

## Influence de la durée d'un traitement progestatif sur la dynamique de croissance des follicules préovulatoires induits par effet mâle chez la brebis Ile de France en anœstrus saisonnier

ADIB A. (1,2,3,4), FRERET S. (1,2,3,4), CHESNEAU D. (1,2,3,4), TOUZE J.L. (1,2,3,4), CHEMINEAU P. (1,2,3,4), PELLICER M.T. (1,2,3,4)

1) INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

2) CNRS, UMR 7247, F-37380 Nouzilly, France

3) Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

4) IFCE, F637380 Nouzilly, France

**RESUME** - Dans le but d'évaluer l'effet de la durée du traitement progestatif (12 jours versus 2 jours) sur la dynamique de croissance des follicules préovulatoires induits par effet mâle, une expérience a été conduite sur 41 brebis anovulatoires de race Ile de France soumises à un effet mâle durant l'anœstrus saisonnier.

Ces brebis ont été réparties en trois groupes homogènes :

Groupe témoin : aucun traitement préalable (n=20).

Groupe traité par des dispositifs vaginaux (CIDR-2) pendant 2 jours : traitement de courte durée (n=11).

Groupe traité par des dispositifs vaginaux (CIDR-12) pendant 12 jours : traitement de longue durée (n=10).

Le retrait des CIDR est réalisé 24h avant l'introduction des béliers (J0). L'effet mâle a été réalisé avec 9 béliers sexuellement actifs. La détection de l'œstrus est faite deux fois par jour. La durée du cycle induit a été déterminée par un suivi journalier de la progestérone plasmatique. Les paramètres de croissance des follicules préovulatoires induits par le mâle ont été analysés par échographie transrectale.

Les résultats montrent que le traitement progestatif appliqué n'a aucune influence sur le pourcentage de brebis qui ovulent (98%). Comme attendu, toutes les brebis prétraitées avec CIDR qui ovulent développent des cycles de durée normale, avec 100% des brebis CIDR-12 qui viennent en chaleur à la première ovulation induite et seulement 20% des brebis CIDR-2. Les brebis témoins quant à elles, présentent majoritairement des cycles courts (80%) et n'expriment pas d'œstrus.

La durée de croissance des follicules préovulatoires est plus importante ( $P=0,003$ ) chez les brebis traitées pendant 12 jours ( $4,4 \pm 0,3$  jours) par rapport aux brebis traitées pendant 2 jours ( $3,2 \pm 0,3$  jours) et les brebis témoins ( $2,9 \pm 0,2$  jours). De la même façon, la durée de vie est prolongée ( $P=0,01$ ) chez le groupe traité pendant 12 jours ( $5,7 \pm 0,3$  jours) par rapport au groupe traité 2 jours ( $5,1 \pm 0,4$ ) et le groupe témoin ( $4,3 \pm 0,3$  jours). Ces résultats sont associés à une ovulation qui a lieu plus tardivement ( $P=0,08$ ) chez les brebis traitées 12 jours ( $3,2 \pm 0,7$  jours) par rapport aux brebis traitées 2 jours ( $2,4 \pm 0,3$  jours) et brebis témoins ( $2,6 \pm 0,2$  jours). Cependant, les autres paramètres analysés ne diffèrent pas entre groupes. Ces résultats suggèrent que la durée du traitement progestatif préalable à l'effet mâle affecte la qualité des follicules préovulatoires induits et permet une meilleure maturation folliculaire.

## Influence of the duration of progesterone treatment on the growth of the pre-ovulatory follicle induced by the ram effect in Ile de France anestrus ewes

ADIB A (1,2,3,4), FRERET S (1,2,3,4), CHESNEAU D (1,2,3,4), TOUZE J-L (1,2,3,4), CHEMINEAU P (1,2,3,4), PELLICER M-T (1,2,3,4)

1) INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

**SUMMARY** - In order to investigate the effect of the duration of progesterone treatment (12 vs. 2 days) on the growth of the pre-ovulatory follicle induced by ram exposure, an experiment was conducted during the anestrus season in 41 anovulatory ewes of the "Ile de France" breed with 9 sexually active males. The ewes were divided into three homogenous groups: **Control group** (n=20) received no hormonal treatment, **CIDR-2** group (n=11) received a short-term progesterone treatment (intravaginal progesterone release device CIDR for 2 days) and **CIDR-12** group (n=10) received a long-term progesterone treatment (CIDR for 12 days), before the introduction of the ram. CIDR was removed 24h before ram introduction (D0).

Estrous behavior was recorded twice daily from day 0 to day 4. The quality of the induced cycle (short or normal cycle) was determined based on plasmatic progesterone profiles over 25 days after the ram effect (blood sampling once a day). The parameters of growing dynamics of pre-ovulatory follicles were also analyzed (day of emergence, size at D0, day of ovulation, ovulatory size, the time for follicular growth, growth rate and follicle lifespan) by transrectal ultrasonography. The results show that the duration of the progesterone treatment had no effect on the proportion of ewes ovulating (98%). As expected, all CIDR-treated ewes which ovulated developed a normal cycle. In contrast, most of the ewes from the control group developed a short cycle (80%). Estrous behaviour was observed in all ewes from the CIDR-12 group but only in 2 ewes from the CIDR-2 group. No ewes from the control group exhibited estrous behaviour. The time for follicular growth was greater ( $P=0.003$ ) in ewes treated with progesterone for 12 days ( $4.4 \pm 0.3$  days) than in ewes treated for 2 days ( $3.2 \pm 0.3$  days) and untreated ewes ( $2.9 \pm 0.2$  days). In the same way, the lifespan was longer ( $P=0,01$ ) in the CIDR-12 group ( $5.7 \pm 0.3$  days) than in the CIDR-2 group ( $5.1 \pm 0.4$  days) and Control group ( $4.3 \pm 0.3$  days). These observations were related to the time of ovulation, which occurred later ( $P=0.08$ ) in the CIDR-12 group ( $3.2 \pm 0.7$  days) than in the CIDR-2 group ( $2.4 \pm 0.3$  days) and Control group ( $2.6 \pm 0.2$  days). However, the other parameters did not differ among groups. These results suggest that a long-term progesterone treatment prior to ram exposure leads to a better maturation of preovulatory follicles induced to ovulate.

## INTRODUCTION

L'effet mâle est une technique d'induction et de synchronisation des ovulations à contre saison chez les ovins. En effet, l'introduction de béliers sexuellement actifs dans un groupe de brebis anovulatoires provoque une augmentation quasi-immédiate de la pulsativité de LH suivie d'une première ovulation dans les 2 à 4 jours qui suivent (Martin *et al.*, 1986 ; Ungerfeld *et al.*, 2004). Cette première ovulation est toujours silencieuse (non accompagnée de comportement d'œstrus) et est suivie soit de la formation d'un corps jaune normal (cycle normal) soit du développement d'un corps jaune hypo-fonctionnel (cycle court) qui régresse prématurément (Thimonier *et al.*, 2000). Il est connu qu'un traitement progestatif de courte durée (une simple injection de 20 mg de progesterone) préalable à l'introduction du mâle permet l'induction d'un premier cycle de durée normale mais sans œstrus (Cognié *et al.*, 1982), contrairement au traitement progestatif de longue durée (10 à 17 jours de progesterone sous forme d'éponge vaginale) qui assure le développement d'un cycle normal avec manifestation d'œstrus (Oldham et Lindsay 1980). Dans l'objectif d'évaluer l'implication de la maturation folliculaire dans la mise en place de cycles courts et l'expression de l'œstrus, le but de ce travail a été d'étudier l'effet de la durée du traitement de progesterone sur la dynamique de croissance des follicules préovulatoires induits par effet mâle chez la brebis en anoestrus saisonnier.

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

L'étude a été conduite durant l'anoestrus saisonnier dans le troupeau ovin de race Ile de France de l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Nouzilly, France, 48°N).

Dans le but de sélectionner des brebis adultes anovulatoires (non cycliques), des dosages de progesterone (Canépa *et al.*, 2008) ont été effectués dans des échantillons de sang prélevés à une semaine d'intervalle pendant trois semaines consécutives. Une brebis est considérée non cyclique quand les concentrations plasmatiques de progesterone sont inférieures à 0,75 ng/ml sur les trois échantillons (Thimonier *et al.*, 2000). L'effet mâle a été réalisé sur 41 brebis anovulatoires âgées de 2 à 5 ans, avec un poids moyen de 63.9± 8.6 kg et une note d'état corporel de 3.1± 0.3 (Russel *et al.*, 1969). Ces brebis étaient pré-isolées des béliers ou de leur odeur depuis plus d'un mois et logées en bâtiment ouvert sous photopériode naturelle. Elles ont été réparties en trois groupes :

**Groupe témoin :** brebis témoins, n'ayant subi aucun traitement hormonal préalable (n=20).

**Groupe CIDR-2 :** brebis traitées à la progesterone par des dispositifs vaginaux (CIDR : *controlled internal drug release dispenser*, 300 mg de progesterone) pendant 2 jours (n=11).

**Groupe CIDR-12 :** brebis traitées à la progesterone sous forme de CIDR pendant 12 jours (n=10).

Le retrait des CIDR a été réalisé 24h avant le jour de l'introduction des béliers (J0). Les brebis ont été exposées aux béliers (1 mâle pour 5 femelles) pour une durée de 25 jours.

Dans le but d'optimiser et de standardiser la qualité de la stimulation procurée par les mâles (Rosa et Bryant, 2002, Chemineau *et al.*, 1992), les béliers utilisés avaient reçu un traitement photopériodique de désaisonnement de 60 jours longs (16h d'éclaircissement par 24h) suivi de 50 jours courts (8h d'éclaircissement par 24h). L'arrêt du traitement des mâles a coïncidé avec le jour de leur mise en contact avec les femelles.

## 1.2. MESURES

L'activité ovulatoire des brebis a été analysée par dosage de la progesterone plasmatique une fois par jour de J0 à J24, afin d'étudier le type de cycle induit par le mâle. Les concentrations plasmatiques en progesterone ont été déterminées par la méthode immuno-enzymatique (ELISA) décrite par Canépa *et al.* (2008). Le pic préovulatoire de l'hormone lutéinisante (LH) a été analysé dans des échantillons de sang prélevés toutes les 4 heures de J0 à J3. Le dosage de la LH a été effectué par la méthode ELISA (Faure *et al.*, 2005).

La détection des signes de chaleurs (immobilisation aux tentatives de chevauchement, marquage au dos) a été réalisée deux fois par jour de J0 à J4 à l'aide de béliers sexuellement actifs (autres de ceux utilisés pour l'effet mâle) munis de tabliers marqueurs.

Les paramètres de la dynamique de croissance des follicules préovulatoires induits par effet mâle (le jour d'émergence défini comme le jour où le follicule préovulatoire mesure 3 mm de diamètre, la taille à J0, la durée de croissance définie comme le temps nécessaire pour que le follicule préovulatoire croît d'une taille de 3 mm de diamètre à une taille maximale, la vitesse de croissance (Ginther et Kot, 1994), le jour de l'ovulation qui correspond au jour de disparition d'un gros follicule de taille ovulatoire (ex : 5-7 mm), la taille ovulatoire et la durée de vie des follicules préovulatoires qui correspond à l'intervalle de temps en jours depuis l'émergence jusqu'à l'ovulation) ont été analysés par échographie transrectale à l'aide d'un échographe de type ALOKA SSD-900 muni d'une sonde linéaire de 7,5MHz. Ces mesures ont été réalisées une fois par jour de J-5 à J7 dans le but d'analyser la cinétique de croissance des follicules préovulatoires, puis à J8, J10 et J14 afin de dénombrer et mesurer les structures lutéales formées.

## 1.3. ANALYSES STATISTIQUES

La comparaison des moyennes des différentes variables quantitatives a été effectuée par une analyse de variance (ANOVA) à une seule voie suivie par le test de comparaison multiple de Tukey-Kramer. Les résultats sont présentés en moyenne ± S.E.M. Les variables qualitatives du type pourcentage de brebis en chaleurs, ayant ovulé ou présentant un pic préovulatoire de LH, ont été comparées avec le test exact de Fisher.

## 2. RESULTATS

L'ovulation a été détectée chez la majorité des brebis (98%) durant les 4 premiers jours d'exposition au mâle, quel que soit le traitement reçu (p>0,05). Toutes les brebis traitées par des CIDR qui ont ovulé ont développé un premier cycle normal. Vingt pour cent (20%) des brebis témoins ont développé des cycles normaux et 80% des cycles courts (P<0,001).

L'œstrus a été détecté chez toutes les brebis traitées par des CIDR pendant 12 jours et chez uniquement 2 brebis sur 10 brebis traitées pendant 2 jours. Aucune brebis témoin n'a exprimé de comportement de chaleur (voir tableau 1).

Les résultats de la dynamique de croissance des follicules préovulatoires induits par le mâle montrent que la durée de croissance est plus longue (P=0,003) chez les brebis traitées par des CIDR pendant 12 jours (4,4 ± 0,3 jours) que chez les brebis traitées pendant 2 jours et chez les témoins (2,9 ± 0,2 jours et 3,2 ± 0,3 jours, respectivement). Il en est de même pour la durée de vie (P=0,01) qui est allongée chez les brebis du groupe CIDR-12 (5,7 ± 0,3 jours) par rapport aux brebis des groupes témoin (4,3 ± 0,3 jours) et CIDR-2 (5,1 ± 0,4 jours). La cinétique de croissance folliculaire est associée à

un pic préovulatoire de LH qui se déclenche plus tard ( $P=0,04$ ) chez les brebis traitées par des CIDR pendant 12 jours ( $38,4 \pm 3,4$  heures) par rapport à celles traitées pendant 2 jours ( $28,4 \pm 4,5$  heures) et sans traitement ( $24,8 \pm 3,1$  heures). Le jour de l'ovulation est retardé ( $P=0,08$ ) chez

les brebis du groupe CIDR-12 ( $3,2 \pm 0,7$  jours) par rapport aux brebis du groupe CIDR-2 et témoin ( $2,6 \pm 0,2$  &  $2,4 \pm 0,3$  jours respectivement). Cependant, les autres paramètres échographiques analysés ne diffèrent pas entre groupes

**Tableau 1** : Pourcentage de brebis ovulantes et exprimant l'œstrus avec le type de cycle induit

Traitement	n	Brebis ovulantes (%)	Brebis exprimant l'œstrus* (%)	Type de cycle induit (% de brebis)	
				Normal*	Court*
Témoin	20	100 (20/20)	0 (0/20)	20 (4/20)	80 (16/20)
CIDR-2 jours	11	91 (10/11)	20 (2/10)	100 (10/10)	0 (0/10)
CIDR-12 jours	10	100 (10/10)	100 (10/10)	100 (10/10)	0 (0/10)

n : nombre de brebis.

\*par rapport aux brebis ayant ovulé

**Tableau 2** : Paramètres folliculaires analysés par échographie transrectale

Traitement	n	Jour d'émergence (jour)	Diamètre folliculaire à J0 (mm)	Jour d'ovulation (jour)	Taille ovulatoire (mm)	Moment du pic de LH (heure)	Durée de croissance (jours)	Vitesse de croissance (mm/jour)	Durée de vie (jours)
Témoin	20	$-1,6 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$	<b><math>24,8 \pm 3,1</math> a</b>	<b><math>2,9 \pm 0,2</math> a</b>	$0,9 \pm 0,1$	<b><math>4,3 \pm 0,3</math> a</b>
CIDR-2 jours	10	$-2,6 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,2$	<b><math>28,4 \pm 4,5</math> ab</b>	<b><math>3,2 \pm 0,3</math> a</b>	$0,9 \pm 0,1$	<b><math>5,1 \pm 0,4</math> ab</b>
CIDR-12 jours	10	$-2,4 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,1$	$3,2 \pm 0,7$	$5,5 \pm 0,1$	<b><math>38,4 \pm 3,4</math> b</b>	<b><math>4,4 \pm 0,3</math> b</b>	$0,7 \pm 0,1$	<b><math>5,7 \pm 0,3</math> b</b>

<sup>a,b</sup>: statistiquement différents (ANOVA à une seule voie suivie du test de tukey-Kramer multiple comparaison test;  $P < 0,05$ ).

n : nombre de brebis ayant ovulé

Toutes les lettres différentes indiquent des différences statistiques

### 3. DISCUSSION

Les résultats de ce travail montrent que le traitement progestatif des brebis avant effet mâle, lorsqu'il est de longue durée (12 jours), retarde le pic préovulatoire de LH et prolonge la durée de croissance et la durée de vie des follicules préovulatoires induits par effet mâle. Ces résultats sont similaires à ceux observés par Viñoles *et al.* (2000), chez des brebis cycliques traitées à l'acétate de médroxyprogestérone (MAP). L'allongement de l'intervalle « introduction des béliers-pic préovulatoire de LH » observé chez les brebis traitées à la progestérone pendant 12 jours suggère que la durée de stimulation des follicules préovulatoires par les hormones gonadotropes pourrait être critique dans l'acquisition d'une fonction lutéale normale. Cependant, dans le groupe de brebis traitées pendant 2 jours, une fonction lutéale normale est également assurée chez toutes les brebis, sans modification du moment d'apparition du pic préovulatoire de LH. Ceci est en accord avec des résultats de Pearce *et al.* (1987) qui ne montrent aucun retard dans le délai d'apparition du pic de LH après une injection de 20 mg de progestérone 5 jours avant l'induction de l'ovulation par effet mâle chez des brebis ovulatoires, alors que toutes les brebis développent des cycles normaux. Les mécanismes impliqués dans la durée de vie des corps jaunes induits par effet mâle ne sont pas bien connus. Il a été décrit dans la littérature que la progestérone pourrait agir directement sur l'utérus en bloquant le relargage des prostaglandines et en inhibant la synthèse et la mise en place des récepteurs à l'ocytocine, empêchant ainsi la luteolyse précoce (Gastli-Lassoued, 1998).

Toutefois, nos résultats suggèrent que la progestérone pourrait également agir sur le follicule préovulatoire lui-même et être à l'origine d'une meilleure maturation folliculaire en prolongeant sa durée de croissance. En effet, la progestérone pourrait modifier l'expression de certains facteurs de croissance angiogéniques et favoriser la vascularisation des jeunes corps jaunes formés (Christensen *et al.*, 2012). Enfin, le traitement à la progestérone de longue durée induit également l'apparition du comportement d'œstrus chez toutes les brebis, contrairement au traitement de courte durée. Ces résultats confirment ceux décrits dans la littérature qui montrent l'importance de la durée d'imprégnation du système nerveux central par la progestérone dans l'expression du comportement d'œstrus (Blache *et al.*, 1994). Il semble donc très probable que la progestérone agirait non seulement au niveau du système nerveux central pour favoriser l'expression du comportement d'œstrus mais aussi au niveau du tractus génital, pour assurer le développement de corps jaunes de durée normale suite à une ovulation induite par effet mâle chez des brebis anovulatoires. Cependant, cette technique d'induction et de synchronisation des ovulations qui associe traitement progestatif (court ou long) et effet mâle peut s'avérer très intéressante pour l'application de l'insémination artificielle et profiter des progrès de sélection génétique en élevage ovin français dans le cas où ces ovulations soient fertiles.

En effet, elle offre des avantages d'un point de vue économique, sociétal et environnemental en réduisant la durée d'utilisation des traitements progestatifs, minimisant ainsi leur propagation dans l'environnement, mais aussi en

supprimant l'utilisation de la gonadotrophine chorionique équine (eCG) qui est une hormone d'origine animale (obtenue à partir du sang de jument gestante), et qui est responsable d'une perte d'efficacité après des administrations répétées résultant de l'immunisation des animaux.

## CONCLUSION

La durée du traitement progestatif a une influence sur la dynamique de croissance des follicules préovulatoires induits par effet mâle. En effet, un traitement de longue durée (12 jours), qui est nécessaire au développement de corps jaunes fonctionnels et l'expression du comportement d'œstrus, rallonge la durée de croissance et la durée de vie du follicule préovulatoire induit. Ces résultats suggèrent que le traitement progestatif de longue durée serait à l'origine d'une meilleure maturation folliculaire chez les brebis anovulatoires qui développent un cycle normal accompagné d'œstrus.

*Les auteurs remercient l'ensemble des personnes impliquées dans la réalisation de cette étude, notamment le personnel de l'UE PAO et du Labo dosage (Nouzilly)*

**Blache, D., Batailler, M., Fabre Nys, C. 1994.** J.Endocrinol., 6,329-339

**Canépa, S., Laine, A.L., Bluteau, A., Fagu, C., Flon, C., Monniaux, D. 2008.** Cahier des Techniques de l'INRA., 64,19-30

**Chemineau, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., Guérin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J., Pelletier, J. 1992.**

Anim.Reprod.Sci., 30, 157-184

**Christensen, A.C.M., Haresign, W., Khalid, M. 2012.**

Theriogenology., 77, 1648-1660

**Cognié, Y., Gray, S.J., Lindsay, D.R., Oldham, C.M.,**

**Pearce, D.T., Signoret, J.P. 1982.**

Proc.Aust.Soc.Anim.Prod., 14,519-522

**Faure, M.O., Nicol, L., Fabre, S., Fontaine, J., Mohoric, N.,**

**McNeilly, A., Taragnat, C. 2005.** J. Endocrinol., 186, 109-21

**Gastli-Lassoued. 1998,** Thèse de Doctorat d'état faculté de Tunis

**Ginther, O.J., Kot, K. 1994.** Theriogenology., 42, 987-1001

**Martin, G.M., Oldham, C.M., Cognie, Y., Pearce, D.T. 1986.**

Prod.Sci., 15, 219-247

**Oldham, C.M., Lindsay, D.R. 1980.** Reprod.Anim.Sci.,

3,119-124

**Pearce, D.T., Oldham, C.M., Haresign, W., Gray, S.J.**

**1987,** Anim.Reprod.Sci., 13, 81-89

**Rosa, HJD, Bryant, M.J. 2002.** Small Ruminant Research.,

45, 1-16

**Russel, A.J.F., Doney, J.M., Gunn, R.G. 1969.** J. Agric. Sci.,

72:451-454

**Thimonier, J., Cognié, Y., Lassoued.N. Khaldi, G. 2000,**

Prod.Anim., 13, 223-231

**Ungerfeld, R., Forsberg M., Rubianes E. 2004.** Reprod,

Fertil and Dev., 16, 479-490.

**Vinôles, C., Forsberg, M., Banchemo, G., Rubianes, E.**

**2000,** Theriogenology., 55, 993-1004