concentrations plasmatiques en LH ont été évaluées par dosage ELISA à partir de 10 µL de plasma (kit LH detect®, Repropharm, Nouzilly, France). Les coefficients de variation intra et inter-dosage déterminés pour 3 niveaux de concentrations de LH (4, 7 et 12 ng/mL) ont été respectivement 17.4 et 21.4 %, 15.6 et 15.6 %, 10.4 et 12.2 %. La sensibilité du test était de 0.6 ng/mL.

### 3. Base de données

Les données suivantes ont été enregistrées, **pour chaque traitement** :

#### Données échographiques :

- Diamètres du ou des follicules dominants observés (un follicule a été considéré comme dominant si un de ses diamètres mesurés excédait 10 mm)
- Disparition ou non du follicule dominant après traitement GnRH
- Apparition ou non d'une structure lutéale à partir du follicule dominant

#### Concentrations plasmatiques et aires sous la courbe :

- Les valeurs de concentration maximales (**C<sub>max</sub>LH**) et des temps d'occurrence des ces valeurs (**T<sub>max</sub>LH**) ont été déterminées à partir de chacun des profils de concentrations plasmatiques de LH
- L'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de LH (**AUC<sub>LH</sub>**) a été calculée de t = 0 (moment de l'administration de la GnRH) au temps d'occurrence de la dernière valeur quantifiée (t = 6 h), en utilisant la méthode des trapèzes non linéaires

Ces différentes données ont alors permis de comparer les 4 traitements GnRH à la fois en termes de réponse hormonale et de dynamique folliculaire.

### 4. Analyses statistiques

Les données brutes concernant les concentrations hormonales et les diamètres des follicules dominants ont été consignées dans un tableur Microsoft Excel®.

Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  ET (écart type). Les analyses ont été effectuées sur le logiciel Systat® 12.0, en utilisant les modèles linéaires, complété si nécessaire par le test de Tukey *post hoc*.

Pour s'assurer de l'homogénéité des différents groupes de génisses avant le début de l'expérimentation, le diamètre des plus gros follicules, la concentration plasmatique basale en LH ont été comparés à l'aide d'une analyse de variance à 2 facteurs avec la séquence, le traitement, l'interaction séquence-traitement et les vaches nichées dans la séquence comme effets fixes. Les concentrations hormonales ont pour cela été transformées (log base 10).

### Données échographiques :

Le taux d'évolution du follicule dominant vers l'ovulation ou la lutéinisation en réponse aux administrations de GnRH a été comparé pour les différentes molécules grâce à un test de régression linéaire.

### LH :

Les données de **C<sub>max</sub><sub>LH</sub>**, **T<sub>max</sub><sub>LH</sub>** et d'**AUC<sub>LH</sub>** ont été transformées (log base 10) pour obtenir une homogénéité des variances et la normalité. Il n'a pas été réalisé de soustraction de la valeur basale en LH (LH<sub>0</sub>) en raison de leurs faibles valeurs et de leur homogénéité entre les génisses.

Les concentrations en LH inférieures à 0.6 ng/mL (seuil de détection) ont été arbitrairement fixées à 0.3 ng/mL.

Les paramètres pharmacodynamiques de la réponse aux administrations de GnRH (**C<sub>max</sub><sub>LH</sub>**, **T<sub>max</sub><sub>LH</sub>** et **AUC<sub>LH</sub>**) ont été comparés grâce à une **analyse de variance à 2 facteurs**, avec la séquence, le traitement, l'interaction séquence-traitement et les vaches nichées dans la séquence comme effets fixes.

## PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Résultats

Les groupes de génisses aléatoirement constitués étaient homogènes en poids ( $325.83 \pm 28.3$  kg) et en âge ( $19.78 \pm 1.9$  mois) au début de l'étude.

#### 1.1. Dynamique ovarienne

Avant administration des différentes GnRH, au jour 6 - 7 du cycle, les femelles incluses dans l'étude ( $n = 46$  valeurs pour 12 ou 11 génisses sur les 4 périodes, voir II. 2.2.2.) présentaient un follicule dominant de plus de 10 mm de diamètre (moyenne  $\pm$  ET =  $12.93 \pm 1.33$  mm). La taille du follicule avant l'administration de GnRH n'a pas été différente en fonction des traitements GnRH ou en fonction de la séquence (ANOVA, NS).

Il a été considéré trois évolutions échographiques possibles du follicule dominant après le traitement GnRH :

- **Disparition** avec formation d'une structure lutéale secondaire
- **Non disparition** :
  - o tel quel, sans modification échographique de sa structure
  - o avec lutéinisation périphérique

Dans le cadre de notre étude (avec l'objectif d'un protocole GPG, voir II. 2.4.1.), seule la persistance du follicule dominant sans lutéinisation a été considérée comme un échec du traitement. En effet cette persistance inhibe la reprise d'une nouvelle vague de croissance folliculaire et la persistance prolongée du follicule entraîne une diminution de la fertilité de l'ovocyte (Austin *et al.*, 1999).

Le Tableau 9 présente les résultats échographiques obtenus :

Molécule injectée, dose	Nombre de génisses	Pourcentage de disparition du follicule dominant	Pourcentage de non disparition du follicule dominant	
			Avec lutéinisation périphérique	Sans lutéinisation périphérique
Gonadoréline 100 µg	11	55 % * (6)	18 % (2)	27 % (3)
Léciréline 25 µg	11	91 % (10)	9 % (1)	0 % (0)
Léciréline 50 µg	12	91.5 % (11)	8.5 % (1)	0 % (0)
Buséréline 10 µg	12	100 % (12)	0 % (0)	0 % (0)

**Tableau 9 :** Résultats échographiques obtenus après injection intramusculaire de 100 µg de gonadoréline, de léciréline à la dose de 25 et de 50 µg et de 10 µg de buséréline chez des génisses présentant un follicule de plus de 10 mm de diamètre (\* différence significative)

Ainsi, la gonadoreline à la dose de 100 µg est moins efficace que la léciréline (aux doses de 50 ou 25 µg) et la buséreline à la dose de 10 µg pour induire la disparition du follicule dominant ( $p < 0.01$ ). Cependant, seules 3 génisses sur 11 n'ont pas présenté de modification du follicule dominant après le traitement à la gonadoreline, ce qui correspond à un échec du traitement. Ce pourcentage n'est pas statistiquement différent de celui observé après les autres traitements.

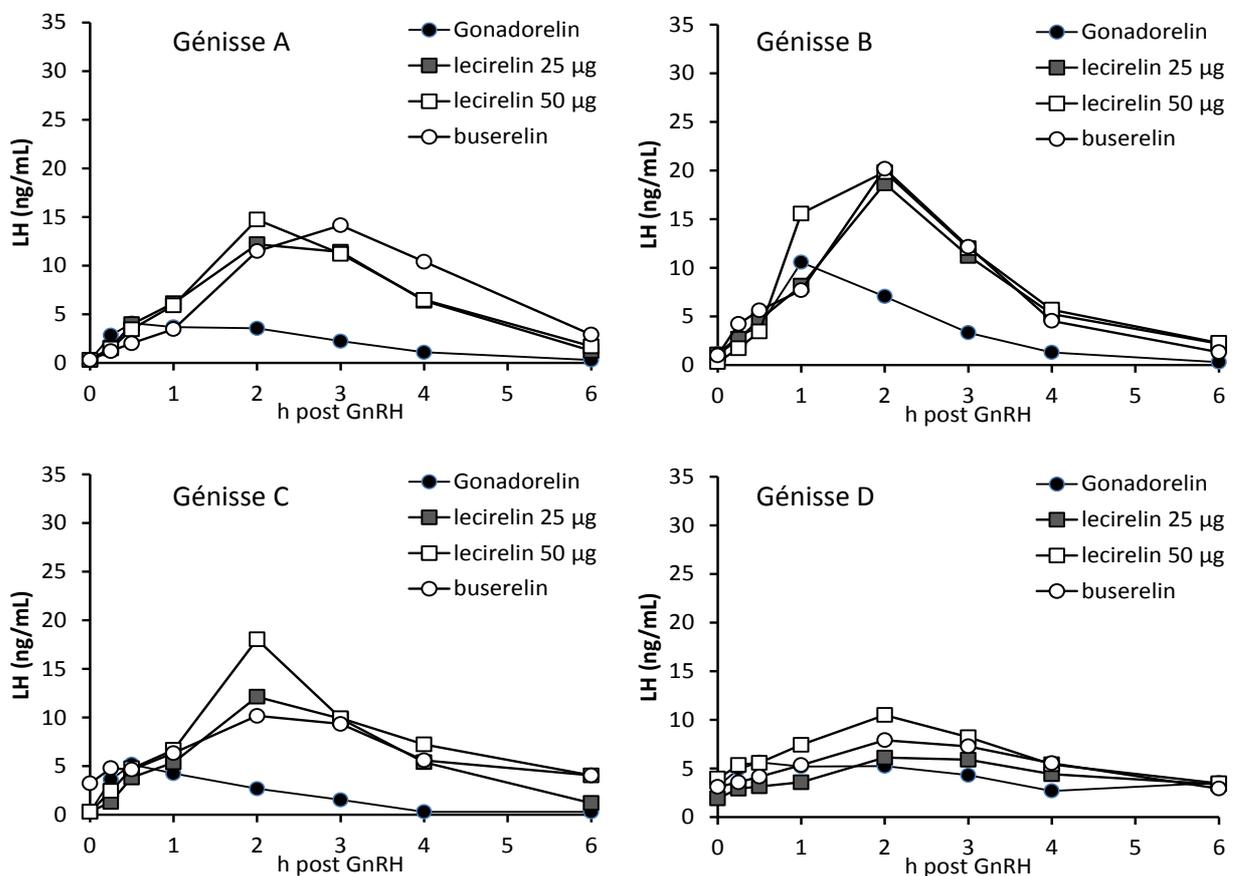
Tous les follicules dominants se sont lutéinisés ou ont ovulé pour la léciréline aux deux doses et pour la buséreline.

## 1.2. Effet des différentes GnRH sur les concentrations plasmatiques en LH

L'échantillon est le même que celui décrit au III. 1.1.1. ( $n = 46$  valeurs sur 12 ou 11 génisses).

Les concentrations plasmatiques en LH avant l'administration des GnRH (à T0) étaient basses ( $0.92 \pm 1.00$  ng/mL) et n'ont pas été différentes en fonction des traitements GnRH ou en fonction de la séquence d'administration (ANOVA, NS).

La Figure 8 présente les concentrations de LH après administration intramusculaire des différentes GnRH chez les 12 génisses de l'étude.



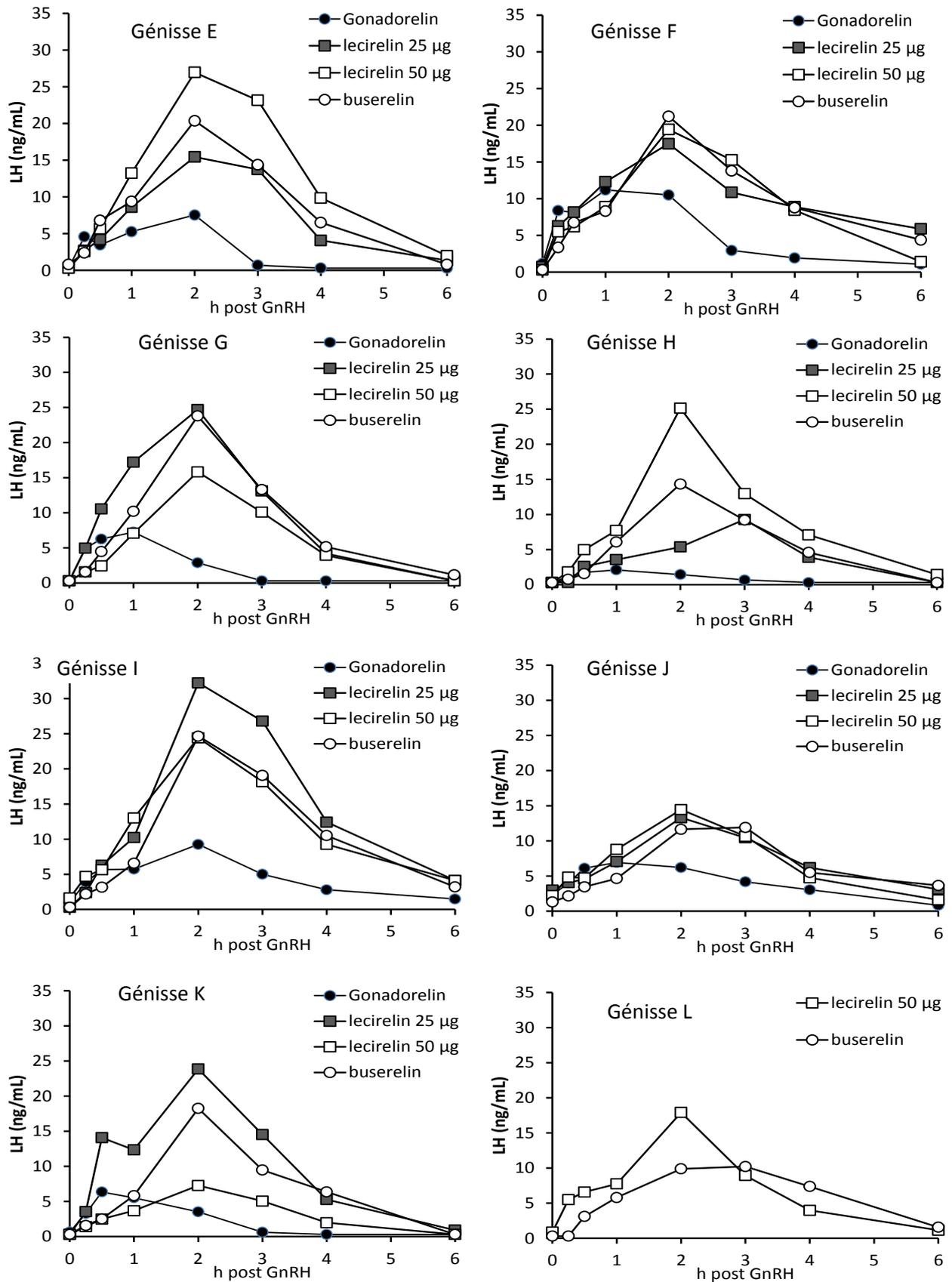


Figure 8: Evolution temporelle des concentrations plasmatiques de LH (ng/mL) après une administration intramusculaire de 100 µg de gonadoreline, de leciréline à la dose de 25 et de 50 µg et de 10 µg de buséreléine chez 12 génisses Prim'Holstein

Au cours du temps, la concentration plasmatique en LH augmente rapidement après l'administration de GnRH, pour atteindre un maximum entre 1 et 2 heures après l'injection. Cette concentration décroît ensuite plus lentement, et revient à des valeurs basales au bout de 6 heures.

**(1) C<sub>max</sub><sub>LH</sub>:**

Les concentrations plasmatiques maximales moyennes en LH (**C<sub>max</sub><sub>LH</sub>**) obtenues après l'injection intramusculaire des différentes GnRH sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 10).

Molécule injectée, dose	Moyenne de la C <sub>max</sub> <sub>LH</sub> (ng/mL)	Ecart type	Nombre de génisses
Gonadoréline 100 µg	6.92	2.72	11
Léciréline 25 µg	16.86	7.63	11
Léciréline 50 µg	17.87	5.86	12
Buséréline 10 µg	16.43	5.70	12

**Tableau 10 :** Valeurs moyennes et écart-type des concentrations plasmatiques maximales en LH obtenues après l'injection intramusculaire de 100 µg de gonadoréline, de léciréline à la dose de 25 et de 50 µg et de 10 µg de buséréline chez des génisses Prim'Holstein

La C<sub>max</sub><sub>LH</sub> après traitement à la gonadoréline (100 µg par voie intramusculaire) a été inférieure à celles obtenues après les autres traitements GnRH. Cependant, il existe une **interaction entre le traitement et la séquence** : cette différence n'est pas observée pour la séquence 4. En effet, la génisse L ayant été exclue de deux périodes, le nombre de génisses pour cette séquence était alors trop limité pour avoir une puissance statistique suffisante. Cet effet était significatif ou tendait à être significatif pour la buséréline (p = 0.06, p = 0.007 et p = 0.002), pour la léciréline à la dose of 25 µg (p = 0.097, p = 0.001, p = 0.031), respectivement pour les trois premières séquences. La différence entre la gonadoréline et la léciréline à la dose of 50 µg était significative uniquement pour deux séquences (p = 0.012 et p < 0.001, respectivement pour la première et la troisième séquence, test ANOVA Tukey *post-hoc*).

La C<sub>max</sub><sub>LH</sub> moyenne obtenue pour le traitement à la gonadoréline (6.15 ± 2.74 ng/mL) est inférieure au pic physiologique de 13 ng/mL en moyenne (voir I. 1.3.2.).

La buséréline à la dose de 10 µg ainsi que les deux doses de léciréline, utilisées par voie IM, provoquent des C<sub>max</sub><sub>LH</sub> similaires (ANOVA, NS) à celles observées lors du pic préovulatoire de LH.

### (2) $T_{max_{LH}}$

Les temps moyens d'occurrence de la concentration plasmatique maximale en LH ( $T_{max_{LH}}$ ) obtenus après injection des différentes molécules sont présentés dans le tableau suivant (Tableau 11) :

Molécule injectée, dose	Moyenne de la $T_{max_{LH}}$ (h)	Ecart type	Nombre de génisses
Gonadoréline 100 $\mu$ g	<b>1.00 *</b>	0.55	11
Léciréline 25 $\mu$ g	2.09	0.30	11
Léciréline 50 $\mu$ g	2.00	0.00	12
Buséréline 10 $\mu$ g	2.25	0.45	12

**Tableau 11** : Valeur moyenne et écart-type du temps d'occurrence de la concentration plasmatique maximale de LH ( $T_{max_{LH}}$ ) après injection intramusculaire de 100  $\mu$ g de gonadoréline, de léciréline à la dose de 25 et de 50  $\mu$ g et de 10  $\mu$ g de buséréline chez des génisses Prim'Holstein (\* : différence significative)

Il n'y a pas eu d'effet séquence sur le  $T_{max_{LH}}$  ni d'interaction entre le traitement et la séquence.

**La gonadoréline utilisée à la dose de 100  $\mu$ g induit une  $T_{max_{LH}}$  significativement inférieure à celles des autres traitements GnRH (ANOVA,  $p < 0.001$ ), autour d'1 heure après l'injection.**

La buséréline à la dose de 10  $\mu$ g ainsi que les deux doses de léciréline, utilisées par voie IM, provoquent des  $T_{max_{LH}}$  similaires (ANOVA, NS), aux alentours de 2 - 3 heures après l'injection de GnRH.

### (3) $AUC_{LH}$

Les aires sous la courbe de concentration plasmatique de LH en fonction du temps (entre  $t = 0$  et  $t = 6$  h) ( $AUC_{LH}$ ), obtenues après injection des différentes molécules sont présentées dans le tableau suivant (Tableau 12) :

Molécule injectée, dose	$AUC_{LH}$ moyenne (ng/h.mL)	Ecart type	Nombre de génisses
Gonadoréline 100 $\mu$ g	18.25	8.20	11
Léciréline 25 $\mu$ g	49.73	19.33	11
Léciréline 50 $\mu$ g	50.53	16.25	12
Buséréline 10 $\mu$ g	47.69	11.14	12

**Tableau 12** : Aire sous la courbe moyenne des concentrations plasmatiques de LH en fonction du temps après injection intramusculaire de 100  $\mu$ g de gonadoréline, de léciréline à la dose de 25 et de 50  $\mu$ g et de 10  $\mu$ g de buséréline chez des génisses Prim'Holstein

L'analyse statistique montre une interaction entre le traitement et la séquence :

- Pour les 3 premières séquences, l' $AUC_{LH}$  moyenne après une injection intramusculaire de 100 µg de gonadoréline est significativement inférieure à celles obtenues après les autres traitements GnRH (ANOVA,  $p < 0.001$ ).
- Pour la séquence 4, le nombre de génisses traitées à la gonadoréline était probablement trop faible pour avoir une puissance suffisante du test statistique.

Les deux doses de léciréline et la dose de buséréline utilisées ont eu des effets comparables sur la sécrétion de LH chez la vache (ANOVA, NS).

## 2. Discussion

### 2.1. Aspects méthodologiques

Dans notre étude, le faible nombre de femelles ( $n = 12$ ), ainsi que leur âge (uniquement des génisses) et leur race (uniquement des Prim'Holstein) rendent les résultats extrapolables uniquement pour cette catégorie d'animaux, et non pas à l'ensemble des vaches françaises. Cependant, le choix du protocole expérimental sous forme de carré latin permet de s'affranchir de l'effet vache et donc d'augmenter la puissance de notre étude.

De plus, en ce qui concerne la réponse en terme de LH aux différents traitements, la génisse L a été par deux fois exclue de l'étude (pour la période 2 et la période 4), ce qui limite le nombre de données pour la gonadoréline et la léciréline 25 µg, et pour la séquence 4. Ainsi, lors de cette dernière séquence, le nombre de vaches était insuffisant pour conclure à un effet significativement inférieur du traitement à la gonadoréline en termes de sécrétion de LH ( $C_{max_{LH}}$  et  $AUC_{LH}$ ).

Par ailleurs, la comparaison des GnRH a été réalisée dans un schéma expérimental contrôlé :

- (1) Le choix de la phase lutéale, et de la fin de la première vague folliculaire, comme moment de traitement aux différentes molécules analogues de la GnRH, ne correspond pas à une réalité pratique. En effet, la GnRH s'utilise principalement dans le cadre d'un traitement GPG pour maîtriser la phase folliculaire et contrôler l'ovulation, afin de programmer l'insémination en s'affranchissant de l'observation des chaleurs. Dans ce cadre, la première GnRH n'est pas réalisée à un moment prédéterminé du cycle (sauf en cas de présynchronisation de type PreSynch®, voir III. 2.2.). C'est une limite à l'exploitation des résultats de notre étude en termes de réussite des traitements (ovulation ou non, lutéinisation ou non). Mais l'objectif de notre étude était de comparer les différents traitements en termes de réponse hormonale de LH, dans des conditions standardisées.
- (2) L'observation des chaleurs, point clé du protocole pour la détermination du jour J0 du cycle, a été réalisée toutes les 2-4 heures, de 7 heures à 22 heures, soit de façon très contraignante et peu applicable aux conditions de terrain.

(3) Les différents traitements GnRH ont été réalisés sur toutes les génisses, selon un plan expérimental en carré latin pour prendre en compte l'effet possible de la répétition des traitements au travers de l'effet séquence.

(4) L'absence de groupe témoin au moment des chaleurs ne permet pas ici d'avoir des valeurs de référence du pic de LH physiologique en termes de  $C_{maxLH}$ ,  $T_{maxLH}$  et  $AUC_{LH}$  chez ces génisses Holstein. Ces valeurs nous auraient permis de comparer le pic de LH induit par les GnRH pendant la phase lutéale, par rapport à un pic de LH spontané préovulatoire.

Après synthèse bibliographique (voir I. 1.3.2.), **nous avons considéré 13 ng/mL comme la valeur moyenne de la concentration maximale physiologique en LH lors du pic préovulatoire.** Mais cette valeur est discutable car les concentrations de LH spontanées sont variables dans la littérature (voir II. 2.2.1.).

## 2.2. Discussion des résultats

Dans les conditions de l'étude, nous avons montré que **les différents traitements GnRH** testés, aux doses « induction de l'ovulation » ou à une demi-dose de léciréline, provoquent l'apparition d'un **pic de LH rapide, d'une durée de 6 heures**, soit la moitié de la durée d'un pic de LH physiologique. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lucy et Stevenson (1986) qui ont comparé dans un même essai le pic de LH physiologique et celui induit par 100 µg de gonadoréline après synchronisation de l'activité ovarienne à l'aide de prostaglandines F2 alpha. Les animaux du groupe traité à la GnRH présentaient des pics de LH d'une durée de  $6.1 \pm 0.8$  h *versus*  $11.0 \pm 0.7$  h pour le groupe non traité.

Le pic de LH observé dans notre étude est atteint entre 30 min et 2h30 après l'administration de GnRH. Ces résultats sont également en accord avec ceux de Lucy et Stevenson (1986).

Notre étude montre également que le traitement à la **gonadoréline (100 µg) provoque une stimulation de la sécrétion de LH plus précoce et inférieure à celle observée après les trois autres traitements** (buséréline 10 µg, léciréline 50 µg et 25 µg).

La différence de réponse en termes de sécrétion de LH après traitement à la gonadoréline ou à la buséréline est en accord avec les résultats de Chesnault et coll. (1990). L' $AUC_{LH}$  obtenue après traitement à la gonadoréline, sous forme de diacétate tétrahydrate à la dose de 100 µg ( $18.25 \pm 8.2$  ng/h.mL) est relativement comparable à celle obtenue par Monnoyer *et al.* (2004), qui ont obtenu sur 12 vaches adultes, en phase lutéale, une  $AUC_{LH}$  moyenne de  $25 \pm 8.3$  ng/h.mL. Ces mêmes auteurs obtiennent une  $AUC_{LH}$  de  $40 \pm 10.3$  ng/h.mL en doublant la dose de gonadoréline (200 µg), ce qui est comparable à celle obtenue dans notre étude pour la buséréline 10 µg ( $47.69 \pm 11.14$  ng/h.mL) et pour la léciréline 50 et 25 µg (respectivement  $50.53 \pm 16.25$  ng/h.mL et  $49.73 \pm 19.33$  ng/h.mL). La gonadoréline à la dose de 200 µg pourrait ainsi induire une réponse en terme de LH équivalente à celle des deux nonapeptides étudiés.

Ainsi, le traitement à la gonadoréline à la dose recommandée pour l'« induction de l'ovulation » semble légèrement moins efficace que les autres analogues de GnRH administrés **en phase lutéale.**

Cependant, il semble que les concentrations de LH en réponse aux différentes GnRH, dont la gonadoréline, soient suffisantes pour induire la disparition ou la lutéinisation du follicule dominant (73 %, 100 %, 100 % et 100 % respectivement pour la gonadoréline, la léciréline 25 µg, la léciréline 50 µg et la buséréline). Ces taux sont relativement élevés, suggérant que ces quatre traitements sont efficaces pour stimuler le redémarrage d'une vague folliculaire dans le cadre d'un protocole de type GPG, si une présynchronisation préalable a été mise en place. Sur le terrain, il est possible d'associer un protocole GPG de type OvSynch® avec un protocole de présynchronisation, de type PreSynch® (2 injections de PGF2 alpha à 14 jours d'intervalle, voir Figure 9). Ce type de protocole double, utilisé actuellement en Amérique du Nord, permet d'initier la première GnRH du protocole GPG entre le jour 5 et 10 du cycle ovarien, ce qui est idéal. Les taux de gestation après application de ce programme double sont plus élevés chez des vaches laitières cyclées qu'avec un protocole OvSynch® seul : 47 % *versus* 34 % respectivement (Moreira *et al*, 2001).

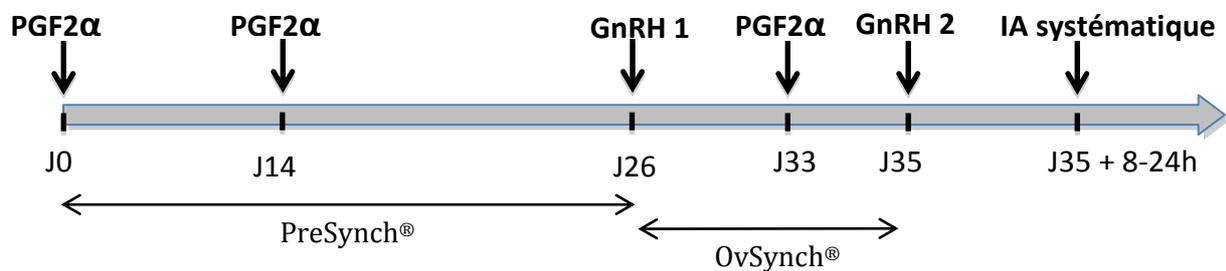


Figure 9 : Représentation schématique d'un protocole PreSynch-OvSynch®

### 2.3. Intérêts et perspectives de l'étude

L'utilisation des hormones, en particulier lors d'un protocole GPG (Ovsynch® associé éventuellement à un protocole Presynch®) est importante en Amérique du Nord et dans différents pays européens. En France, le marché du protocole GPG est relativement réduit actuellement mais pourrait se développer. En effet, les troupeaux (en particulier laitiers) ont des effectifs de plus en plus importants, et la main d'œuvre est réduite, ce qui contribue à une baisse de l'efficacité de la détection des chaleurs des vaches. Les éleveurs cherchent donc à s'affranchir de cette surveillance, et optent pour des protocoles de synchronisation tels que le protocole GPG.

Notre étude a montré que :

- l'utilisation de la gonadoréline, de la buséréline et de la léciréline à la dose « induction de l'ovulation » est efficace pour synchroniser la vague de croissance folliculaire de génisses cyclées dans le cadre d'un protocole GPG, si une présynchronisation a été mise en place (la première injection de GnRH doit se faire au jour 6 – 7 du cycle, pour maximiser les chances d'être en présence d'un follicule dominant)

- l'utilisation de la gonadoréline à la dose « traitement des kystes folliculaires » (soit 200 µg) pourrait permettre d'augmenter la sécrétion de LH et ainsi d'optimiser les chances de redémarrage d'une vague folliculaire. De plus, Monnoyer *et al.* (2004) ont estimé que la dose de gonadoréline nécessaire pour induire des concentrations plasmatiques en LH équivalentes à la moitié des concentrations observées lors de la décharge préovulatoire de LH est de 203 µg. Cependant, ces résultats sont en désaccord avec ceux de Fricke *et al.* (1998) qui ont montré qu'une demi-dose de gonadoréline (50 µg), utilisée dans le cadre d'un protocole GPG, suffirait pour synchroniser les chaleurs dans 84 % des cas.
- l'utilisation d'une demi-dose de léciréline (25 µg) est suffisante pour induire un pic de LH et une nouvelle vague folliculaire (100 % des cas de notre étude), et ses effets sont comparables à ceux d'une dose de léciréline indiquée pour induire l'ovulation, en termes d'évolution folliculaire et de sécrétion de LH.

Des expérimentations complémentaires restent nécessaires pour évaluer l'efficacité de ce protocole en terme d'ovulation et de fertilité à l'œstrus induit, à la fois chez des génisses et des vaches et dans les conditions terrain.

**AGREMENT SCIENTIFIQUE**

**En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire**

Je soussignée, Véronique GAYRARD, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **MERLE Delphine** intitulée « **Comparaison de la réponse en termes de sécrétion de LH à la gonadoréline, à la buséréline et à la léciréline chez des génisses prim'hostein** » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 25 septembre 2014  
Professeur Véronique GAYRARD  
Enseignant chercheur  
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



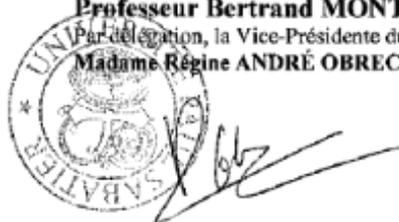
Vu :  
Le Directeur de l'Ecole Nationale  
Vétérinaire de Toulouse  
Professeur Alain MILON



Vu :  
Le Président du jury :  
Professeur Jean PARINAUD



Vu et autorisation de l'impression :  
Le Président de l'Université  
Paul Sabatier  
Professeur Bertrand MONTHUBERT  
Par déléation, la Vice-Présidente du CEVU  
Madame Régine ANDRÉ OBRECHT



Conformément à l'Arrêté du 20 avril 2007, article 6, la soutenance de la thèse ne peut être autorisée qu'après validation de l'année d'approfondissement.

## Références bibliographiques

- Adams G.P., Jaiswal R., Singh J., Malhi P., Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 2008, 669:72-80
- Austin E.J., Mihm M., Ryan M.P. et coll., Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. *J. Anim. Sci.*, 1999, 77:2219-26
- Bleach E.C.L., Glencross R.G., Knight P.G., Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous estrous cycles. *Reproduction*, 2004, 127:621-29
- Constant F., Devaux P., Ponter A.A., Grimard B., Deletang F. et Mialot J.P., L'association GnRH-PGF2 $\alpha$ -GnRH chez la vache allaitante : résultats de reproduction et qualité du corps jaune induit. *Renc. Rech. Rum.*, 2000, 7:241
- Erickson B.H., Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.*, 1966, 25:800-5
- Foote R.H. and Riek P.M., Gonadotropin-releasing hormone improves reproductive performance of dairy cows with slow involution of the reproductive tract. *J. Anim. Sci.*, 1999, 77:12-6
- Fricke P.M., Guenther J.N. and Wiltbank M.C., Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 1998, 50:1275-84
- Garverick H.A., Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80:995-1004
- Ginther O.J., Knopf L., Kastelic J.P., Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.*, 1989, 87:223-30
- Ginther O.J., F.L.V. Pinaffi, F.A. Khan, L.F. Duarte and M.A. Beg., Follicular-phase concentrations of progesterone, estradiol 17 beta, LH, FSH and a PGF2alpha metabolite and daily clustering of prolactin pulses, based on hourly blood sampling and hourly detection of ovulation in heifers. *Theriogenology*, 2013, 79:918-28
- Guibault L.A., Lussier F., Grasso F. and Matton P., Influence of the GnRH analogue on follicular dynamics in cows pretreated or not with FSH. *Theriogenology*, 1990, 33:240
- Gustafsson H., Larsson K., Kindahl H. and Madej A., Sequential endocrine changes and behaviour during oestrus and metoestrus in repeat breeder and virgin heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, 1986, 10:261-73
- Hansel W. and Convey E.M., Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 1983, 57(2):404-24
- Hansel W., Alila H.W., Dowd J.P., Milvae R.A., Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *J. Reprod. Fertil.*, 1991, Suppl. 43:77-89
- Hanzen C.H., Houtain J.Y. et Laurent Y., Mise au point relative à l'utilisation de la gonadolibérine en reproduction bovine. *Med. Vet. Québec*, 1996, 26:47-54

- Haughian J.M., Ginther O.J., Kot K. and Wiltbank M.C., Relationships between FSH patterns and follicular dynamics and the temporal association among hormones in natural and GnRH-induced gonadotrophin surges in heifers. *Reproduction*, 2004, 127:23-33
- Hussein F.M., Eilts B.E., Paccamonti D.L. and Younis M.Y., Effect of repeated injections of GnRH in postpartum anoestrus dairy cows. *Theriogenology*, 1992, 37:605-17
- Irvin M.J., Zaied A.A., Day B.N. and Garverick H.A., GnRH-induced release in suckled beef cows. The effects of days post-partum and E2-17 $\beta$  concentration on the release of LH following administration of GnRH. *Theriogenology*, 1981, 15:443-8
- Jemmeson A., Synchronizing ovulation in dairy cows with either two treatments of GnRH and one prostaglandin, or two treatments of prostaglandin. *Aust. Vet. J.*, 2000, 78(2):108-11
- Kaim M., Bloch A., Wolfenson D., Braw-Tal R., Rosenberg M., Voet H. and Folman Y., Effects of GnRH administered to cows at the onset of oestrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. *J. Dairy Sci.*, 2003, 86:2012-21
- Karsh F.J., Bowen J.M., Caraty A., Evans N.P. and Moenter S.M., Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol. Reprod.*, 1997, 56:303-9
- Kowase T., Walsh H.E., Darling D.S. and Shupnik M.A., Estrogen enhances gonadotropin-releasing hormone-stimulated transcription of the luteinizing hormone subunit promoters via altered expression of stimulatory and suppressive transcription factors. *Neuroendocrinology*, 2007, 148(12):6083
- Kulick L.J., Kot K., Wiltbank M.C. and Ginther O.J., Follicular and hormonal dynamics during the first follicular wave in heifers. *Theriogenology*, 1999, 52:913-21
- Larson S.F., Butler W.R. and Currie W.B., Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80:1288-95
- Leslie K.E., The events of normal and abnormal postpartum reproductive endocrinology and uterine involution in dairy cows : A review. *Can. Vet. J.*, 1983b, 24:67-71
- Luck M.R., A fonction for ovarian oxytocin. *J. Endocrinol.*, 1989, 121:203-4
- Lucy M.C. and Stevenson J.S., Gonadotrophin-releasing hormone at estrus: luteinising hormone, oestradiol and progesterone during the periestrual and postinsemination periods in dairy cattle. *Biol. Reprod.*, 1986, 35:300-11
- Lussier J.G., Matton P., Dufour J.J., Growth rates of the follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 1987, 81:301-7
- Martin O., Friggens N.C., Dupont J., Salvetti P., Freret S., Rame C., Elis S., Gatién J., Disenhaus C. and Blanc F., Data-derived reference profiles with corepresentation of progesterone, estradiol, LH, and FSH dynamics during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*, 2013, 79:331-43
- Martinez M.F., Mapletoft R.J., Kastelic J.P. and Carruthers T., The effects of 3 gonadorelin products on luteinizing hormone release, ovulation, and follicular wave emergence in cattle. *Can. Vet. J.*, 2003, 44:125-31
- Maurer R.R. and Echtenkamp S.E., Hormonal asynchrony and embryonic development. *Theriogenology*, 1982, 17:11-22

- Mee M.O., Stevenson J.S., Alexander B.M. and Sasser R.G., Administration of GnRH at oestrus influences pregnancy rates, serum concentration of LH, FSH, oestradiol-17 $\beta$ , pregnancy-specific protein B and progesterone, proportion of luteal cell types and in-vitro production of progesterone in dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 1993, 71:185-98
- Monnoyer S., Guyonnet J. and Toutain P.L., A preclinical pharmacokinetic/ pharmacodynamic approach to determine a dose of GnRH, for treatment of ovarian follicular cyst in cattle, a Review. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 2004, 27:527-35
- Moreira F., Orlandi C., Risco C.A., Mattos R., Lopes F. and Thatcher W.W., Effects of presynchronisation and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 2001, 84(7):1646-59
- Morgan W.F. and Lean I.J., GnRH treatment in cattle: a meta-analysis of the effects on conception at the time of insemination. *Aust. Vet. J.*, 1993, 70:205-9
- Navarro V.M., Castellano J.M., Fernandez-Fernandez R., Tovar S., Roa J. and Mayen A., Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology*, 2005, 146(1):156-63
- Palhao M.P., Beg M.A., Rodrigues M.J. and Ginther O.J., Follicle and hormone dynamics in single versus double ovulating heifers. *Reproduction*, 2009, 138(3):561-70
- Peter A.T. and Bosu W.T.K., Influence of intrauterine infections and follicular development on the response to GnRH administration in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 1988, 29:1163-75
- Peters A.R., Pimentei M.G. and Lamming G.E., Hormone responses to exogenous GnRH pulses in postpartum dairy cows. *J. Reprod. Fertil.*, 1985, 75:557-65
- Peters A.R., Embryo mortality in the cow. *Anim. Breeding Abstracts*, 1996, 64:587-98
- Peters A.R., Ward S.J., Warren M.J., Gordon P.J., Mann G.E. and Webb R., Ovarian and hormonal response of cows to treatment with an analogue to gonadotrophin releasing hormone and prostaglandins F2 $\alpha$ . *Vet. Rec.*, 1999, 144:343-46
- Peters A.R., Veterinary clinical application of GnRH-Questions of efficacy. *Anim. Reprod. Sci.*, 2005, 88:155-67
- Pursley J.R., Mee M.O. and Wiltbank M.C., Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 $\alpha$  and GnRH. *Theriogenology*, 1995, 44:915-23
- Pursley J.R., Wiltbank M.C., Stevenson J.S. and coll., Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized oestrus. *J. Dairy Sci.*, 1997, 80:295-300
- Rahe C.H., Owens R.E., Fleeger J.L., Newton H.J., Harms P.G., Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology* 1980, 107:498-503
- Rajamahendran R., Ambrose J.D., Schmitt E.J.P., Thatcher M.J. and Thatcher W.W., Effects of buserelin injection and deslorelin (GnRH agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpus luteum dynamic in Holstein cows. *Theriogenology*, 1998, 50:1141-55

- Rizzo A., Campanile D., Mutinati M., Minoia G., Spedicato M. and Sciorsci R.L., Epidural VS intramuscular administration of leirelin, a GnRH analogue, for the resolution of follicular cysts in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 2011a, 126(1-2):19-22
- Rizzo A., Spedicato M., Mutinati M., Minoia G., Pantaleo M. and Sciorsci R.L., *In vivo* and *in vitro* studies of the role of the adrenergic system and follicular wall contractility in the pathogenesis and resolution of bovine follicular cysts. *Theriogenology*, 2011b, 76(8):1526-31
- Rodriguez-Martinez H., Ko J., McKenna D., Weston P.G., Whitmore H.L., Gustafsson B.K. and Wagner W.C., Uterine motility in the cow during the estrous cycle. II. Comparative effects of prostaglandins F(2alpha), E(2), and cloprostenol. *Theriogenology*, 1987, 27(2):349-58
- Rosenberg, Chun, Kaim, Herz and Folman, The effect of GnRH administered to dairy cows during oestrus on plasma LH and conception in relation to the time of treatment and insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, 1991, 24:13-24
- Sartori R., Fricke P.M., Ferreira J.C.P., Ginther O.J., Wiltbank M.C., Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.*, 2001, 65:1403-9
- Savio J.D., Boland M.P., Roche J.F., Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post partum dairy cows. *J. Reprod. Fert.*, 1990b, 88:581-91
- Silcox R.W., Powell K.L., Pursley J.R. and Wiltbank M.C., Use of GnRH to synchronize ovulation in Holstein cows and heifers treated with GnRH and prostaglandins. *Theriogenology*, 1995, 43:325
- Skinner, D.C. and Dufourny L., Oestrogen receptor beta-immunoreactive neurones in the ovine hypothalamus: distribution and colocalisation with gonadotropin releasing hormone. *J Neuroendocrinol*, 2005
- Smith, J.T., Coolen L.M., Kriegsfeld L.J., Sari I.P., Jaafarzadehshirazi M.R. and Maltby M., Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology*, 2008, 149(11):5770-82
- Souza A.H., Cunha A.P., Silva E.P.B., Gümen A., Ayres H., Guenther J.N. and Wiltbank M.C., Comparison of gonadorelin products in lactating dairy cows : Efficacy based on induction of ovulation of an accessory follicle and circulating luteinizing hormone profiles. *Theriogenology*, 2009, 72:271-9
- Spicer L. J. and Echterkamp S. E., Ovarian Follicular Growth, Function and Turnover in Cattle: A Review. *J. Anim. Sci.*, 1986, 62:428-51
- Stevenson J.S. and Call E.P., Fertility of postpartum dairy cows after administration of gonadotrophin-releasing hormone and prostaglandin F2 alpha : A field trial. *J. Dairy Sci.*, 1988, 71:1926-33
- Swanson L.V. and Hafs H.D., LH and prolactin in blood serum from estrus to ovulation in Holstein heifers. *J. Anim. Sci.*, 1971, 33(5):1038-42
- Tebble J.E., O'Donnel M.J. and Dobson H., Ultrasound diagnosis and treatment outcome of cystic ovaries in cattle. *Vet. Rec.*, 2001, 148:411-3

Thatcher W.W., Patterson D.J., Moreira F., Pancarci M., Jordan E.R. and Risco C.A., Current concepts for estrus synchronization and timed ovulation. *Proceedings of the American Association of Bovine Practitioners, Vancouver, Canada*. September 2001, 95-105

Twagiramungu H., Guilbault L.A. and Dufour J.J., Synchronization of ovarian follicular waves with a GnRH agonist to increase the precision of oestrus in cattle : a review. *J. Anim. Sci.*, 1995, 73:3141-51

Twagiramungu H., Guilbault L.A., Proulx J., Ramkumar R. and Dufour J.J., Histological populations and atresia of ovarian follicles in post-partum cattle treated with an agonist of gonadotrophin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.*, 1994, 72:192-200

Twagiramungu H., Guilbault L.A., Proulx J., Villeneuve P. and Dufour J.J., Influence of an agonist of GnRH (buserelin) on oestrus synchronization and fertility in beef cows. *J. Anim. Sci.*, 1992, 70:1904-10

Twagiramungu H., Guilbault L.A., Proulx J., Dufour J.J., Buserelin alters the development of the corpora lutea in cyclic and early postpartum cows. *J Anim Sci*, 1995, 73:805-11

Vasconcelos J.L.M., Silcox R.W., Rosa G.J.M., and coll., Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rates after synchronization of ovulation beginning on different days of the oestrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 1999, 52:1067-78

Vorstemans J.P.M. and Walton J.S., Effect of intermittent injections of GnRH at various frequencies on the release of LH and ovulation in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 1985, 8:335-47

Webb R., Garnsworthy P.C., Gong J.G. and Armstrong D.G., Control of the follicular growth: local interaction and nutritional influences. *J. Anim. Sci.*, 2004, 82(suppl):E63-E64

Willard S., Gandy S., Bowers S., Graves K., Elias A. and Whisnant C., The effects of GnRH administration postinsemination on serum concentration of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology*, 2003, 59:1799-810

Wolfenson D., Inbar G., Roth Z., Kaim M., Bloch A. and Braw-Tal R., Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology*, 2004, 62:1042-55

Wollums A.R. and Peters A.T., Cystic ovarian condition in cattle. *The compendium food animal practice*, 1994, 16(9):1247-52

Zheng J., Fricke P.M., Reynolds L.P. and Redmer D.A., Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biology of Reproduction*, 1994, 51:623-32

NOM : MERLE

PRENOM : DELPHINE

TITRE : Comparaison de la réponse en termes de sécrétion de LH à la gonadoréline, la buséréline et la léciréline chez des génisses Prim'Holstein

RESUME : En France, trois analogues de la GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone) sont à la disposition du praticien pour l'espèce bovine : la gonadoréline (Cystoréline®), la buséréline (Réceptal®) et la léciréline (Reproreline®). Ces hormones sont indiquées pour induire l'ovulation au moment de l'insémination artificielle, pour traiter les kystes ovariens ou pour traiter l'anoestrus *post-partum* (buséréline). En plus de ces indications, les analogues du GnRH sont largement utilisés en élevage laitier, en particulier en Amérique du Nord, dans le cadre de programmes de synchronisation des chaleurs avec une insémination à un moment prédéterminé.

L'objectif de cette étude était de comparer les effets biologiques en termes de sécrétion de LH d'une administration de gonadoréline, de buséréline et de léciréline à la dose « induction de l'ovulation » (indiquée dans le Résumé des Caractéristiques du Produit). En outre, l'effet d'une demi-dose de léciréline a été évalué. L'étude a été réalisée sur 12 génisses Prim'Holstein cyclées, recevant chacune les quatre traitements GnRH selon un protocole expérimental en carré latin, au cours des 4 périodes de l'étude. Au jour 6 ou 7 du cycle ovarien, en présence d'un follicule dominant, 100 µg de gonadoréline, 25 µg ou 50 µg de léciréline ou encore 10 µg de buséréline ont été administrés aux génisses. Les concentrations plasmatiques de LH ont été évaluées pendant 6 heures post-administration et l'évolution échographique du follicule dominant (persistance, disparition ou lutéinisation) a été suivie pendant 4 jours.

La sécrétion de LH a été plus faible après la gonadoréline, comparativement à la léciréline à la dose de 25 et 50 µg et à la buséréline. Les concentrations maximales de LH ont été 2.5 fois plus faibles comparativement à celles observées après la léciréline ou la buséréline et ont été atteintes une heure plus tôt. Le pourcentage d'évolution du follicule dominant par ovulation ou lutéinisation après le traitement GnRH a été élevé (respectivement, 73 %, 100 %, 100 % et 100 %, pour la gonadoréline, la léciréline à la dose de 25 et 50 µg et la buséréline). La léciréline à la demi-dose de 25 µg a eu les mêmes effets que la dose de 50 µg.

MOTS CLES : GnRH – LH – gonadoréline – buséréline – léciréline - induction de l'ovulation - maîtrise des cycles – bovin

---

ENGLISH TITLE : Comparison in terms of LH secretion to gonadorelin, buserelin and lecirelin in Holstein heifers

ABSTRACT: In France, three GnRH analogues, gonadorelin (Cystoréline®), buserelin (Réceptal®) and lecirelin (Reproreline®), are used to induce ovulation at the time of artificial insemination, to treat ovarian cysts or to manage *post-partum* anestrus (buserelin). Moreover, these GnRH analogues are widely used in dairy farms, especially in North America, for synchronization programs with a fixed timed artificial insemination.

The aim of the study was to compare the LH secretion in response to gonadorelin, buserelin and lecirelin (at the dose recommended to induce ovulation, as reported in the summary of characteristics of products). In addition, the biological response to a half dose of lecirelin was assessed. The study was conducted according to a latin-square protocol, with 12 Holstein heifers receiving the four treatments during the four periods of the study. On Day 6 or 7 of the ensuing cycle, in the presence of a dominant follicle, 100 µg of gonadorelin, 25 µg or 50 µg of lecirelin or 10 µg of buserelin was administered to the cows. The plasma LH response was evaluated for up to 6 hours post-administration and ovarian follicular dynamics (persistence, disappearance or luteinisation) for up to four days, by ultrasonography.

There was a significantly lower LH release following gonadorelin treatment compared to lecirelin at the doses of 25 or 50 µg and the buserelin treatment. The mean maximal LH concentration following gonadorelin was 2.5 lower than after lecirelin or buserelin and was reached one hour earlier. The percentage of evolving of the dominant follicle by ovulation or luteinisation following GnRH treatment was high (73 %, 100 %, 100 % and 100 %, for gonadorelin, lecirelin at the dose of 25 and 50 µg and buserelin, respectively). The lecirelin at the dose of 25 µg had the same effects than the 50 µg dose.

KEYWORDS: GnRH – LH – gonadorelin – buserelin – lecirelin - ovulation induction - cycle control – bovine