

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE, AGROALIMENTAIRE
ET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE - ONIRIS
ANNÉE 2020

Evaluation des effets d'une primo-immunisation et de rappels d'immunisation anti-GnRH par injections d'Improvac® sur les concentrations plasmatiques d'AMH, de testosterone, d'androsténédione et d'oestradiol chez l'étalon.

THÈSE
pour le
diplôme d'Etat de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 03 décembre 2020
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Henri GUERIN

Né le 16 septembre 1993 à HARFLEUR (76)

JURY

Président : Monsieur Paul BARRIÈRE
Professeur à la faculté de Médecine de Nantes

Rapporteur : Monsieur Jean-François BRUYAS
Professeur agrégé à l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique – ONIRIS

Assesseur : Madame Laëticia JAILLARDON
Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique –
ONIRIS



ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE, AGROALIMENTAIRE
ET DE L'ALIMENTATION NANTES ATLANTIQUE - ONIRIS
ANNÉE 2020

Evaluation des effets d'une primo-immunisation et de rappels d'immunisation anti-GnRH par injections d'Improvac® sur les concentrations plasmatiques d'AMH, de testosterone, d'androsténédione et d'oestradiol chez l'étalon.

THÈSE
pour le
diplôme d'Etat de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

présentée et soutenue publiquement
le 03 décembre 2020
devant
la Faculté de Médecine de Nantes
par

Henri GUERIN

Né le 16 septembre 1993 à HARFLEUR (76)

JURY

Président : Monsieur Paul BARRIÈRE
Professeur à la faculté de Médecine de Nantes

Rapporteur : Monsieur Jean-François BRUYAS
Professeur agrégé à l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique – ONIRIS

Assesseur : Madame Laëticia JAILLARDON
Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique –
ONIRIS



Département BPSA Biologie, Pathologie et Sciences de l'Aliment

Responsable : Hervé POULIQUEN - Adjoint : Emmanuel JAFFRES

Nutrition et Endocrinologie	Patrick NGUYEN (Pr)
Pharmacologie et Toxicologie	Jean-Claude DESFONTIS (Pr) Martine KAMMERER (Pr) Yassine MALLEM (Pr) Hervé POULIQUEN (Pr) Antoine ROSTANG (MCC)
Physiologie fonctionnelle, cellulaire et moléculaire	Jean-Marie BACH (Pr) Julie HERVE (MC) Lionel MARTIGNAT (Pr) Grégoire MIGNOT (MC)
Histologie et anatomie pathologique	Jérôme ABADIE (MC) Marie-Anne COLLE (Pr) Laetitia JAILLARDON (MC) Frédérique NGUYEN (MC)
Pathologie générale, microbiologie et immunologie	Hervé SEBBAG (MC)
Biochimie alimentaire industrielle	Clément CATANEO (MC) Joëlle GRUA (MC) Laurent LE THUAUT (MC) Carole PROST (Pr) Thierry SEROT (Pr) Florence TEXIER (MC)
Microbiotech	Géraldine BOUE (MC) Nabila HADDAD (MC) Emmanuel JAFFRES (MC) Mathilde MOSSER (MC) Hervé PREVOST (Pr) Raouf TAREB (MCC)

Département SAESP Santé des Animaux d'Elevage et Santé Publique

Responsable : Alain CHAUVIN - Adjoint : Raphaël GUATTEO

Elevage, nutrition et santé des animaux domestiques	Nathalie BAREILLE (Pr) François BEAUDEAU (Pr) Ségolène CALVEZ (MC) Christine FOURICHON (Pr) Aurélien MADOUASSE (MC) Lucile MARTIN (Pr) Nora NAVARRO-GONZALEZ (MCC)
Infectiologie	Albert AGOULON (MC) Suzanne BASTIAN (MC) Alain CHAUVIN (Pr) François MEURENS (Pr) Emmanuelle MOREAU (PR) Carole PEREZ (MC) Nadine RAVINET (MC) Nathalie RUVOEN-CLOUET (Pr)
Médecine des animaux d'élevage	Sébastien ASSIE (MC) Catherine BELLOC (Pr) Isabelle BREYTON (MC) Christophe CHARTIER (Pr) Raphaël GUATTEO (Pr) Mily LEBLANC MARIDOR (MC) Anne RELUN (MC)
Hygiène et qualité des aliments	Jean-Michel CAPPELIER (Pr) Eric DROMIGNY (MC HDR) Michel FEDERIGHI (Pr) Bruno LE BIZEC (Pr) Catherine MAGRAS (Pr) Marie-France PILET (Pr) Fanny RENOIS-MEURENS (MC)

Département DSC Sciences cliniques

Responsable : Catherine IBISCH - Adjoint : Olivier GAUTHIER	
Anatomie comparée	Eric BETTI (MC) Claude GUINTARD (MC) Margarida RIBEIRO DA SILVA NEUNLIST (MCC)
Pathologie chirurgicale et anesthésiologie	Eric AGUADO (MC HDR) Olivier GAUTHIER (Pr) Eric GOYENVALLE (MC HDR) Caroline TESSIER* (MC) Gwénola TOUZOT-JOURDE (MC)
Dermatologie, parasitologie des carnivores et des équidés, mycologie	Patrick BOURDEAU (Pr) Emmanuel BENSIGNOR (Pr Ass)
Médecine interne, imagerie médicale et législation professionnelle vétérinaire	Nora BOUHSINA (MCC) Nicolas CHOUIN (MC) Anne COUROUCE (Pr) Jack-Yves DESCHAMPS (Pr) Amandine DRUT (MC) Marion FUSELLIER-TESSON (MC) Catherine IBISCH (MC) Françoise ROUX (Pr) Odile SENECAAT (MC)
Biotechnologies et pathologie de la reproduction	Djemil BENCHARIF (MC HDR) Lamia BRIAND (MC HDR) Jean-François BRUYAS (Pr) Francis FIENI (Pr)

Département GPA Génie des procédés alimentaire

responsable : Olivier ROUAUD - Adjoint : Sébastien CURET-PLOQUIN	
Lionel BOILLEREAUX (Pr) Marie DE LAMBALLERIE (Pr) Francine FAYOLLE (Pr) Vanessa JURY (MC) Alain LEBAIL (Pr) Jean-Yves MONTEAU (MC HDR) Laurence POTTIER (MC) Cyril TOUBLANC (MC)	Sébastien CURET PLOQUIN (MC) Dominique DELLA VALLE (MC HDR) Michel HAVET (Pr) Emilie KORBEL (MC) Catherine LOISEL (MC) Olivier ROUAUD (Pr) Eve-Anne NORWOOD (MCC)

Département MSC Management, statistiques et communication

Responsable : Michel SEMENOU - Adjointe : Pascal BARILLOT (MC)	
Mathématiques, Statistiques, Informatique	Véronique CARIOU (MC) Philippe COURCOUX (MC) El Mostafa QANNARI (Pr) Michel SEMENOU (MC) Chantal THORIN (Pr Ag.) Evelyne VIGNEAU (Pr)
Economie, gestion	Pascal BARILLOT (MC) Ibrahima BARRY (MCC) Florence BEAUGRAND (MC) Sibylle DUCHAINE (MC) Sonia EL MAHJOUB (MC) Jean-Marc FERRANDI (Pr) Samira ROUSSELIERE (MC)
Langues et communication	Marc BRIDOU (PLPA) David GUYLER (Ens. cont.) Shaun MEEHAN (Ens. cont.) Linda MORRIS (PCEA) Ian NICHOLSON (Ens. Cont.)

La reproduction d'extraits de cette thèse est autorisée avec mention de la source. Toute reproduction partielle doit être fidèle au texte utilisé. Cette thèse devra être citée comme suit :

GUERIN H, (2020), Evaluation des effets d'une primo-immunisation et de rappels d'immunisation anti-GnRH par injections d'Improvac® sur les concentrations plasmatiques d'AMH, de testostérone, d'androsténédione et d'œstradiol chez l'étalon. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes, Oniris : Ecole Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique, 88p

Le défaut de citation est considéré comme du plagiat. Ce dernier est puni par la loi française et passible de sanctions allant jusqu'à 3 ans d'emprisonnement et 300 000€ d'amende

Remerciements

A Monsieur Paul Barrière :

Professeur à la faculté de Médecine de Nantes

Pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance de thèse.

A Monsieur Jean-Francois Bruyas

Professeur agrégé à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique-Oniris

Pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et m'avoir soutenu et encadré tout au long de travail

A Madame Laëticia Jaillardon

Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique-Oniris

Pour avoir accepté de prendre la place d'assesseur au sein de mon jury de thèse et d'avoir réaliser l'ensemble des analyses avec le personnel de l'ensemble du laboratoire.

Table des matières

Remerciements	6
Introduction.....	12
Première partie : matériel et méthodes.....	17
Population d'étude.....	17
Protocole expérimental.....	19
Protocole d'immunisation :	19
Prélèvement et mesure	21
Analyse des échantillons	22
Dosage de l'AMH sérologique	22
Dosage sérique de l'œstradiol.....	25
Dosage sérique de la testostérone.....	27
Dosage sérique de l'androsténédione.....	29
Analyses statistiques	31
Deuxième partie : Résultats	32
Profil de sécrétions des chevaux entiers non immunisés	32
Profil de sécrétion de l'AMH	32
Profil de sécrétion des stéroïdes	33
Profil de sécrétions hormonales chez les chevaux immunisés de rang 1	36
Profil de sécrétion de l'AMH	37
.....	37
Profil de sécrétion des stéroïdes	38
Profil de sécrétions hormonales chez les chevaux immunisés de rang 2	40
Profil de sécrétion de l'AMH	40
Profil de sécrétion des stéroïdes	41
Profil de sécrétions hormonales chez les chevaux immunisés de rang 3	44
Profil de sécrétion de l'AMH	44
Profil de sécrétion des stéroïdes	45
Profil de sécrétions hormonales chez les chevaux immunisés de rang 4	49
Profil de sécrétion de l'AMH	49
Profil de sécrétion des stéroïdes	50
Profil de sécrétions hormonales chez les chevaux immunisés de rang 5	53
Profil de sécrétion des stéroïdes	54

Comparaison des profils hormonaux entre les différents rangs de vaccination	56
Profil de sécrétion de l'AMH	56
Profil de sécrétion des stéroïdes	57
Comparaison des profils hormonaux entre 2016 et 2017	61
Comparaison des profils hormonaux des 5 chevaux entier entre 2016 et 2017.	63
Comparaison des profils hormonaux des 3 chevaux de rang 1 entre 2016 (entier) et 2017 (rang 1).....	65
.....	65
Comparaison des profils hormonaux des 7 chevaux de rang 2 entre 2016 (rang 1) et 2017 (rang 2).....	67
Comparaison des profils hormonaux des 4 chevaux de rang 3 entre 2016 (rang 2) et 2017 (rang 3).....	68
.....	68
Comparaison des profils hormonaux des 6 chevaux de rang 4 entre 2016 (rang 3) et 2017 (rang 4).....	70
.....	70
Comparaison des profils hormonaux des 2 chevaux de rang 5 entre 2016 (rang 4) et 2017 (rang 5).....	71
.....	71
TROISIEME PARTIE : DISCUSSION	73
Bilan des résultats	73
Résultats de l'AMH	73
Résultats des stéroïdes.....	75
Validité des résultats	81
Population d'étude.....	81
Protocole vaccinal	82
Suivi des chevaux.....	83
Fiabilité des analyses de laboratoire	83
Perspectives.....	84
CONCLUSION	85
BIBLIOGRAPHIE.....	86

Liste des abréviations

AMH : Anti-Müllérien Hormone

ABP : Androgen Binding Protein

BSA : Bovine Serume Albumine

CPM : Count Per Minutes

FSH : Follicle Stimulating Hormone

GnRH : Gonadotrophin Releasing Hormone

LH : Luteinizing Hormone

PSL : Pur-sang Lusitanien

PRE : Pure race Espagnol

Liste des tableaux

<u>Tableau I : Chevaux entiers immunisés</u>	17
<u>Tableau II: Chevaux entiers non immunisés</u>	18
<u>Tableau III : Protocole de vaccinations des entiers immunisés</u>	20
<u>Tableau IV : Dates des prélèvements sur les chevaux</u>	21
<u>Tableau V: Date et rang de vaccination des chevaux castrés chirurgicalement au cours de l'étude</u> ..	22
<u>Tableau VI: Variations inter et intra-essai du test AMH GENII ELISA</u>	23
<u>Tableau VII : Variations inter et intra-essai du test Estradiol sensitive ELISA</u>	27
<u>Tableau VIII: Variations inter et intra-essai du test RIA SPECTRIA TESTOSTERONE</u>	29
<u>Tableau IX : Variations inter et intra-essai du kit ANDROSTENEDIONE ACTIVE RIA DSL</u>	30
<u>Tableau X : Concentration plasmatique en AMH (µg/L) chez les entiers non immunisés</u>	32
<u>Tableau XI : Testostéronémie (nMole/L) chez les entiers non immunisés</u>	34
<u>Tableau XII : Œstradiolémie(pMole/L) chez les entiers non immunisés</u>	35
<u>Tableau XIII : Concentration plasmatique en androsténédione chez les entiers non immunisés</u>	36
<u>Tableau XIV: Concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 1</u>	37
<u>Tableau XV: Testostéronémie (nMole/L) chez les chevaux de rang 1</u>	38
<u>Tableau XVI : Œstradiolémie(pMole/L) chez les chevaux de rang 1</u>	39
<u>Tableau XVII: Concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 1</u>	40
<u>Tableau XVIII : Concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 2</u>	41
<u>Tableau XIX : Testostéronémie (nMole/L) chez les chevaux de rang 2</u>	42
<u>Tableau XX: Œstradiolémie(pMole/L) chez les chevaux de rang 2</u>	43
<u>Tableau XXI: Concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 2</u>	44
<u>Tableau XXII : Concentration plasmatique en AMH(µg/L) chez les chevaux de rang 3</u>	45
<u>Tableau XXIII : Testostéronémie (nMole/L) chez les chevaux de rang 3</u>	46
<u>Tableau XXIV : Œstradiolémie(pMole/L) les chevaux de rang 3</u>	47
<u>Tableau XXV : Concentrations plasmatiques en androsténédione chez les chevaux de rang 3</u>	48
<u>Tableau XXVI: Concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 4</u>	49
<u>Tableau XXVII : Testostéronémie (nMole/L) chez les chevaux de rang 4</u>	50
<u>Tableau XXVIII : Œstradiolémie(pMole/L) chez les chevaux de rang 4</u>	51
<u>Tableau XXIX: Concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 4</u>	52
<u>Tableau XXX: Concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 5</u>	53
<u>Tableau XXXI : Testostéronémie (nMole/L) chez les chevaux de rang 5</u>	54
<u>Tableau XXXII : Œstradiolémie(pMole/L) chez les chevaux de rang 5</u>	55
<u>Tableau XXXIII: Liste des chevaux de la comparaison</u>	62
<u>Tableau XXXIV: Comparaison des chevaux immunisés de la population d'étude en fonction du rang</u>	81

Liste des figures

Figure 1:Concentrations sériques d'AMH chez le mâle humain, mesurées à l'aide du kit de dosage immunologique AMH (Immunotech-Coulter) (Rey R, 1998).....	14
Figure 2:Concentrations sériques de testostérone (barre noire) et d'AMH (barre grise) chez les poulains prépubères et les étalons postpubères (Claes et al, 2013)	14
Figure 3 : Concentration moyenne en AMH sérique chez les étalons cryptorchides, les étalons cryptorchides avec un testicule en place et les étalons intacts	15
Figure 4 : Protocole de dosage sérique de l'AMH	24
Figure 5: Protocole de dosage sérique de l'AMH	24
Figure 6: Protocole de dosage de l'œstradiol	26
Figure 7: Protocole de dosage de la testostérone	28
Figure 8: Protocole de dosage de l'androsténédione	30
Figure 9 : Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les entiers non immunisés au cours de l'année.....	33
Figure 10 : Evolution de la testostéronémie chez les entiers non immunisés au cours de l'année.....	34
Figure 11: Evolution de l'œstradiolémie chez les entiers non immunisés au cours de l'année.....	35
Figure 12: Evolution de la concentration plasmatique en androsténédione chez les entiers non immunisés au cours de l'année.....	36
Figure 13: Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 1 au cours de l'année.....	37
Figure 14: Evolution de la testostéronémie chez les chevaux de rang 1 au cours de l'année	38
Figure 15: Evolution de l'œstradiolémie chez les chevaux de rang 1 au cours de l'année	39
Figure 16 : Evolution de la concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 1 au cours de l'année.....	40
Figure 17 : Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 2 au cours de l'année	41
Figure 18 : Evolution de la testostéronémie chez les chevaux de rang 2 au cours de l'année	42
Figure 19: Evolution de l'œstradiolémie chez les chevaux de rang 2 au cours de l'année	43
Figure 20 : Evolution de la concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 2 au cours de l'année.....	44
Figure 21: Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 3 au cours de l'année.....	45
Figure 22: Evolution de la testostéronémie chez les chevaux de rang 3 au cours de l'année	46
Figure 23 : Evolution de l'œstradiolémie chez les chevaux de rang 3 au cours de l'année	47
Figure 24 : Evolution de la concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 3 au cours de l'année.....	48
Figure 25 : Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 4.....	49
Figure 26 Evolution de la testostéronémie chez les chevaux de rang 4 au cours de l'année	50
Figure 27: Evolution de l'œstradiolémie chez les chevaux de rang 4 au cours de l'année	51
Figure 28: Evolution de la concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 4 au cours de l'année.....	52
Figure 29: Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 5 au cours de l'année.....	54
Figure 30: Evolution de la testostéronémie chez les chevaux de rang 5 au cours de l'année	55
Figure 31: Evolution de l'œstradiolémie chez les chevaux de rang 5 au cours de l'année	56
Figure 34: Evolution de l'œstradiolémie moyenne au cours de l'année selon le rang de vaccination	59
Figure 35: Evolution des concentrations plasmatiques mensuelles en androsténédione chez les entiers non immunisés et les entiers immunisés par rang.....	80

Introduction

La castration chirurgicale est le mode de stérilisation le plus couramment utilisé par les vétérinaires chez les équidés à la demande des propriétaires d'individus mâles. Cette castration est réalisée afin d'éviter une saillie non désirée et de faciliter la gestion de ces individus en modifiant leur comportement. Cette question de la gestion des individus à haut potentiel génétique est posée pour de nombreux propriétaires de chevaux car l'hébergement, la manipulation, le transport et l'entraînement d'un étalon avec d'autres congénères peuvent être compliqués, notamment d'un point de vue comportemental, et possiblement incompatible avec la réalisation d'une carrière sportive.

La castration immunologique est une alternative à la castration chirurgicale qui a été rendu possible récemment par la mise au point et la commercialisation par la suite de formulations immunisantes vis-à-vis de la GnRH. Cette vaccination malgré l'adjonction d'adjuvant de l'immunité n'entraîne peu ou pas d'effets secondaires locaux ou généraux. Théoriquement cette castration immunologique est réversible et permet de conserver le patrimoine génétique d'un individu tout en lui laissant mener une carrière sportive en parallèle. Du fait de cette potentielle réversibilité son utilisation est en nette augmentation dans la clientèle des vétérinaires praticiens mais également comme une alternative lorsque la castration chirurgicale présente des risques importants ou est refusée par les propriétaires.

Cependant, bien que les formulations présentes sur le marché en France de ces « vaccins » anti-GnRH ne soient pas destinés aux étalons, quelques premiers travaux expérimentaux ont été menés chez les équidés mâles avec l'utilisation de la formulation à destinée à l'espèce porcine ou la formulation équine mise au point pour induire un anœstrus prolongée chez la jument et disponible en Australie et en Nouvelle-Zélande. Il reste néanmoins quelques inconnues quant à l'utilisation de ce mode de castration en particulier quant à la réversibilité de l'effet stérilisant et par conséquent sur le rythme des rappels d'immunisation à effectuer afin de conserver un effet de « castration » efficace. En effet, aucune donnée n'a jusqu'alors été publiée sur la persistance de la réversibilité de l'effet après plusieurs injections de rappels immunisant. C'est pourquoi la recherche de marqueurs biologiques permettant de déterminer le moment où une répétition de l'injection est nécessaire, de juger la possible réversibilité ou si l'arrêt des fonctions gonadiques est définitif seraient particulièrement utile pour orienter le praticien sur la poursuite du traitement d'un étalon. C'est dans cette optique que des études sont conduites par l'unité de reproduction de l'école vétérinaire de Nantes.

Une première étude menée en 2013 en partenariat avec le laboratoire des course hippiques (LCH) sur 10 chevaux entiers a conduit à la réalisation d'une thèse d'exercice de docteur vétérinaire (Dreau M.L., 2015) et de quelques communications et publications (Bailly-Chouriberry L, Loup B, Popot MA, Dreau ML, Garcia P, Bruyas JF, Bonnaire Y, 2017 Bruyas, J.F., Dreau, M.-L., Bailly-Chouriberry, L., Popot, M.-A., Nguyen, F., Loup, B., Garcia, P., Bonnaire, Y, 2017, Dreau M-L., 2015). Cette étude a démontré que la production de stéroïdes sexuels mesurée par leur concentration urinaire chute très rapidement avant même la seconde injection de primo-immunisation en parallèle de l'apparition d'anticorps anti-GnRH. Cette étude a également montré la grande variabilité inter-individu quant à la concentration plasmatique de ces anticorps produits, l'intensité de la modification de comportement ainsi que la durée de l'effet sur les sécrétions stéroïdiennes et le manque de corrélation entre la

concentration sanguine en anticorps et d'une part celle des stéroïdes et d'autre part la réapparition des manifestations comportementales caractéristiques des mâles non castrés, manifestations qui sont la plupart du temps le motif initial et principal à la castration. Le seul critère objectif mis en évidence dans cette étude a été l'évaluation de la taille du scrotum, en effet son volume diminue de façon spectaculaire lors de la mise en place de l'immunisation tandis qu'au contraire une augmentation de ce volume signe la fin de l'effet produit et indique la nécessité d'une injection de rappel afin de conserver l'effet souhaité car cette augmentation de volume est parfois précédée ou synchrone ou souvent précède le retour du comportement gênant.

Une seconde étude a été initiée en 2016 et poursuivie en 2017 avec la collaboration du LDHvet et du laboratoire d'anatomopathologie d'Oniris. Cette étude est découpée en plusieurs phases avec en premier lieu le suivi hormonal sur l'année 2016 d'une population de chevaux non-immunisés ou immunisés pour la première fois pour certains et entre deux à quatre années consécutives pour les autres. Cette première phase a conduit à la réalisation d'une thèse de doctorat vétérinaire d'exercice (Gorreguès, 2018) et une présentation au dernier Symposium International de Reproduction Equine (Dordas-Perpinya, M., Gorreguès, M., Gervasoni, M.-A., Berder, C., Thorin, C., Jaillardon, L., Bruyas, J.-F., 2018) La seconde phase de l'étude sert de support à ce présent travail, elle est en continuité avec la thèse précédemment réalisée et correspond au suivi hormonal des mêmes chevaux immunisés une nouvelle année supplémentaire pour certains ou pour la première fois pour d'autres en 2017. Le but étant de juger l'effet d'une primo-immunisation mais également de rappels d'immunisation sur les concentrations plasmatiques, et non plus urinaire, de testostérone, d'androsténédione et d'œstradiol et ainsi évaluer l'impact du nombre d'années consécutives d'immunisation sur ces sécrétions. L'hypothèse a également été émise que la concentration plasmatique d'Anti-mullerienn-Hormone (AMH) pourrait être un marqueur biologique de l'effet, de la réversibilité et potentiellement de l'irréversibilité de l'immunisation sur les fonctions testiculaires.

L'AMH est une glycoprotéine composée de 573 acides aminés chez les chevaux qui est sécrétée dès la vie embryonnaire par les cellules de Sertoli du testicule fœtal. Les connaissances concernant cette hormone chez le cheval on fait l'objet d'une synthèse bibliographique dans le cadre d'une thèse de doctorat vétérinaire d'exercice (Naudin M., 2018). Cette hormone entraîne la dégénérescence des canaux de Müller qui sont les ébauchent des voies génitales femelles chez les foetus mâle., tandis que la testostérone est l'hormone qui permet le maintien des canaux de Wolff lors du développement embryonnaire, qui vont devenir les canaux déférents et les vésicules séminales et permet le développement de la prostate et des organes génitaux externes mâles. Chez la femelle, l'absence d'AMH et de testostérone lors du développement embryonnaire concourt à la disparition des canaux de Wolff d'une part et au maintien des canaux de Müller qui donneront les organes génitaux femelles d'autre part (Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R, 1998), (Rey R, Picard JY, Josso N, 2014).

A la suite de la découverte de l'AMH par Alfred Jost en 1947 et de son rôle qu'elle a pendant le développement, il a également été mis en évidence que la sécrétion d'AMH ne s'arrête pas après la naissance chez l'homme et que les concentrations sériques d'AMH augmentent jusqu'à un pic lors de la première année de vie et restent élevées jusqu'à la puberté (figure 1) (Rey R, 1998).

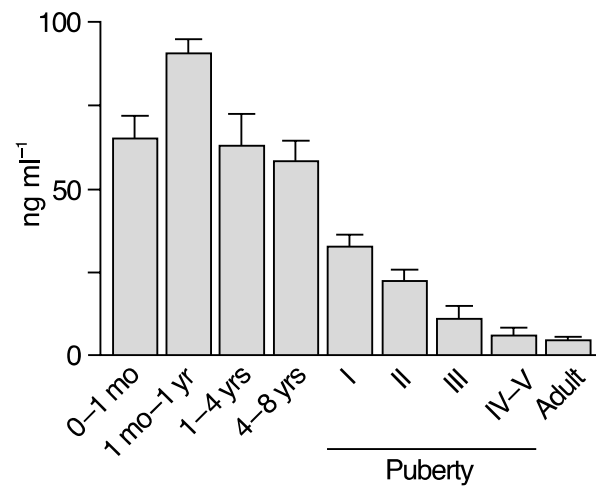


Figure 1: Evolutions des concentrations sériques d'AMH chez le mâle humain en fonction de l'âge, mesurées à l'aide du kit de dosage immunologique AMH (Immunotech-Coulter) (Rey R, 1998)

Chez les différentes espèces de mammifère une cinétique de sécrétion comparable a été retrouvé avec une forte diminution des concentrations d'AMH après la puberté. De ce fait, il est admis que la sécrétion d'AMH subit un effet inhibiteur à la fois de la stéroïdogénèse et de la spermatogénèse alors que les sécrétions gonadotropes de FSH et de LH n'auraient aucun rôle sur la sécrétion d'AMH par les cellules de Sertoli. Dans l'espèce équine, les effets inhibiteurs qui semblent se mettre en place avec la survenue de la puberté ont également été observés (figure 2).

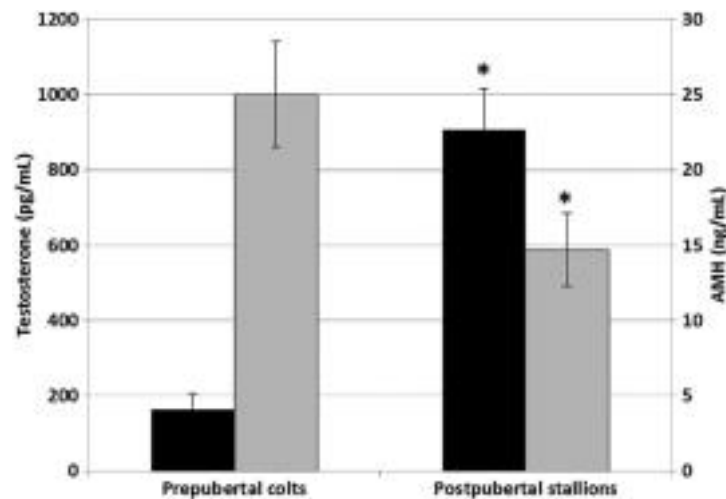


Figure 2: Concentrations sériques de testostérone (barre noire) et d'AMH (barre grise) chez les poulains prépubères et les étalons postpubères (Claes et al, 2013)

De plus, chez les hongres, l'ablation des testicules entraînent logiquement un arrêt de la production d'AMH car les cellules de Sertoli ne sont plus présentes et L'AMH ne devient plus détectable au niveau sérique dans les 8 à 12 jours post-castration. (Claes, 2013 ; Murrase, 2015). De plus il apparait que ce dosage de l'AMH permet de déterminer si un cheval est cryptorchide ou non si on ne connaît pas son historique et qu'on n'observe pas la présence de testicule en place dans le scrotum (Scarlett, 2017)

Ainsi chez les chevaux cryptorchides avec 2 testicules en position intraabdominale ou avec un testicule en position abdominal mais ayant subi l'ablation du testicule scrotale, la concentration en AMH plasmatique est significativement supérieure à celle des chevaux adultes entiers (figure 3). En revanche, la présence simultanée d'un testicule scrotal et d'un testicule en position intraabdominal semble avoir un plus faible impact sur la concentration plasmatique d'AMH.

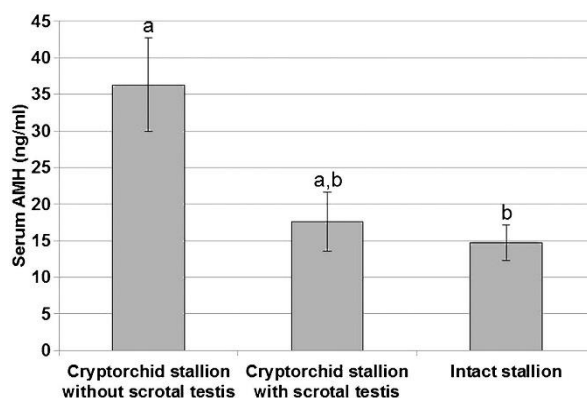


Figure 3 : Concentration moyenne en AMH sérique chez les étalons cryptorchides, les étalons cryptorchides avec un testicule en place et les étalons intacts

Les fonctions testiculaires de stéroïdogénèse et de spermatogénèse étant très fortement réduites voir stoppées dans les testicules cryptorchides, l'effet inhibiteur de ces deux fonctions testiculaires sur la production d'AMH semble parfaitement illustré.

Lors d'immunisation anti- GnRH, les fonctions de stéroïdogénèse et de spermatogénèse sont stoppées. Par analogie cela devrait provoquer une augmentation des concentrations d'AMH chez les chevaux ayant subis une immunisation anti-GnRH.

En outre, il pourrait être supposé que les immunisations répétées et la suppression des stimulations gonadotropes par la FSH et la LH du testicule pendant une longue ou une très longue durée pourrait altérer définitivement le fonctionnement des cellules testiculaires et notamment des cellules de Sertoli. Cette atteinte des cellules de Sertoli pourrait entraîner un arrêt de la production d'AMH et donc un effondrement de la concentration d'AMH sérique chez les entiers immunisés depuis plusieurs années.

La première phase de l'étude comportait donc 3 catégories de population dont 13 hongres, 11 mâles entiers non immunisés et 29 mâles entiers immunisés avec deux chevaux immunisés 4 années de suite, 6 chevaux immunisés 3 années consécutives, 6 chevaux ayant été immunisés 2 années

consécutives et 15 chevaux ayant été immunisés pour la première fois. Pour l'ensemble de cette population, un suivi des concentrations plasmatiques des stéroïdes sexuels et d'AMH a été réalisé au cours d'une année à partir du moment où les rappels d'injection ou de primo-immunisation ont été réalisés.

Les résultats obtenus chez les hongres et les entiers étaient en accord avec les données attendus c'est-à-dire l'absence de sécrétion de stéroïdes et d'AMH chez les hongres et des concentrations plasmatiques plus importante de stéroïdes chez les entiers non immunisés.

En revanche, si on observe bien une baisse des concentrations des stéroïdes chez les entiers immunisés, les variations inter-individuelles sont très importantes et une réponse très variable notamment chez les primo-immunisés était observée. Les résultats obtenus chez les entiers immunisés concernant l'AMH ne concordent pas avec l'hypothèse émise selon laquelle la production d'AMH devait augmenter de la même façon que chez les cryptorchides, en effet l'immunisation ne semble pas avoir d'effet significatif sur la production d'AMH.

Le but de notre étude est donc dans la continuité de l'étude précédente de poursuivre le suivi des concentrations sanguines en hormones stéroïdiennes et en AMH en 2017 avec des individus ayant été immunisés vis-à-vis de la GnRH une année supplémentaire mais également d'effectuer une comparaison des concentrations plasmatiques pour les stéroïdes étudiées ainsi que l'AMH mesurées en 2016 avec celles mesurées en 2017, chez d'une part des chevaux ayant eu une année d'immunisation supplémentaire et d'autre part chez des chevaux ayant été primo-immunisés en 2017 alors qu'ils étaient entiers en 2016.

Première partie : matériel et méthodes.

Population d'étude

L'étude a été réalisée sur 31 chevaux entiers de race ibériques appartenant à une même écurie de spectacle. L'indication de l'immunisation est d'atténuer les manifestations propres aux entiers, manifestations qui peuvent gêner leur gestion au quotidien, leur entraînement ou leur prestation en spectacle mais également qui peuvent être dangereuse pour le personnel ou vis-à-vis des autres chevaux. Cette population est composée de 26 chevaux entiers immunisés par l'Improvac® (tableau I) dont 6 étant primo immunisés en 2017, 5 entiers n'ayant jamais été immunisé (tableau II) constituant la population témoin de cette étude. Parmi les 26 immunisés figure un entier ayant été primo-immunisé en 2013 avec un rappel en 2014 mais n'ayant pas eu de rappel pendant deux années (2015 et 2016) puis de nouveau immunisé en 2017 (cheval n° 26 : Espadarte) nous traiterons donc ce cheval en tant que cas particulier et aucun rang de vaccination ne lui sera attribué. Le rang de vaccination correspond aux nombres d'années d'immunisation successives, c'est-à-dire qu'un cheval de rang 4 aura été immunisé durant 4 années successives, la quatrième année étant celle de notre présente étude tandis qu'un cheval de rang 1 sera primo immunisé en 2017.

Tableau I : Chevaux entiers immunisés

Entiers immunisés	Nom du cheval	Race	Age (années)	Rang de vaccination
1	Cantinflas	PSL	10	5
2	Burundi	PSL	11	5
3	Candelario	PRE	11	4
4	Civaque	PSL	10	4
5	Craque	PSL	10	4
6	Eclipse	PSL	8	4
7	Catraio	PSL	10	4
8	Ze-quidim	PSL	13	4
9	Distinto	PSL	9	3
10	Capote	PSL	10	3
11	Brasil	PSL	11	3
12	Kongo I	PRE	10	3
13	Ambar	PSL	12	2
14	Cravo II	PSL	10	2
15	Castor	PSL	10	2
16	Rifado	PSL	19	2
17	Alecrim	PSL	12	2
18	Alamar	PSL	12	2
19	Baco	PSL	11	2
20	Casablanca	PSL	10	1
21	Oriental	PRE	7	1
22	Cesar	PRE	12	1
23	Fundador	PSL	7	1
24	Habibe	PSL	5	1
25	Hino	PSL	5	1
26	Espadarte	PSL	8	X

PSL: Pur-sang Lusitanien, PRE: Pure race Espagnol, X : cheval ayant été immunisé en 2013 et ayant eu un rappel d'immunisation en 2014 mais pas en 2015 ni 2016 et de nouveau immunisé en 2017.

Tableau II: Chevaux entiers non immunisés

Témoin non immunisé	Nom du cheval	Race	Age (années)
27	Apito Dourando	PSL	12
28	Eneias	PSL	8
29	Olaf	PRE	15
30	Quico	PSL	20
31	Zangando	PSL	13

L'étude précédente portait sur 53 chevaux, parmi lesquels figuraient 13 hongres qui étaient considérés comme témoins négatifs. Ces hongres ne présentaient aucune sécrétion d'AMH et de très faibles sécrétions de stéroïdes sexuels et n'ont pas été suivis pour notre étude car les résultats obtenus étaient en accord avec la bibliographie et les hypothèses émises. Il y avait 11 entiers non immunisés ainsi que 29 entiers immunisés lors de l'étude précédente. Dans la population de la présente étude 3 chevaux qui étaient entier non immunisés au cours de l'année précédente ont été primo immunisés en 2017, il s'agit des chevaux n° 20, 21 et 22 (Casablanca, Oriental et Cesar voir Tableau I). Deux autres chevaux non immunisés en 2016 ont été castrés chirurgicalement fin 2016, il ne reste donc que 5 chevaux entiers non immunisés (tableau II). De plus, neuf des 29 chevaux immunisés en 2016 ont été soit vendus pour deux d'entre eux soit castrés chirurgicalement en 2016, ils ne se retrouvent donc pas dans notre étude. Ainsi 7 primo immunisés et deux immunisés la seconde fois en 2016 ne sont pas inclus. En revanche 3 nouveaux chevaux arrivés dans l'effectif fin 2016 ont été primo immunisés en 2017 et inclus dans l'étude (n°24.25.26 tableau I)

Ainsi 23 chevaux immunisés en 2017 et 5 non immunisés en 2017 avaient déjà été suivis l'année 2016 et inclus dans l'étude précédente

Protocole expérimental

Protocole d'immunisation :

L'ensemble des chevaux de la population d'étude sont immunisés via un « vaccin » anti-GnRH utilisé dans le cadre du dispositif réglementaire d'utilisation dénommé la « cascade » car n'ayant pas d'AMM pour l'espèce équine. La formulation porcine (Improvac®) pour l'immunisation anti-GnRH possède une AMM européenne et est disponible en France. Elle est composée d'un peptide synthétique analogue au GnRH conjugué à une toxine diphtérique. Son utilisation permet d'éviter la castration chirurgicale des porcelets tout en prévenant l'odeur d'urine de la viande (ou viande « pisseuse ») de porc male non castré.

Le protocole utilisé dans cette étude et recommandé dans l'espèce équine est de réaliser deux injections par la voie intra-musculaire dans l'encolure de 1 mL d'Improvac® à 28 jours d'intervalle, soit 150 µg du peptide actif à chaque injection. Le rappel annuel mis en place dans cet effectif de chevaux consiste en deux injections à 28 jours d'intervalle aux mêmes dosages.

Trois chevaux avaient été primo immunisés en juin et juillet 2013. Ils ont reçu un rappel en février 2014 soit 8 mois après la première injection et seul le cheval Cantinflas a eu une seconde injection de rappel en mars 2014. En 2015 et en 2016, les rappels ont été effectués en février et mars soit 12 et 13 mois après le rappel précédent pour le cheval Burundi et uniquement en 2016 pour le cheval Cantinflas soit 24 et 25 mois après le rappel précédent. En 2017, leurs rappels ont été effectués en janvier et en février soit 11 et 12 mois après la première injection du rappel précédent. Ces chevaux sont les chevaux de rang 5 à l'exception du cheval Espadarte qui n'a pas eu de rappel en 2015 et 2016 mais une nouvelle primo-vaccination en 2017.

Six des 26 entiers immunisés de l'étude avaient été primo immunisés en février et mars 2014. En 2015 et en 2016 leurs injections de rappel d'immunisation ont été effectuées en février et en mars soit 12 et 13 mois après la première injection. En 2017, les rappels ont été effectués en janvier et en février soit 11 et 12 mois après la première injection du rappel précédent. Ces chevaux sont les chevaux de rang 4.

Quatre des 26 chevaux immunisés avaient été primo immunisés en février et mars 2015. Les injections de rappel d'immunisation ont été effectuées en février et en mars 2016 puis en janvier et en février 2017 à l'exception du cheval numéro 11 (Brasil) qui a reçu ses injections de second rappel d'immunisation en décembre 2016 et en janvier 2017 soit 9 et 10 mois après la première injection de rappel précédent. Ces chevaux sont les chevaux de rang 3.

Sept chevaux de l'étude ont été primo immunisés en février et en avril 2016, les injections de rappel d'immunisation ont été réalisées en janvier et février 2017 soit 11 et 12 mois après la première injection réalisée. Ces chevaux sont les chevaux de rang 2.

Enfin cinq chevaux ont été primo immunisés en janvier et en février 2017 et le cheval Casablanca a été primo-immunisé le 22 novembre et le 20 décembre 2016 avec un rappel en une injection en mai 2017. Cette injection anticipée par rapport au protocole a été effectuée à la suite de la réapparition des manifestations comportementales d'entier gênantes. Ce sont les chevaux de rang 1.

Tous les chevaux ont reçu une injection d'Improvac® le 24 Janvier 2017, date du début de notre étude, et une seconde injection le 23 Février 2017 à l'exception du cheval Casablanca et du cheval Brasil, comme expliqué ci-dessus (tableau III).

Tableau III : Protocole de vaccinations des entiers immunisés

Entiers immunisés	Nom du cheval	Rang de vaccination	2013	2014	2015	2016	2017
1	Cantinflas	5	PV 06 et 07	R1 02		R1 02 et 03	R2 01 et 02
2	Burundi	5	PV 06 et 07	R1 02 et 03	R2 02 et 03	R3 02 et 03	R4 01 et 02
3	Candelario	4		PV 02 et 03	R1 02 et 03	R2 02 et 03	R3 01 et 02
4	Civaque	4		PV 02 et 03	R1 02 et 03	R2 02 et 03	R3 01 et 02
5	Craque	4		PV 02 et 03	R1 02 et 03	R2 02 et 03	R3 01 et 02
6	Eclipse	4		PV 02 et 03	R1 02 et 03	R2 02 et 03	R3 01 et 02
7	Catraio	4		PV 02 et 03	R1 02 et 03	R2 02 et 03	R3 01 et 02
8	Ze-quidim	4		PV 02 et 03	R1 02 et 03	R2 02 et 03	R3 01 et 02
9	Distinto	3			PV 02 et 03	R1 02 et 03	R2 01 et 02
10	Capote	3			PV 02 et 03	R1 02 et 03	R2 01 et 02
11	Brasil	3			PV 02 et 03	R1 02 et 03 + R2 27/12	R2 01
12	Kongo I	3			PV 02 et 03	R1 02 et 03	R2 01 et 02
13	Ambar	2				PV 02 et 03	R1 01 et 02
14	Cravo II	2				PV 02 et 03	R1 01 et 02
15	Castor	2				PV 02 et 03	R1 01 et 02
16	Rifado	2				PV 02 et 03	R1 01 et 02
17	Alecrim	2				PV 02 et 03	R1 01 et 02
18	Alamar	2				PV 02 et 03	R1 01 et 02
19	Baco	2				PV 02 et 03	R1 01 et 02
20	Casablanca	1				PV 11 et 12	R1 05
21	Oriental	1					PV 01 et 02
22	Cesar	1					PV 01 et 02
23	Fundador	1					PV 01 et 02
24	Habibe	1					PV 01 et 02
25	Hino	1					PV 01 et 02
26	Espadarte	*	PV 06 et 07	R1 02			PV 01 et 02

PV : Primovaccination

R1 : Premier rappel

R2 : Second rappel

R3 : Troisième rappel

01 : Janvier, 02 : Février, 03 : Mars, 05 : Mai, 06 : Juin, 07 : Juillet, 11 : Novembre, 12 : Décembre

Prélèvement et mesure

Chaque cheval a ensuite été soumis à des prélèvements sanguins à la jugulaire tous les mois, le premier prélèvement étant réalisé le jour de la 1^{ère} injection immunisante en janvier 2017, afin de réaliser les dosages de l'étude. Le tableau suivant présente les dates de prélèvements et de suivi pour l'ensemble du protocole.

Tableau IV : Dates des prélèvements sur les chevaux.

Numéro prélèvement	Date prélèvement	Jour de l'étude
1	24/01/2017	0
2	23/02/2017	30
3	28/03/2017	63
4	28/04/2017	94
5	23/05/2017	119
6	14/06/2017	141
7	11/07/2017	168
8	08/08/2017	196
9	08/09/2017	227
10	04/10/2017	253
11	07/11/2017	287
12	08/12/2017	318

Pour les chevaux Brasil et Casablanca des prélèvements sanguins avaient été effectués au moment des injections immunisantes fin 2016 et pour ces deux chevaux, les prélèvements seront de ce fait considérés comme portant les numéros 1 et 2.

A chaque date de prélèvement, une prise de sang jugulaire sur tube hépariné de 10 ml a été effectuée sur chaque cheval immunisé ou non. Les tubes héparinés conservés au maximum 6 heures à température ambiante ont ensuite été centrifugés afin de récupérer le plasma (4ml par cheval réparti dans deux tubes de 2 ml). Ces échantillons de plasma ont été congelés et conservés à -20°C dans l'attente des analyses.

Pour l'ensemble des chevaux immunisés et en fonction de leurs disponibilités et de leurs coopérations une mesure du diamètre scrotal est réalisée par un opérateur à l'aide d'un compas spécifique (Stallion Scrotal Caliper®) comme présenté en 2011 (Brinsko SP., Blanchard T.L., Varner D. , Schmacher J., Love C. Hinrichs K., Hartman D., 2011) et déjà mis en place dans l'étude précédente réalisée par M.L. Dreau. Lors de la mesure cet opérateur évaluait également la consistance des testicules par palpation. Au cours de l'étude, 4 chevaux ont été castrés chirurgicalement, les testicules étaient récupérés afin d'être conservés en vue d'une future étude histologique. Ces chevaux sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau V: Date et rang de vaccination des chevaux castrés chirurgicalement au cours de l'étude.

Cheval	Rang de vaccination	Date de castration
Cantinflas	5	03/10/2017
Distinto	3	29/08/2017
Fundador	1	14/11/2017
Habibe	1	22/08/2017

Analyse des échantillons

L'ensemble des analyses sanguines a été réalisé au laboratoire d'analyses biologiques spécialisées LDHVet d'Oniris selon les mêmes procédures que l'étude précédente (Gorregues 2018) que nous reprenons ci-dessous.

Les dosages d'AMH et d'œstradiol ont été réalisés par une méthode ELISA quantitative par mesure de la densité optique via le kit ELISA AMH GENII (A79765 Beckman, Coulter) pour l'AMH et le kit Estradiol sensitive ELISA (DE4399, Demeditec) pour l'œstradiol. Les dosages de testostérone et d'androsténédione ont été réalisés par dosage radio-immunologique quantitatif via le kit RIA SPECTRIA TESTOSTERONE (38628, Labodia) pour la testostérone et le kit ANDROSTENEDIONE ACTIVE RIA DSL (DSL3800 Beckman, Coulter) pour l'androsténédione. L'ensemble des dosages a été réalisé selon les recommandations des fabricants.

Dosage de l'AMH sérologique

Le principe du dosage repose sur un essai immunologique par amplification enzymatique de deux sites.

- **Etapes préalables :**

La solution de lavage est diluée au dixième avec de l'eau déminéralisée. Les réactifs et les échantillons sont réchauffés jusqu'à température ambiante. Une dilution au sixième est réalisée pour les calibrateurs, les témoins et les échantillons avec la solution tampon de dosage. Pour les échantillons à concentration plus élevée que le calibrateur, une dilution au dixième est réalisée avec la solution pour dilution des échantillons.

- **Méthode ELISA :**

Les solutions obtenues sont ensuite prélevées et déposées dans des puits de microtitration préalablement recouverts avec des anticorps anti-AMH. Les puits sont mis à incuber à 600-800 tours par minute durant une heure sur un agitateur de microplaques orbital. Le contenu de chaque puit est ensuite aspiré et rincé cinq fois avec la solution de lavage grâce à une laveuse automatique de microplaques. Ces plaques sont éponnées et séchées après lavage.

Des anticorps anti-AMH de détection sont ensuite ajoutés dans chacun des puits, les anticorps étant marqués à la biotine.

Un second cycle d'incubation et de lavage comme indiqué précédemment est réalisé puis dans chacun des puits une solution de conjugué enzymatique de streptavidine conjuguée à la Péroxydase de Raifort (HRP) est ajoutée. Une dernière incubation de 30 minutes ainsi qu'un lavage à l'identique sont réalisés.

- **Révélation de la micro-plaque :**

Un substrat chromogène contenant de la Tétraméthylbenzidine (TMB) est ajouté à chacun des puits et une dernière incubation (8-12 minutes) est réalisée. La réaction enzymatique est alors stoppée par l'ajout dans chacun des puits d'une solution d'arrêt contenant de l'acide sulfurique.

- **Calcul des résultats**

Le degré de turnover enzymatique du substrat est déterminé par une double mesure d'absorbance à la longueur d'onde de 450 nm et entre 600 et 630 nm, une moyenne est alors calculée pour chaque calibrateur, témoin et échantillon. Cette absorbance mesurée est proportionnelle à la concentration d'AMH présent dans le substrat.

Une courbe d'étalonnage de l'absorbance est tracée via les calibrateurs d'AMH en fonction de la concentration en AMH. Il peut alors être calculer à partir de cette courbe la concentration en AMH dans chacun des échantillons et les valeurs obtenues sont multipliées au besoin en fonction du facteur de dilution.

- **Variabilité inter et intra-essai**

La reproductibilité du test a été déterminée dans une étude en utilisant deux pools de témoins internes (Q1, Q2) et deux kits témoins (C1, C2) avec deux lots de réactifs. L'étude a compris au total 40 tests avec 4 répétitions par dosage (Tableau VI). Les moyennes des coefficients de variation intra et inter-essais sont respectivement de 4 et 4,6% et la moyenne du coefficient de variation total est de 6,1%. Les moyennes des coefficients de variations intra-essais varient de 3,4 à 5,4% avec des valeurs un peu plus élevées pour les concentrations inférieures à 5ng/mL et les plus faibles pour les concentrations supérieures à 14 ng/mL. Il en est de même pour les coefficients de variations inter-essais qui varient de 4 à 5,6 %.

Tableau VI: Variations inter et intra-essai du test AMH GENII ELISA

Echantillon	Concentration moyenne (ng/ml)	CV intra-essai (%) (Coefficient de variation)	CV inter-essai (%)
Q1	4,42	5,4	5,6
Q2	14,03	3,6	4,5
C1	3,82	3,7	4,4
C2	16,45	3,4	4,0
Moyenne	9,68	4,0	4,6

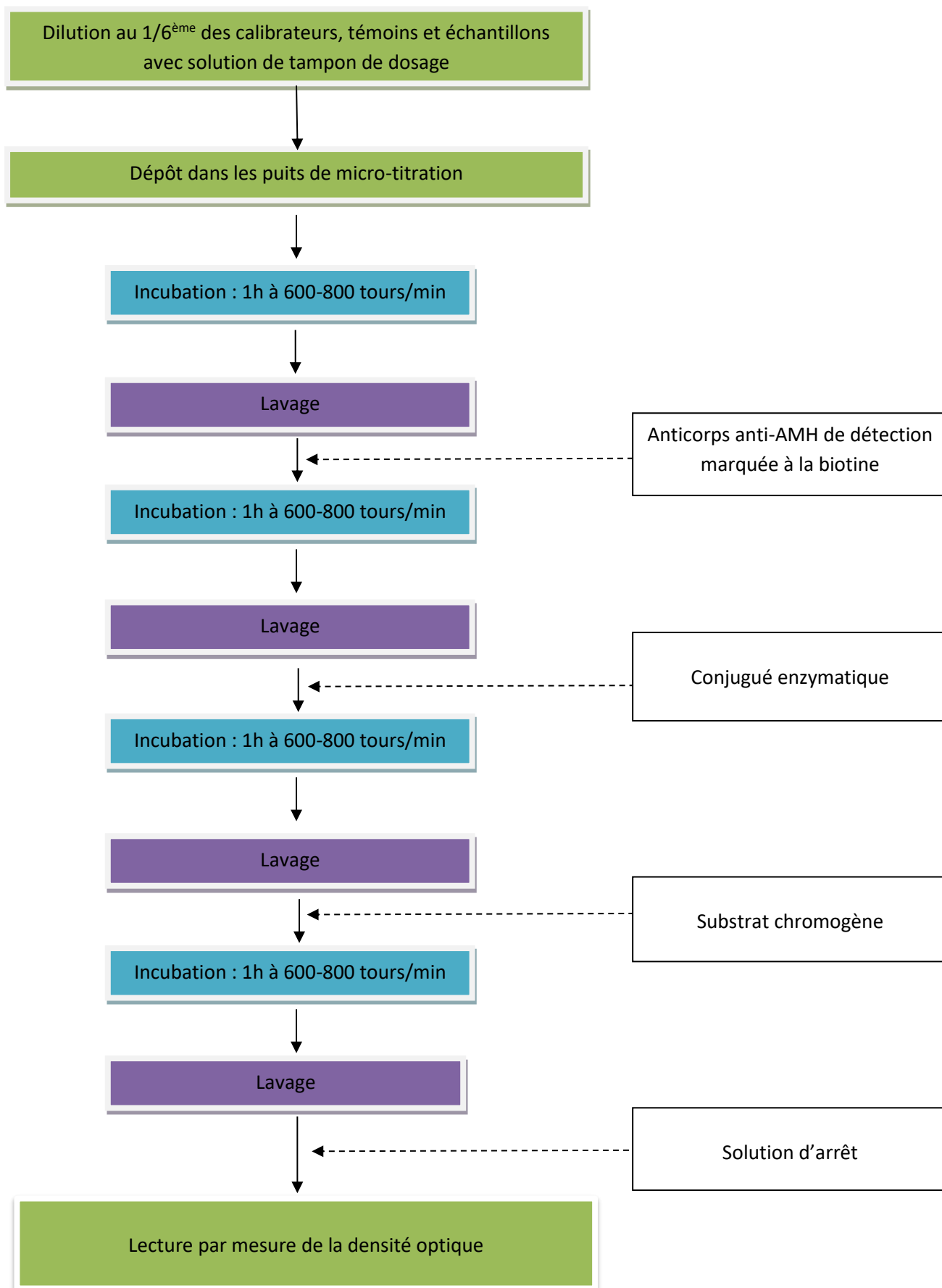


Figure 4 : Protocole de dosage sérique de l'AMH

Dosage sérique de l'œstradiol

Le principe de ce dosage repose sur une réaction immuno-enzymatique compétitive, de nombreuses étapes sont similaires à celles utilisées pour le dosage de l'AMH.

Étapes préalables à la méthode ELISA.

Contrairement au dosage de l'AMH, il faut réaliser une extraction de l'œstradiol avant de lancer le test ELISA. Pour se faire, la prise d'essai (PE) du prélèvement est pipetée dans un flacon en polypropylène auquel on ajoute 1 ml d'un mélange cyclohexane/éthyle d'acétate réalisé au préalable. Ce mélange obtenu est agité à l'aide d'un vortex pendant 1 minute puis refroidi à -20°C pendant 1h afin que la phase aqueuse soit gelée. La phase organique est récupérée dans un tube en verre puis évaporée avec un vacutener jusqu'au séchage complet. L'échantillon est reconstitué avec la dose identique de Serum Free Steroid dilué au $\frac{1}{2}$ en eau distillée (SFS $\frac{1}{2}$) que la PE à partir du résidu séché. Le dosage est alors effectué.

Comme pour le dosage de l'AMH, les réactifs et les prélèvements sont réchauffés à température ambiante tout comme les barrettes de microcupules nécessaires au dosage et la solution de lavage concentrée est diluée. L'échantillon peut également être dilué si nécessaire.

Méthode ELISA

Pour cette méthode, les puits sont recouverts par un anticorps polyclonal dirigé contre un antigène spécifique de la molécule d'œstradiol et la solution préparée d'œstradiol endogène est déposée dans un puit pour chaque échantillon. Est ajoutée ensuite une solution de conjugué enzymatique composé d'œstradiol conjugué à la peroxydase de Raifort (HRP). Cette solution est mélangée puis mise en incubation pendant 4 heures à température ambiante. Durant cette incubation, l'œstradiol que l'on cherche à mesurer est en compétition avec l'œstradiol conjugué à l'HRP pour la liaison avec l'anticorps présent dans les puits. Le conjugué non lié est éliminé par la réalisation de 3 lavages successifs.

Révélation de la micro-plaque

Un substrat chromogène, comme pour la mesure de l'AMH, est ajouté, une nouvelle incubation de 30 minutes est réalisée puis la solution d'arrêt préalablement préparée est ajoutée.

La lecture de la densité optique est effectuée 450 ± 10 nm via un spectrophotomètre de micro-plaques dans les 10 minutes après l'ajout de la solution d'arrêt.

Calcul des résultats.

C'est la mesure de la quantité d'HRP qui nous permet de calculer la concentration en œstradiol. En effet, celle-ci est inversement proportionnelle à la concentration d'œstradiol endogène à cause de la compétition entre l'œstradiol que l'on cherche à mesurer et celui conjugué à l'HRP.

Comme pour l'AMH, les valeurs moyennes de densité optique sont calculées pour chacune des séries de standards, de témoins et d'échantillon. La courbe étalon ainsi obtenue permet de convertir la densité optique moyenne obtenue pour chaque série d'échantillons en valeur de concentration en œstradiol. Le facteur de dilution est utilisé comme coefficient multiplicateur si une dilution a été réalisée.

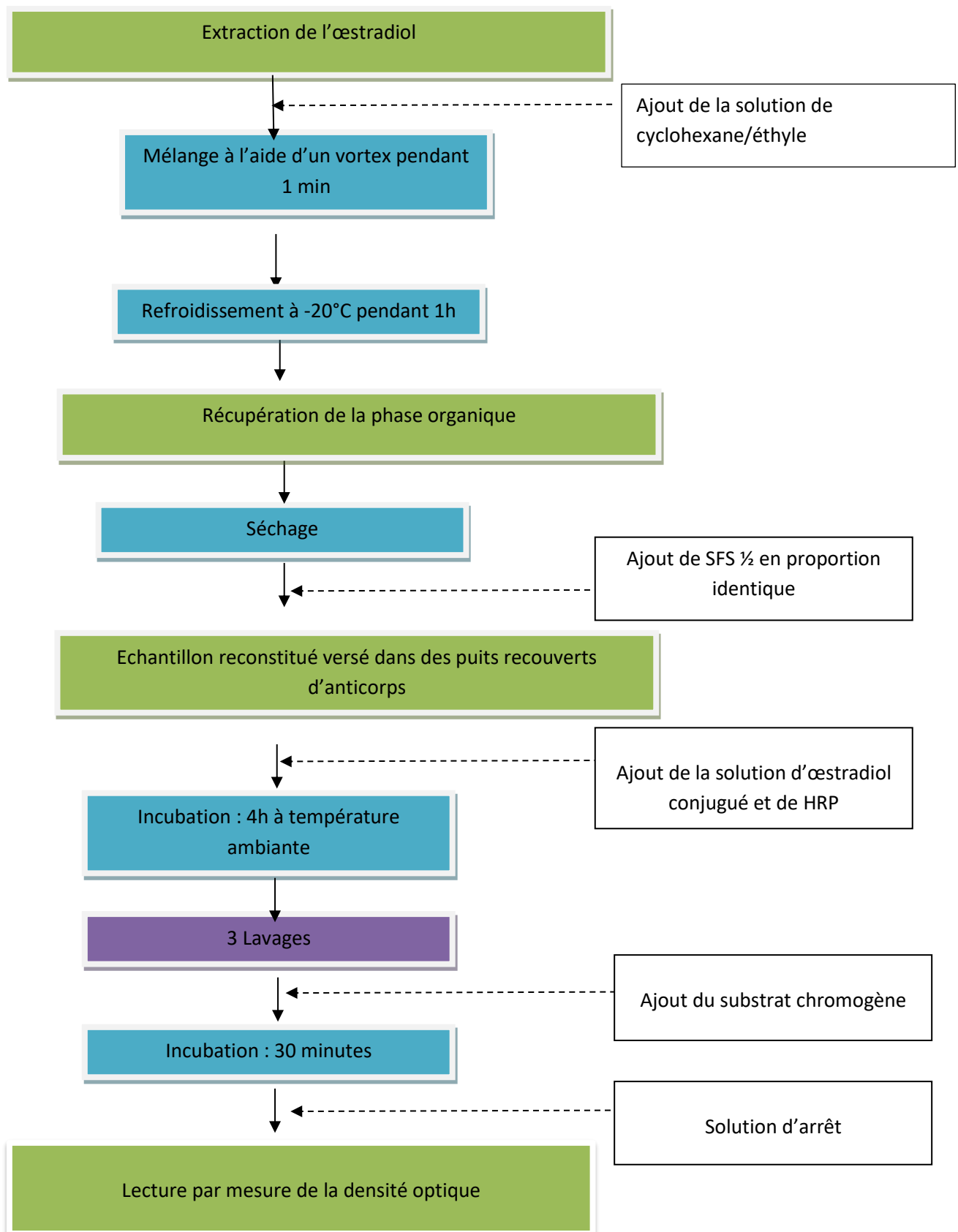


Figure 6: Protocole de dosage de l'œstradiol

Variabilité inter et intra-essai

Les moyennes des coefficients de variation intra et interessais sont respectivement de 5,52 et 7,6% (tableau VII). Les moyennes des coefficients de variations intra-essais varient de 5,52 à 7,87% avec des valeurs un peu plus élevées pour les concentrations inférieures à 9 nMole/L et les plus faibles pour les concentrations supérieures à 25 nMole/L. Il en est de même pour les coefficients de variations inter essais qui varient de 6,78 à 8,78 %.

Tableau VII : Variations inter et intra-essai du test Estradiol sensitive ELISA

Echantillons	n	Intra-essai			Echantillons	n	Inter-essai	
		Moyenne (nmol/l)	CV (%)				Moyenne (nmol/l)	CV (%)
1	20	8,21	7.87		1	12	7,87	8,78
2	20	18.50	5.68		2	12	17,87	7,25
3	20	27,62	5,52		3	12	26,71	6,78
Moyenne		17,92	5,52		Moyenne		17,48	7,60

Dosage sérique de la testostérone.

Comme pour le dosage de l'œstradiol, ce dosage repose sur la compétitivité entre de la testostérone marquée et la testostérone que l'on cherche à mesurer. En effet, les tubes utilisés pour le dosage contiennent une quantité limitée de sites anticorps anti-testostérone. La quantité de testostérone marquée à ^{125}I (iode marqué par un isotope radioactif) que l'on mesure en radio-immunologie est ainsi inversement proportionnelle à la quantité de testostérone que l'on mesure et qui s'est préalablement fixée dans les tubes.

Etapes préalables à la méthode RIA

Une extraction préalable de la testostérone est nécessaire au dosage comme pour l'œstradiol. Ce protocole est identique hormis le tampon utilisé pour la reconstitution qui est un tampon Tris-BSA-triton. Ce tampon BSA (Bovine Serum Albumine) est dosé car il réagit avec le réactif, cette valeur dosée sera soustraite aux résultats obtenus par radio-immunologie. Tous les réactifs et les échantillons sont amenés à température ambiante et les calibrateurs du kit sont reconstitués avec de l'eau distillée.

Méthode RIA

Les anticorps anti-testostérone sont fixés au fond des tubes. Les solutions de calibrateurs, de témoins et d'échantillons sont répartis dans les différents tubes. Est ajoutée ensuite une solution de ^{125}I testostérone dans tous les tubes.

Ces tubes sont ensuite mélangés via un appareil de type vortex puis mis à incuber pendant 1 heure à 37°C dans un bain marie après avoir été préalablement recouverts par du film plastique. A l'issue de l'incubation, un lavage est effectué afin d'éliminer la testostérone qui ne se serait pas fixée.

La radioactivité est mesurée grâce à un scintillateur gamma réglé sur la mesure de l'iode-125, ce résultat est donné en CPM (Counts per minutes)

Calcul des résultats

Pour chaque lot de tubes, une moyenne des comptages est effectuée ce qui permet la construction d'une courbe d'étalonnage en CPM (Counts per minutes) des calibrateurs en fonction de la concentration en testostérone. La valeur de la concentration en testostérone de chaque échantillon est alors obtenue par comparaison avec la courbe d'étalonnage en l'ajustant si nécessaire avec un facteur de dilution.

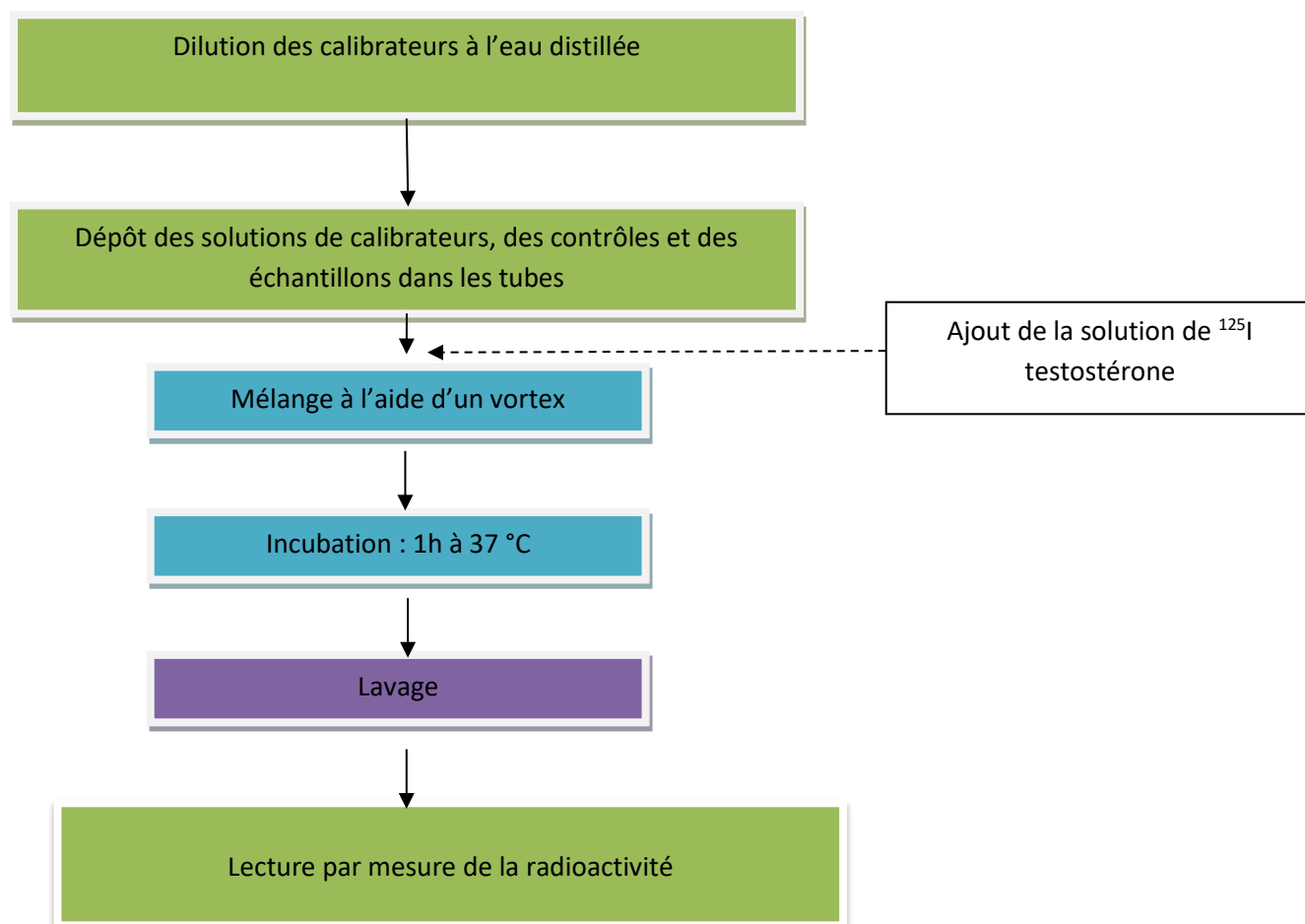


Figure 7: Protocole de dosage de la testostérone

Variabilité inter et intra-essai du test RIA SPECTRIA TESTOSTERONE

Les moyennes des coefficients de variation intra et interessais sont respectivement de 5,6 et 8 % (tableau VIII). Les moyennes des coefficients de variations intra-essais varient de 3,1 à 8,9 % avec des valeurs plus élevées pour les concentrations inférieures à 2 nMole/L et les plus faibles pour les concentrations supérieures à 30 nMole/L. Il en est de même pour les coefficients de variations inter essais qui varient de 5,2 à 11,6 %.

Tableau VIII: Variations inter et intra-essai du test RIA SPECTRIA TESTOSTERONE

Echantillons	Intra-essai			Echantillons	Inter-essai	
	Moyenne (nmol/l)	CV (%)			Moyenne (nmol/l)	CV (%)
1	1,3	8,9		1	3,3	11,6
2	5,4	5,9		2	4,9	8,5
3	16,3	4,6		3	12,9	6,5
4	31,6	3,1		4	28,8	5,2
Moyenne	13,7	5,6		Moyenne	12,5	8,0

Dosage sérique de l'androsténédione

Le principe de ce test est similaire au dosage de la testostérone. En utilisant de l'androsténédione marquée à ¹²⁵I. La quantité mesurée sera inversement proportionnelle à la concentration en androsténédione non marquée des échantillons.

Etapes préalables à la méthode RIA

Les échantillons sont décongelés, les réactifs sont préparés et les calibrateurs et les contrôles reconstitués via de l'eau désionisé.

Méthode RIA

Des anticorps anti-androsténédione sont fixés au fond des tubes. Les solutions de calibrateurs, de témoins et d'échantillons sont réparties dans les différents tubes. Est ajouté ensuite une solution de ¹²⁵I androsténédione dans tous les tubes.

Le contenant des tubes est ensuite mélangé grâce à un appareil de type vortex puis les tubes sont mis à incuber pendant 1 heure à 37°C dans un bain marie après avoir été préalablement recouverts par du film plastique. A l'issue de l'incubation, un lavage est alors effectué afin d'éliminer la testostérone qui ne se serait pas fixée.

La radioactivité est mesurée avec un scintillateur gamma réglé sur la mesure de l'iode 125, ce résultat est donné en CPM (Counts per minutes).

Calcul des résultats

Comme pour la testostérone, une courbe étalon est établi, elle va permettre la lecture de la concentration en androsténédione de chaque tube en fonction des CPM mesurés.

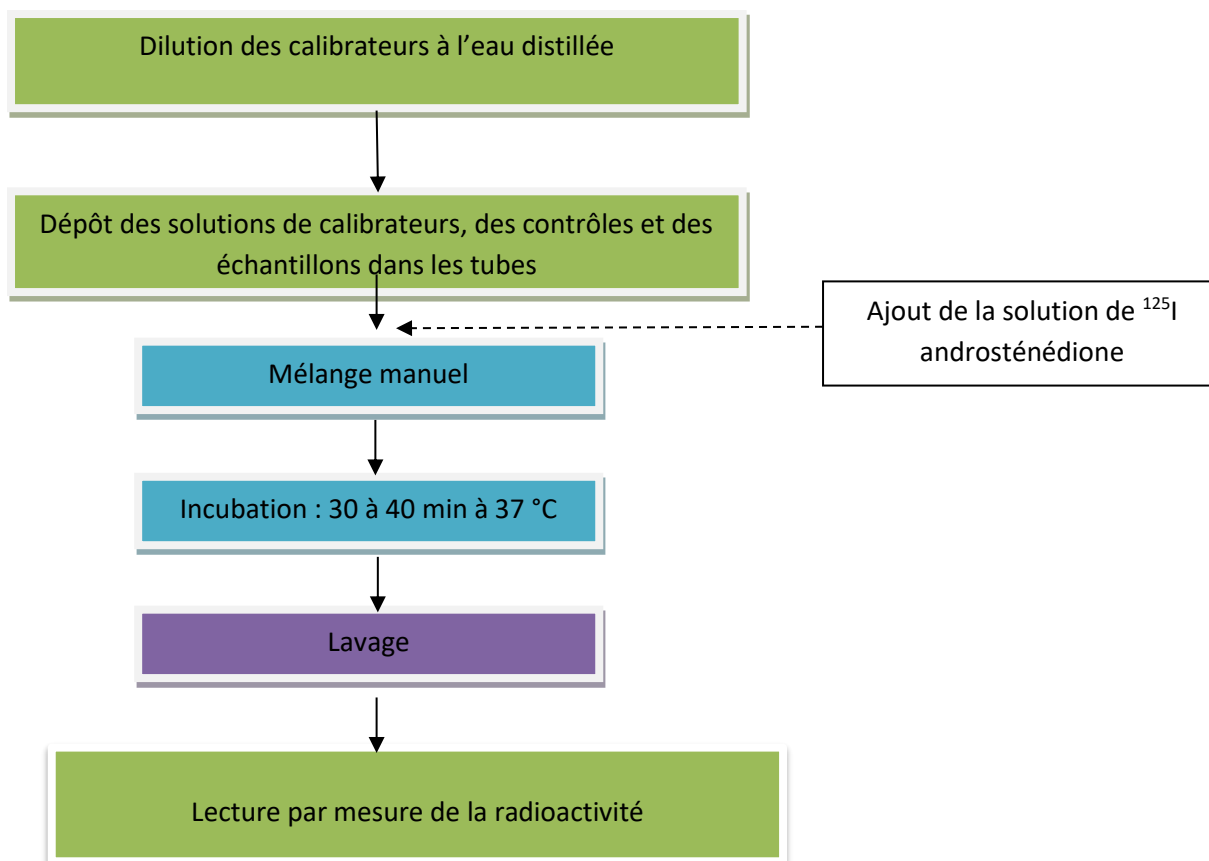


Figure 8: Protocole de dosage de l'androsténédione

Variabilité inter et intra-essai

Pour la variation intra-essai, des échantillons plasmatiques ont été dosés 25 fois dans une même série tandis que pour la variation inter-essai des échantillons plasmatiques ont été dosés en doublet dans 10 séries différentes (Tableau IX). Les moyennes des coefficients de variation intra et interessais sont respectivement de 2,21 et 10,63 %. Les moyennes des coefficients de variations intra-essais varient de 8,04 à 14,45 % avec des valeurs plus élevées pour les concentrations inférieures à 0,5 nMole/L et les plus faibles pour les concentrations supérieures à 5 nMole/L. Tandis que les coefficients de variations inter essais varient de 8,79 à 13,1 % avec les valeurs les plus faibles pour les valeurs supérieures à 5 nMole/L et les plus élevées pour les valeurs intermédiaires à 0,66 nMole/L.

Tableau IX : Variations inter et intra-essai du kit ANDROSTENEDIONE ACTIVE RIA DSL

Echantillons	n	Intra-essai			Echantillons	n	Inter-essai	
		Moyenne (nmol/l)	CV (%)				Moyenne (nmol/l)	CV (%)
1	25	0,10	14,45		1	10	0,17	10,0
2	25	1,50	6,35		2	10	0,66	13,1
3	25	5,03	8,04		3	10	5,89	8,79
Moyenne		2,21	9,61		Moyenne		2,24	10,63

Analyses statistiques

La cinétique d'évolution à long terme des concentrations de la testostérone, de l'androsténédione, de l'œstradiol et de l'AMH au cours de l'année 2017 a été analysée comme cela avait été fait dans l'étude sur le suivi effectué en 2016 selon un modèle linéaire à effet mixte incluant le statut d'immunisation comme covariable avec des effets aléatoires sur les chevaux regroupés par séries de mesures hormonales.

C'est un modèle hiérarchique dans lequel le premier niveau modélise la réponse individuelle, le deuxième niveau modélise le comportement des paramètres pour l'ensemble de la population. Par exemple pour l'étude de l'effet du Temps et du Protocole sur la concentration en Hormone Anti-Müllérienne (AMH) le modèle s'écrit :

Niveau individuel : $AMH_{ijk} = \alpha_i + \beta_{1i} * Protocole_{ij} + \beta_{2i} * Temps_{ik} + \varepsilon_{ijk}$

Niveau population :
$$\begin{cases} \alpha_i = \alpha + a_i \\ \beta_{1i} = \beta_1 + b_{1i} \\ \beta_{2i} = \beta_2 + b_{2i} \end{cases}$$

ε_{ijk} Indépendamment et identiquement distribués selon la loi $N(0, \sigma^2)$.

σ^2 est la variance résiduelle.

α , β_1 , β_2 sont appelés effets fixes, ils sont les estimations ponctuelles des paramètres pour l'ensemble de la population.

a_i , b_{1i} , b_{2i} sont les effets aléatoires, ils doivent être distribués selon une loi normale.

La normalité des résidus et des effets aléatoires a été vérifiée et validée pour chaque modèle aux moyens de graphiques préconisés par les auteurs des modèles à effets mixtes (JC Pinheiro and M D Bates, 2000). Des comparaisons multiples entre les statuts d'immunisation ont été effectuées sur les résultats de chaque modèle avec le logiciel R (R Core Team (2013)). L'évolution des concentrations hormonales avant et après immunisation a été analysée par un test de Student sur séries appariées (Schwartz D. 1994).

Pour analyser la corrélation entre l'âge des chevaux et les valeurs moyennes au cours de l'année des 3 stéroïdes et de l'AMH, ainsi que la corrélation entre les moyennes d'AMH et les moyennes de chacun des 3 stéroïdes, nous avons procédé à un test de corrélation de Pearson.

Enfin, nous avons utilisé un test ANOVA d'analyse de la variance pour comparer les valeurs à J0 des immunisés et des sous-lots d'immunisés à celles des entiers non immunisés.

Deuxième partie : Résultats

Au cours de l'étude, plusieurs prélèvements n'ont pas pu être effectués ou analysés soit parce que le cheval de spectacle n'était pas disponible soit parce que le prélèvement s'est révélé non exploitable. Il sera précisé pour chaque lot de chevaux le nombre d'analyses qui n'ont pas été exploité.

Profil de sécrétions des chevaux entiers non immunisés

On dénombre 5 chevaux appartenant à cette catégorie.

Profil de sécrétion de l'AMH

Au total 5 prélèvements n'ont pas été analysés par défaut de prélèvement ou d'analyse. Pour les 5 entiers non immunisés les valeurs moyennes des concentrations en AMH sont très variables (12.0 µg/L – 29.3 µg/L) avec des variations de concentrations pour un même individu également très variable au cours du temps (0.9-6.5) (Tableau X). Ces concentrations mesurées semblent donc fortement liées à l'individu (figure 9) car on observe des concentrations moyennes pour certains chevaux plus de deux fois supérieures à celle d'autres chevaux de l'étude. On notera que c'est le cheval le plus jeune (8 ans) de ce lot qui présente la concentration moyenne en AMH la plus élevée.

Tableau X : Concentration plasmatique en AMH (µg/L) chez les entiers non immunisés

AMH (µg/L)	N°27 Apito 12 ans	N°28 Eneias 8 ans	N°29 Olaf 15 ans	N°30 Quico 20 ans	N°31 Zangando 13 ans	Moyenne
Valeur j0	13,4	28,9	13,6	11,7	27,2	19,0
Valeur j28	12,6	24,6	13,4	35,9	25,3	22,4
Moyenne	12,0	29,3	13,7	21,0	25,9	20,4
Ecart-type	0,9	3,5	0,9	6,5	4,4	3,2
Minimum	10,8	24,0	12,1	11,7	17,8	15,3
Maximum	13,4	34,1	15,4	35,9	31,6	26,1

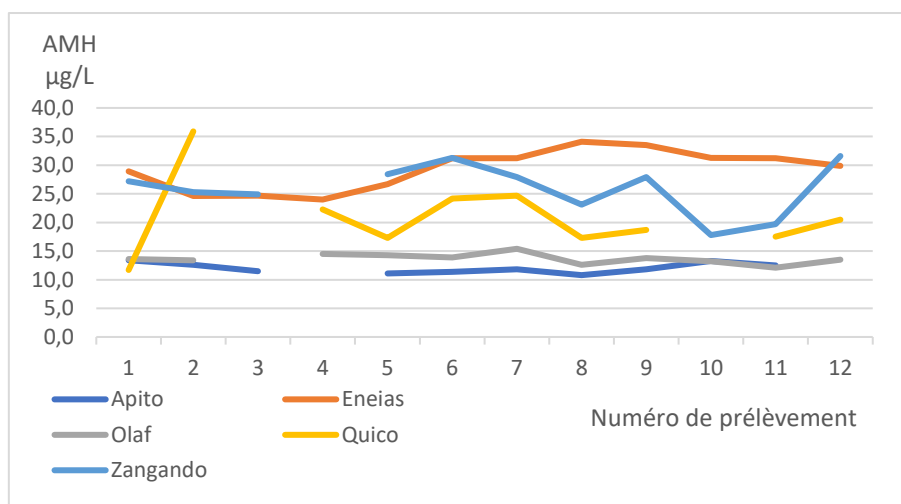


Figure 9 : Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les entiers non immunisés au cours de l'année

Profil de sécrétion des stéroïdes

Profil de sécrétion de la testostérone

Au total 6 prélèvements n'ont pas été exploités. Les concentrations moyenne de testostérone (tableau XI) montrent que 3 étalons possèdent des valeurs moyennes plus élevées mais de même niveau (7, 7.6, 7.1 nMole/L), un étalon possède une valeur moyenne plus basse (2 nMole/L) et un possède une valeur moyenne intermédiaire (5 nMole/L). On observe également que celui qui possède la testostéronémie moyenne la plus faible présente le moins de variation au cours de l'année (0.9) tandis que ceux possédant les valeurs moyennes les plus élevées présentent le plus de variation (2, 2.3, 3.1) et le dernier présente comme pour la concentration moyenne une variation intermédiaire au cours de l'année (1.3).

Les concentrations mesurées les plus faibles sont obtenues pour le mois de juillet (figure 10) mais également pour les mois d'août et septembre pour l'ensemble des étalons

On observe également que le cheval qui présente la testostéronémie moyenne la plus basse est celui qui possède la concentration moyenne en AMH la plus élevée et que celui présentant la testostéronémie moyenne intermédiaire présente la concentration moyenne en AMH la plus basse.

On observe également que c'est le cheval le plus jeune (8 ans) qui présente la concentration moyenne en testostérone la plus basse et que ce sont les plus âgés qui présentent les concentrations moyennes les plus élevées.

Tableau XI : Testostéronémie (nMole/L) chez les entiers non immunisés

Testostérone nMole/L	N°27 Apito 12 ans	N°28 Eneias 8 ans	N°29 Olaf 15 ans	N°30 Quico 20 ans	N°31 Zangando 13 ans	Moyenne
Valeur j0	4,8	4,6	6,8	5,8	10,6	6,5
Valeur j28	3,7	1,8	9,8	5,0	5,7	5,2
Moyenne	5,0	2,0	7,0	7,6	7,1	5,7
Ecart-type	1,3	0,9	2,0	2,3	3,1	1,9
Minimum	3,4	1,2	4,4	3,7	0,0	2,6
Maximum	7,3	4,6	9,8	11,5	11,0	8,9

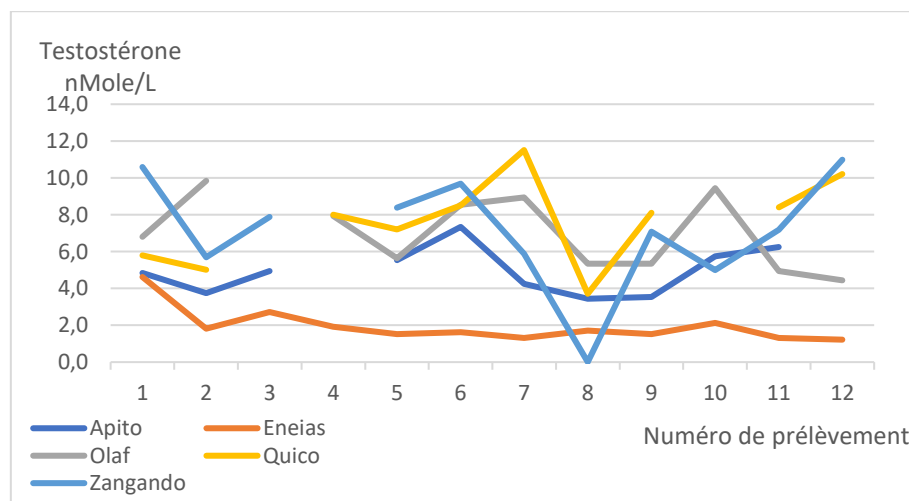


Figure 10 : Evolution de la testostéronémie chez les entiers non immunisés au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'œstradiol

Au total, 10 prélèvements n'ont pas été exploités. Les valeurs moyennes de l'œstradiolémie mesurées chez les 5 chevaux entiers montrent une répartition comparable avec les résultats obtenus pour la testostéronémie (tableau XII) avec les 3 mêmes entiers présentant les valeurs moyennes les plus élevées (118, 117.9 et 57.3 pMole/L) avec les plus grandes variabilités (23 , 29.4 et 56.8) tandis que celui présentant la concentration moyenne intermédiaire en testostérone présente également la concentration moyenne intermédiaire en œstradiol (29.5 pMole/L) et la variabilité intermédiaire (15.9) et le cheval le plus jeune présentant la testostéronémie moyenne la plus faible avec la plus faible variation annuelle présente les même caractéristiques pour l'œstradiolémie (7.5 pMole/L +/- 9.2).

En revanche il ne semble pas y avoir de relation entre la saisonnalité et la concentration mesurée en œstradiol sanguin (figure 11).

Tableau XII : Œstradiolémie(pMole/L) chez les entiers non immunisés

Œstradiol pMole/L	N°27 Apito 12 ans	N°28 Eneias 8 ans	N°29 Olaf 15 ans	N°30 Quico 20 ans	N°31 Zangando 13 ans	Moyenne
Valeur j0	39,8	28,6	221,0	132,0	100,4	104,4
Valeur j28	54,1	8,4	25,8	103,7	99,0	58,2
Moyenne	29,5	7,5	57,3	118,0	117,9	66,0
Ecart-type	15,9	9,2	56,8	23,0	29,4	26,9
Minimum	5,9	0,2	14,0	85,2	84,9	38,0
Maximum	54,1	28,6	221,0	150,5	176,8	126,2

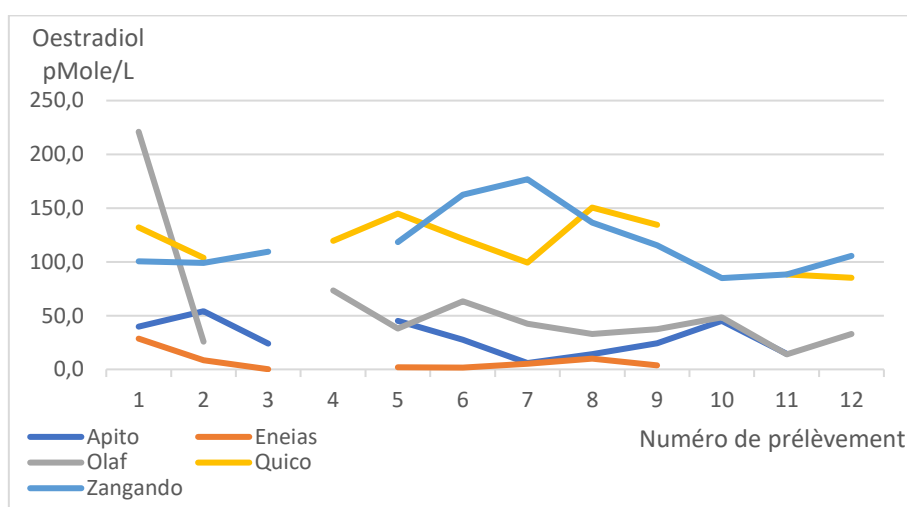


Figure 11: Evolution de l'œstradiolémie chez les entiers non immunisés au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'androsténédione

Au total, 8 prélèvements n'ont pas été exploités. On observe que pour les concentrations d'androsténédione les variations et les amplitudes sont moins marquées que pour les deux autres stéroïdes. Le cheval présentant les concentrations moyennes de testostérone et d'œstradiol les plus élevées présente des concentrations d'androsténédione inférieures au seuil de détection du test pour l'ensemble des prélèvements (tableau XIII), de façon similaire celui qui présente les concentrations moyennes des autres stéroïdes les plus faible ne présente que la première mesure au-dessus du seuil de détection du test.

Pour les autres individus on observe des concentrations plasmatiques variables au cours de l'année (figure 12).

Tableau XIII : Concentration plasmatique en androsténédione chez les entiers non immunisés

Androsténédione nMole/L	N°27 Apito 12 ans	N°28 Eneias 8 ans	N°29 Olaf 15 ans	N°30 Quico 20 ans	N°31 Zangando 13 ans	Moyenne
Valeur j0	1,2	0,7			0,0	0,6
Valeur j28	1,0	0,0	3,3	0,0	0,0	0,9
Moyenne	1,7	0,1	2,4	0,9	0,0	1,0
Ecart-type	1,1	0,2	1,1	0,6	0,0	0,6
Minimum	0,9	0,0	1,0	0,0	0,0	0,4
Maximum	4,3	0,7	3,6	1,8	0,0	2,1

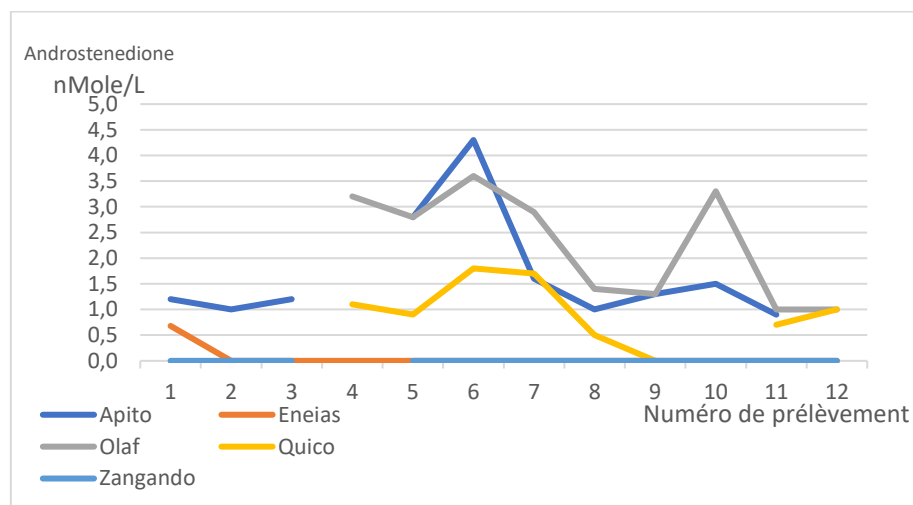


Figure 12: Evolution de la concentration plasmatique en androsténédione chez les entiers non immunisés au cours de l'année

Profil de sécrétions hormonales chez les chevaux immunisés de rang 1

On compte 5 chevaux pour cette catégorie de rang 1. Le cheval Casablanca a reçu sa première injection vaccinale en novembre 2016 et ce cheval faisait partie de l'étude précédente. Nous considérerons donc que sa valeur initiale est à j0 celle qu'il possédait en novembre 2011 afin de pouvoir effectuer des comparaisons avec les chevaux du même lot. Les prélèvements du cheval Habibe n'ont pas été réalisés pour les mois d'Aout, Octobre, Novembre et Décembre ainsi qu'en juillet pour le cheval Fundador. Sur chacun des graphiques les flèches rouges représentent les injections de primo-immunisation pour les chevaux de rang 1. La flèche verte correspond à l'injection de rappel prématurément réalisée pour le cheval Casablanca.

Profil de sécrétion de l'AMH

Des variations interindividuelles de la concentration d'AMH entres les différents chevaux de rang 1 avec des concentrations moyennes après j28 allant de 16.4 µg/L à 89.5 µg/L (tableau XIV). Les écarts-types sont faibles pour tous les chevaux (1.4-10.3) à l'exception de César (65.9). Chez ce dernier cheval il se produit une forte augmentation de la concentration mesurée en AMH dès la première injection (26.2 µg/L à j0 et 143.2 µg/L à j28) avec des fluctuations très importantes au cours de l'année (figure 13)

Tableau XIV: Concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 1

AMH (µg/L)	N°25 Hino 5 ans	N°24 Habibe 5 ans	N°23 Fundador 7 ans	N°22 Cesar 12 ans	N°21 Oriental 7 ans	N°20 Casablanca 10 ans	Moyenne
Valeur j0	38,6	22,8	34,6	26,2	13,6	10,2	24,3
Valeur j28	25,4	13,6	35,4	143,2	22,0	11,3	41,8
Moyenne >j28	25,3	16,4	30,3	89,5	29,2	11,7	33,7
Ecart-type	4,9	7,1	10,3	65,9	6,0	1,4	15,9
Minimum	22,3	0,7	0,5	11,4	13,6	9,0	9,6
Maximum	38,6	22,8	36,7	207,8	33,3	14,3	58,9

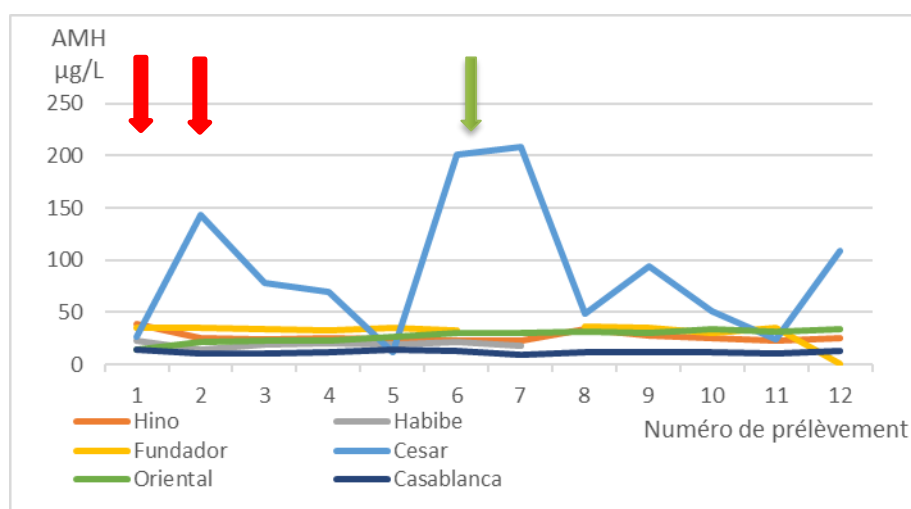


Figure 13: Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 1 au cours de l'année

Profil de sécrétion des stéroïdes

Profil de sécrétion de la testostérone

Pour l'ensemble des chevaux du lot à l'exception de Casablanca une baisse de la concentration plasmatique en testostérone survient dès la première injection vaccinale (tableau XV). Chez les chevaux les plus jeunes (Hino, Habibe, Fundador et Oriental) les concentrations mesurées restent basses au cours du temps avec de faibles variations (figure 14). En revanche il se produit une augmentation rapide 3 mois après la première injection pour Casablanca de la concentration plasmatique en testostérone puis une baisse après son injection reçue 5 mois après sa première injection avant une augmentation dès le mois de juillet. Pour le cheval César qui présentait les plus grosses variations en AMH, la testostéronémie remonte dès le mois de juin avant de baisser en Aout et de réaugmenter en septembre avant de diminuer pour la fin d'année.

Tableau XV: Testostéronémie (nMole/L) chez les chevaux de rang 1

Testostérone nMole/L	N°25 Hino 5 ans	N°24 Habibe 5 ans	N°23 Fundador 7 ans	N°22 Cesar 12 ans	N°21 Oriental 7 ans	N°20 Casablanca 10 ans	Moyenne
Valeur j0	7,6	9,5	9,1	6,5	5,2	1,8	6,6
Valeur j28	3,4	8,9	4,4	3,6	4,4	2,0	4,5
Moyenne >j28	0,4	1,0	2,0	6,9	2,2	6,1	3,1
Ecart-type	2,3	3,9	3,1	5,1	1,5	3,1	3,2
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,2	0,9	0,9	0,3
Maximum	7,6	9,5	9,1	15,0	5,2	9,7	9,4

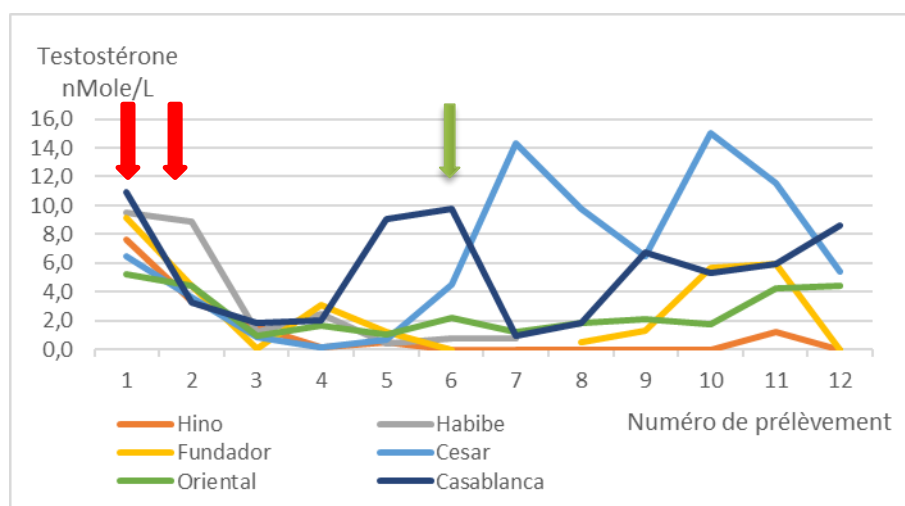


Figure 14: Evolution de la testostéronémie chez les chevaux de rang 1 au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'œstradiol

Pour l'ensemble des chevaux du lot à l'exception de Casablanca une baisse de la concentration plasmatique en œstradiol se produit après la fin du protocole vaccinal et même parfois après la première injection (tableau XVI). Par la suite, les concentrations mesurées restent stables au cours de l'étude (figure 15) sauf pour le cheval César, le plus âgé du lot, chez qui les concentrations mesurées sont très variables dès le mois de Mai. On notera chez Casablanca une baisse de la concentration mesurée après le premier rappel vaccinal puis une ré augmentation dès le mois suivant.

Tableau XVI : Œstradiolémie(pMole/L) chez les chevaux de rang 1

Œstradiol pMole/L	N°25 Hino 5 ans	N°24 Habibe 5 ans	N°23 Fundador 7 ans	N°22 Cesar 12 ans	N°21 Oriental 7 ans	N°20 Casablanca 10 ans	Moyenne
Valeur j0	269,2	173,3	219,2	235,0	128,0	11,8	172,8
Valeur j28	131,8	100,8	283,8	166,2	14,8	21,2	119,8
Moyenne >j28	90,9	114,9	124,1	134,3	15,2	46,3	87,6
Ecart-type	54,0	26,9	56,3	52,3	34,5	26,1	41,7
Minimum	63,1	99,2	87,8	83,6	5,3	0,1	56,5
Maximum	269,2	173,3	283,8	245,3	128,0	75,8	195,9

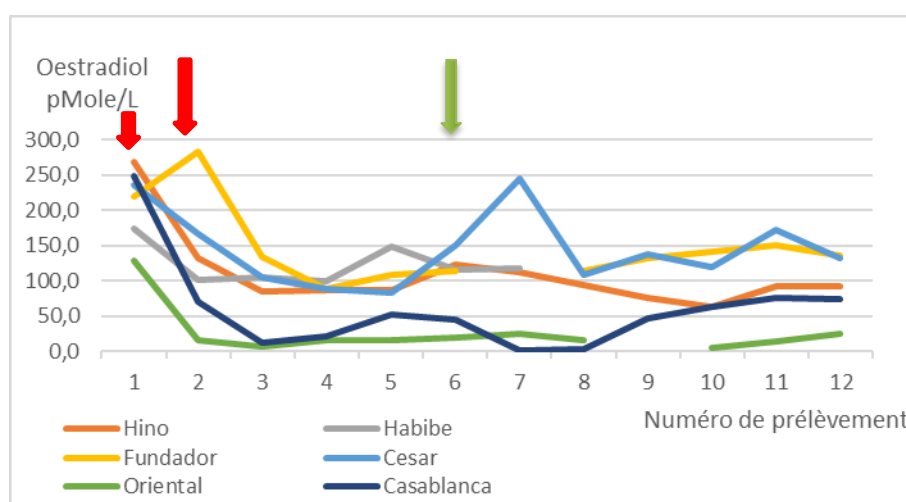


Figure 15: Evolution de l'œstradiolémie chez les chevaux de rang 1 au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'androsténédione

Les prélèvements pour César et Oriental n'ont pas pu être analysés en Janvier soit pour la valeur j0. Il s'agit du seul lot de chevaux immunisés où l'ensemble des chevaux possèdent au moins une concentration plasmatique en androsténédione au-dessus du seuil de détection du test (tableau XVII). Chez tous les chevaux il se produit une baisse de la concentration plasmatique en androsténédione après les deux injections à l'exception de Casablanca chez qui une baisse ne survient que temporairement après son premier rappel (figure 16). De même que pour la testostérone, seuls César et Casablanca présentent des variations importantes d'androsténédionémie au cours du temps.

Tableau XVII: Concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 1

Androsténédione nMole/L	N°25 Hino 5 ans	N°24 Habibe 5 ans	N°23 Fundador 7 ans	N°22 Cesar 12 ans	N°21 Oriental 7 ans	N°20 Casablanca 10 ans	Moyenne
Valeur j0	3,2	1,3	2,5			0,0	2,3
Valeur j28	0,0	0,0	2,6	0,8	0,0	0,0	0,7
Moyenne >j28	0,0	0,0	0,3	0,7	0,0	1,6	0,2
Ecart-type	0,9	0,5	1,1	0,8	0,1	1,2	0,7
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Maximum	3,2	1,3	2,6	2,1	0,5	3,5	1,9

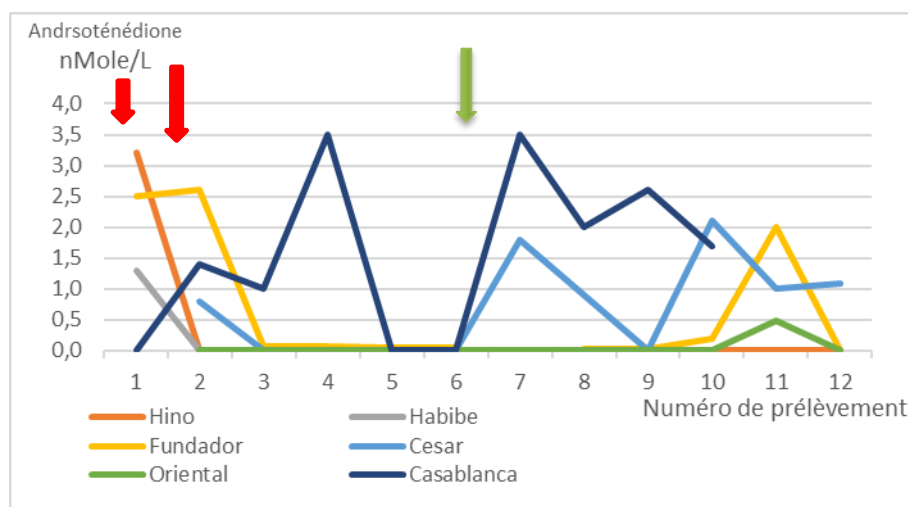


Figure 16 : Evolution de la concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 1 au cours de l'année

Profil de sécrétions hormonales chez les chevaux immunisés de rang 2

Profil de sécrétion de l'AMH

Les concentrations plasmatiques moyenne en AMH après j28 sont très variable entre les différents individus du lot (10.9 µg/L - 41.1 µg/L) avec des concentrations moyenne après j28 équivalentes ou supérieures à la valeur initiale à j0 pour l'ensemble des chevaux. Les variations observées au cours du temps ne semblent pas suivre de saisonnalité (figure 17) et pour le cheval Rifado, le plus âgé du lot (19 ans) les valeurs de concentrations en AMH sont toutes supérieures à l'ensemble des autres valeurs obtenus pour les chevaux du lot.

Tableau XVIII : Concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 2

AMH (µg/L)	N°19 Baco 11 ans	N°18 Alamar 12 ans	N°17 Alecrim 12 ans	N°16 Rifado 19 ans	N°15 Castor 10 ans	N°14 Cravo II 10 ans	N°13 Ambar 12 ans	Moyenne
Valeur j0	13,6	11,7	20,2	30,8	8,7	10,6	9,1	15,0
Valeur j28	12,2	12,4	18,4	36,1	16,2	13,8	7,5	16,7
Moyenne >j28	14,0	12,7	17,7	41,1	22,5	17,1	10,9	19,4
Ecart-type	1,0	1,3	3,7	4,5	6,0	3,4	1,6	3,1
Minimum	12,2	10,3	10,1	30,8	8,7	10,6	7,5	12,9
Maximum	15,3	14,7	21,9	46,7	27,3	22,9	12,5	23,0

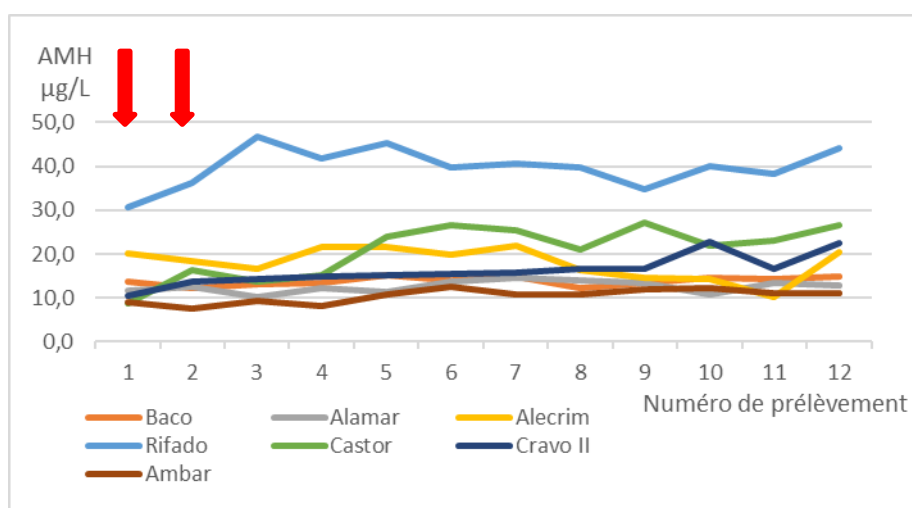


Figure 17 : Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 2 au cours de l'année

Profil de sécrétion des stéroïdes

Profil de sécrétion de la testostérone

Pour l'ensemble des chevaux du lot il se produit une baisse de la concentration plasmatique en testostérone après les deux injections pour le cheval Baco et dès la première injection pour les autres individus (tableau XIX). Ces concentrations baissent et se stabilisent au cours du temps (figure 18) à l'exception des chevaux Alamar et Alecrim qui possèdent des concentrations mesurées plus variable avec une baisse lors des mois de Juillet et Aout.

Tableau XIX : Testostéronémie (nMole/L) chez les chevaux de rang 2

Testostérone nMole/L	N°19 Baco 11 ans	N°18 Alamar 12 ans	N°17 Alecrim 12 ans	N°16 Rifado 19 ans	N°15 Castor 10 ans	N°14 Cravo II 10 ans	N°13 Ambar 12 ans	Moyenne
Valeur j0	2,3	4,9	7,3	2,6	5,8	3,5	10,2	5,2
Valeur j28	2,5	3,2	0,1	0,8	1,4	2,5	3,3	2,0
Moyenne >j28	1,7	3,7	2,0	1,3	1,4	1,5	1,0	1,8
Ecart-type	0,8	1,7	2,1	0,7	1,3	0,7	2,7	1,4
Minimum	0,1	0,1	0,1	0,7	0,5	0,9	0,0	0,4
Maximum	2,6	6,3	7,3	2,6	5,8	3,5	10,2	5,5

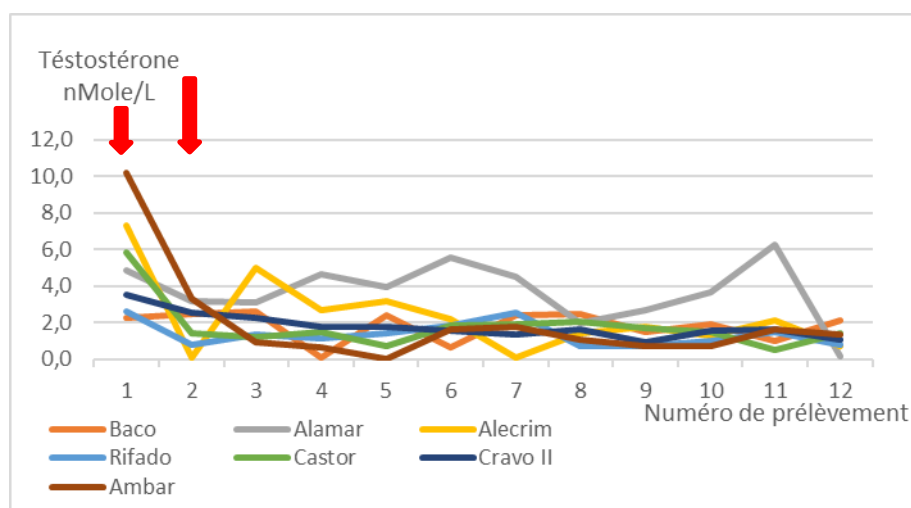


Figure 18 : Evolution de la testostéronémie chez les chevaux de rang 2 au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'œstradiol

Au total, 7 prélèvements sur les chevaux Rifado, Castor et Ambar n'ont pas pu être analysés. A l'observation des concentrations plasmatiques mesurées en œstradiol chez les chevaux de rang 2 on peut classer les chevaux de ce lot selon 3 catégories. Ceux dont la concentration initiale est très basse et ne variera que très peu au cours du temps (Rifado et Castor), ceux dont la concentration mesurée chute dès la première injection vaccinale et restera ensuite basse au cours du temps (Cravo II et Ambar) et enfin les autres dont les concentrations mesurées ne sont pas ou peu modifiées après le rappel vaccinal (tableau XX) et dont les variations ne semblent pas répondre à une saisonnalité particulière (figure 19)

Tableau XX: Œstradiolémie(pMole/L) chez les chevaux de rang 2

Œstradiol pMole/L	N°19 Baco 11 ans	N°18 Alamar 12 ans	N°17 Alecrim 12 ans	N°16 Rifado 19 ans	N°15 Castor 10 ans	N°14 Cravo II 10 ans	N°13 Ambar 12 ans	Moyenne
Valeur j0	98,6	78,8	129,4	8,6	17,5	164,0	219,0	102,3
Valeur j28	84,9	71,6	95,2	17,5	12,8	15,5	6,3	43,4
Moyenne >j28	86,6	83,6	88,8	9,0	10,7	11,2	5,6	42,2
Ecart-type	15,7	20,3	19,9	5,0	4,3	44,2	67,6	25,3
Minimum	55,2	41,0	48,3	1,4	3,0	0,9	0,8	21,5
Maximum	109,7	105,3	129,4	17,5	17,5	164,0	219,0	108,9

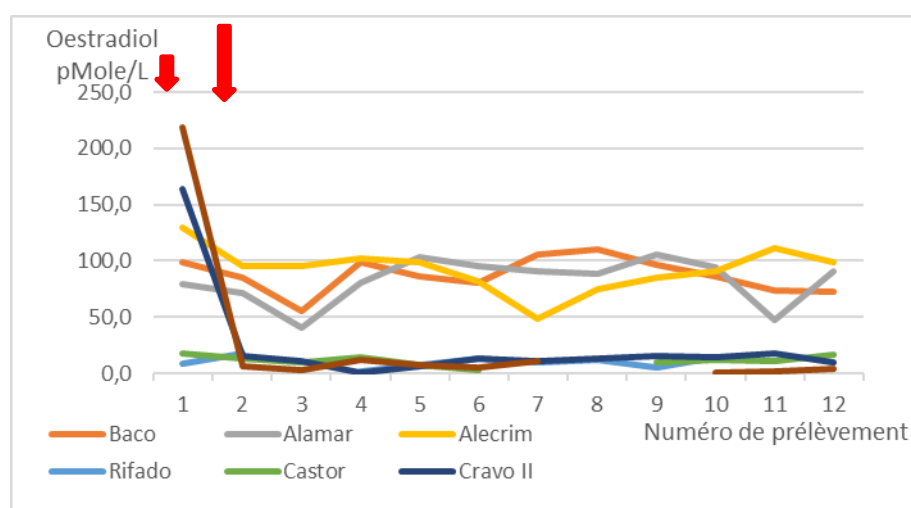


Figure 19: Evolution de l'œstradiolémie chez les chevaux de rang 2 au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'androsténédione

Les prélèvements à j0 de Cravo II et Ambar n'ont pas pu être effectués. Des valeurs au-dessus du seuil de détection ne sont présentes seulement que pour deux chevaux dans le lot (tableau XXI). Il se produit une baisse des concentrations mesurées après la première injection de rappel pour ensuite avoir des mesures en dessous du seuil de détection pour le reste de l'année (figure 20).

Tableau XXI: Concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 2

Androsténédione nMole/L	N°19 Baco 11 ans	N°18 Alamar 12 ans	N°17 Alecrim 12 ans	N°16 Rifado 19 ans	N°15 Castor 10 ans	N°14 Cravo II 10 ans	N°13 Ambar 12 ans	Moyenne
Valeur j0	0,0	0,0	0,6	0,0	1,2			0,3
Valeur j28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Moyenne >j28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ecart-type	0,0	0,0	0,2	0,0	0,3	0,0	0,0	0,1
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Maximum	0,0	0,0	0,6	0,0	1,2	0,0	0,0	0,2

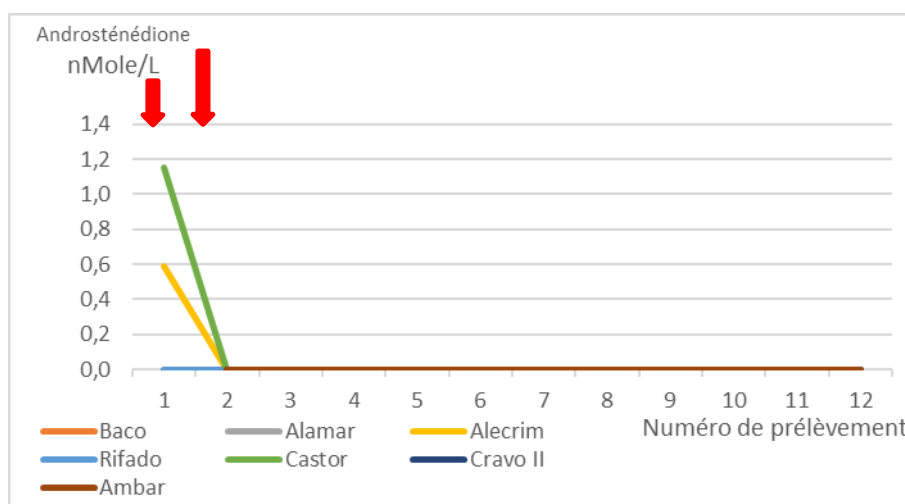


Figure 20 : Evolution de la concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 2 au cours de l'année

Profil de sécrétions hormonales chez les chevaux immunisés de rang 3

On compte 4 Chevaux appartenant à cette catégorie, le cheval Distinto a été castré chirurgicalement le 29 août il n'a plus subi de prélèvement en novembre et en décembre. Les prélèvements de Kongo en Février, Septembre, Octobre, Novembre et Décembre n'ont pas pu être analysés ainsi que rdle prélèvement d'Avril du cheval Capote.

Profil de sécrétion de l'AMH

Les concentrations plasmatiques moyenne après j28 sont très variables entre les différents chevaux de rang 3 (14 $\mu\text{g/L}$ – 40.5 $\mu\text{g/L}$) et les variations sont plus importante pour les chevaux présentant les valeurs les plus élevées (1 – 19.7). On observe pour l'ensemble des chevaux du lot une baisse de la concentration plasmatique en AMH après le rappel vaccinal (figure 17) mais, à l'exception du cheval Distinto chez lequel on observe une chute de la concentration mesurée après sa castration chirurgicale, les concentrations restent relativement stable au cours du temps.

Tableau XXII : Concentration plasmatique en AMH($\mu\text{g/L}$) chez les chevaux de rang 3

AMH ($\mu\text{g/L}$)	N°11 Brasil 11 ans	N°10 Capote 10 ans	N°9 Distinto 9 ans	N°8 Kongo I 10 ans	Moyenne
Valeur j0	13,6	41,1	60,4	31,2	36,6
Valeur j28	12,2	39,7	54,8		35,6
Moyenne >j28	14,0	40,5	39,0	28,7	30,6
Ecart-type	1,0	2,7	19,7	4,6	7,0
Minimum	12,2	36,8	0,2	21,3	17,6
Maximum	15,3	45,8	60,4	34,0	38,9

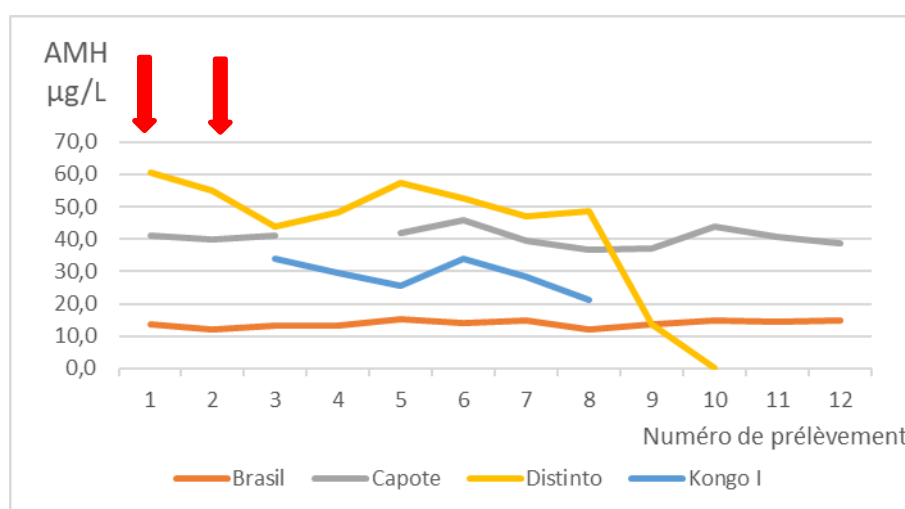


Figure 21: Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 3 au cours de l'année

Profil de sécrétion des stéroïdes

Profil de sécrétion de la testostérone

Pour deux chevaux de rang 3 les concentrations plasmatiques en testostérone initiales sont très basse et ne varient que très peu au cours du temps (tableau XXIII). Cependant pour les deux autres on observe une concentration moyenne après j28 inférieures aux mesures initiales. Cette baisse est notable chez le cheval Capote qui présente la concentration initiale la plus élevée (8.2 nMole/L), on observe néanmoins une nouvelle baisse saisonnière pour les mois de Juillet et Aout avant une ré augmentation de la concentration mesurée dès le mois de septembre (figure 18)

Tableau XXIII : Testostéronémie (nMole/L) chez les chevaux de rang 3

Testostérone nMole/L	N°11 Brasil 11 ans	N°10 Capote 10 ans	N°9 Distinto 9 ans	N°8 Kongo I 10 ans	Moyenne
Valeur j0	2,3	8,2	0,0	0,0	2,6
Valeur j28	2,5	5,2	0,7		2,8
Moyenne >j28	1,7	4,6	0,1	0,1	1,6
Ecart-type	0,8	2,6	0,3	0,3	1,0
Minimum	0,1	1,5	0,0	0,0	0,4
Maximum	2,6	9,9	0,7	0,7	3,5

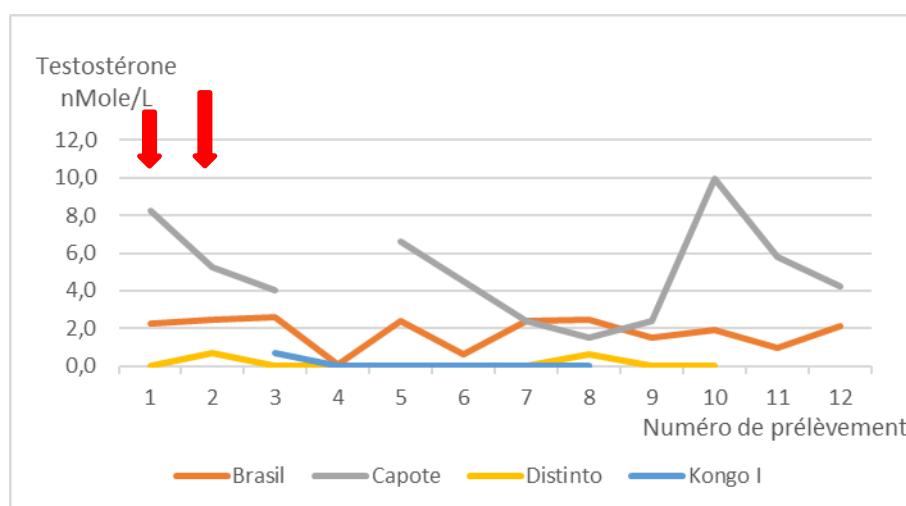


Figure 22: Evolution de la testostéronémie chez les chevaux de rang 3 au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'œstradiol

Les valeurs initiales d'œstradiolémie entre sont très variables (38 – 112.8 pMole/L) (Tableau XXIV) entre les différents chevaux de rang 3 et les écarts-types sont du même ordre de grandeur (15.7-29.3) entre ces mêmes chevaux. Cependant une nette diminution de l'œstradiolémie entre j0 et j28 n'est observé que chez le cheval Distinto et il n'y a pas de différence entre la moyenne observée après j28 et la valeur initiale à j0 à l'exception du cheval Kongo.

Il est à noter que l'œstradiolémie augmente pour le cheval Capote après les nouvelles injections vaccinales. (Figure 23).

Tableau XXIV : Œstradiolémie(pMole/L) les chevaux de rang 3

Œstradiol pMole/L	N°11 Brasil 11 ans	N°10 Capote 10 ans	N°9 Distinto 9 ans	N°8 Kongo I 10 ans	Moyenne
Valeur j0	98,6	38,0	112,8	99,6	87,3
Valeur j28	84,9	59,1	111,0		85,0
Moyenne >j28	86,6	39,2	114,6	80,5	80,2
Ecart-type	15,7	29,3	17,3	29,3	22,9
Minimum	55,2	12,7	84,9	42,0	48,7
Maximum	109,7	112,8	131,3	118,0	118,0

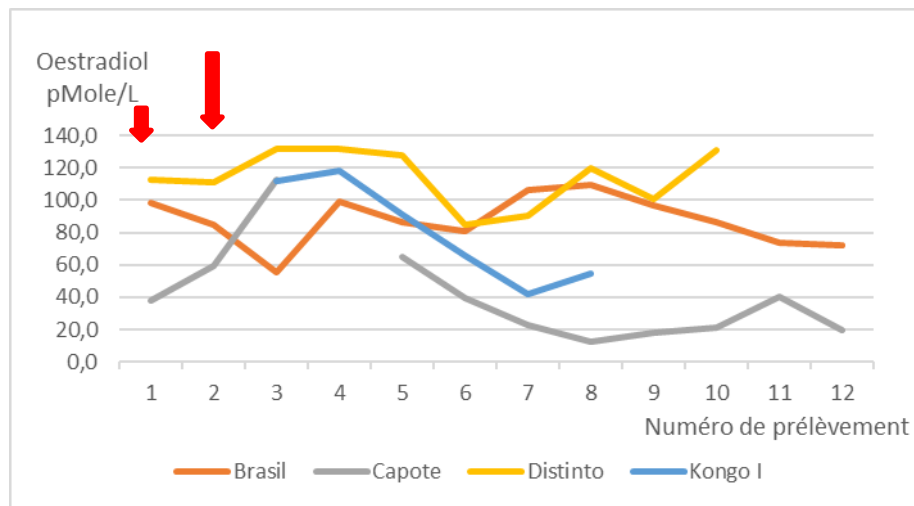


Figure 23 : Evolution de l'œstradiolémie chez les chevaux de rang 3 au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'androsténédione

Un seul cheval de rang 3 présente des concentrations plasmatiques au-dessus du seuil de détection du test (tableau XXV). Il n'y a pas d'effet observé après le rappel vaccinal effectué et les concentrations mesurées sont très variable au cours du temps (figure 20).

Tableau XXV : Concentrations plasmatiques en androsténédione chez les chevaux de rang 3

Androsténédione nMole/L	N°11 Brasil 11 ans	N°10 Capote 10 ans	N°9 Distinto 9 ans	N°8 Kongo I 10 ans	Moyenne
Valeur j0	0,0	1,3	0,0	0,0	0,3
Valeur j28	0,0	1,6	0,0		0,5
Moyenne >j28	0,0	1,8	0,0	0,0	0,5
Ecart-type	0,0	1,2	0,0	0,0	0,3
Minimum	0,0	0,5	0,0	0,0	0,1
Maximum	0,0	3,7	0,0	0,0	0,9

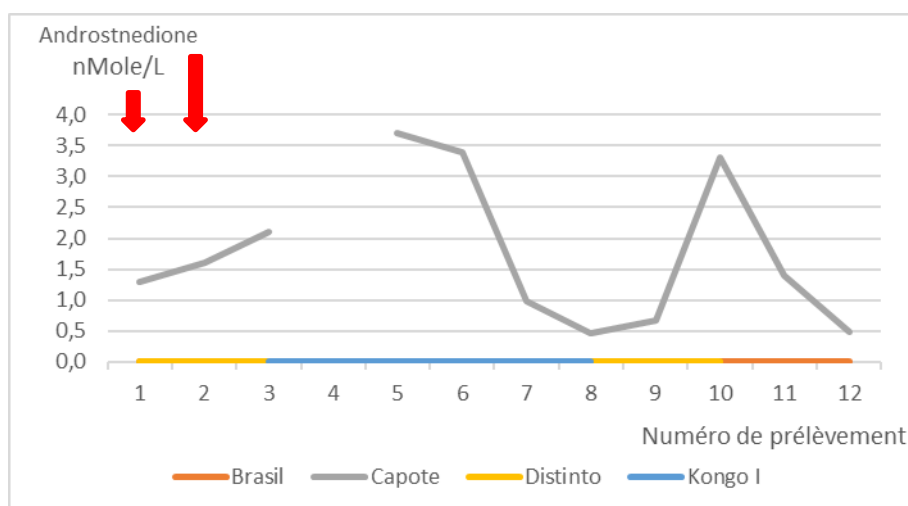


Figure 24 : Evolution de la concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 3 au cours de l'année

Profil de sécrétions hormonales chez les chevaux immunisés de rang 4

Il y a 5 chevaux de rang 4 dans l'étude, aucun n'a été castré chirurgicalement au cours de l'étude. On notera que les prélèvements de mars, novembre et décembre n'ont pas été réalisés pour le cheval Candelario ainsi que pour le cheval Craque au mois de juillet.

Profil de sécrétion de l'AMH

Pour 4 des 5 chevaux de l'étude, les concentrations plasmatiques moyenne après j28 sont assez similaires à la valeur obtenue à j0 avec des variations assez faible (4.6 – 8.3) malgré une variabilité inter-individu assez nette (tableau XXVI). Cependant le cheval Candelario présente une forte augmentation de la concentration en AMH plasmatique après la première injection de rappel (10.6 g/L à j0, 240.7 g/L à j 28), c'est également lui qui présente la plus grande variabilité de concentration plasmatique mesurée (83.9 g/L). On observe donc chez ce cheval une forte augmentation avant une diminution progressive tandis que pour les autres les concentrations mesurées sont stables au cours du temps (figure 21) et que l'on n'observe pas d'effet d'injection.

Tableau XXVI: Concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 4

AMH (µg/L)	N°3 Candelario 11 ans	N°7 Catraio 10 ans	N°5 Craque 10 ans	N°6 Eclipse 8 ans	N°8 Ze-quidim 13 ans	Moyenne
Valeur j0	10,6	31,1	49,2	18,5	12,7	24,4
Valeur j28	240,7	27,3	43,2	18,7	13,1	68,6
Moyenne >j28	61,4	34,5	44,0	16,9	18,8	35,1
Ecart-type	83,9	4,6	7,1	6,0	8,3	22,0
Minimum	0,0	27,3	27,0	5,2	0,0	11,9
Maximum	240,7	41,6	52,9	23,8	30,1	77,8

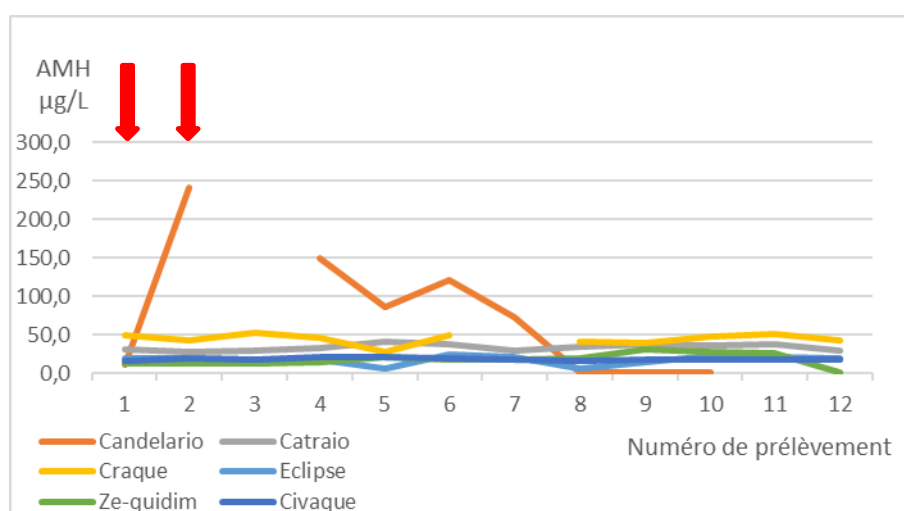


Figure 25 : Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 4

Profil de sécrétion des stéroïdes

Profil de sécrétion de la testostérone

On observe une grande disparité entre les concentrations en testostérone plasmatique obtenus à la valeur j0 (0 – 8,2 nMole/L) avec une moyenne à 3,3 nMole/L (tableau XXVII). Pour le cheval Eclipse la plupart des valeurs mesurées sont inférieures au seuil de détection du test et on n’observe pas d’effet lié à la réimmunisation car la concentration était déjà très basse. Pour 3 des autres chevaux de rang 4 on observe une baisse de la concentration plasmatique mesurée après la première injection (Candelario et Catraio) ou après la deuxième (Ze-quidim). En revanche la modification des concentrations plasmatiques en testostérone n’est pas marquée chez le cheval Craque et le rappel pratiqué semble avoir peu d’effet (figure 22). On note également l’augmentation de la concentration mesurée à partir du mois d’octobre pour le cheval Ze-quidim qui présentait la concentration initiale la plus élevée.

Tableau XXVII : Testostéronémie (nMole/L) chez les chevaux de rang 4

Testostérone nMole/L	N°3 Candelario 11 ans	N°7 Catraio 10 ans	N°5 Craque 10 ans	N°6 Eclipse 8 ans	N°8 Ze-quidim 13 ans	Moyenne
Valeur j0	5,0	2,0	1,3	0,0	8,2	3,3
Valeur j28	0,3	0,0	2,0	0,0	7,2	1,9
Moyenne >j28	0,2	0,0	1,2	0,1	1,9	0,7
Ecart-type	1,6	0,6	0,8	0,1	2,8	1,2
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
Maximum	5,0	2,0	2,2	0,5	8,2	3,6

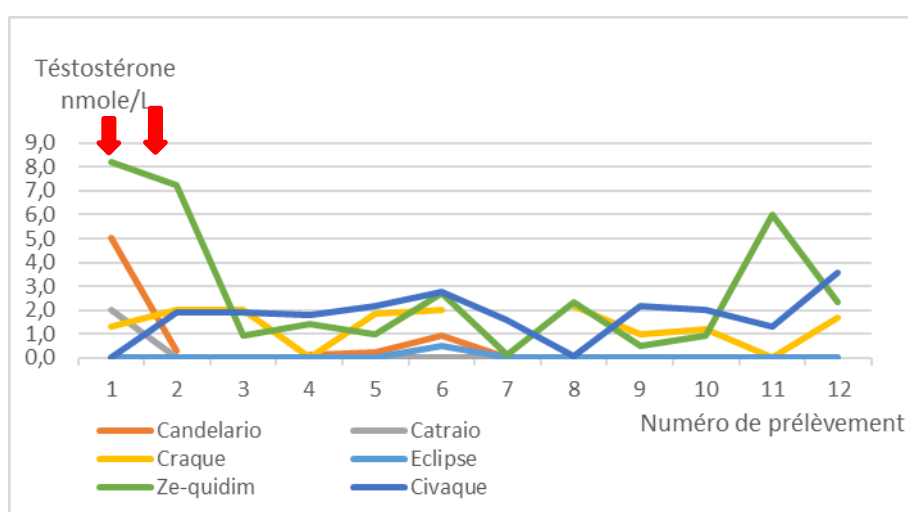


Figure 26 Evolution de la testostéronémie chez les chevaux de rang 4 au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'œstradiol

Les concentrations plasmatiques moyenne en œstradiol après j 28 sont très variables selon les individus (58,4 pMole/L – 111,1 pMole/L). On observe une baisse de la concentration plasmatique en œstradiol chez tous les individus après la première ou la deuxième injection de rappel (tableau XXVIII) mais les concentrations mesurées au cours du temps sont très variable (figure 23)

Tableau XXVIII : Œstradiolémie(pMole/L) chez les chevaux de rang 4

Œstradiol pMole/L	N°3 Candelario 11 ans	N°7 Catraio 10 ans	N°5 Craque 10 ans	N°6 Eclipse 8 ans	N°8 Ze-quidim 13 ans	Moyenne
Valeur j0	133,0	120,2	77,0	89,3	127,0	109,3
Valeur j28	56,9	41,3	82,1	85,2	93,0	71,7
Moyenne >j28	58,4	101,3	66,4	111,1	96,8	86,8
Ecart-type	32,4	25,8	9,4	21,1	30,6	23,8
Minimum	27,3	41,3	56,2	75,4	58,6	51,8
Maximum	133,0	126,1	82,1	137,7	174,4	130,7

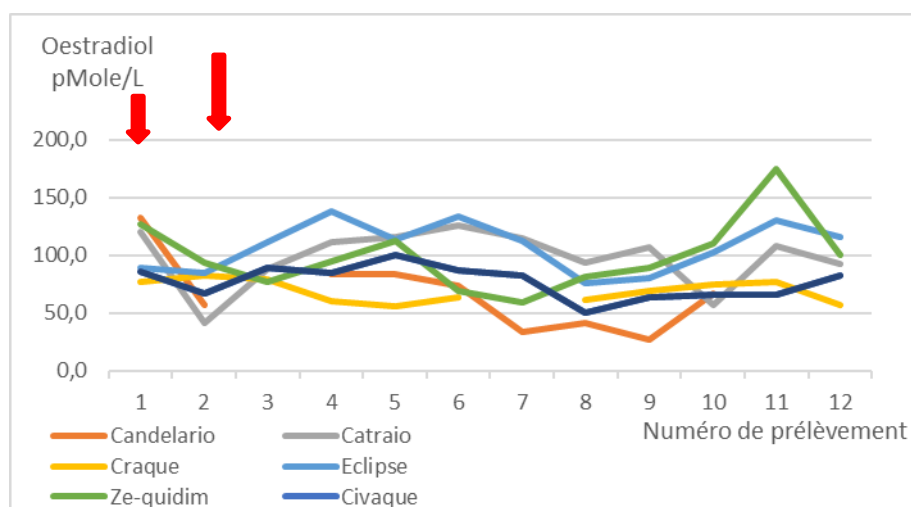


Figure 27: Evolution de l'œstradiolémie chez les chevaux de rang 4 au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'androsténédione

Un seul cheval présente des valeurs au-dessus du seuil de détection du test (Tableau XXIX) avec une concentration moyenne après 28 jours inférieure à la valeur initiale (1,7 nMole/L). On observe également une augmentation de la concentration mesurée à partir du mois d'avril (figure 24) tandis qu'on observait une augmentation de la concentration en testostérone uniquement à partir du mois d'octobre pour ce cheval Ze-quidim

Tableau XXIX: Concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 4

Androsténédione nMole/L	N°3 Candelario 11 ans	N°7 Catraio 10 ans	N°5 Craque 10 ans	N°6 Eclipse 8 ans	N°8 Ze-quidim 13 ans	Moyenne
Valeur j0		0,0	0,0	0,0	1,7	0,4
Valeur j28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0
Moyenne >j28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1
Ecart-type	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6	0,1
Minimum	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Maximum	0,0	0,0	0,0	0,0	1,7	0,3

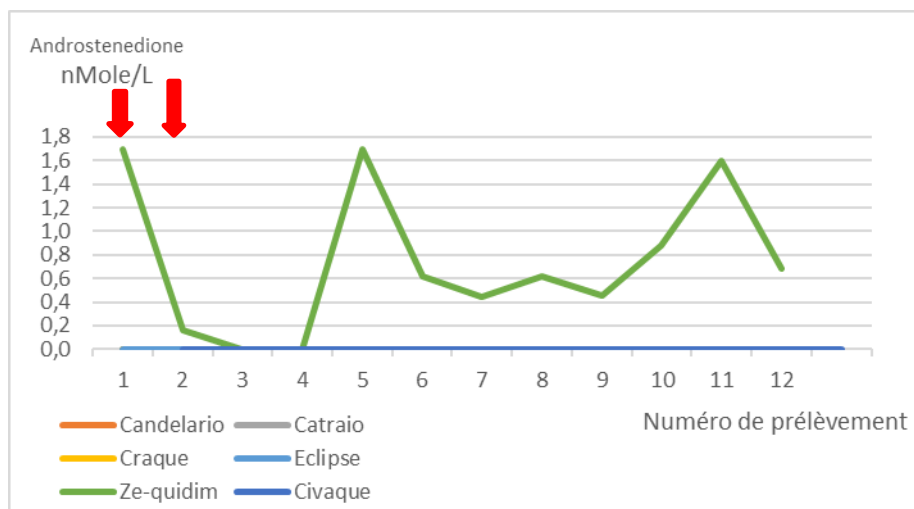


Figure 28: Evolution de la concentration plasmatique en androsténédione chez les chevaux de rang 4 au cours de l'année

Profil de sécrétions hormonales chez les chevaux immunisés de rang 5

L'effectif des chevaux de rang 5 est composé de deux individus, Burundi et Cantinflas. Pour l'ensemble des différents tests, 3 analyses par série n'ont pas été réalisées par défaut de prélèvement

Pour Cantinflas pour les mois de Mars, Novembre et Décembre. On notera par ailleurs la castration chirurgicale de ce même cheval à la date du 03/10/2017.

Profil de sécrétion de l'AMH

On observe une concentration moyenne très différente en AMH pour les deux chevaux de l'effectif (6.3, 240.7 g/L) avec des concentrations plasmatiques très variables pour le cheval Cantinflas (82.5) (Tableau XXX). Cette valeur moyenne obtenue est la plus élevée de l'ensemble des chevaux de l'étude. On observe une baisse de la concentration obtenue à partir du mois d'Avril pour le cheval Cantinflas (figure 25) et une concentration plasmatique en AMH assez stable pour le cheval Burundi.

Tableau XXX: Concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 5

AMH (µg/L)	N°2 Burundi 11 ans	N°1 Cantinflas 10 ans	Moyenne
Valeur j0	5,8	25,7	15,8
Valeur j28	9,9	240,7	125,3
Moyenne	6,3	61,4	33,8
Ecart-type	2,4	82,5	42,5
Minimum	3,0	0,0	1,5
Maximum	10,1	240,7	125,4

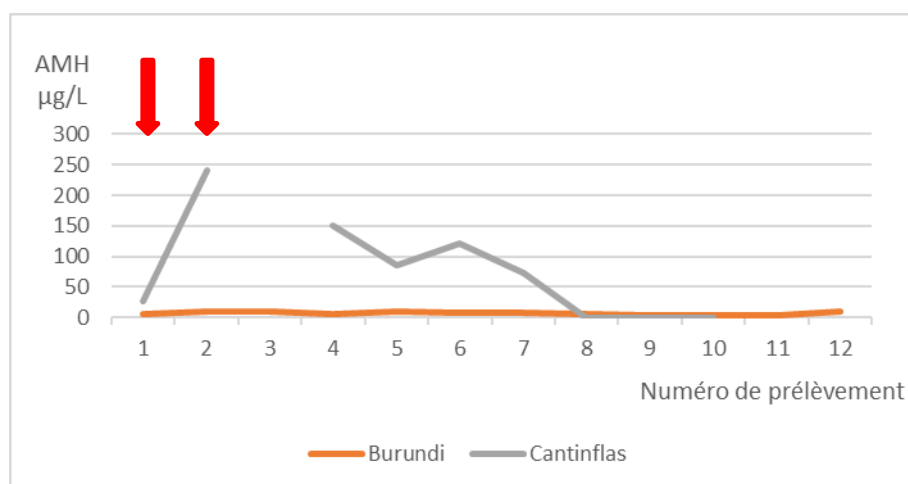


Figure 29: Evolution de la concentration plasmatique en AMH chez les chevaux de rang 5 au cours de l'année

Profil de sécrétion des stéroïdes

Profil de sécrétion de la testostérone

On observe pour les deux chevaux de rang 5 une faible sécrétion en testostérone avec des moyennes à 0.3 nMole/L et des maximums à 1.7 et 1.3 nMole/l (Tableau XXXI). De plus on observe des variations de la concentration plasmatique mesurée entre Janvier et Juin pour le cheval Burundi et entre Janvier et Juillet pour le cheval Cantinflas avant de voir la sécrétion de testostérone chuté en dessous du seuil de détection et donc de tomber à 0 pour le reste de l'étude (figure 26).

Tableau XXXI : Testostéronémie (nMole/L) chez les chevaux de rang 5

Testostérone nMole/L	N°2 Burundi 11 ans	N°1 Cantinflas 10 ans	Moyenne
Valeur j0	0	1,3	0,7
Valeur j28	1,01	0,31	0,7
Moyenne	0,3	0,2	0,2
Ecart-type	0,6	0,5	0,5
Minimum	0,0	0,0	0,0
Maximum	1,7	1,3	1,5

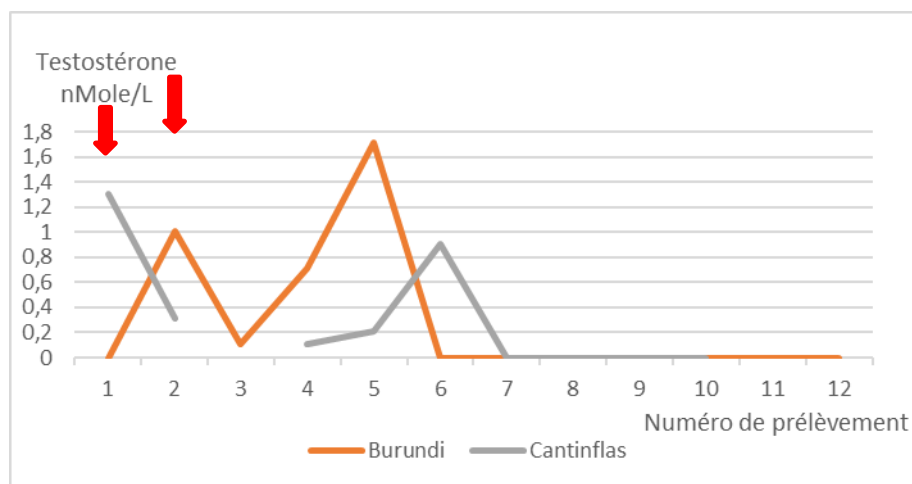


Figure 30: Evolution de la testostéronémie chez les chevaux de rang 5 au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'œstradiol

On observe chez le cheval Burundi la concentration plasmatique moyenne en œstradiol la plus élevée de l'ensemble des chevaux de l'étude (tableau XXXII) avec un écart-type très important (303.1). On observe une très forte augmentation après la première injection de rappel vaccinal puis une baisse à partir du mois d'Avril pour le cheval Burundi (figure 27). Pour le cheval Cantinflas, on observe une baisse de la concentration en œstradiol obtenue dès la première injection de rappel vaccinal avec par la suite une concentration moyenne après la deuxième injection plus basse que celles observées chez les chevaux de rang 4.

Tableau XXXII : Œstradiolémie(pMole/L) chez les chevaux de rang 5

Œstradiol pMole/L	N°2 Burundi 11 ans	N°1 Cantinflas 10 ans	Moyenne
Valeur j0	86	139	112,5
Valeur j28	749,7	56,9	403,3
Moyenne >j28	238,8	58,4	148,6
Ecart-type	303,1	33,9	168,5
Minimum	71,0	27,3	49,2
Maximum	784,2	139,0	461,6

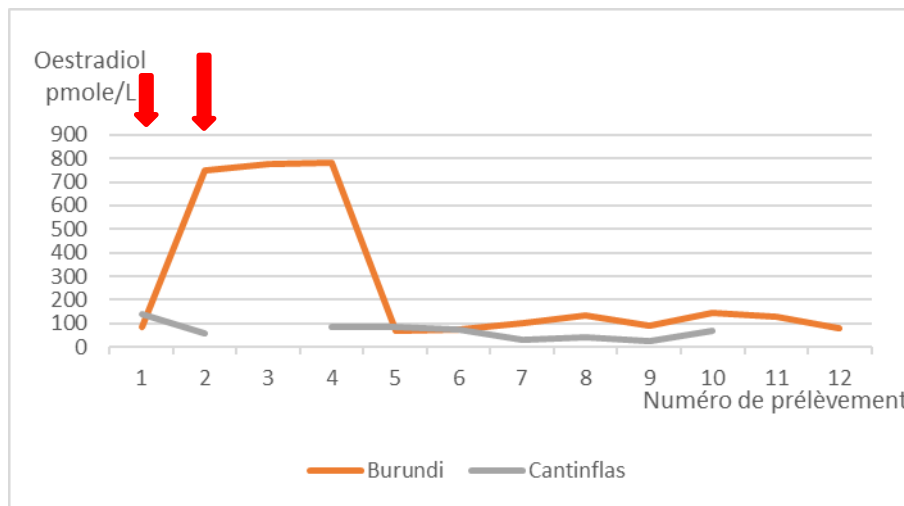


Figure 31: Evolution de l'œstradiolémie chez les chevaux de rang 5 au cours de l'année

Profil de sécrétion de l'androsténédione

L'ensemble des valeurs mesurées pour les deux chevaux de rang 5 sont inférieures au seuil de détection du test et donc égales à 0. On peut supposer qu'il n'y a donc pas de sécrétion d'androsténédione notable pour ces deux individus. Pour l'ensemble de la série, 5 prélèvements n'ont pas été analysés.

Comparaison des profils hormonaux entre les différents rangs de vaccination

Profil de sécrétion de l'AMH

Initialement, les valeurs chez les chevaux immunisés oscillent entre 15 et 40 µg/L (figure 32) et celle des chevaux entiers est à 20 µg/L. La concentration mesurée chez les entiers et les chevaux de rang 2 est stable aux alentours de 20 µg/L tandis que l'on observe une diminution chez les chevaux de rang 3 chez qui la valeur initiale est pourtant la plus élevée (36,6 µg/L) jusqu'au prélèvement numéro 10 (20 µg/L) avant une légère remontée.

Chez les 3 autres groupes on observe une augmentation de la concentration plasmatique d'AMH après la première injection avant une diminution importante dès le prélèvement numéro 3. Ces fluctuations sont plus importantes chez les chevaux de rang 5 que chez les chevaux de rang 4 que chez les chevaux de rang 2.

Pour la suite, les concentrations mesurées sont oscillantes pour les chevaux de rang 4 et 5 jusqu'à une baisse très importante à partir du prélèvement 8 pour les chevaux de rang 5 et une stabilisation entre 20 et 30 µg/L pour les chevaux de rang 4.

Pour les chevaux de rang 1, on observe une augmentation à partir du prélèvement 6 (après la réimmunisation de Casablanca) avant une diminution à partir du prélèvement 8 et une augmentation pour le dernier prélèvement.

Les valeurs finales oscillent entre 8,7 (rang 5) et 42 $\mu\text{g/L}$ (rang 1).

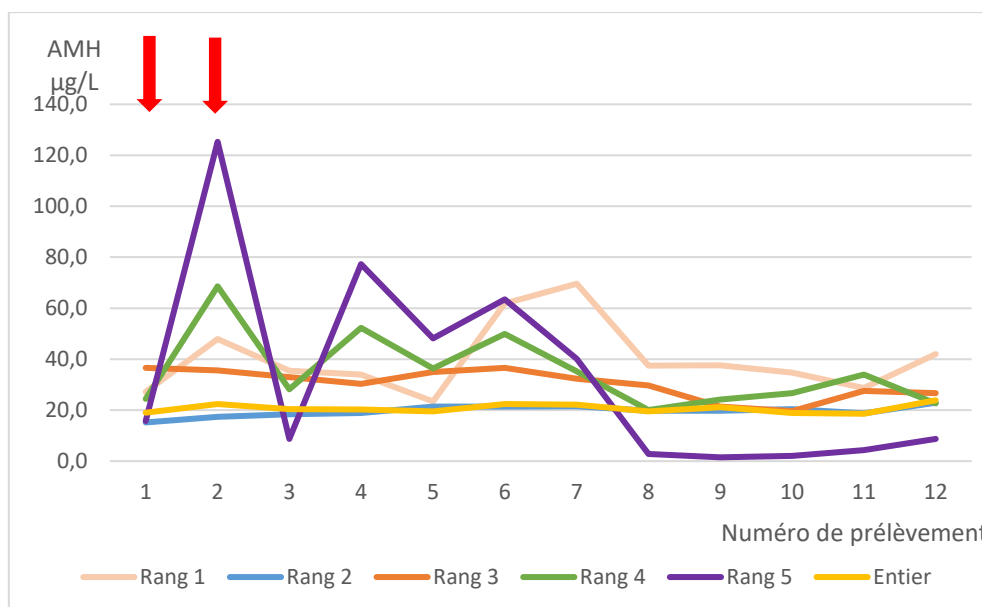


Figure 32 : Evolution des concentrations plasmatiques moyenne en AMH au cours de l'année selon le rang de vaccination

Profil de sécrétion des stéroïdes

Profil de sécrétion de la testostérone

Les valeurs initiales les plus élevées sont celles des chevaux de rang 1 (7,6 nMole/L) et des entiers (6,5 nMole/L) et la plus basse est celle des chevaux de rang 5 (0,65 nMole/L) (figure 33).

Pour l'ensemble des chevaux immunisés la testostéronémie moyenne diminue dès la première ou à partir de la seconde injection de rappel immunisant. Chez les chevaux de rang 5 la testostéronémie reste inférieure à 0,96 nMole/L sur l'ensemble de l'année. La testostéronémie moyenne reste stable pour les chevaux de rang 4 et ceux de rang 2 pour finir respectivement à 1 et 0,9 nMole/L.

Pour les autres on observe une augmentation à partir du prélèvement numéro 6 pour les chevaux de rang 2 et à partir du prélèvement numéro 9 pour les chevaux de rang 3. Les mesures précédentes étaient assez variables. Les valeurs finales sont de 2,5 nMole/L pour les chevaux de rang 2 après un passage au-dessus de 5 nMole/L et de 3,2 nMole/L pour les chevaux de rang 3 sans jamais dépasser 4 nMole/L.

Chez les entiers la testostéronémie moyenne oscille au cours du temps entre 7,1 et 5 nMole/L à l'exception d'une diminution au prélèvement numéro 8 à 2,8 nMole/L.

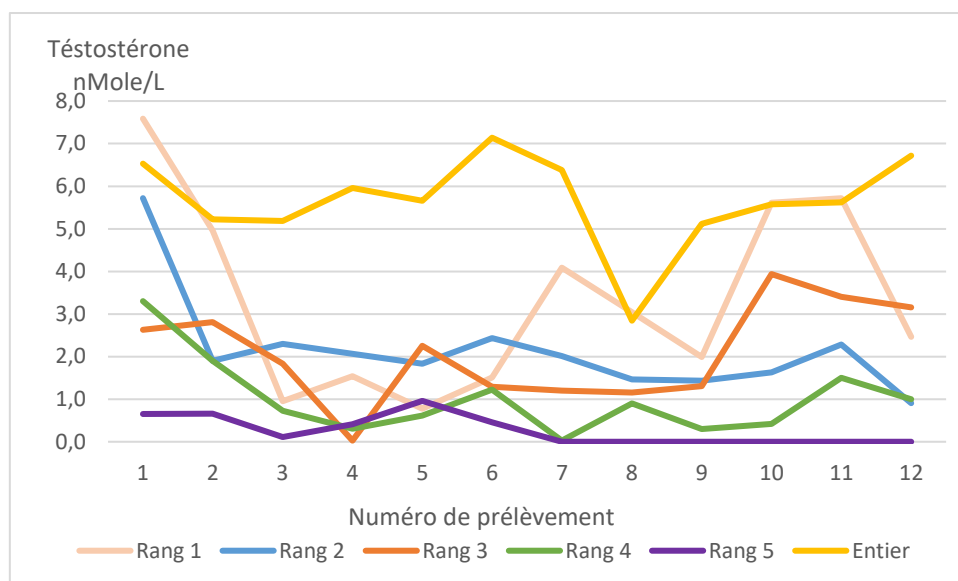


Figure 33 : Evolution de la testostéronémie moyenne au cours de l'année selon le rang de vaccination

Profil de sécrétion de l'œstradiol

L'œstradiolémie initiale la plus importante est de 205 pMole/L chez les chevaux de rang 1 et la plus basse de 87,3 pMole/L chez les chevaux de rang 3. Pour l'ensemble des chevaux immunisés l'œstradiolémie baisse à partir de la première injection immunisante à l'exception des chevaux de rang 3 chez lesquels cette baisse intervient à partir du prélèvement numéro 4 (figure 34). Même si l'on observe des variations un ordre de grandeur de cette œstradiolémie moyenne peut être dégager pour chacun des rangs. Chez les rangs 1 l'œstradiolémie moyenne oscille aux alentours de 100 pMole/L comme chez les chevaux de rang 4. Pour les chevaux de rang 3, la concentration plasmatique mesurée est aux alentours de 100 pMole/L jusqu'au prélèvement 5 avant de descendre jusqu'à 50 pMole/L au prélèvement numéro 12 tandis que chez les chevaux de rang 2, l'œstradiolémie moyenne mesurée est inférieure à 50 pMole/L à partir du prélèvement numéro 2.

Chez les entiers, on observe une oscillation entre 100 et 44,5 pMole/L avec une diminution au début d'année et une réaugmentation pour le prélèvement numéro 4 avant une descente jusqu'au prélèvement numéro 11 et une légère augmentation pour finir à 74 pMole/L.

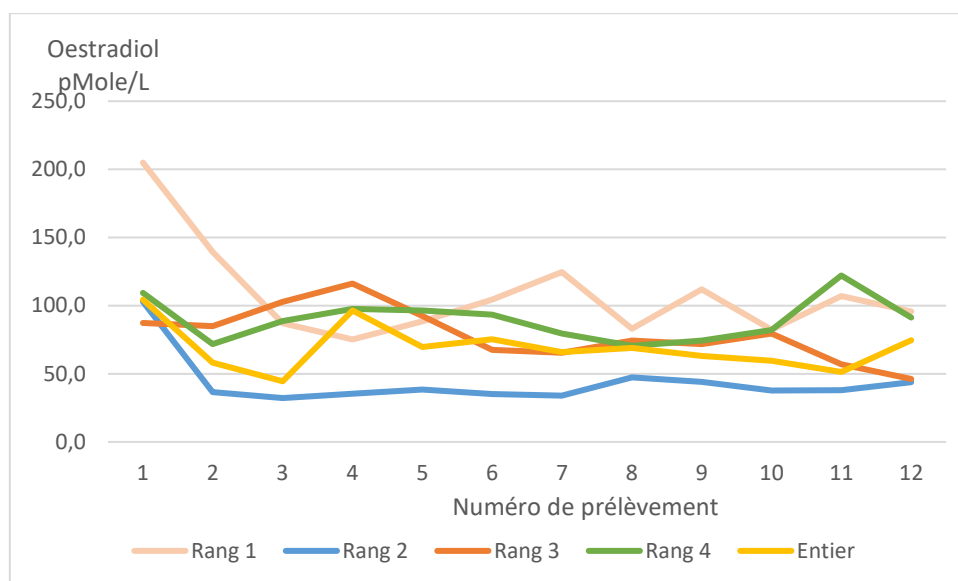


Figure 324: Evolution de l'oestradiolémie moyenne au cours de l'année selon le rang de vaccination

Profil de sécrétion de l'androsténédione

Les valeurs des chevaux de rang 5 sont en dessous du seuil de détection et seulement la valeur initiale à 0,4 nMole/L est au-dessus du seuil de détection pour les chevaux de rang 2 (figure 35).

Les valeurs initiales varient entre 0 et 2,3 nMole/L pour les chevaux de rang 1. Ces valeurs diminuent dès la première injection pour les chevaux immunisés à l'exception des chevaux de rang 3 ou cette diminution intervient à partir du prélèvement numéro 4. Chez l'ensemble des chevaux immunisés, les valeurs oscillent entre 0 et 1 nMole/L à partir du prélèvement numéro 2 à l'exception des chevaux de rang chez lesquels l'androsténédionémie augmente et diminue deux fois consécutivement sans dépasser 1,1 nMole/L avant de chuter pour la fin d'année.

Chez les entiers, l'androsténédionémie moyenne augmente avant de diminuer pour les prélèvements 8 et 9 avant de remonter pour le prélèvement 10 puis de se stabiliser à 0,5 nMole/L pour les deux derniers prélèvements. C'est la population pour laquelle l'androsténédionémie moyenne est la plus élevée

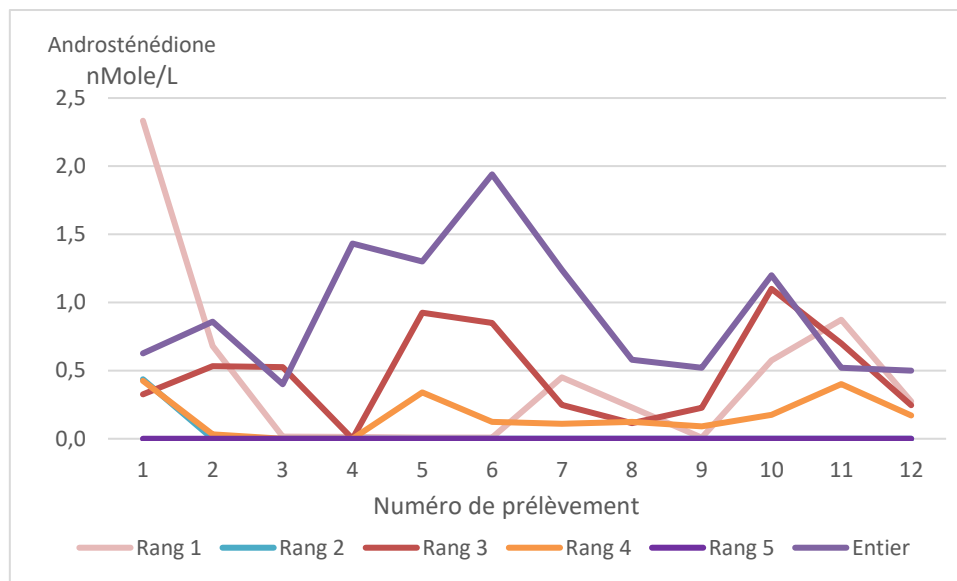


Figure 35 : Evolution de l'androsténédionémie moyenne au cours de l'année selon le rang de vaccination

Comparaison des profils hormonaux entre 2016 et 2017

Grâce à la réalisation de prélèvements et d'analyse entre les deux années successives nous sommes en mesure pour certains chevaux d'effectuer une comparaison des profils hormonaux avec une année de vaccination supplémentaire pour les chevaux déjà immunisés en 2016 mais également une comparaison pour les chevaux primo-immunisés en 2017 ou tout simplement entre deux années successives pour les entiers qui n'ont pas été immunisés.

L'androsténédione n'ayant pas été dosée systématiquement sur les chevaux lors de l'étude de 2016 nous n'effectuerons pas de comparaison des profils hormonaux pour cette dernière. Nous étudierons donc les comparaisons des profils hormonaux pour la liste des chevaux suivants (tableau XXXIII). Les chevaux N°23,24 et 25 sont exclus de la comparaison car n'ayant pas eu de prélèvement en 2016. Nous aurons donc 27 chevaux pour la comparaison avec 2 chevaux qui passent de rang 4 à 5, 6 chevaux qui passent de rang 3 à 4, 4 chevaux qui passent de rang 2 à 3, 7 chevaux qui passent de rang 1 à 2, 3 chevaux qui passent d'entier à rang 1 et 5 chevaux qui restent entier.

Tableau XXXIII: Liste des chevaux de la comparaison

Numéro du cheval	Nom du cheval	Race	Année de naissance	Evolution du statut entre 2016 et 2017
1	Cantinflas	PSL	2007	Passage de rang 4 à 5
2	Burundi	PSL	2006	Passage de rang 4 à 5
3	Candelario	PRE	2006	Passage de rang 3 à 4
4	Civaque	PSL	2007	Passage de rang 3 à 4
5	Craque	PSL	2007	Passage de rang 3 à 4
6	Eclipse	PSL	2009	Passage de rang 3 à 4
7	Catraio	PSL	2007	Passage de rang 3 à 4
8	Ze-quidim	PSL	2004	Passage de rang 3 à 4
9	Distinto	PSL	2008	Passage de rang 2 à 3
10	Capote	PSL	2007	Passage de rang 2 à 3
11	Brasil	PSL	2006	Passage de rang 2 à 3
12	Kongo I	PRE	2007	Passage de rang 2 à 3
13	Ambar	PSL	2005	Passage de rang 1 à 2
14	Cravo II	PSL	2007	Passage de rang 1 à 2
15	Castor	PSL	2007	Passage de rang 1 à 2
16	Rifado	PSL	1998	Passage de rang 1 à 2
17	Alecrim	PSL	2005	Passage de rang 1 à 2
18	Alamar	PSL	2005	Passage de rang 1 à 2
19	Baco	PSL	2006	Passage de rang 1 à 2
20	Casablanca	PSL	2007	Passage d'entier à rang 1
21	Oriental	PRE	2010	Passage d'entier à rang 1
22	Cesar	PRE	2005	Passage d'entier à rang 1
27	Apito Dourando	PSL	2005	Resté entier
28	Eneias	PSL	2011	Resté Entier
29	Olaf	PRE	2002	Resté Entier
30	Quico	PSL	1997	Resté Entier
31	Zangando	PSL	2004	Resté Entier

Comparaison des profils hormonaux des 5 chevaux entier entre 2016 et 2017.

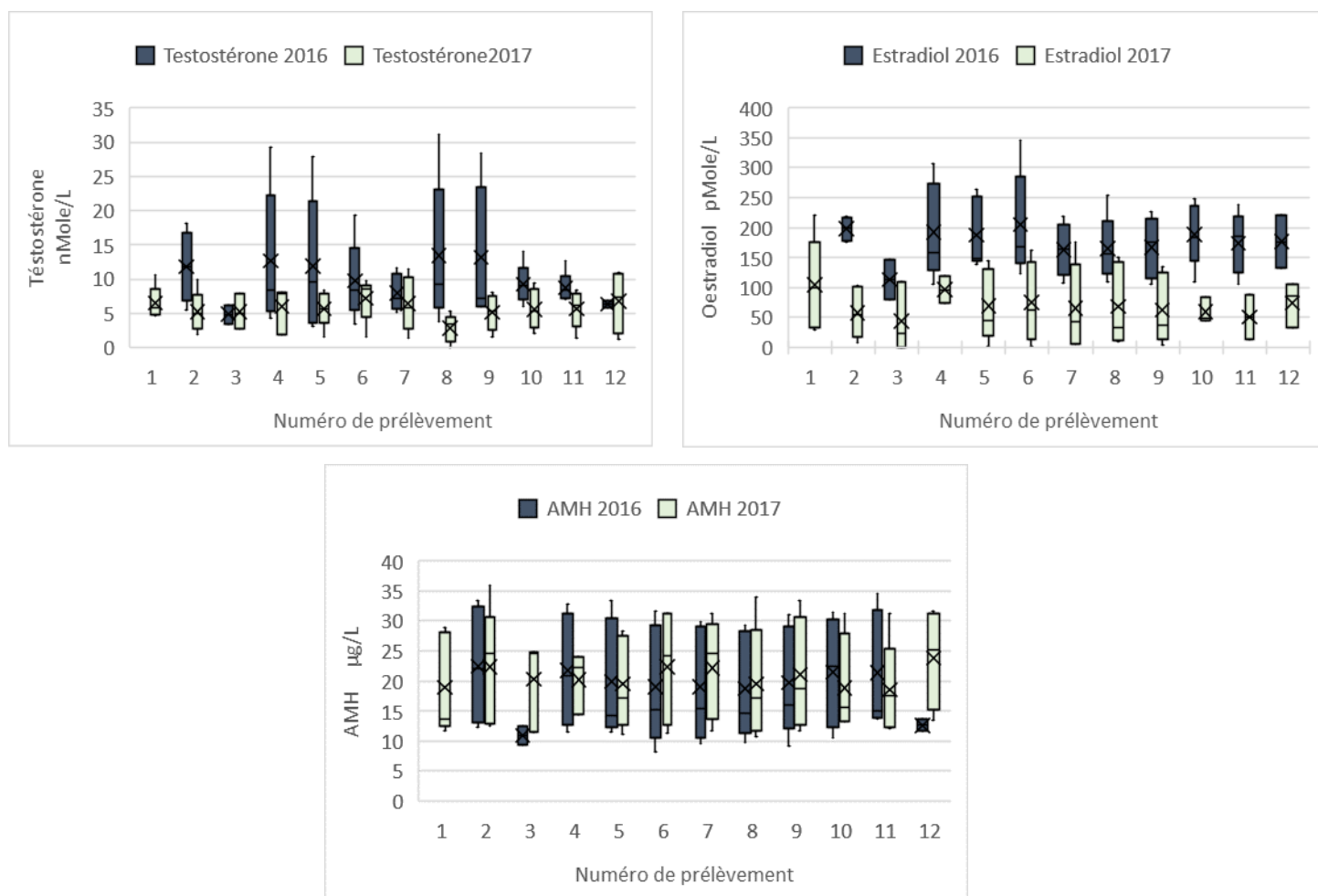


Figure 36: Comparaison des concentrations plasmatiques en AMH, des testostéronémies, des oestradiolémies entre les années 2016 et 2017 pour les entiers non immunisés au cours des différents mois de l'année

Les concentrations plasmatiques en AMH sont très variables entre les différents individus à chaque prélèvement pour les deux années mais les concentrations mesurées sont stables au cours du temps et les moyennes oscillent entre 18 et 25 µg/L à l'exception des prélèvements numéro 3 et 12 en 2016 où les concentrations mesurées sont proche de 10µg/L. Il n'y a pas de différence significative entre les deux années. (figure 36)

En revanche on note une différence importante pour la comparaison de la testostéronémie qui est plus élevée en 2016 en moyenne à chaque prélèvement avec une plus grande variabilité interindividuel en 2016. La testostéronémie moyenne oscille autour de 5 nMole/L pour 2017 et est plus élevée en 2016.

De même les oestradiolémies mesurées en 2016 sont nettement supérieures à celle observées en 2017 pour l'ensembles des prélèvements réalisés à des dates équivalentes. Les moyennes de 2016 sont au dessus de 150 pMole/L à l'exception du prélèvement numéro 2 tandis que celles de 2017 sont aux

alentours ou inférieures à 100 pMole/L. Ces différences observées pour les stéroïdes sont significatives.

L'oestradiolémie de l'année 2016 est stable au cours du temps au alentours de 100 pMole/L tandis que les valeurs mesurées pour les prélèvements 2,3 et 4 sont très élevées pour l'année 2017 alors que pour les autres prélèvements la moyenne est au alentour de 100 pMole/L également.

Comparaison des profils hormonaux des 3 chevaux de rang 1 entre 2016 (entier) et 2017 (rang 1)

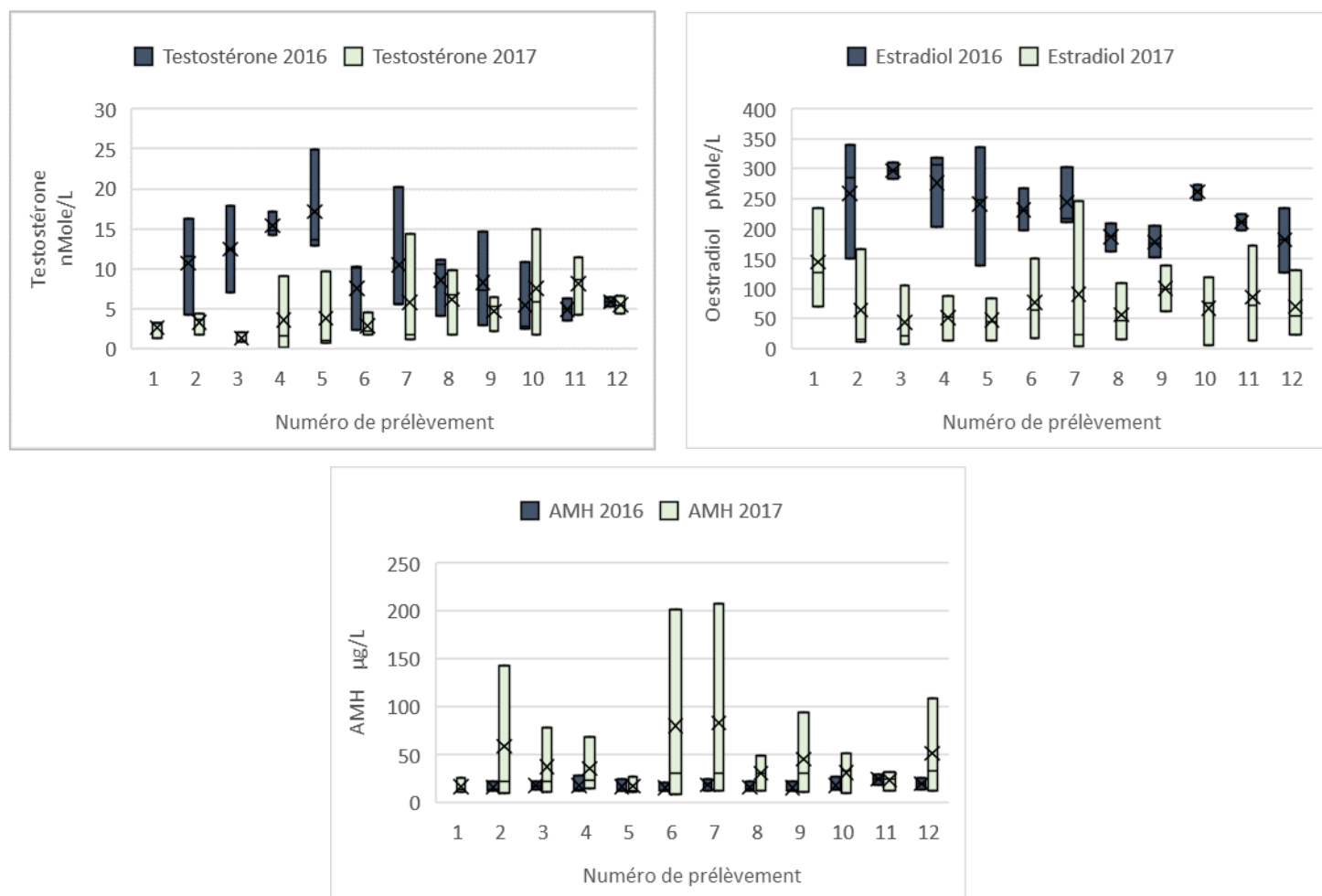


Figure 37: Comparaison des concentrations plasmatiques en AMH, des testostéronémies, des oestradiolémies entre les années 2016 et 2017 pour les entiers immunisés de rang 1 au cours des différents mois de l'année.

Ces trois chevaux sont primo immunisés en 2017 et le profil est comparé avec celui de 2016 lorsqu'ils étaient entier.

Les concentrations plasmatiques en AMH sont significativement plus élevées en 2017 par rapport à 2016 avec une variabilité individuelle importante. L'augmentation est importante dès la première injection immunisante mais diminue rapidement dès le prélèvement numéro 3. Une forte augmentation est observée pour le prélèvement numéro 6 après un rappel réalisé pour le cheval casablanca avant une diminution jusqu'à la fin de l'année pour obtenir une valeur moyenne à 50 µg/L (figure 42). Les valeurs de 2016 sont toutes en dessous de 30 µg/L.

La testostéronémie mesurée initialement est basse en 2017 et reste en dessous de 5 nMole/L jusqu'au prélèvement numéro 7 à partir duquel une augmentation et un rapprochement avec les

valeurs obtenues lorsque les chevaux étaient entiers en 2016 sont observées. La testostéronémie de 2016 est nettement supérieure pour la première partie de l'année avant l'augmentation des valeurs de 2017 et une diminution de la testostéronémie en fin d'année.

L'oestradiolémie de 2017 est inférieure à celle de 2016 avec une valeur moyenne initiale à 150 pMole/L qui diminue dès la première injection immunisante avant de se stabiliser entre 50 et 100 pMole/L dès le prélèvement numéro 3. L'oestradiolémie moyenne de 2016 est toujours supérieures à 150 pMole/L.

Les différences observées pour les concentrations moyennes en stéroïdes sont significatives d'un point de vue statistique. Les effets de la primo-immunisation sont visibles entre les deux années.

Comparaison des profils hormonaux des 7 chevaux de rang 2 entre 2016 (rang 1) et 2017 (rang 2)

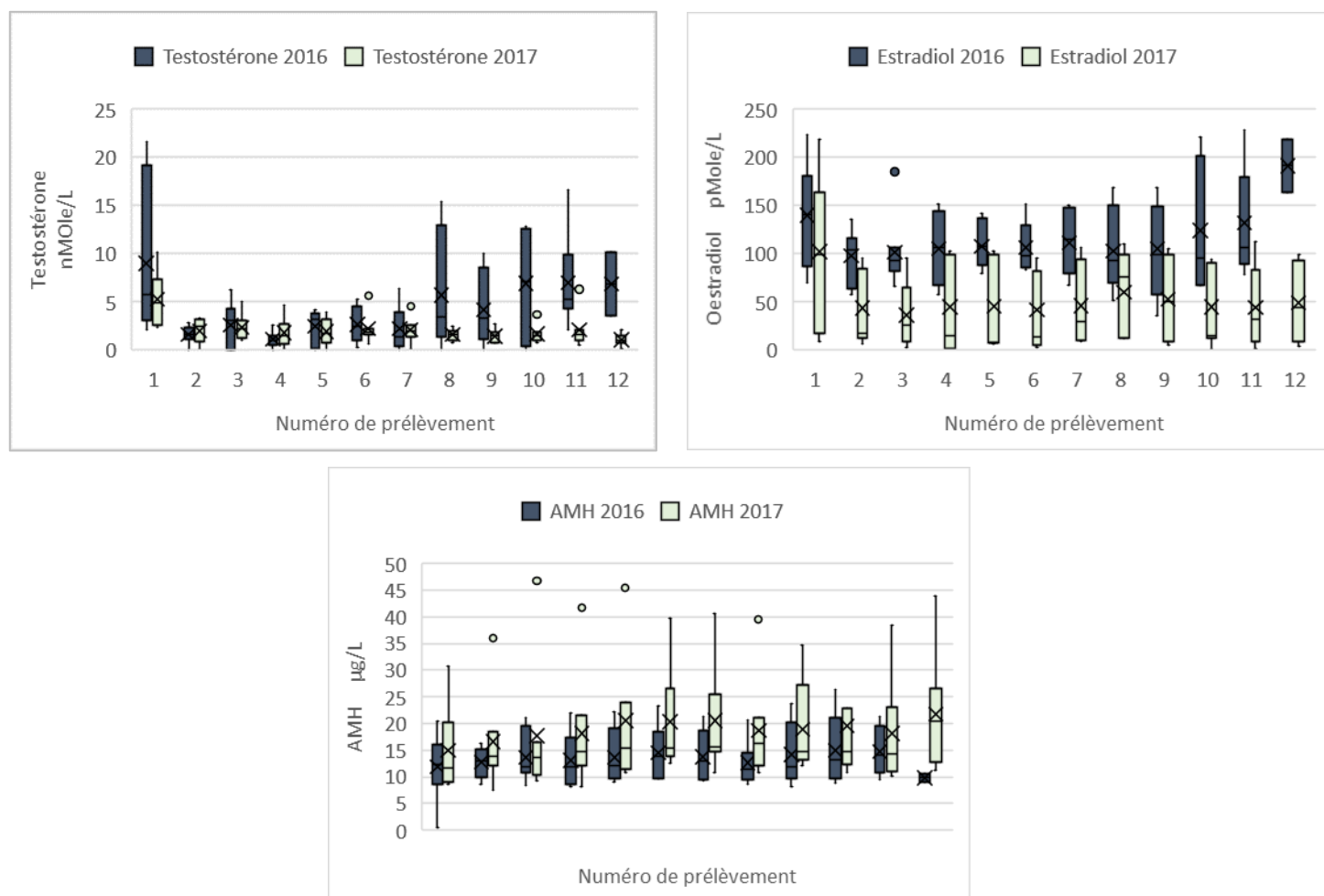


Figure 38: Comparaison des concentrations plasmatiques en AMH, des testostéronémies, des oestradiolémies entre les années 2016 et 2017 pour les entiers immunisés de rang 2 en 2017 au cours de différents mois de l'année

Les concentrations plasmatiques en AMH sont plus élevées en 2017 par rapport à 2016 avec une valeur moyenne aux alentours des 20 µg/L tandis que les valeurs moyennes observées en 2016 sont aux alentours de 15µg/L. Cependant il y a une plus grande disparité en 2017 avec un cheval qui présente une concentration plasmatique en AMH plus élevée oscillant entre 35 et 45 µg/L (figure 38)

Les différences observées pour l'AMH ne sont pas significatives entre les deux années.

Pour les stéroïdes, les concentrations plasmatiques sont significativement plus basses en 2017 par rapport à 2016 avec une nette diminution dès la première injection de rappel immunisant pour les deux années.

La testostéronémie moyenne est à 5 nMole/L initialement et descend ensuite en dessous de 3nMole/L en 2017 tandis qu'elle débute aux alentours de 10 nMole/L (primo-immunisation en 2016) en 2016 avant de descendre en dessous de 5 nMole/L puis de remonter à partir du prélèvement numéro 8

pour l'année 2016. Cette augmentation n'est pas notable en 2017. Pour la comparaison sur l'ensemble de l'année, les différences observées ne sont pas significatives entre les deux années.

L'oestradiolémie moyenne est initialement à 150 pMole/L en 2016 et 100 pMole/L en 2017 avant de descendre dès la première injection de rappel immunisant. En 2017 les valeurs sont autour de 50 pMole/L pour le reste de l'année alors qu'elles sont aux alentours de 100 pMole/L en 2016 avant de remonter à partir du prélèvement numéro 9. Les différences observées sont significatives. On a donc une différence entre les deux années concernant la concentration moyenne en œstradiol pour les chevaux passant du rang 1 à 2.

Comparaison des profils hormonaux des 4 chevaux de rang 3 entre 2016 (rang 2) et 2017 (rang 3)

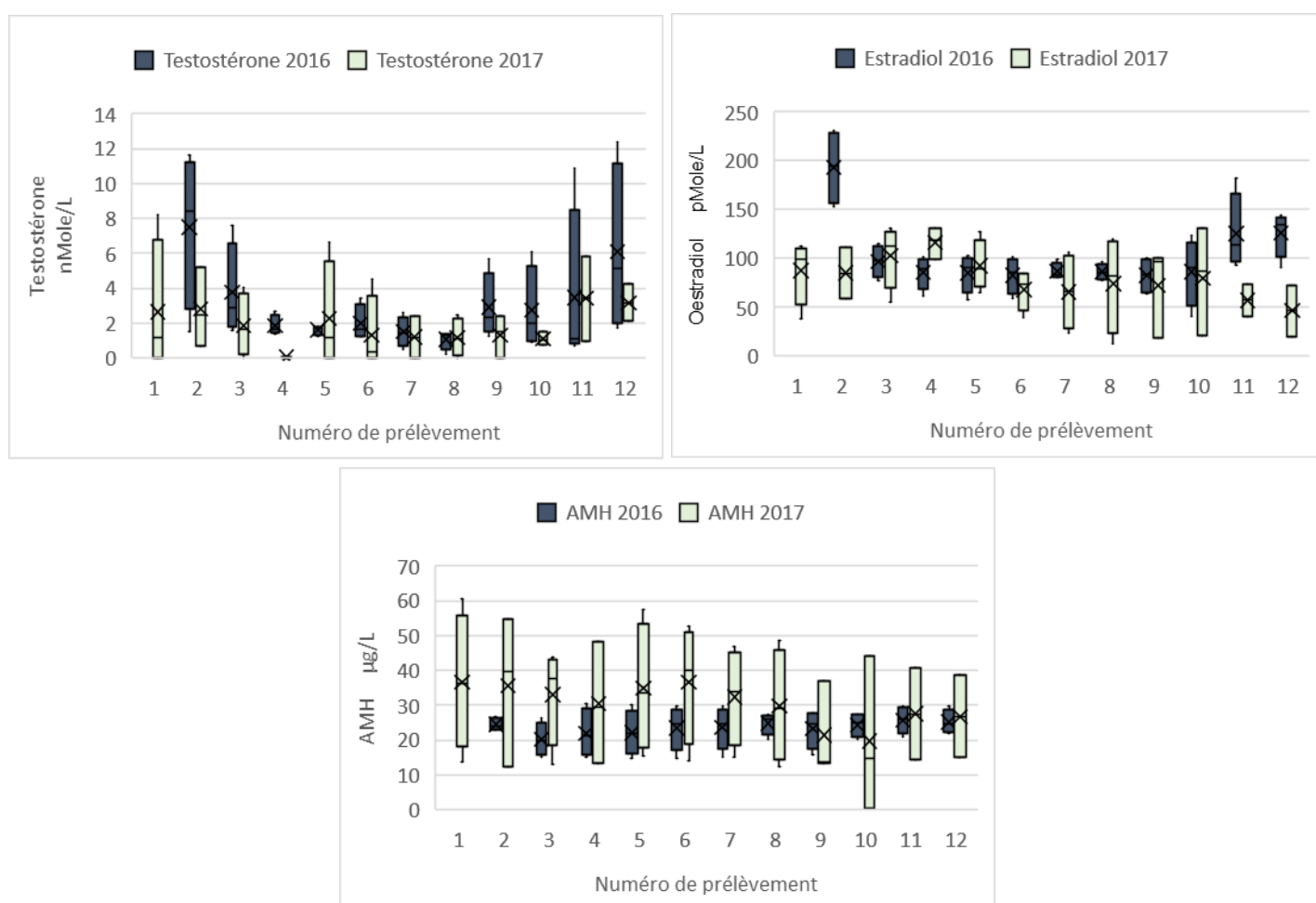


Figure 39: Comparaison des concentrations plasmatiques en AMH, des testostéronémies, des oestradiolémies entre les années 2016 et 2017 pour les entiers immunisés de rang 3 en 2017 au cours des différents mois de l'année.

Les concentrations plasmatiques en AMH sont très dispersées en 2017 sur l'ensemble de l'année avec des valeurs moyennes aux alentours de 35 µg/L pour le début de l'année avant une baisse

à partir du prélèvement numéro 7 et des valeurs moyennes oscillant entre 20 et 30 µg/L. les concentrations mesurées en 2016 sont stables au cours du temps aux alentours de 25µg/L avec moins de variations inter individuelles (figure 39).

La testostéronémie moyenne initiale est en dessous de 3nMole/L en 2017 et reste en dessous de 3 nMole/L jusqu'au prélèvement numéro 11, prélèvement à partir duquel on observe une remontée de la testostéronémie. Les valeurs obtenues en 2016 sont initialement plus élevées et descendent en dessous de 2nMole/L dès le prélèvement numéro 4 avant de remonter à partir du prélèvement numéro 9 jusqu'à la fin de l'année.

L'oestradiolémie moyenne reste aux alentours de 100 pMole/L pour l'année 2017 et diminue à partir du prélèvement numéro 11 vers 50 pMole/L. Celle observée en 2016 est initialement plus élevée avant une baisse à la suite des injections des rappels immunisants et une remontée à partir du prélèvement numéro 11 pour rester au dessus de 100 pMole/L.

De même que pour les rang 4, les variations observées ne sont pas significatives entre les deux années successives et le passage de rang 2 à 3.

Comparaison des profils hormonaux des 6 chevaux de rang 4 entre 2016 (rang 3) et 2017 (rang 4)

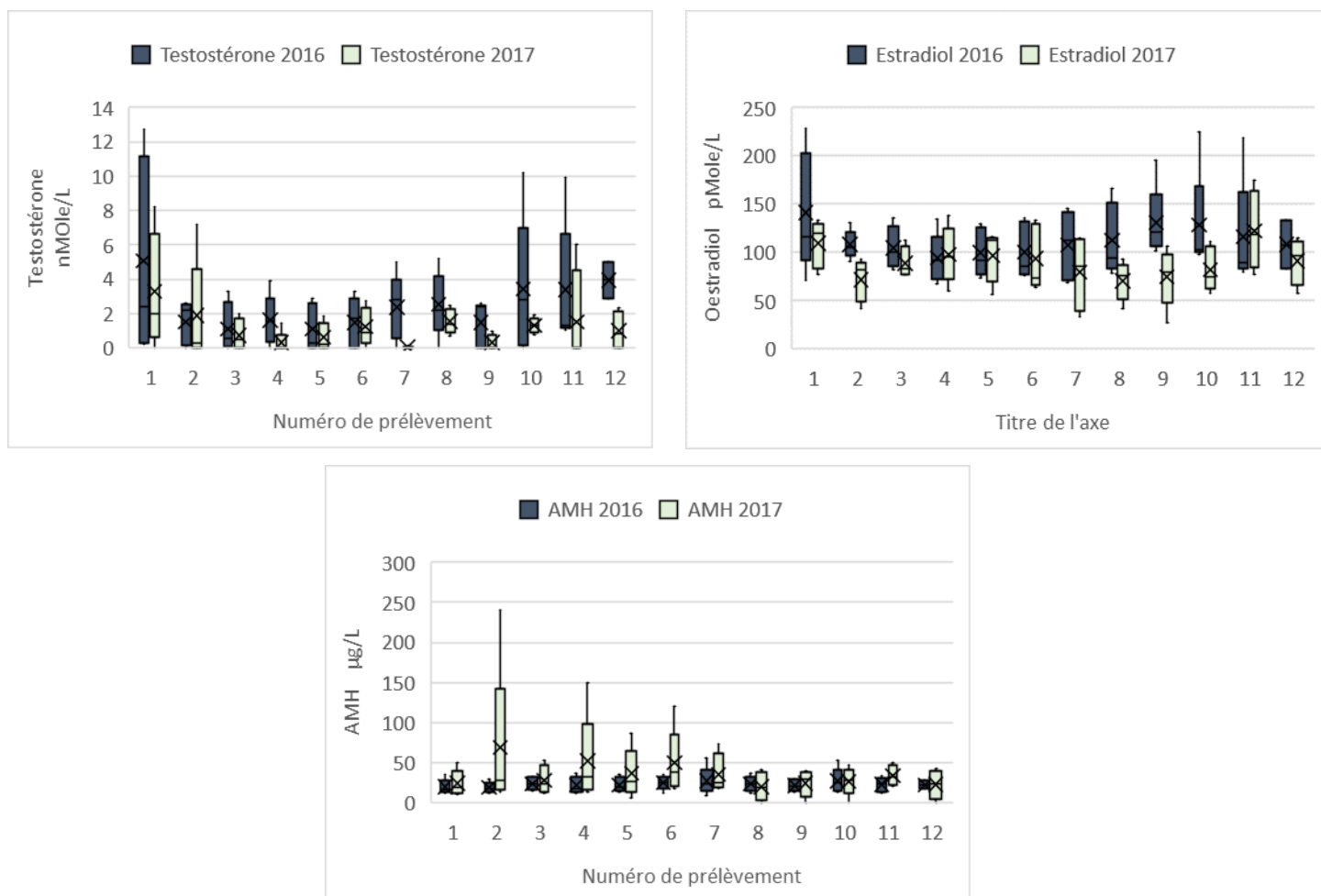


Figure 40 : Comparaison des concentrations plasmatiques en AMH, des testostéronémies, des oestradiolémies entre les années 2016 et 2017 pour les entiers immunisés de rang 4 en 2017 au cours des différents mois de l'année

Les concentrations plasmatiques en AMH sont plus élevées en 2017 par rapport à 2016 notamment après la première injection de rappel immunitaire (prélèvement n°2), ces concentrations diminuent au cours du temps jusqu'au prélèvement numéro 8. Par la suite les valeurs sont similaires à celles de 2016 avec une moyenne aux alentours de 25 µg/L (figure 40). Les concentrations mesurées sont stables pour l'année 2016 et ne sont pas significativement différentes des valeurs obtenues en 2017.

Les testostéronémies mesurées en 2017 sont plus basses que celles observées en 2016. On note une baisse pour les deux années consécutives à la suite des injections de rappels immunisants réalisées lors des prélèvements 1 et 2 avec une moyenne initiale inférieure à 4 nMole/L en 2017 et une moyenne à 5 nMole/L en 2016. Par la suite, la testostéronémie moyenne remonte à partir du prélèvement numéro 6 en 2016 tout en restant inférieure à 4 nMole/L tandis que la testostéronémie moyenne reste inférieure à 2 nMole/L en 2017.

Les oestradiolémies de 2017 sont plus basses en moyenne à l'exception du prélèvement numéro 11 par rapport à l'année 2016. Les valeurs initiales sont aux alentours de 100 pMole/L en 2017 et de 150 pMole/L en 2016 et les oestradiolémies baissent dès la première injection de rappel immunisant et on observe une remontée des valeurs à partir du prélèvement numéro 8 pour l'année 2016 et du prélèvement numéro 11 en 2017. Mais à l'exception du prélèvement initial et de ce prélèvement numéro 11, l'oestradiolémie moyenne reste inférieure à 100 pMole/L en 2017.

L'ensemble des différences observées ne sont pas significatives statistiquement. On peut considérer le fait qu'il n'y a pas de différence pour les hormones étudiées pour le passage de rang 3 à 4.

Comparaison des profils hormonaux des 2 chevaux de rang 5 entre 2016 (rang 4) et 2017 (rang 5)

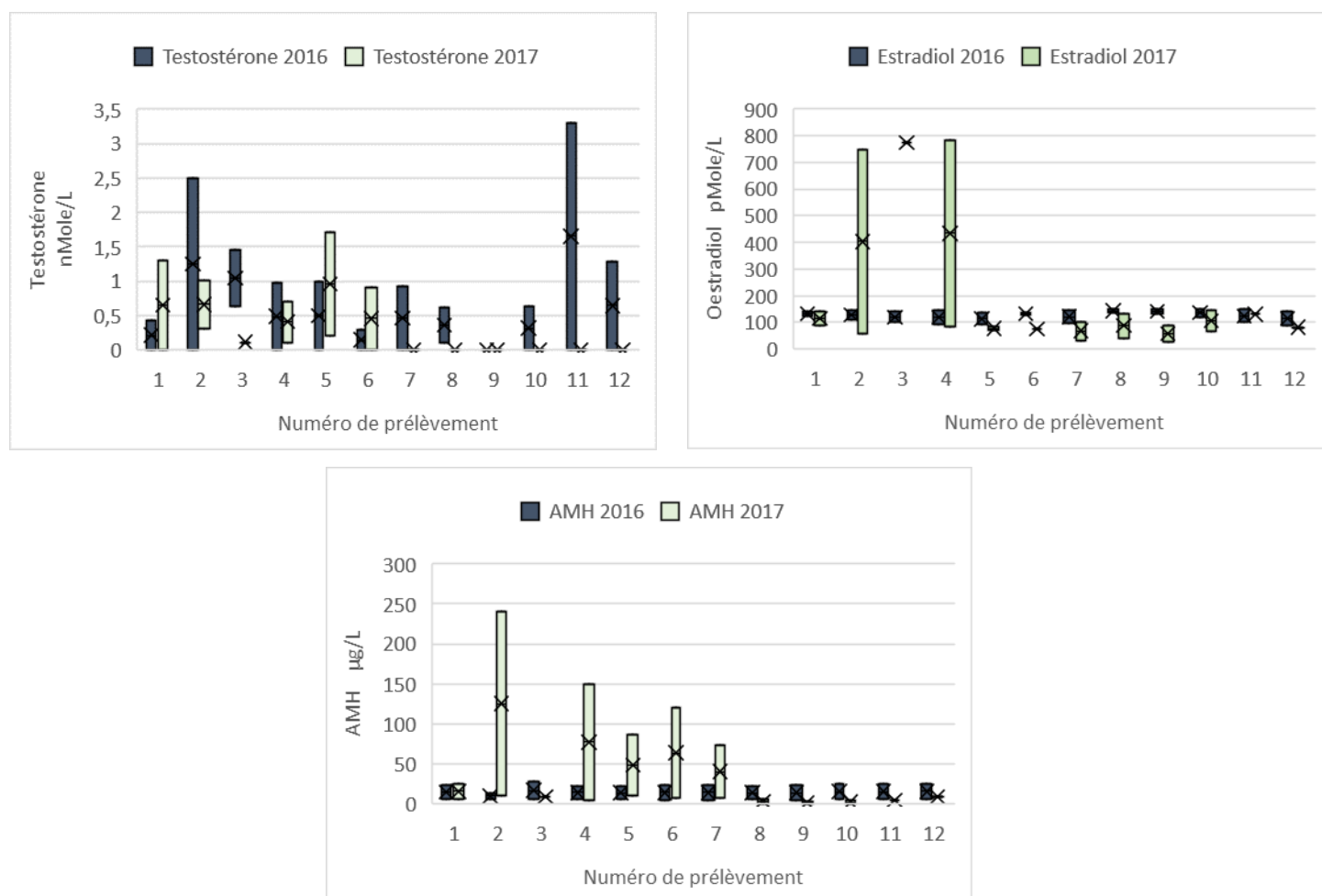


Figure 41 : Comparaison des concentrations plasmatiques en AMH, des testostéronémies, des oestradiolémies entre les années 2016 et 2017 pour les entiers immunisés de rang 5 en 2017 au cours des différents mois de l'année

Les concentrations en AMH sont nettement supérieures en 2017 pour les prélèvements 2, 4, 5, 6 et 7 avant de s'effondrer pour le reste de l'année tandis que les concentrations de 2016 sont stables aux alentours de 20 µg/L (figure 37). Du fait de la présence d'uniquement deux chevaux avec de nombreux prélèvements de 2017 où un seul individu a été prélevé, l'analyse statistique n'est pas interprétable pour les chevaux de ce rang.

La testostéronémie de ces deux chevaux reste inférieure à 3.5 nMole/L sur les deux années successives avec des valeurs encore plus basses pour l'année 2017.

TROISIEME PARTIE : DISCUSSION

Bilan des résultats

L'ensemble des résultats sera interprété dans un premier temps en évaluant les différences observées pour chaque hormone en fonction des rangs de vaccination par rapport à la population d'entier qui constitue notre témoin avant de revenir ensuite sur les différences observées entre les deux années successives de 2016 et 2017 lorsque les chevaux ont acquis un rang de vaccination supplémentaire.

Résultats de l'AMH

Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence une variabilité interindividuelle très importante parmi les chevaux d'un même rang de vaccination (figure 42).

La comparaison entre les différents rangs de vaccination ne permet pas de mettre en évidence de différence significative entre les chevaux immunisés à l'exception des chevaux de rang 5. Cependant les chevaux de cet effectif n'étant que deux et pour certains prélèvements un seul d'entre eux a pu être prélevé, cette différence est difficilement interprétable.

Il n'y a pas de tendance qui se dégage entre les différents rangs de vaccination compte tenu de la forte variabilité interindividuelle car les concentrations moyennes mesurées en AMH chez les chevaux de rang 1 sont proches de celles observées chez les chevaux de rang 4 alors qu'elles sont différentes pour les chevaux de rang 2 et 3.

Il a été observé lors de l'étude précédente de 2016 une augmentation de la sécrétion d'AMH chez les chevaux immunisés par rapport à celle des chevaux entiers. Cependant les concentrations moyennes d'AMH obtenus en 2017 chez les chevaux de rang 2 sont similaires statistiquement à celles des chevaux entiers.

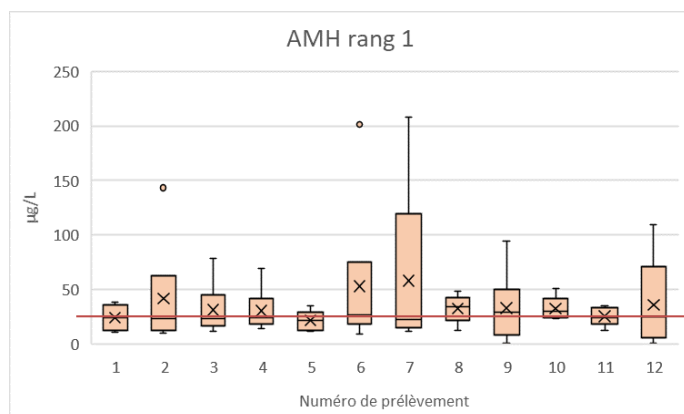
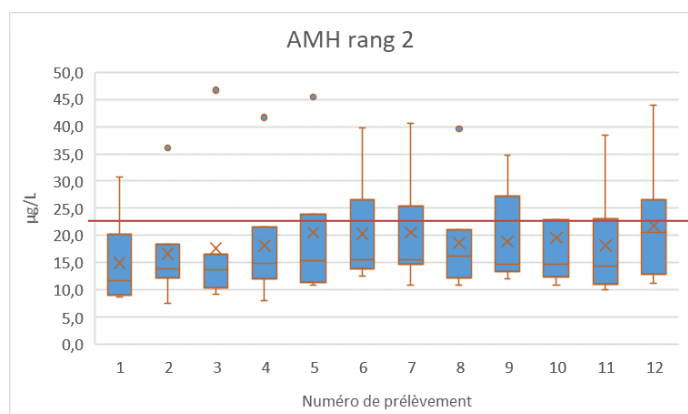
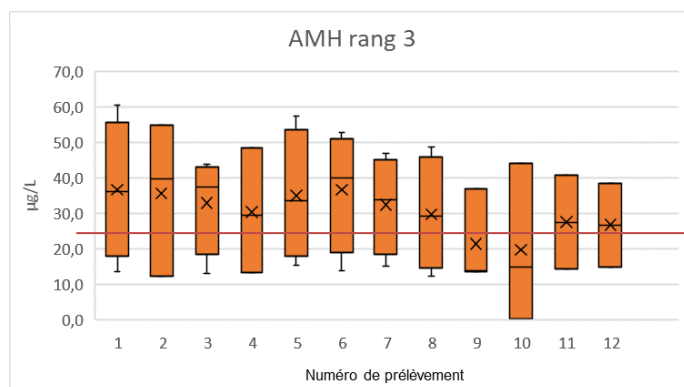
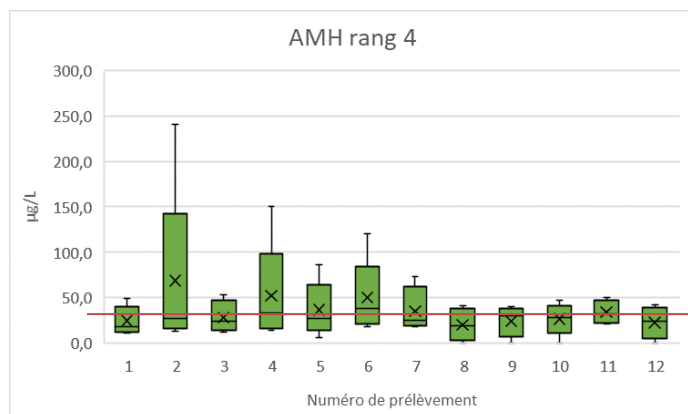
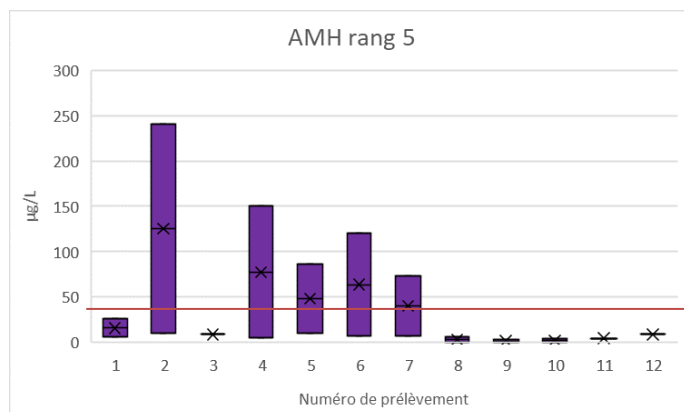
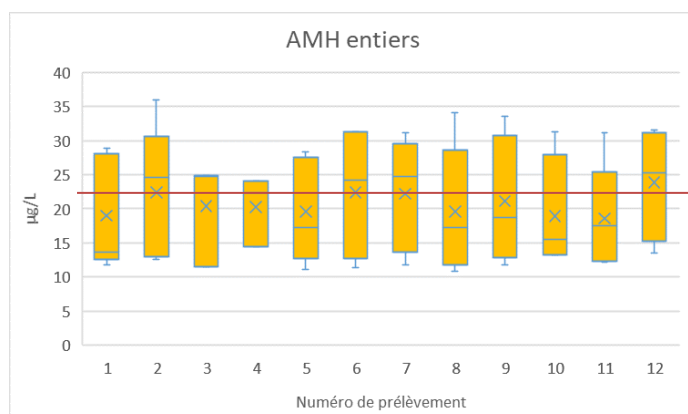


Figure 42 : Evolution des concentrations plasmatiques mensuelles en AMH chez les entiers non immunisés et les entiers immunisés par rang

En rouge, la valeur moyenne observée chez les entiers au cours de l'année 2017 à 22.5 µg/L

Résultats des stéroïdes

Résultats de la testostérone

Pour l'ensemble des chevaux immunisés, un effet est observé sur la testostéronémie mesurée après les injections de rappels ou de primo-immunisation à l'exception des chevaux de rang 5 chez lesquels la testostéronémie est très basse initialement (figure 43). Une réaugmentation de la testostéronémie moyenne en fin d'étude est observée pour plusieurs rang (1 et 3) avec une disparité interindividuelle.

Il n'y a pas de différence significative pour la testostéronémie moyenne mesurée pour les chevaux de rang 1 à 4 avec une différence pour les chevaux de rang 5 chez lesquels la testostéronémie mesurée est très basse. Cependant les concentrations en testostérone mesurée par rapport aux chevaux entiers ne sont pas significatives car les valeurs mesurées en 2017 chez ces entiers sont plus basses que celles mesurées en 2016 pour les mêmes chevaux.

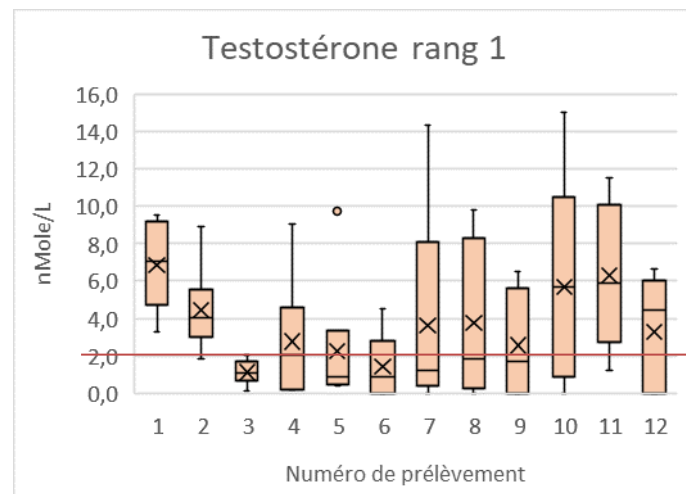
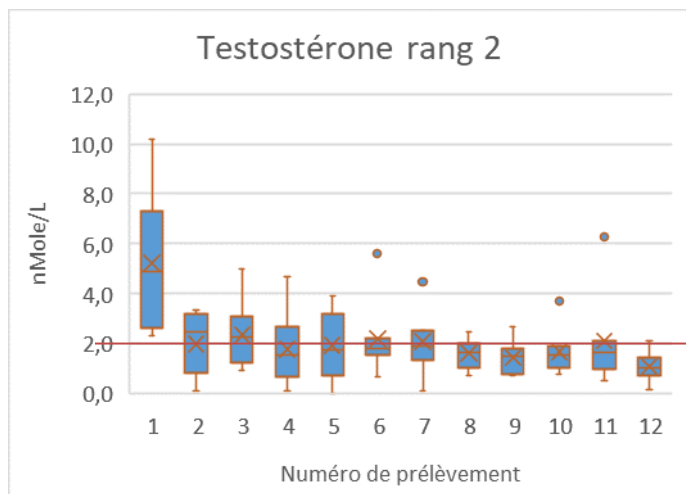
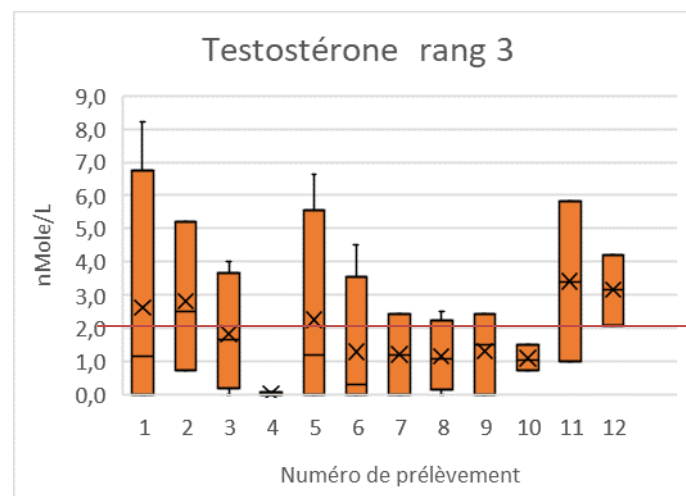
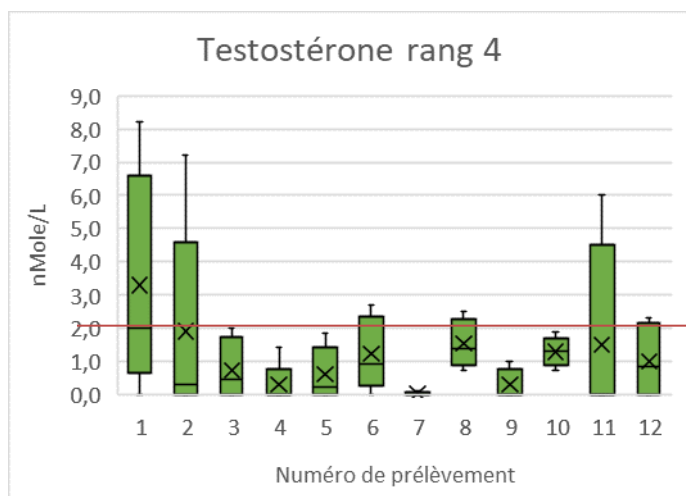
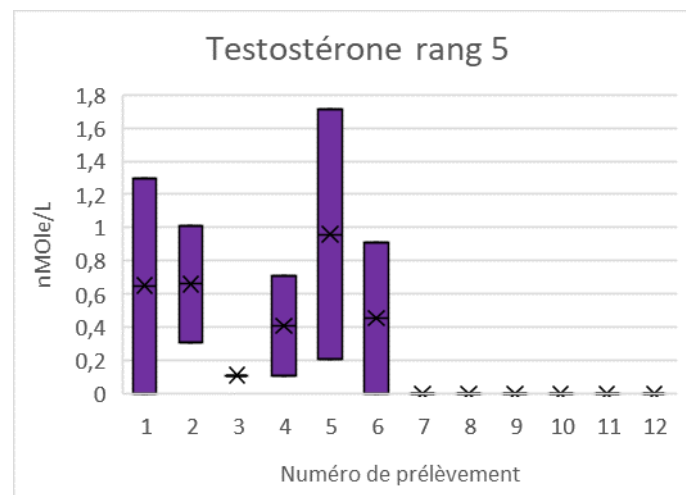
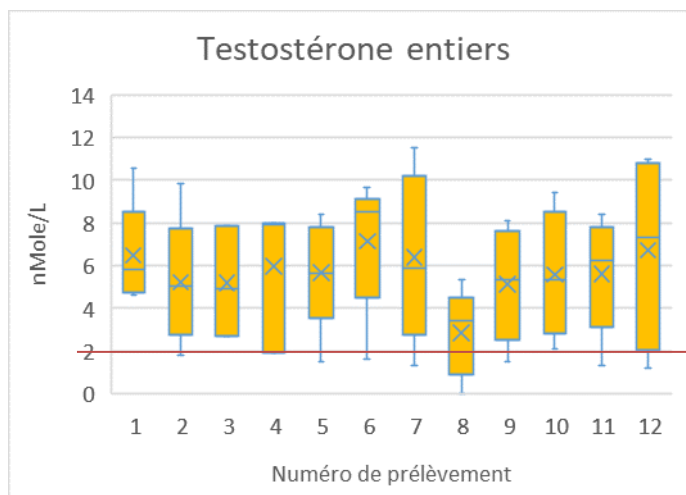


Figure 43: Evolution des concentrations plasmatiques mensuelles en testostérone chez les entiers non immunisés et les entiers immunisés par rang

En rouge ici une valeur minimum observée chez les entiers à 2 nMole/L

Résultats de l'oestradiol

L'oestradiolémie mesurée chez les chevaux de rang 5 semble erronée au vu des valeurs car les moyennes sont très élevées par rapport à celles des autres chevaux.

Il y a une grande variabilité interindividuelle entre les différents chevaux de chaque lot (figure 44) avec une tendance à la baisse après les injections de rappels ou de primo-immunisation pour les chevaux de rang 1, 2 et 4. Mais il y a une augmentation de l'oestradiolémie moyenne liée à un individu pour les chevaux de rang 3 suite aux injections de rappels vaccinaux.

L'oestradiolémie moyenne des chevaux entiers n'est pas significativement différente de celles des chevaux immunisés avec des moyennes inférieures à celles des chevaux de rang 1 par exemple. Ceci peut également être expliqué par la différence entre les mesures de l'année 2016 et de celle de 2017 car lors de l'étude précédente une différence était notable par rapport aux chevaux immunisés.

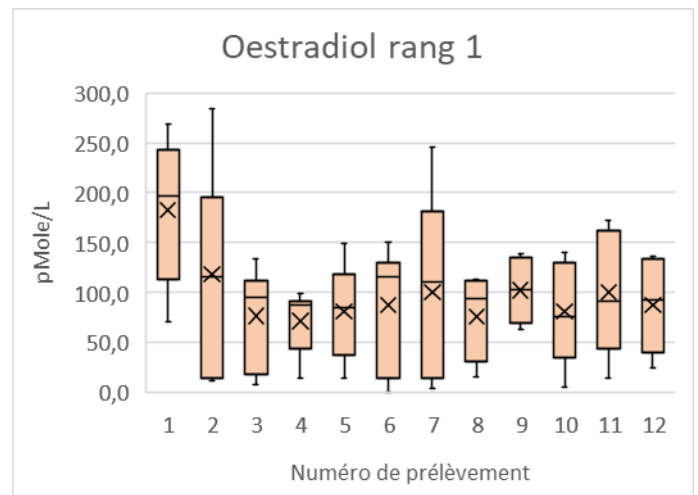
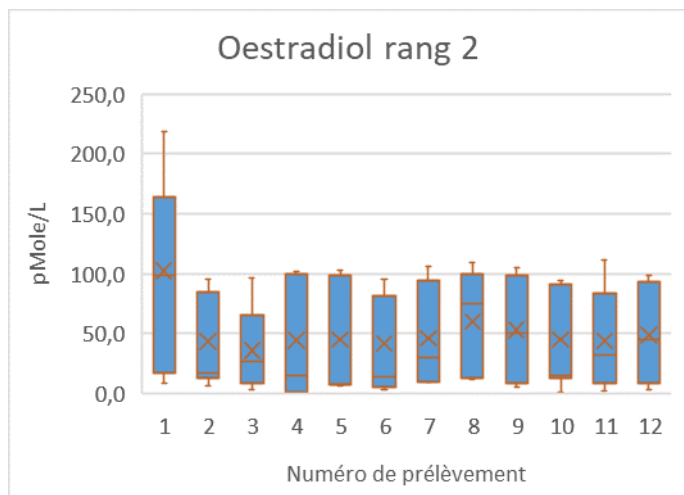
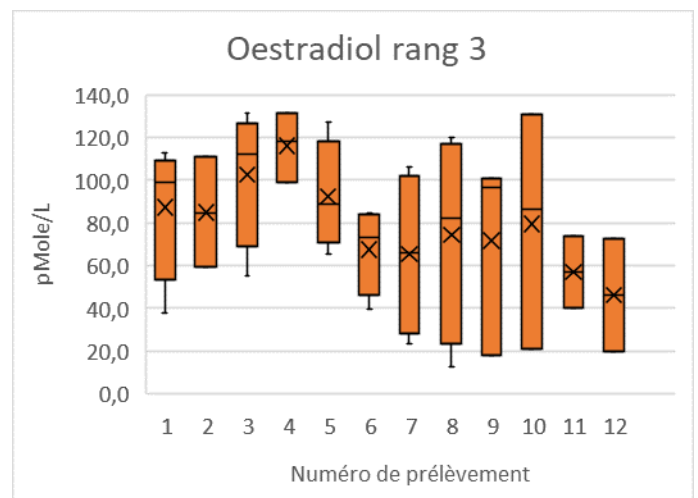
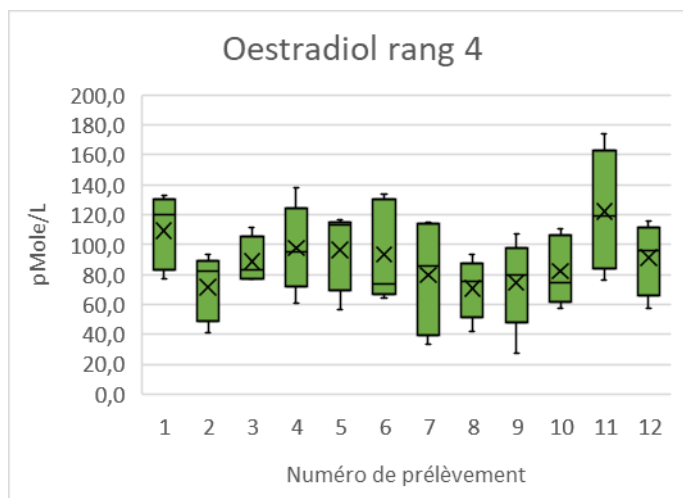
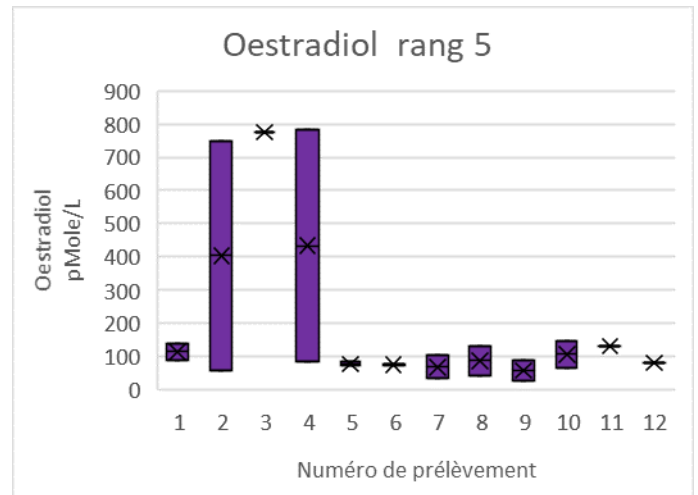
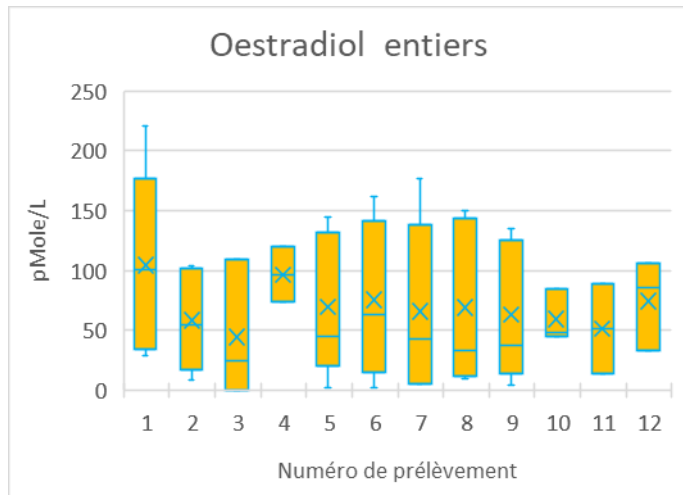


Figure 44: Evolution des concentrations plasmatiques mensuelles en œstradiol chez les entiers non immunisés et les entiers immunisés par rang

Résultats de l'androsténédione

L'interprétation des résultats concernant l'androsténédionémie moyenne obtenue est difficile car pour certains rangs de vaccination, seul un cheval présente des valeurs au-dessus du seuil de détection. Les chevaux de rang 5 ne sont pas représentés sur la figure suivante car aucune des valeurs mesurées n'est au-dessus du seuil de détection du dosage.

Cependant les valeurs obtenues chez les chevaux immunisés sont significativement plus basses que les valeurs mesurées pour les entiers non immunisés. L'immunisation semble entraînée une diminution de l'androsténédionémie. Pour la comparaison entre les différents rangs la variabilité entre les individus au sein d'un même rang ne permet pas de dégager de tendance entre les différentes années de vaccination.

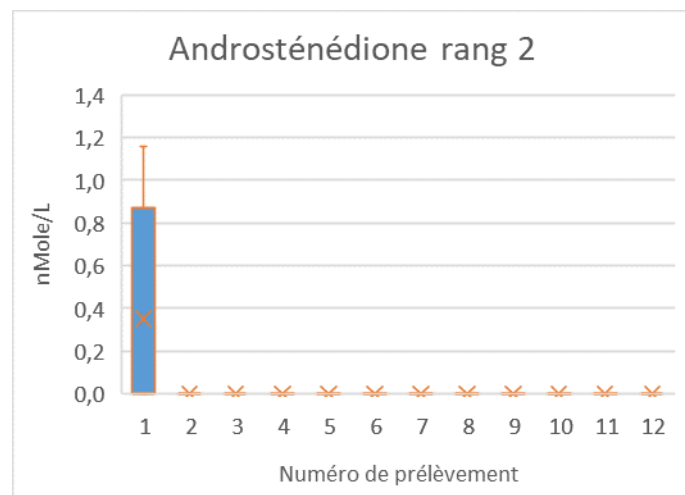
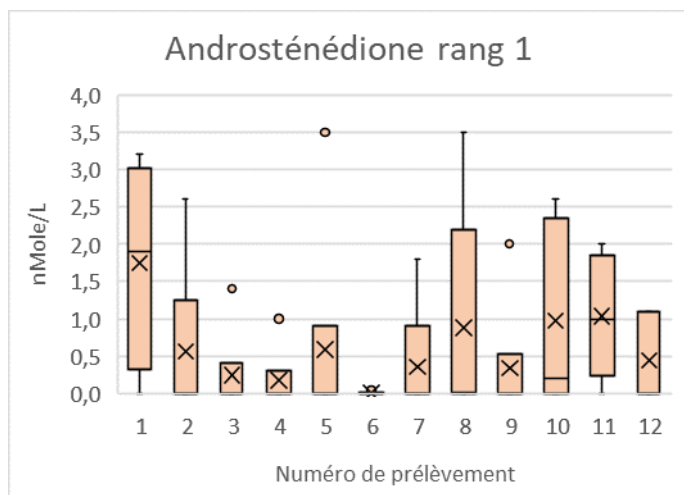
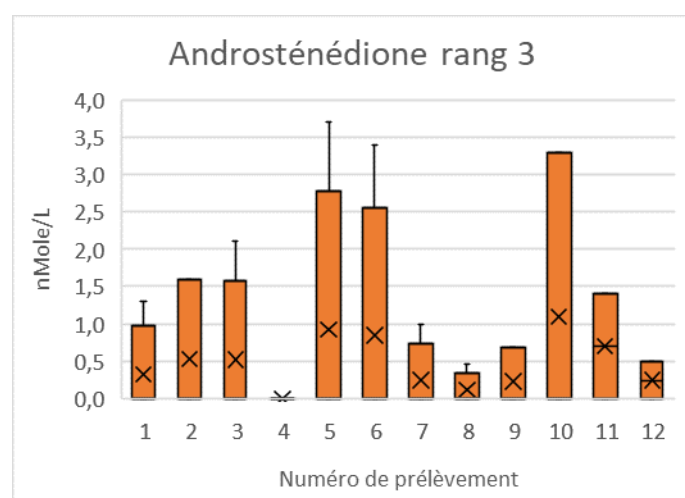
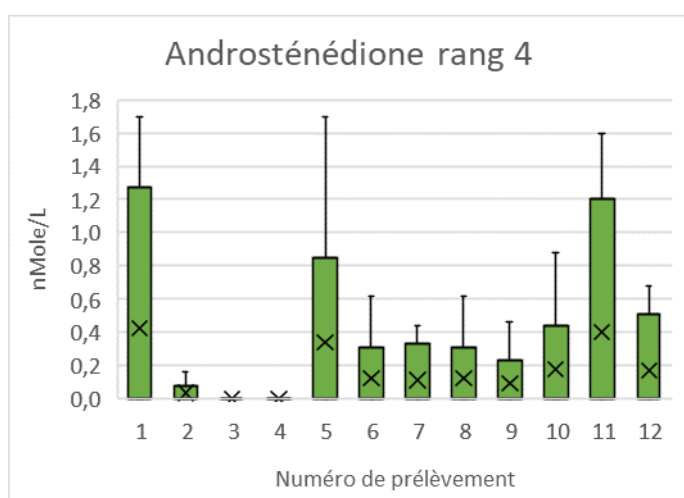
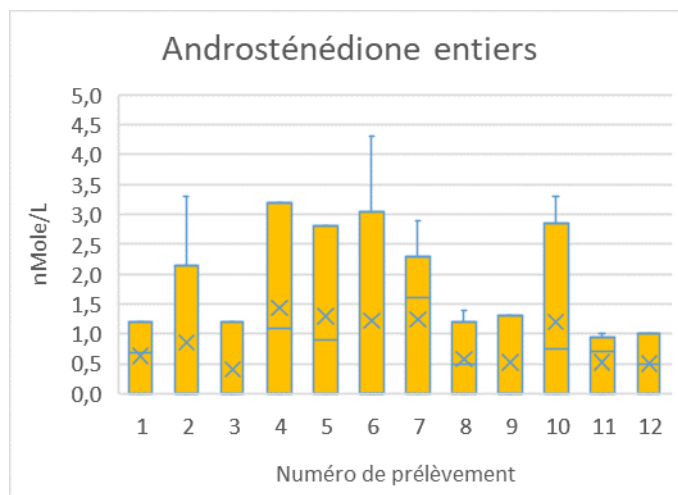


Figure 45: Evolution des concentrations plasmatiques mensuelles en androsténédione chez les entiers non immunisés et les entiers immunisés par rang

Validité des résultats

Population d'étude

Les 31 chevaux de la population d'étude vivent dans les mêmes conditions au sein de l'écurie de spectacle et sont repartis en deux catégories : 5 entiers non immunisés et 26 entiers immunisés selon différents rangs de vaccination. Le choix a été fait de ne pas retenir d'hongre dans notre population d'étude car les résultats obtenus lors de l'année précédente étaient en accord avec la bibliographie et les hypothèses formulées à savoir : arrêt de la sécrétion d'AMH après la castration et des niveaux de production de stéroïdes très bas. Ce choix de ne pas retenir de témoin négatif est justifié.

Parmi notre population d'étude les chevaux immunisés ou entiers appartiennent à deux races : PSL (22 entiers immunisés et 4 entiers) et PRE (4 entiers immunisés et 1 entier), la race PSL est largement représenté (85% de la population d'entiers immunisés et 80% de la population d'entiers). L'âge moyen est de 10,2 ans chez les chevaux immunisés et de 13,6 ans pour les entiers non immunisés tandis que le rang de vaccination moyen est de 2,64.

A l'exception de 3 chevaux de rang 1 (Hino, Habibe et Fundador) l'ensemble des chevaux de notre population d'étude ont été suivis lors de l'année précédente cette étude ce qui nous permet de prendre chaque cheval comme son propre témoin lors des comparaisons avec l'année précédente le rang de vaccination ayant été augmenté d'une année pour les immunisés et étant resté identique pour les entiers. Cependant on regrettera que le nombre de chevaux présent dans chacun des lots soit très hétérogène (Tableau XXXIV).

Tableau XXXIV: Comparaison des chevaux immunisés de la population d'étude en fonction du rang

Rang de vaccination	Rang 5	Rang 4	Rang 3	Rang 2	Rang 1
Nombre de chevaux	2	6	4	7	6
Age moyen	10,5	10,2	10	12,3	7,7
% de la population	7,7	23,1	15	26,9	23,1

En effet la population des chevaux de rang 4 et de rang 2 constitue plus de la moitié de la population d'étude tandis que l'on a seulement que deux chevaux de rang 5. Il est néanmoins difficile d'obtenir une population homogène avec des chevaux ayant subis des injections immunisantes pendant 5 années consécutives et les chevaux de notre étude étant des chevaux de « travail » nous devons faire avec ceux que nous avons à notre disposition.

De plus on remarque que l'âge moyen est très proche entre les chevaux de rang 3, 4 et 5 mais que les chevaux de rang 1 sont plus jeunes pour la plupart d'entre eux et que les chevaux de rang 2 sont plus âgés.

Enfin il est regrettable d'un point de vue de notre étude mais l'écurie de spectacle a procédé à la castration de quatre chevaux entiers immunisés lors de l'année de l'étude. Il s'agit du cheval Cantinflas de rang 5, du cheval Distinto de rang 3 et des chevaux Fundador et Habibe de rang 1. Pour ces chevaux, les prélèvements ont cessé après que la castration chirurgicale ait été réalisée ce qui nous enlève des données pour notre étude.

Protocole vaccinal

Le protocole vaccinal utilisé dans l'étude est un protocole utilisé usuellement avec les deux injections de primo-immunisation réalisées à un mois d'intervalle comme il est recommandé de faire dans l'AMM de l'Improvac® chez le porc. Ce protocole est également recommandé pour la formulation équine australienne. Cependant la dose que nous utilisons est inférieure de moitié par rapport à la dose préconisée chez l'espèce porcine qui est de 2mL par injection. En effet la formulation porcine qui est la seule dont nous avons accès en France pour une utilisation pratique est concentré à 150 µg de particule immunisante par millilitre. Pour la formulation équine Equity® disponible en Australie et en Nouvelle-Zélande la dose contient 200 µg de particule immunisante mais la composition diffère quant à la protéine couplée à l'analogue de la GnRH ainsi que pour les adjuvants de l'immunité.

Il a été démontré que l'utilisation de la dose de 1mL de la formulation porcine permet d'induire une immunisation suffisante pour atteindre les effets recherchés chez l'étalon (Dreau M-L, 2015), de plus l'utilisation de deux doses différentes dans un vaccin hydrosoluble (200 et 400 mg) permet d'obtenir une suppression de la fonction testiculaire avec une réponse immunitaire moins variée pour la dose de 200 mg (Dowsett, 1996).

Il n'est pas classique comme dans notre protocole de faire deux injections lors des rappels d'immunisation comme lors de la primo-immunisation. Cependant dans cette écurie de spectacle, compte tenu du mode de gestion des chevaux, il est plus facile pour eux d'effectuer des rappels d'immunisation toujours à la même période en janvier et février (période sans spectacle). Il est assez net pour certains chevaux que l'intervalle d'un an entre deux immunisations est trop long et que la réversibilité de l'effet « castration » se manifeste avant les réinjections, aussi pour s'assurer d'une efficacité il a été choisi de suivre le même protocole avec deux injections annuelles que pour la primo-immunisation.

Pour les lots en premières années d'immunisation, la réversibilités de l'effet semble se manifester au niveau des dosages de stéroïdes par une réaugmentation des concentrations de testostérone et d'œstradiol lors des derniers prélèvements de l'année notamment pour les chevaux de rang 1 et ceux de rang 3 dans notre étude. Ainsi lors de la première injection de l'année suivante, les concentrations stéroïdiennes de ces chevaux sont proches de celles des entiers non immunisés. En revanche pour la plupart des chevaux immunisés depuis plus de 3 ans, ces variations hormonales ne semble pas se manifester.

Suivi des chevaux

L'ensemble des chevaux a été suivi pendant 12 mois toutes les 4 semaines afin d'effectuer le suivi hormonal de chacun d'entre eux. Les chevaux de notre étude ont également tous été suivis en 2016, à l'exception de 3 d'entre eux de rang 1 en 2017, pendant 11 mois à partir de la première injection immunisante et selon le même protocole de suivi avec un prélèvement réalisé toutes les 4 semaines afin de suivre le profil hormonal de chacun d'entre eux. Nous disposons donc de données suffisantes afin de pouvoir comparer les profils hormonaux avec une année d'immunisation supplémentaire et d'utiliser chaque cheval comme son propre témoin. Cependant il serait également intéressant de continuer un suivi encore une année supplémentaire afin d'évaluer le profil hormonal des chevaux de rang 6 et également augmenté les données collectées pour les différents rangs de vaccination avec une augmentation des effectifs qui permettrait de renforcer la puissance statistique de nos résultats.

Fiabilité des analyses de laboratoire

Pour les dosages immunologiques comme ceux réalisés dans notre étude, les tests sont considérés comme fiables lorsque le coefficient de variation intra essai est inférieur à 10 % et que le coefficient de variation inter essai est inférieur à 15 %. Ces coefficients de variations sont établis à partir du dosage de différents chevaux dont les concentrations sont connues au préalable.

Pour le dosage immunologique de l'AMH l'ensemble des coefficients de variations sont inférieurs aux seuils précédemment évoqués. On peut donc considérer les résultats obtenus lors de ces dosages comme fiables. Il en est de même pour les coefficients obtenus pour la testostérone et l'œstradiol.

Cependant les concentrations obtenues pour le dosage de l'œstradiol sont en picomoles par litres et du fait des faibles concentrations mesurées il convient de rester prudent lorsque l'on obtient des valeurs qui ne sont pas en adéquation avec les autres valeurs obtenues dans une série. La conservation et la manipulation des échantillons peuvent engendrer des variations importantes lors de la réalisation des dosages.

Les coefficients de variation du dosage de l'androsténédione sont tous en dessous des seuils évoqués à l'exception du coefficient de variation intra essai pour une moyenne à 0,10 nMole/L qui est à 14,45%. Ce coefficient de variation reste cependant assez faible et même si de nombreux résultats obtenus sont de cet ordre de grandeur pour les chevaux immunisés cela ne modifie en rien notre interprétation car nous considérons ces résultats comme de faible concentration par rapport aux concentrations obtenues chez les entiers non immunisés.

Perspectives

Il apparaît clairement que l'immunisation vis-à-vis de la GnRH est une alternative crédible à la castration chirurgicale qui présente plus de risque lié à l'acte chirurgical notamment pour les étalons assez âgés et est irréversible. Cependant la fréquence de rappel à réaliser afin de conserver une immunité constante n'a pas encore été découverte tout comme la présence d'un marqueur biologique fiable permettant d'adapter le moment où réaliser un rappel d'immunisation à partir de la réalisation d'un examen de laboratoire. La question de la réversibilité reste encore en suspens, un vétérinaire praticien ne peut affirmer que l'utilisation de l'immunisation anti-GnRH est réversible. Il apparaît évident que des études supplémentaires permettraient d'affiner nos connaissances quant à l'utilisation de ce procédé.

Une formulation équine disponible en France serait également la bienvenue notamment à cause des effets secondaires parfois obtenus lors de la réalisation des injections de la formulation porcine.

Une troisième phase sera effectuée à la suite de notre étude et de celle réalisée pour le suivi des données de 2016 avec l'analyse histologique des testicules de chevaux ayant été immunisés puis castrés de façon chirurgicale afin de juger des effets de l'immunisation répétée ou non sur les cellules testiculaires et sur l'ensemble structurelle du testicule et ainsi juger de la réversibilité possible ou non de la castration immunologique en fonction du rang de vaccination mais également du profil hormonal qui a été évalué lors de nos études.

CONCLUSION

Les résultats obtenus concernant les valeurs des stéroïdes sexuels pour l'année 2017 sont en accord avec ce que nous attendions à l'exception des valeurs obtenues chez les entiers non immunisés. En effet la baisse significative des concentrations moyenne en stéroïdes sexuels entre 2016 et 2017 ne semblent pas s'expliquer car ces chevaux entiers vivent dans les mêmes conditions que l'année précédente et ils ne sont pas considérés comme des chevaux âgés chez lesquels une dégénérescence testiculaire peut être observée.

Pour l'ensemble des chevaux immunisés, les valeurs obtenues pour les stéroïdes sexuels avec l'augmentation du rang de vaccination sont en accord avec les résultats attendus c'est à dire une baisse des concentrations significative jusqu'au rang 3. Pour les chevaux de rang 4 et 5, les différences obtenues sont moins importantes et les effets de l'immunisation sont stables par rapport à l'année précédente.

Notre étude ne peut conclure quant aux résultats obtenus sur l'AMH. En effet les valeurs mesurées ne correspondent pas aux concentrations chez les chevaux cryptorchides et les différences obtenues pour notre panel de chevaux ne sont pas significatives en fonction des différents rangs de vaccination sur l'année 2017. Cependant les concentrations comparatives entre 2016 et 2017 sont en adéquations avec les attentes pour les chevaux de rang 1 et les entiers non immunisés contrairement aux chevaux de rang supérieur pour lesquels les différences entre les deux années ne sont pas significatives.

L'hypothèse émise concernant l'inhibition de la spermatogénèse et la stéroïdogénèse entraînant l'arrêt de l'inhibition de la sécrétion d'AMH n'est donc pas vérifiée. Concernant la recherche d'un marqueur biologique afin d'évaluer la qualité de l'immunisation, les résultats obtenus ne permettent pas de conclure par rapport aux marqueurs hormonaux de notre étude.

La réalisation de l'analyse histologique des testicules des chevaux immunisés ayant été castrés chirurgicalement pourrait permettre d'évaluer les conséquences de plusieurs années d'immunisation consécutives sur la structure tissulaire testiculaire afin de pouvoir les comparer à nos observations sur les stéroïdes sexuels. Cette étude permettra également d'observer l'impact de chaque année d'immunisation sur l'architecture testiculaire, ce qui n'a été réalisé que sur des chevaux primo-immunisés dans les études antérieures ((Dreau M-L, 2015), (Turkstra et al, 2005) (Jackson et Dowsett, 1995) alors que des testicules de différents rang de vaccination seront analysés.

Ceci pourrait permettre de juger quant à la potentielle réversibilité de l'immunisation d'un point de vue histologique en comparaison aux données biologiques obtenues dans les études de 2016 et de 2017.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) **Bailly-Chouriberry L, Loup B, Popot MA, Dreau ML, Garcia P, Bruyas JF, Bonnaire Y.** Two complementary methods to control gonadotropin-releasing hormone vaccination (Improvac®) misuse in horseracing: Enzyme-linked immunosorbent assay test in plasma and steroidomics in urine. *Drug Test Anal.* 2017 Sep;9(9):1432-1440. doi: 10.1002/dta.2187. Epub 2017 Jun 2. PMID: 28294552.
- (2) **Bruyas, J.F., Dreau, M.-L., Bailly-Chouriberry, L., Popot, M.-A., Nguyen, F., Loup, B., Garcia, P., Bonnaire, Y.** (2016): Morphological, hormonal and histological modifications induced by immunisation against GnRH in stallions. *Reproduction Domestic Animals* 51 (supp.2), 55
- (3) **Brinsko SP., Blanchard T.L., Varner D. , Schmacher J., Love C. Hinrichs K., Hartman D.** 2011 *Manuel of equine reproduction* (Third Edition) St Louis: Mosby Elsevier, 336 p
- (4) **Claes A, Ball B.A, Almeida J, Corbin C.J. & Conley A.J.** 2013. Serum Anti-Müllerian Hormone Concentrations in Stallions : Developmental Changes, Seasonal Variation, and Differences between Intact Stallions, Cryptorchid Stallions, and Geldings. *Theriogenology*, 79, pp. 1229–
- (5) **Dordas-Perpinya, M., Gorrégues, M., Gervasoni, M.-A., Berder, C., Thorin, C., Jaillardon, L., Bruyas, J.-F.** (2018): What Is the Effect of Anti-GnRH Immunization on Plasmatic Levels of Anti Mullerian Hormone? *Journal of Equine Veterinary Science* 66, 26.
- (6) **Dowsett et al.** 1996. Suppression of testicular function using two dose rates of a reversible water soluble gonadotrophin releasing hormone (GnRH) vaccine in colts. *Australian veterinary journal*, 74, n°3, pp. 228–235.
- (7) **DREAU Marie-Laure.** 2015. Modifications morphologiques, hormonales et histologiques induites par une immunisation anti-GnRH chez l'étalon. *Thèse de doctorat vétérinaire.* 101 pages.
- (8) **GORRÉGUÈS M.** (2018). Effets de l'immunisation anti-GnRH chez l'étalon sur la sécrétion d'AMH et de stéroïdes sexuels. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine, Nantes. Oniris : École Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique, 102p.
- (9)
- (10) **Jackson A. & Dowsett K.** 1995. Proliferating Cell Nuclear Antigen in the Equine Testis : Effects of Age and Experimental Treatment. *Equine reproduction VI*, pp. 631–640.
- (11) **Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R. & Xavier F.** 1998. The role of anti-Müllerian hormone in gonadal development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145, pp. 3–7.
- (12) **Murase H. et al.** 2015. Anti-Müllerian hormone as an indicator of hemi-castrated unilateral cryptorchid horses. *Journal of equine science*, 26, pp. 15–20
- (13) **Rey, Rodolfo.** 1998. Endocrine, Paracrine and Cellular Regulation of Postnatal Anti-Müllerian Hormone Secretion by Sertoli Cells. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 9, n°7, pp. 271–276.
- (14) **Rey R.A, Picard JY. & Josso N.** 2014. Intérêt du dosage de l'hormone anti-müllérienne pour le diagnostic et la définition des anomalies de la différenciation sexuelle. *Médecine de la Reproduction, Gynécologie, Endocrinaole*, 16, pp. 56–68.
- (15) **Scarlett D. et al.** 2017. Anti-Muellerian Hormone, Inhibin A, Gonadotropins, and Gonadotropin Receptors in Bull Calves after Partial Scrotal Resection, Orchidectomy, and Burdizzo Castration. *Theriogenology*, 87, pp. 242–249.

- (16) **Turkstra J.A. et al.** 2005. Effects of GnRH Immunization in Sexually Mature Pony Stallions. *Animal Reproduction Science*, 86, pp. 247–259.

Vu : **L'enseignant Rapporteur**

De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Oniris

Pr Jean-François Bruyas



Vu : **Le Directeur Général**

par interim
De l'Ecole Nationale Vétérinaire,
Agroalimentaire et de l'Alimentation
Oniris
Marc GOGNY

Nantes, le

Vu : **Le Président de la Thèse**

Professeur **P. BARRIERE**



Vu : **Le Doyen de la Faculté de
Médecine de Nantes**

Professeur Pascale JOLLIET

Vu et permis d'imprimer

NOM : GUERIN
Prénom : Henri

Evaluation des effets d'une primo-immunisation et de rappels d'immunisation anti-GnRH par injections d'Improvac® sur les concentrations plasmatiques d'AMH, de testostérone, d'androsténédione et d'oestradiol chez l'étalon.

RESUME

Cette étude est la suite d'une étude réalisée en 2017 et a pour objectif d'évaluer les effets d'une primo-immunisation d'Improvac® sur 6 chevaux mâles entiers et les effets de rappels annuels d'immunisation sur une population de 20 chevaux ayant déjà été immunisés auparavant. Les chevaux sont répartis en 4 groupes selon leur nombre d'années consécutives d'immunisation ainsi qu'un groupe de 5 mâles entiers non immunisés. Une comparaison entre deux années successives dans laquelle chaque cheval est son propre témoin permet d'évaluer les effets de la primo-immunisation ainsi que d'une année supplémentaire d'immunisation. Des dosages plasmatiques d'AMH, de testostérone, d'oestradiol et d'androsténédione ont été effectués pendant l'année étudiée.

Un effet net est observé concernant les 3 stéroïdes sexuels dès la première injection immunisante, avec des variations individuelles. Ces variations sont moins importantes avec l'augmentation du nombre d'immunisations successives. Concernant l'AMH, les résultats obtenus chez les chevaux immunisés ne sont pas en accord avec les prévisions et aucun effet de l'immunisation sur les concentrations plasmatiques d'AMH n'est observée malgré les immunisations successives.

MOTS CLES

- GnRH
- Etalon
- Castration
- Immunisation
- Hormone Anti-Mullerienne
- Hormone Stéroïde

JURY

Président : Monsieur le Professeur Paul BARRIERE Professeur à la faculté de Médecine de Nantes

Rapporteur Monsieur Jean-François BRUYAS Professeur agrégé à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique Oniris

Assesseur : Madame Laëticia JAILLARDON Maître de conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation Nantes Atlantique Oniris

ADRESSE DE L'AUTEUR

N° Rue : 371 chemin de tancarbot

Code Postal-Ville : 76430 La Cerlangue

Nom de l'imprimeur