



**HAL**  
open science

# Maitrise de la folliculogénèse chez la chienne a l'aide d'agonistes de la GnRH

Emmanuel Fontaine

► **To cite this version:**

Emmanuel Fontaine. Maitrise de la folliculogénèse chez la chienne a l'aide d'agonistes de la GnRH. Génétique animale. AgroParisTech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0049 . tel-03683648

**HAL Id: tel-03683648**

**<https://pastel.hal.science/tel-03683648>**

Submitted on 31 May 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## Doctorat ParisTech

# THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

## L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Reproduction Animale

*présentée et soutenue publiquement par*

**Emmanuel FONTAINE**

le 12 juillet 2012

## Maitrise de la folliculogénèse chez la chienne à l'aide d'agonistes de la GnRH

Directeur de thèse : **Pr Sylvie CHASTANT-MAILLARD**

Co-encadrement de la thèse : **Dr Alain FONTBONNE**

### Jury

**M. Alain CARATY**, Ingénieur de Recherche, UMR0085, INRA Nouzilly

**Mme Brigitte SILIART**, Professeur, ONIRIS

**Mme Helene COMBRISSE**, Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

**M. Samuel BUFF**, Maître de Conférences, Vet-Agro-Sup

**M. Jacques GUILLOT**, Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

**Mme Sylvie CHASTANT-MAILLARD**, Professeur, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

**M. Alain FONTBONNE**, Maître de Conférences, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

**Mme Christelle NAVARRO**, Membre invité, VIRBAC SA

Rapporteur

Rapporteur

Examinateur

Examinateur

Examinateur

Directeur

Co-directeur

Invitée

# Table des matières

---

## Table des matières

Résumé.....	5
Abstract .....	7
Contexte .....	9
GnRH et contrôle endocrinien de la fertilité .....	11
1. Introduction .....	12
2. L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique .....	13
2.1 Organisation fonctionnelle de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique chez les mammifères.....	13
2.3 Sécrétion hypothalamique de la GnRH .....	15
2.4 Rétrocontrôles régulant le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique ..	15
3. Bases moléculaires à la réponse de la cellule gonadotrope à la GnRH.....	23
3.1 Aspects structurels et fonctionnels du récepteur à la GnRH .....	23
3.2 Transduction du signal induit par la GnRH dans la cellule gonadotrope .....	25
4. Conclusion .....	26
Analyse bibliographique : .....	27
Utilisation clinique des agonistes de la GnRH chez les carnivores domestiques.....	27
1. Introduction .....	28
2. Les agonistes GnRH.....	30
2.1 Structure-fonction.....	30
2.2 Mode d'action.....	31
2.4 Importance de la dose administrée et de la durée .....	35
3. Utilisation des agonistes de la GnRH dans le contrôle de la fertilité .....	35
3.1 Administration prolongée en vue d'une stérilisation chimique des individus.....	35
3.2 Retarder la puberté: utilisation sur des individus prépubères.....	42
3.3 Profiter de l'effet stimulant des agonistes .....	44
4. Utilisation des agonistes GnRH dans un cadre thérapeutique.....	47
4.1 Utilisation dans un cadre comportemental. ....	48
4.2 Utilisation dans le traitement d'affections liées aux hormones sexuelles .....	49
4.3 Utilisation dans le traitement d'affections liées à la stérilisation chirurgicale .....	50
5. Effets secondaires suite à l'administration prolongée d'agonistes de la GnRH.....	53
5.1 Prévenir l'effet stimulant de départ .....	53

5.2 Autres effets secondaires .....	54
6. Conclusion.....	55
Induction de chaleurs fertiles chez la chienne à l'aide d'implants de desloréline, un agoniste de la GnRH .....	56
1. Introduction .....	58
2. Matériels et méthodes.....	59
2.1 Animaux .....	59
2.2 Critères d'inclusion .....	60
2.3 Traitement .....	60
2.4 Détermination du moment de l'ovulation.....	61
2.5 Retrait de l'implant.....	61
2.6 Mise à la reproduction .....	62
2.7 Suivi de la phase lutéale .....	62
2.8 Résultats de fertilité.....	62
2.9 Analyse statistique.....	63
3. Résultats .....	63
3.1 Induction des chaleurs .....	63
3.2 Ovulation .....	63
3.3 Gestation.....	64
3.4 Insuffisance lutéale.....	64
3.5 Mise-bas/ Taille des portées .....	65
3.6 Mortalité néonatale.....	65
4. Discussion .....	67
5. Conclusion.....	70
Profils de sécrétion de la progestérone durant le suivi de chiennes induites en chaleurs par des implants de desloréline.....	72
1. Introduction .....	74
2. Matériels et méthodes.....	75
2.1 Animaux et traitement .....	75
2.2 Suivi des chaleurs .....	75
2.3 Analyse des profils de la progestéronémie sanguine.....	76
2.4 Analyse statistique.....	76
3. Résultats .....	76
4. Discussion .....	78
5. Conclusion.....	79

Raccourcissement de l'intervalle inter-œstrus chez la chienne un l'aide d'un protocole combinant l'anti-progestérone aglépristone et l'agoniste de la GnRH desloréline. ....	80
1. Introduction .....	82
2. Matériel et méthodes .....	83
2.1 Animaux .....	83
2.2 Traitement .....	84
2.3 Analyse statistique.....	85
3. Résultats .....	86
4. Discussion .....	86
5. Conclusion.....	89
Stérilisation chimique des chiennes à l'aide d'implants de desloréline .....	90
1. Introduction .....	92
2. Matériels et méthodes.....	95
2.1 Animaux .....	95
2.2 Critères d'inclusion et définition du stade du cycle. ....	95
2.3 Administration de l'implant d'agoniste de la GnRH et suivi .....	96
2.4 Effets secondaires.....	97
2.5 Durée d'efficacité.....	98
2.6 Analyse statistique .....	99
3. Résultats .....	99
3.1 Induction des chaleurs .....	99
3.2 Effets secondaires .....	100
3.3 Durée d'efficacité pour les chiennes ayant reçu un seul implant (n=54).....	103
3.4 Chiennes ayant reçu plusieurs implants (n=3) .....	107
4. Discussion .....	107
4.1 Induction des chaleurs et ovulation .....	107
4.2 Effets secondaires.....	109
4.3 Durée de la stérilisation chimique. ....	110
5. Conclusion.....	110
Prévention de l'œstrus induit suite à l'utilisation d'implants d'agonistes de la GnRH sur des chiennes adultes en anœstrus.....	111
1. Introduction .....	113
2. Matériels et méthodes.....	114
2.1 Expérience 1 .....	114
2.2 Expérience 2.....	115

2.3	Données analysées.....	115
3.	Résultats .....	116
3.1	Expérience 1 .....	116
3.2	Expérience 2.....	116
4.	Discussion .....	117
5.	Conclusion.....	118
	Utilisation d’implants d’agonistes de la GnRH sur des chiennes prépubères .....	119
	Résumé : .....	120
1.	Introduction .....	121
2.	Matériels et méthodes.....	121
3.	Résultats .....	122
4.	Discussion .....	122
5.	Conclusion.....	123
	Discussion générale- Perspectives.....	124
1.	Objectifs du travail .....	125
2.	Induction de chaleurs fertiles chez la chienne .....	125
3.	Stérilisation chez la chienne .....	127
4.	Autres perspectives .....	128
	Conclusion.....	130
	Bibliographie.....	132

## Résumé

Les implants contenant l'agoniste de la GnRH desloréline (Suprelorin®4,7mg, Virbac, Carros, France) ont un mode d'action en deux temps permettant l'activation et l'inhibition de la fonction de reproduction chez la chienne. Chacun de ces mécanismes a des applications cliniques, depuis l'induction des chaleurs jusqu'à la stérilisation chimique. D'un point de vue scientifique cependant les données chez la chiennes se limitent principalement à des animaux d'expérimentation (Trigg et al. 2001) : leur utilisation potentielle est ainsi très peu détaillée. 173 chiennes (dont 24 beagles d'expérimentation) ont ainsi été incluses dans 6 différents protocoles pour documenter leur utilisation.

Quand l'implant est utilisé pour l'induction des chaleurs, il était administré durant l'anœstrus et retiré juste après l'ovulation (déterminée quand la progestéronémie est de 6 ng/mL). Les 64 chiennes ayant participé à ces différents protocoles ont toutes présenté un œstrus induit. Pour 32 d'entre elles, celui est survenu  $4,3 \pm 1,4$  jours [2 à 7 jours après] suite à l'administration de l'implant. Des cycles anovulatoires ont été rapportés chez 14 de ces 64 chiennes, mais aucun facteur permettant de différencier ces chiennes de celles qui ovulent n'a pu être identifié.

Quand l'implant était administré en anœstrus précoce, 2 chiennes sur 22 (9,1%) ont conduit une gestation à terme, alors que quand le traitement avait lieu en anœstrus tardif, cela a été le cas pour 16 chiennes sur 23 (69,6%). La taille moyenne de ces portées était de  $6,7 \pm 3,5$  chiots. Une insuffisance lutéale a été suspectée dans 5 cas: 2 de ces chiennes n'étaient pas gestantes au moment du diagnostic de gestation, une a mis bas prématurément à 58 jours post-ovulation, le propriétaire refusant de supplémenter sa chienne. Les deux chiennes restantes ont été supplémentées avec de la progestérone par voie orale et ont mis bas naturellement.

Ces implants ont également été utilisés chez 109 chiennes en vue d'obtenir une stérilisation chimique. La réponse clinique au traitement était principalement dépendante du stade du cycle auquel celui-ci était administré. Les mêmes caractéristiques que celles vues lors de l'induction de l'œstrus ont été retrouvées lorsque l'implant était utilisé en anœstrus. Des chaleurs induites sont également survenues chez 3 chiennes sur 15 implantées en diœstrus. Quand cela était observé, l'implant était retiré, des niveaux élevés de progestérone et d'œstrogènes au même moment pouvant favoriser le développement de pyomètre. Chez une de ces chiennes, l'œstrus induit est survenu alors que la progestéronémie était supérieure à 60ng/mL, ce qui était bien supérieur au palier proposé par Trigg et al (2001), qui n'avaient pas observé de chaleurs induites quand la progestéronémie était supérieure à 5ng/mL. Chez 12 chiennes, l'œstrus

induit a entraîné ainsi des effets secondaires qui ont conduit à l'arrêt du traitement : 3 chiennes en dioestrus, 7 chiennes ayant présenté des chaleurs persistantes qui ont duré plus de 30 jours et 2 chiennes qui ont présenté une lactation persistante. Par conséquent, les chiennes implantées devraient être contrôlées 30 jours après la pose de l'implant pour s'assurer que les chaleurs induites sont bien terminées et, si non, un examen échographique du tractus génital est recommandé pour vérifier la présence ou non de kystes ovariens.

Il apparaît nécessaire de développer des alternatives pour éviter cette induction des chaleurs. Nous avons essayé plusieurs stratégies : l'utilisation de l'inhibiteur de l'aromatase anastrozole n'a pas été concluante (3 chiennes sur 3 ont présenté des chaleurs induites). Il en va de même lorsque l'anti-œstrogène clomifène a été utilisé (5 chiennes sur 8 ont présenté des chaleurs induites). De meilleurs résultats ont été obtenus avec un progestagène, l'osatéronne : 11 chiennes sur 16 n'ont pas présenté d'œstrus induit. Quelque soit le protocole utilisé cependant, nous n'avons jamais été capables de prévenir complètement l'entrée en chaleurs. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque des individus prépubères étaient implantés : aucun des 24 animaux participant à ce protocole n'a présenté d'œstrus induit.

La fréquence à laquelle ces implants doivent être utilisés reste encore à détailler pour maintenir l'effet stérilisant. Néanmoins, l'administration d'un seul implant a conduit à un effet contraceptif de moins de 180 jours chez 5 chiennes, entre 180 et 365 jours chez 15 chiennes et plus de 365 jours chez 19 chiennes.

## Abstract

The mode of action of desloréline implants (Suprelorin®4,7mg, Virbac, Carros, France) allows activation and inhibition of the estrous cycle, with both clinical applications (from estrus induction to chemical sterilization). From a scientific background however, data concerning these different uses were mainly restricted to experimental bitches (Trigg et al. 2001) and yet no clear guidelines concerning the use of this product in females has been edicted. 173 bitches (including 24 experimental beagles) were includes in 6 different experiments to assess the use of these implants from the two perspectives.

When used for estrus induction, the implant was administered during anœstrus and removed just after occurrence of ovulation (defined as progesterone level >5-6 ng/mL). All 64 bitches included in these experiments expressed an induced oestrus. For 32 of them, it occurred  $4.3 \pm 1.4$  days [2 to 7 days after] following implant administration. Anovulatory cycles were reported in 14 of these 64 bitches, but no statistical difference could be enlightened to discriminate the ones that ovulated and the ones that did not. When the implant was administered in early anoestrus, 2 out of 22 (9.1%) bitches carried their pregnancy to term while, when implanted in late anoestrus, this concerned 16 out of 23 (69.6%) bitches. Mean litter size obtained was  $6.7 \pm 3.5$  puppies. Luteal failure was suspected in 5 cases: 2 bitches were not pregnant at the time of pregnancy diagnosis and one gave birth 58 days post-ovulation as the owner refused supplementation. The two remaining bitches were supplemented with oral progesterone and gave birth normally.

These implants were also used in 109 bitches in the purpose of chemical sterilization. The clinical response was depending of the stage of the cycle. The same features than for oestrus induction were obtained when administering the treatment in anoestrus. Oestrus induction also concerned 3 out of 15 bitches implanted in diestrus. When this was observed, implants were removed, as concomitant high levels of progesterone and estrogens may favored occurrence of uterine disorders. In one of these diestrous bitches, oestrus was induced with progesterone levels >60 ng/mL, which was different from the threshold proposed by Trigg et al (2001), who did not experience oestrus induction when bitches were above 5 ng/mL. In 15 bitches, the induced oestrus lead to side effects that required to stop the treatment: 3 bitches in diestrus, 7 bitches presenting persistent heats which lasts more than 30 days and 5 bitches presenting persistent lactation. Therefore, implanted bitches should be controlled after 30 days

to ensure that heats are over and if not, ultrasound examination of the genital tract is advised to rule out the presence of ovarian cysts.

Development of medical protocols to avoid the induced oestrus may change this. We tried different strategies to prevent the occurrence of this phenomenon. The use of the aromatase inhibitor anastrozole and the anti-estrogen clomifen did not give satisfying results (3/3 induced oestrus with anastrozole, 5/8 induced oestrus with clomifen). Better results were obtained with the progestagen osaterone acetate: 11 out of 16 bitches did not express induced oestrus, but the phenomenon was not completely prevented. The best results were obtained when implanting prepubertal bitches: none of the 24 animals exhibited oestrus after implant administration.

Further data are still required to determine at which frequency the treatment should be administered in order to maintain its effect. However, with one implant administration, bitches, the contraceptive effect lasted less than 180 days in 5 bitches, between 180 and 365 days in 15 bitches and more than 365 days in 19 bitches.

## Contexte

Ce travail de thèse a été initié en septembre 2008, soit il y a maintenant un peu plus de trois ans. Lorsque nous l'avons débuté, les agonistes de la GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone), neurohormone sécrétée par l'hypothalamus et considérée comme véritable « *pace-maker* » de la fonction de reproduction, n'étaient que rarement utilisés en pratique vétérinaire et en particulier les applications dans l'espèce canine étaient restreintes. Chez les carnivores domestiques, leur principale utilisation – quoique somme toute peu répandue – s'inscrivait de façon quasi-exclusive dans le cadre du diagnostic, via la réalisation de « tests de stimulation » (visant à déterminer, après une stimulation hypophysaire, la réponse hormonale gonadique).

Pourtant, dans le domaine de la reproduction clinique, ces molécules pouvaient se révéler intéressantes. En effet, leur effet agoniste stimule dans un premier temps la sécrétion hypophysaire de gonadotrophines, « activant » donc le fonctionnement gonadique, alors que dans un second temps, leur administration sur le long terme entraîne un arrêt de ces mêmes sécrétions hypophysaires, conduisant alors à une véritable stérilisation chimique (Trigg et al. 2001). De cette dualité d'action pouvait découler foule d'applications médicales, en particulier pour le contrôle de la reproduction aussi bien mâle que femelle.

Dès le début des années 80 sont parues dans l'espèce canine plusieurs études qui ont mis en exergue ce fabuleux potentiel (Vickery et al. 1982, Vickery et al. 1984, Vickery et al. 1985). Mais la plupart d'entre elles utilisaient en fait le chien comme modèle animal de maladies humaines, notamment vis-à-vis des pathologies prostatiques. Si des données intéressantes avaient ainsi été produites, les retombées de celles-ci en médecine vétérinaire courante s'avéraient plutôt limitées du fait de l'usage de formes injectables à courte durée de vie. L'induction des chaleurs chez la chienne était obtenue à l'aide de pompes à infusion délivrant un pulse de GnRH toutes les 90 minutes par voie intraveineuse (Vanderlip et al. 1987, Cain et al. 1989): leur emploi était ainsi fortement limité par les formes galéniques disponibles. L'usage des agonistes de la GnRH semblait alors restreint au domaine expérimental.

Pourtant, l'avènement de nouvelles formes galéniques allait ouvrir de nouvelles perspectives. Des implants sous-cutanés, permettant la délivrance quotidienne de ces molécules, ont été développés pour une utilisation chez les mammifères. Chez le chien, les premières études sont parues ainsi au début des années 2000 et concernaient la stérilisation chimique chez le chien mâle (Trigg et al. 2001, Junaidi et al. 2003). C'est sous cette indication qu'ont été

commercialisées, en médecine vétérinaire, ces formes galéniques. En France, la mise sur le marché d'un implant d'agoniste de la GnRH a eu lieu en 2009 (Suprelorin®4.7mg, Virbac, Carros, France).

Et si l'utilisation chez le chien mâle avait fait l'objet de nombreuses publications, l'utilisation d'implants d'agoniste de la GnRH avait été bien moins documentée chez la femelle. Ces données se limitaient principalement à des chiennes d'expérimentation (essentiellement des animaux de race Beagle) (Kutzler et al. 2002, Volkmann et al. 2006a, Volkmann et al. 2006b). Or l'espèce canine est celle qui dans le règne animal présente la plus grande variabilité staturale : un Chihuahua pèse 1.5kg (taille au garrot entre 16 et 22cm) alors que des Mastiff atteindront plus de plus de 100kg à l'âge adulte (plus de 70cm au garrot) L'efficacité des implants pourrait donc varier en fonction de la race. L'objectif de notre travail était donc d'évaluer l'intérêt d'un agoniste de la GnRH à libération contrôlée (sous forme d'implants) dans le contrôle de l'activité ovarienne de la chienne. Nos études ont porté sur deux grandes indications : l'induction des chaleurs et ses conséquences sur la fertilité (via l'effet agoniste initial), et l'effet contraceptif (via la désensibilisation hypophysaire secondaire). De notre travail découlent également à ce jour deux articles scientifiques (Fontaine et al. 2011, Fontaine et al. 2009b) ainsi que trois autres articles de vulgarisation visant à faire connaître aux vétérinaires les possibilités et les alternatives qui s'offrent à eux via l'utilisation de ces implants (Fontaine 2009, 2010, 2011).

Ce travail, mené au sein de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, pose les jalons d'une utilisation raisonnée de ces molécules en pratique vétérinaire courante.

# **GnRH et contrôle endocrinien de la fertilité**

## 1. Introduction

L'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique consiste en un enchevêtrement de tissus nerveux et endocriniens interconnectés : c'est via ce système hautement intégré qu'est aujourd'hui régulée la fertilité. Son organisation a été conservée au cours de l'évolution puisque les mêmes bases se retrouvent aussi bien chez les oiseaux, reptiles, poissons et mammifères. Les cellules gonadotrophes de l'antéhypophyse occupent un rôle central au sein de ce système, représentant « les intermédiaires » indispensables entre le signal transmis par l'hypothalamus via la neurohormone GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone) et la production des hormones stéroïdes sexuelles par les gonades. Une des caractéristiques de ces cellules est qu'elles expriment sur leur membrane externe des récepteurs à la GnRH : la transduction du signal issu de la liaison de la GnRH sur ces récepteurs extramembranaires induit une cascade de réactions intracellulaires, régulant ainsi la réponse physiologique à la stimulation hypothalamique. Cette stimulation influence la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicle Stimulating Hormone), qui influenceront par la suite à leur tour la synthèse des stéroïdes sexuels gonadiques. Aussi, d'un point de vue aussi bien fonctionnel qu'anatomique, le récepteur à la GnRH et les systèmes de transduction intracellulaire du signal qui lui sont associés constituent l'interface fondamentale entre les composantes neurologiques et endocrines de ce système neuroendocrinien.

Les différentes réponses intracellulaires qui peuvent être obtenues constituent les bases biochimiques par lesquelles les cellules délivrent une réponse biologique spécifique et appropriée à une grande variabilité de signaux extra et intracellulaires. La compréhension et la possibilité de contrôler ces différentes voies de signalisation représentent aujourd'hui des intérêts majeurs, aussi bien d'un point de vue scientifique que thérapeutique. De nombreux travaux se sont donc penchés durant ces 20 dernières années sur la compréhension du mécanisme d'action de la GnRH, générant un nombre important de données sur la nature des événements qui se déroulent dans la cellule gonadotrope ainsi que sur leur cinétique. Pour bien comprendre ces mécanismes moléculaires, il est important de comprendre les fonctions intracellulaires activées *in vivo* par la GnRH et comment celles-ci influencent par la suite la fertilité. Nous allons donc ici nous attarder à décrire le système hypothalamo-hypophyso-gonadique chez les mammifères, en mettant en exergue les mécanismes intracellulaires induits par la GnRH et comment ils modifient l'expression des gènes au sein de la cellule gonadotrope dans un cadre physiologique.

## 2. L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique

### 2.1 Organisation fonctionnelle de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique chez les mammifères.

Classiquement, ce système est généralement présenté sous forme linéaire comme une organisation de tissus endocriniens dédiés à la régulation et au soutien de la fonction de reproduction (voir Figure 1).

Cet axe est ainsi constitué d'une population de neurones hypothalamiques qui sécrètent le décapeptide GnRH, des cellules gonadotropes de l'antéhypophyse et des gonades.

L'activation de ce système endocrinien commence par la sécrétion pulsatile de la GnRH par l'hypothalamus. La GnRH est délivrée aux cellules de l'antéhypophyse via le système porte hypothalamo-hypophysaire. La GnRH se lie ensuite aux récepteurs situés sur la membrane externe des cellules gonadotropes, modulant ainsi la sécrétion des gonadotrophines FSH et LH. Ces gonadotrophines sont des hormones dimériques, constituées d'une sous-unité  $\beta$  spécifique couplée à une sous-unité  $\alpha$  commune aux deux hormones. L'expression des gènes codant pour les sous-unités  $\beta$  de la FSH et de la LH, ainsi que la sous-unité  $\alpha$  et le récepteur à la GnRH, représentent un élément essentiel de la réponse des cellules gonadotropes à la stimulation par la GnRH.

Chez le mâle, la LH stimule la production de testostérone et de l'Androgen Binding Protein respectivement par les cellules de Leydig et de Sertoli. Chez la femelle, la LH stimule la production d'androgènes par les cellules de la thèque entourant le follicule ovarien en développement. Durant la partie terminale de la folliculogénèse, la LH stimule également la synthèse de progestérone par les cellules de la granulosa des follicules pré-ovulatoires. La FSH quant à elle se lie aux récepteurs situés à la surface des cellules de la granulosa et stimule l'expression des aromatasés, enzymes qui convertissent les androgènes produits par les cellules de la thèque en œstradiol. Chez le mâle, la FSH se lie aux récepteurs situés sur la surface des cellules de Sertoli et fonctionne de concert avec la testostérone pour permettre la prolifération des spermatogonies ainsi que le développement des cellules germinales.

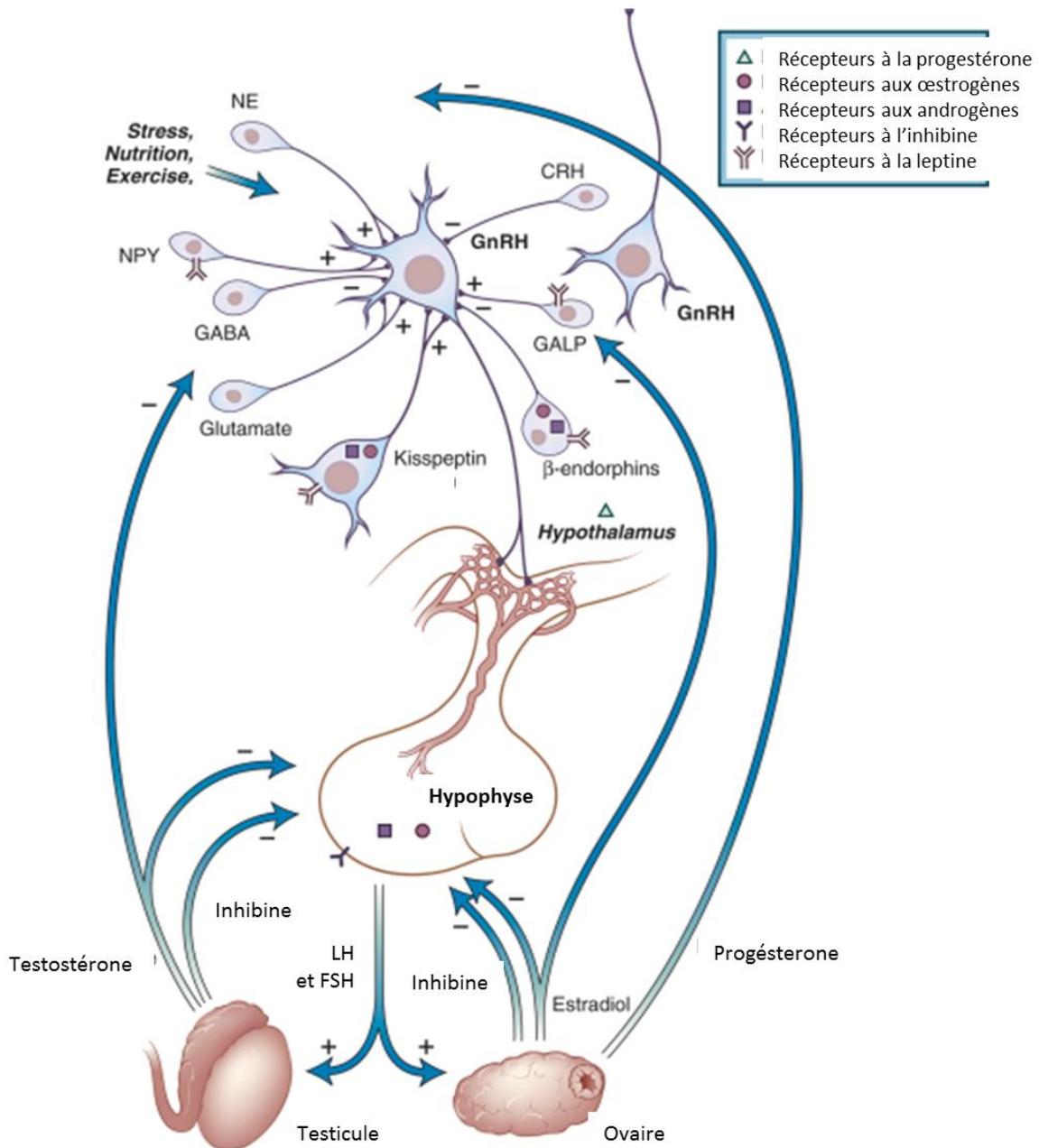


Figure 1 : Organisation générale de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez les mammifères et représentation schématisée des différents systèmes régulant la sécrétion de GnRH et le rétrocontrôle des hormones gonadiques au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. CRH, Corticotropin-releasing hormone; FSH, follicle-stimulating hormone; GABA, acide  $\gamma$ -aminobutyrique; GALP, galanin-like peptide; LH, luteinizing hormone; NPY, neuropeptide Y (source Internet).

### 2.3 Sécrétion hypothalamique de la GnRH

La synthèse de la GnRH par l'hypothalamus est un phénomène pulsatile, et cette pulsativité est l'élément clé influençant la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires. Cette importance a d'ailleurs été démontrée en 1978 dans des expériences sur des singes Rhésus sur lesquels une ablation chirurgicale de la population hypothalamique de neurones à GnRH avait volontairement été pratiquée. Une administration continue de GnRH exogène à ces animaux avait alors conduit à une diminution de la production de gonadotrophines et à un hypogonadisme, alors qu'une administration pulsatile toutes les heures avait restauré la fonction gonadique et la cyclicité. Ce sont ces propriétés qui sont notamment exploitées en thérapeutique lors de l'utilisation d'agonistes de la GnRH (Bliss et al. 2010).

Amplitude et fréquence des pulses de la GnRH sont régulés de façon précise et chez la femelle, varient de façon importante au cours du cycle sexuel. Il a été montré que des pulses rapides de GnRH stimulaient la synthèse de la sous-unité  $\alpha$  et LH- $\beta$ , alors qu'une pulsativité plus faible favorisait la production de FSH- $\beta$  (voir Figure 2). Des différences dans la fréquence des pulses affectent ainsi directement la cinétique de production des gonadotrophines, une fréquence plus importante étant liée à une sécrétion sélective de LH alors qu'une fréquence plus tonique et consistante favorise la sécrétion de FSH. La réponse des cellules gonadotropes aux changements de la pulsativité de la sécrétion de GnRH est un paramètre critique pour générer le pic préovulatoire de LH chez la femelle.

Au contraire chez le mâle, il semble que cette régulation joue un rôle moindre dans le contrôle de la fonction de reproduction. Cette différence semble s'établir très tôt durant l'embryogénèse chez les mammifères, conséquence d'une exposition aux androgènes (Bliss et al. 2010).

### 2.4 Rétrocontrôles régulant le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique

L'axe hypothalamo-hypophysogonadique est sujet à la fois à des rétrocontrôles positifs et négatifs, et ce à plusieurs niveaux. On pense aujourd'hui qu'il existe une structure centrale, qui se situerait dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus, dont l'activité est capable de contrôler le rythme de sécrétion de la GnRH. Il est cependant intéressant de noter que certaines études faites sur des neurones hypothalamiques cultivés *in vitro* suggèrent que les neurones seraient capables de réguler par eux-mêmes leur activité sécrétoire (Bliss et al. 2010).

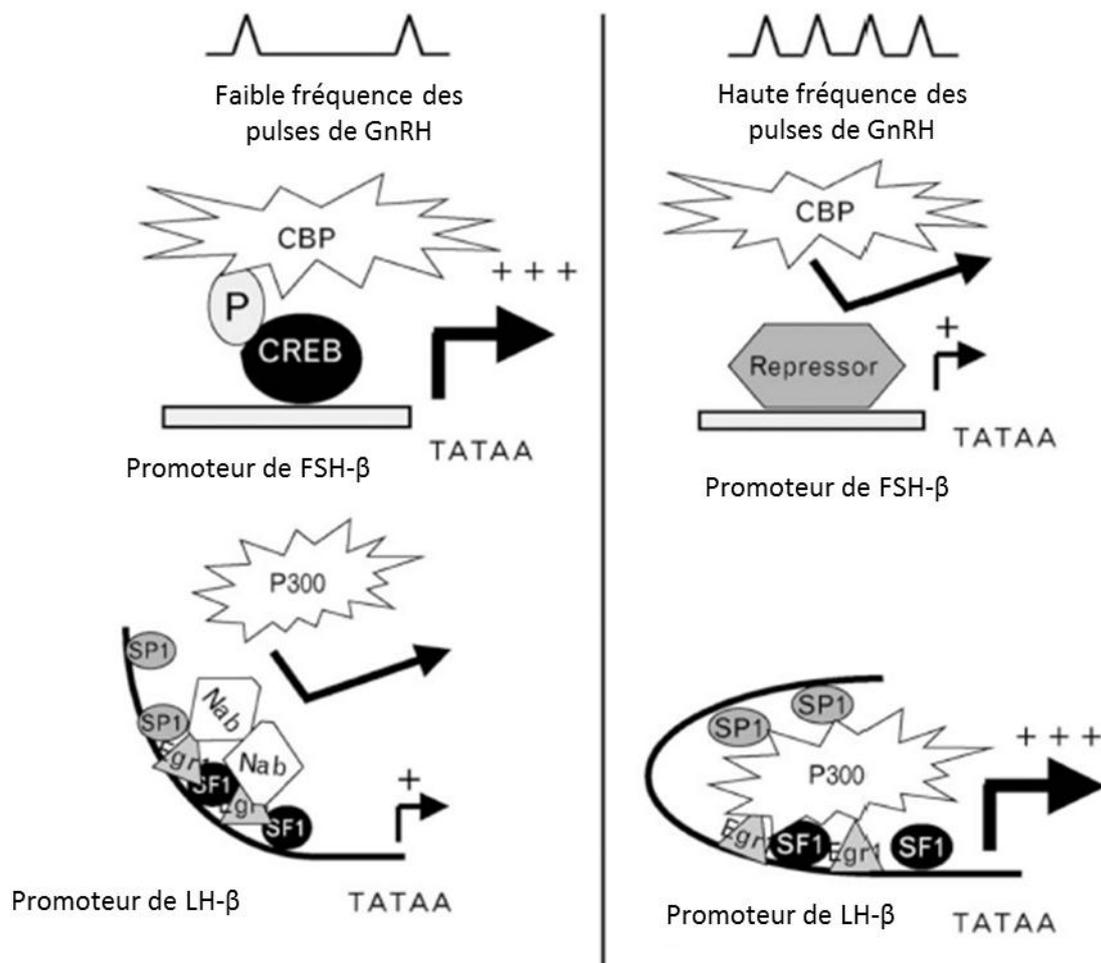


Fig 2 : La transcription de la sous-unité  $\beta$  des gonadotrophines est influencée par la fréquence des pulses de GnRH à travers le recrutement d'histones acetyl-transferase (HATs) et par l'induction ou la modification de différents facteurs de transcription (Ciccone et Kaiser 2009).

Dans certains cas, les neurones à la GnRH semblent même capables de réguler leur sécrétion par eux-mêmes, sans qu'un contact intercellulaire direct ne soit nécessaire. Ils présentent en effet à leur surface des récepteurs à la GnRH, couplés à différentes protéines G : de faibles doses de GnRH peuvent ainsi exercer un rétrocontrôle positif autocrine et paracrine sur la sécrétion de GnRH en elle-même, par une activation des récepteurs à la GnRH et une augmentation des niveaux intracellulaires en AMPc (voir Figures 3). Ce rétrocontrôle positif est renforcé dans un premier temps par l'augmentation de la sécrétion de GnRH, conduisant à une augmentation des niveaux intracellulaires en calcium. Quand la concentration en GnRH atteint cependant un palier suffisamment élevé, des voies de signalisation inhibitrice sont alors activées conduisant à un rétrocontrôle négatif et une suppression de cette activité sécrétoire (Bliss et al. 2010).

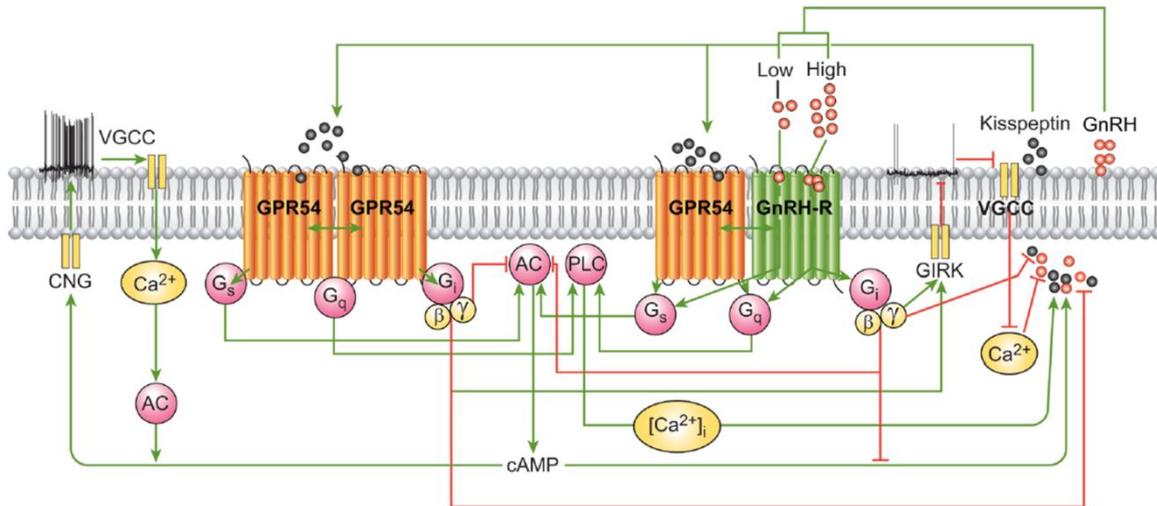
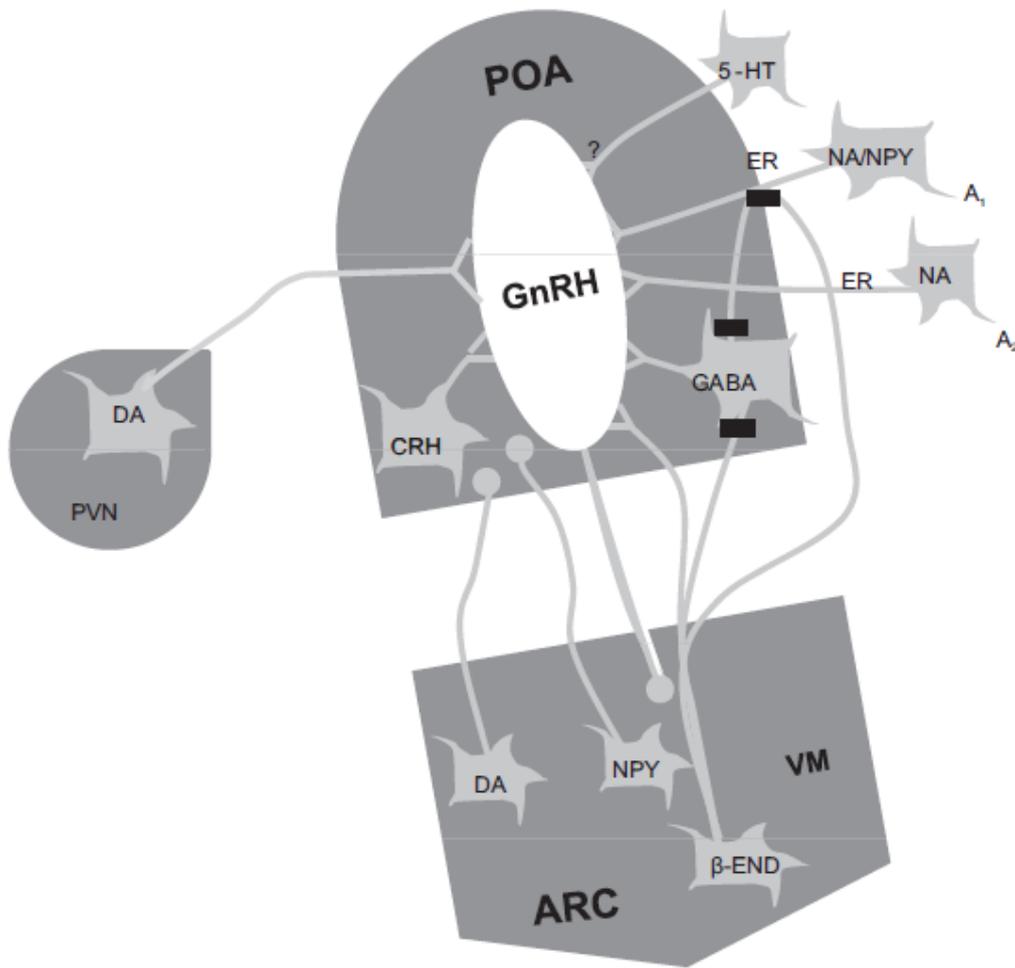


Fig 3: Homo et hetero-oligomérisation des récepteurs couplés à une protéine G dans le neurone à GnRH (Kramanovic et al. 2009).

L'expression des ARNm codant pour le kisspeptine et le GPR54 dans les neurones à GnRH de l'hypothalamus et l'hétéro-oligomérisation du récepteur à la GnRH (GnRH-R) et de GPR54 indique que les deux récepteurs sont impliqués dans la régulation de la fonction du neurone à GnRH (AC=Adenylate Cyclase/PLC=Phospho Lipase C/GIRK=G Protein Coupled Receptor Kinase/VGCC=Voltage Gated Calcium Channel/CNG=Calcium Channel).

Il est donc admis que la pulsativité des neurones à la GnRH représente une caractéristique cellulaire inhérente. Cependant, comment sont contrôlées *in vivo* les oscillations rencontrées dans la sécrétion de GnRH est quelque chose qu'il reste encore à éclaircir. L'activité de ces neurones est en fait modulée par une multitude d'autres facteurs, incluant la photopériode, le stress, le statut métabolique et nutritionnel ainsi qu'un nombre varié de neuromédiateurs. Le système nerveux central intègre ainsi constamment une vaste variété d'informations environnementales et physiologiques, et les traduit en une réponse coordonnée qui influence

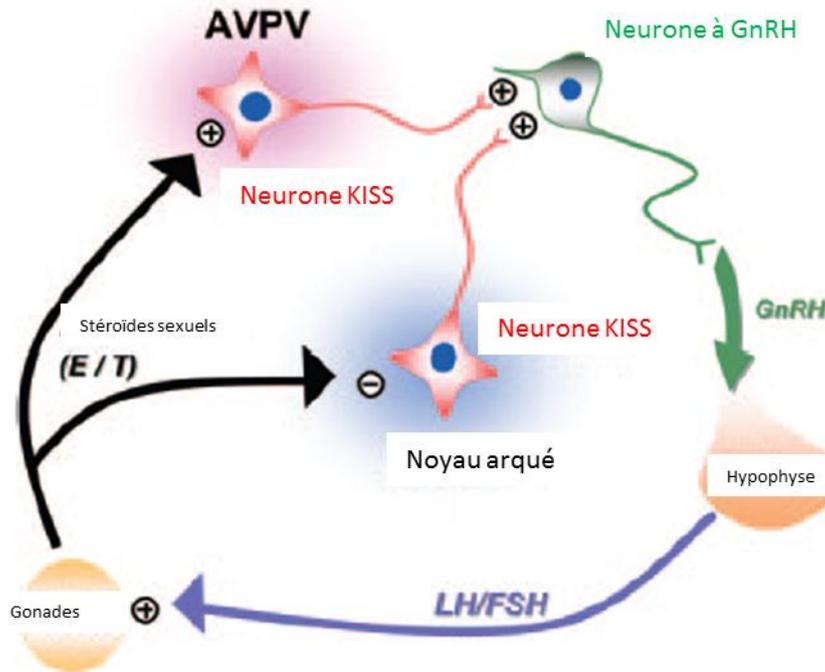
la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus (voir Figure 4).



*Figure 4: Régulation des neurones à la GnRH dans la région préoptique du cerveau (Ciechanowska et al. 2010)*

*ARC : noyau arqué ; CRH : neurones corticotropes ; DA : neurones dopaminergiques ; ER : récepteurs à l'oestradiol ; GABA : neurones à acide γaminobutyrique ; 5-HT : neurones à sérotonine ; NA : neurones à noradrénaline ; NA/NPY : neurones à noradrénaline et neuropeptide Y ; NPY : neurones à neuropeptide Y de l'hypothalamus ventromédial ; β-END : β-endorphine ; POA : région préoptique ; PVN : noyau périventriculaire ; VM : noyau ventromédial*

Le rôle des kisspeptines, neurohormones identifiées en 2003, semble être un élément important modulant la pulsativité de la sécrétion de la GnRH (voir Figure 5).



*Fig 5 : Les kisspeptines stimulent le système neuroendocrinien de la fonction de reproduction, et les stéroïdes sexuels régulent de façon différentielle son fonctionnement. Les kisspeptines sécrétés par les neurones du noyau antéroventriculaire préventriculaire (AVPV) et du noyau arqué stimulent la sécrétion de GnRH. La sécrétion des gonadotrophines hypophysaires qui en résulte régule par la suite l'activité des neurones KISS (Dungan et al. 2006).*

La sécrétion d'hormones stéroïdes joue aussi un rôle important dans les rétrocontrôles impliqués dans le fonctionnement de cette structure (voir Figure 6). Chez le mâle, la testostérone exerce un rétrocontrôle négatif primaire sur la sécrétion de GnRH par l'hypothalamus. Cependant, des analyses immunohistochimiques chez le bélier suggère que, au moins dans cette espèce, les neurones à GnRH n'expriment pas de récepteurs aux androgènes. Aussi les effets de la testostérone semblent-ils être médiés par une population de neurones situés en amont, qui incluent vraisemblablement les neurones à kisspeptine (Bliss et al. 2010).

Chez la femelle, le rétrocontrôle initié par les stéroïdes gonadiques est beaucoup plus complexe et varie en fonction des espèces et du stade du cycle. Des études chez le rat indiquent que les œstrogènes sont capables d'inhiber l'expression de la GnRH dans l'hypothalamus, et que cet effet est plus prononcé durant la phase folliculaire. Cet effet inhibiteur direct sur le neurone à GnRH est médié par l'isoforme  $\beta$  du récepteur aux œstrogènes (ER $\beta$ ). Au contraire, durant la période préovulatoire, les œstrogènes, et ce aussi bien sur l'hypophyse que sur l'hypothalamus, conduisent à un rétrocontrôle positif, et la

compréhension de ce mécanisme a conduit à établir le modèle de sécrétion périodique de la GnRH, qui se décompose en trois phases : activation, transmission puis pic préovulatoire. On sait aujourd'hui que la phase d'activation implique un effet positif indirect des œstrogènes sur la production hypothalamique, médié par ER $\alpha$  exprimé par les neurones à kisspeptine. L'augmentation des sécrétions en œstrogènes durant le milieu à la fin de la phase folliculaire conduit à une augmentation de la synthèse de kisspeptines dans ces neurones. Une stimulation directe des neurones à la GnRH par les kisspeptines à travers le récepteur KISS 1R (phase de transmission) va ensuite conduire en retour à une augmentation rapide et significative de la sécrétion de GnRH (phase de pic), dont le point culminant sera le relargage massif en période préovulatoire de LH par l'hypophyse, ce qui conduira alors à l'ovulation.

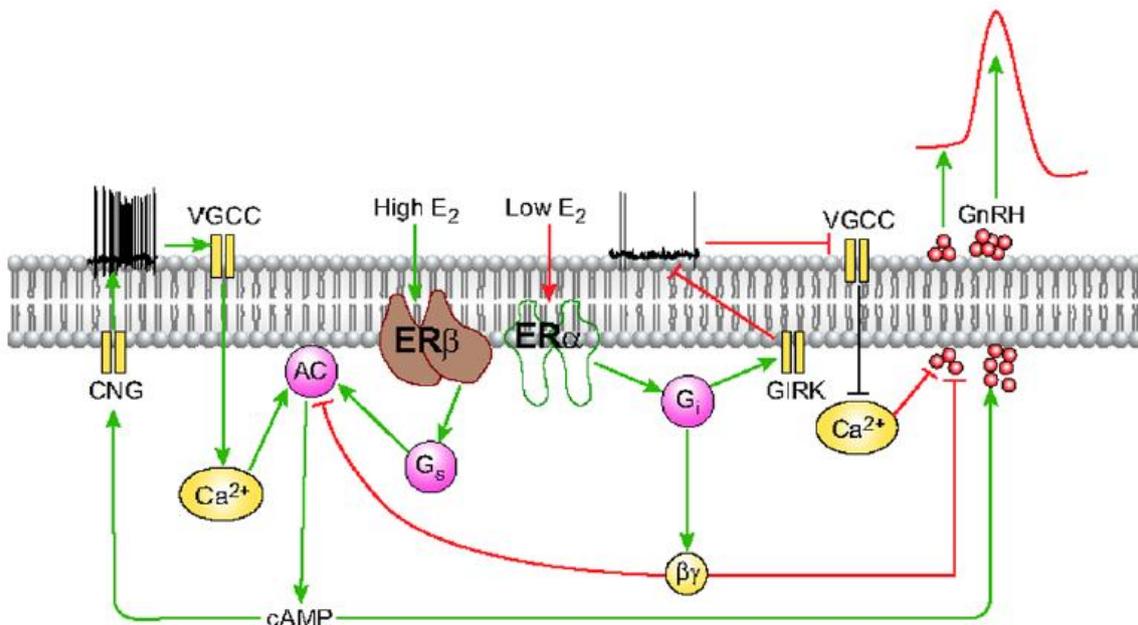


Fig 6: Expression des récepteurs aux œstrogènes (ER) dans les neurones à GnRH de l'hypothalamus et signalisation cellulaire suite à leur activation (Kramanovic et al. 2009). AC=Adenylate Cyclase/PLC=Phospho Lipase C/GIRK=G Protein Coupled Receptor Kinase/VGCC=Voltage Gated Calcium Channel/CNG=Calcium Channel

En plus du rôle des œstrogènes, la progestérone semble elle aussi exercer un rôle complexe en termes de régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Le rétrocontrôle négatif de la progestérone sur la synthèse hypothalamique de GnRH durant la phase lutéale est aujourd'hui bien établi et joue un rôle important en limitant les effets potentiels des œstrogènes sécrétés pendant la phase lutéale. Ce rétrocontrôle négatif peut cependant

s'exercer soit durant la phase d'activation, soit durant la phase de transmission du cycle de sécrétion de la GnRH, et les neurones à kisspeptine apparaissent là encore comme la principale cible du mode d'action de la progestérone dans ce contexte. Des résultats récents semblent également indiqués que la progestérone exerce un rétrocontrôle négatif à travers l'activation rapide d'un récepteur membranaire à la progestérone, impliquant des événements de signalisation au niveau de la membrane plasmique des neurones à GnRH comme possibles éléments régulateurs de la phase de pic. La progestérone peut cependant également avoir un effet positif. Des études avaient démontré chez le rat l'importance de l'activation des récepteurs à la progestérone pour obtenir le pic préovulatoire de GnRH, et chez le mouton, il a été montré que l'administration de progestérone exogène préparait la réponse hypothalamique, conduisant à des concentrations préovulatoires plus élevées en GnRH chez des animaux ainsi traités (Bliss et al. 2010).

Des travaux récents ont souligné le rôle que pourraient jouer les astrocytes, fonctionnant comme une source hypothalamique de progestérone qui faciliterait l'occurrence du pic de GnRH. La synthèse de progestérone par les astrocytes est elle-même positivement influencée par les œstrogènes. Cette régulation implique une activation rapide de récepteurs ER $\alpha$  membranaires. Le récepteur à la progestérone lui-même peut être activé par les œstrogènes dans certaines cellules hypothalamiques, et ainsi exercer un effet positif sur la sécrétion de GnRH de façon ligand-dépendante.

En plus des stéroïdes gonadiques, les hormones peptidiques inhibine, activine et follistatine jouent un rôle important dans les rétrocontrôles régulant le fonctionnement de la cellule gonadotrope, aussi bien au niveau gonadique que de façon paracrine (voir Figure 7).

L'inhibine est une glycoprotéine dimérique consistant en une sous-unité  $\alpha$  commune et une sous-unité  $\beta$  spécifique. Deux sous-unités  $\beta$  (désignées comme  $\beta A$  et  $\beta B$ ) sont identifiées et du coup, il existe deux types d'inhibines, dimères  $\alpha\beta A$  et  $\alpha\beta B$ . Les activines sont quant à elles des hormones constituées de dimères de sous-unités  $\beta$  de l'inhibine, il y a donc 3 types d'activines  $\beta A\beta A$ ,  $\beta B\beta B$  et  $\beta A\beta B$ , désignées sous le terme activine A, B et AB. La follistatine est une protéine indépendante modulant la bioactivité des dimères d'activine. Inhibines, activines et follistatines ont été à l'origine isolées et purifiées à partir de tissus gonadiques. Cependant, on sait aujourd'hui qu'ils se retrouvent à tous les niveaux de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, aussi bien que dans d'autres tissus comme le foie ou le cerveau. Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta B$  de l'inhibine/activine ainsi que la follistatine sont exprimés dans l'hypophyse, et alors que l'activine B et la follistatine sont impliquées dans des mécanismes

de régulation paracrine de la fonction gonadotrope, les gonades semblent constituer la source prédominante d'inhibine bioactive.

Les inhibines et activines font partie de la famille des TGF $\beta$ , et se lient au récepteur de type II à l'activine, un récepteur transmembranaire avec une activité sérine-thréonine kinase. La liaison de l'activine aux récepteurs de type II conduit au recrutement de récepteurs de type I et à l'activation d'un complexe récepteur-ligand hétérodimérique. A l'inverse, la liaison de l'inhibine aux récepteurs de type II préviendra aussi bien l'interaction du récepteur de type II avec l'activine ainsi que la dimérisation du récepteur. L'inhibine fonctionne ainsi comme un inhibiteur compétitif de l'activine. La follistatine se lie à l'activine dans le compartiment extracellulaire et neutralise son activité en empêchant l'interaction avec le récepteur.

Le système inhibine-activine-follistatine permet dans un premier temps de moduler la production de FSH par les cellules gonadotropes. Cependant cette modulation se produit à plusieurs niveaux. Certains travaux suggèrent actuellement que l'activine A et la follistatine pourrait agir de façon autocrine ou paracrine au niveau hypothalamique et réguler ainsi la sécrétion de GnRH. Les cellules gonadotropes quant à elles portent le récepteur à l'activine, et celle-ci peut potentiellement stimuler l'expression de FSH dans ces cellules en conjonction avec la GnRH.

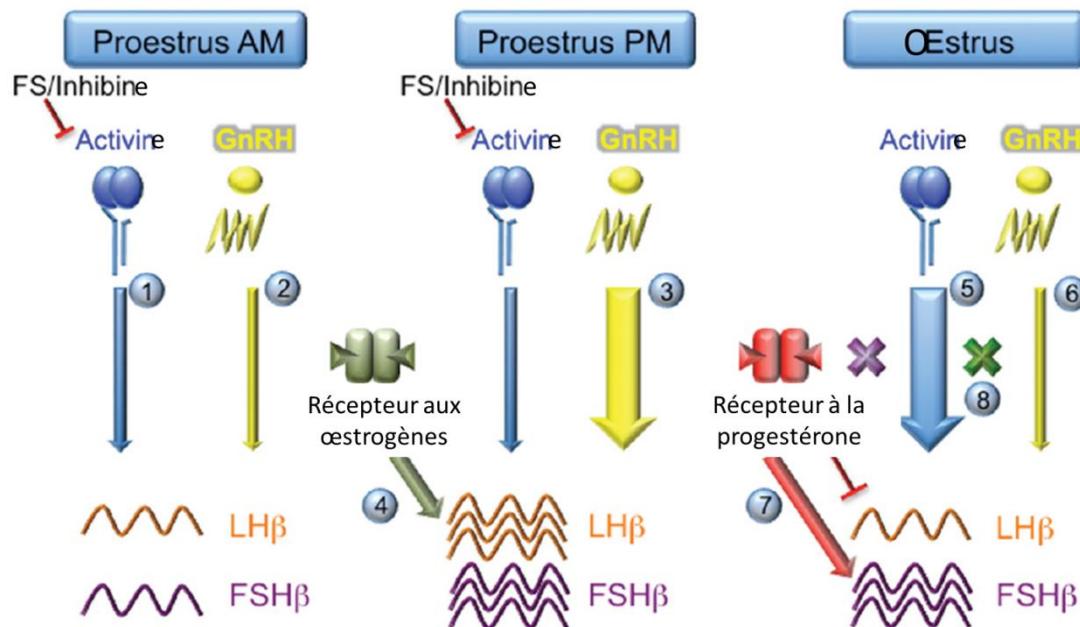


Fig 7: Régulation différentielle de la synthèse de LH et FSH dans les cellules gonadotrophes hypophysaires (Thackray et al. 2010) :

Le matin du pro-oestrus, la signalisation de l'activine est réduite due aux concentrations élevées d'inhibiteurs comme la follistatine (FS) et l'inhibine (1). La signalisation de la GnRH est aussi mise sous silence, d'où des concentrations faibles d'ARNm codant pour LH- $\beta$  et FSH- $\beta$  (2). Dans l'après-midi du pro-oestrus, les pulses de GnRH et leur amplitude augmentent de façon importante juste avant l'ovulation, conduisant à une augmentation de la transcription des ARNm codant pour LH- $\beta$  et FSH- $\beta$  (3). Les oestrogènes pourraient jouer un rôle direct en induisant l'expression du gène pour LH- $\beta$  (4). Pendant l'oestrus, les niveaux d'activine biodisponible augmentent à cause d'une réduction des niveaux de follistatine et d'inhibine, conduisant à une augmentation de la concentration des ARNm codant pour FSH- $\beta$  (5). Dans le même temps, il y a une baisse de la pulsatilité de la GnRH, qui favorise la transcription de FSH- $\beta$ , directement et indirectement via la réduction de l'induction de la follistatine (6). De plus, l'action de la progestérone conduit à une induction de FSH- $\beta$  mais à une suppression de l'expression de LH- $\beta$  (7). Finalement, une action synergique entre les voies de signalisation de l'activine et de la GnRH ou de la progestérone augmentent l'action positive de ces hormones sur la transcription de FSH- $\beta$  (8), participant ainsi à la régulation du second pic de FSH.

### 3. Bases moléculaires à la réponse de la cellule gonadotrophe à la GnRH

#### 3.1 Aspects structurels et fonctionnels du récepteur à la GnRH

Le récepteur à la GnRH (voir Figure 8) fait partie de la superfamille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (GPCR). Trois formes ont été identifiées chez les vertébrés et désignées comme type I, II et III. Trois formes correspondantes de GnRH ont également été

identifiées. Le récepteur de type I est la forme prédominante retrouvée dans les cellules gonadotropes, et chez certains vertébrés comme l'espèce humaine, est aussi retrouvé dans des tissus extra-hypophysaires (glande mammaire, gonades, prostate, utérus). Le ligand naturel pour ce récepteur de type I est la GnRH de type I, même s'il a été montré que les GnRH de type II et III peuvent aussi activer le récepteur de type I.

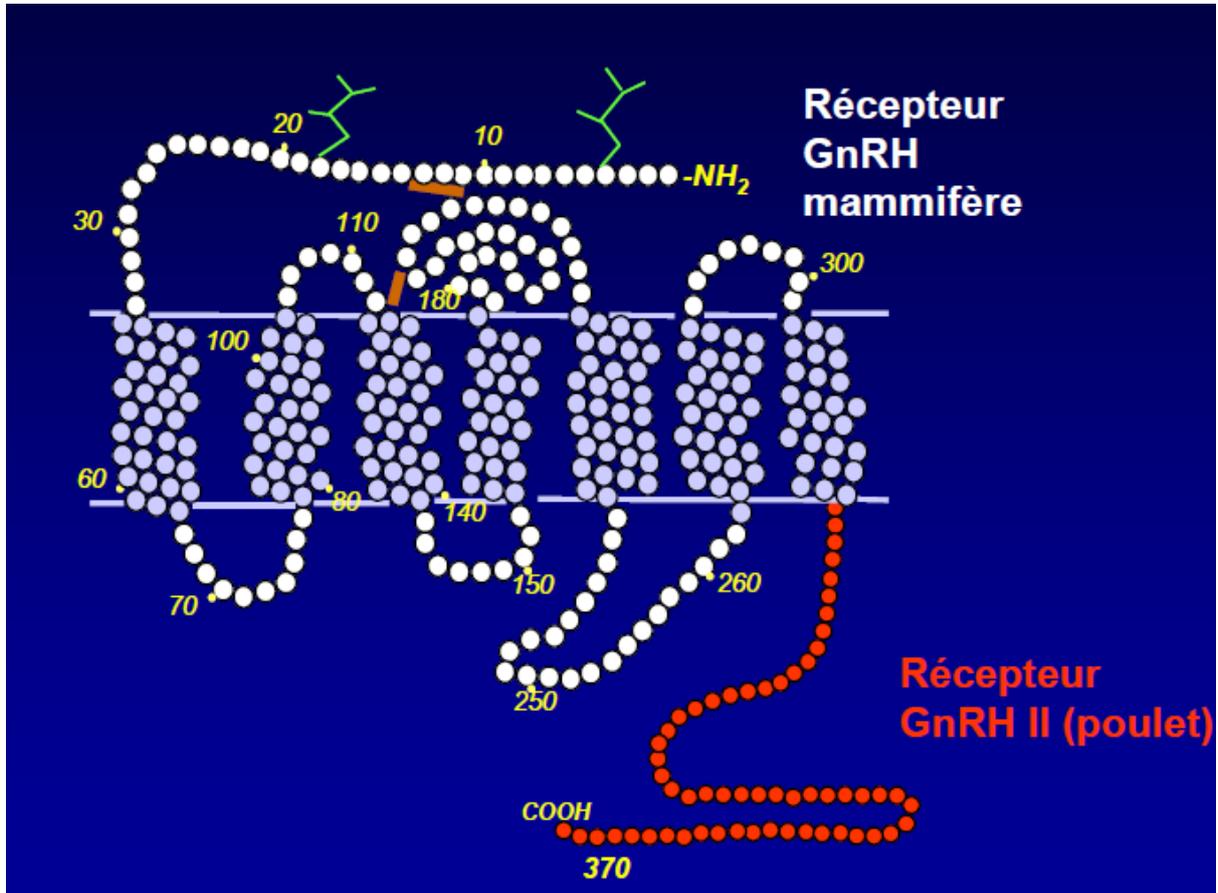


Fig 8 : Récepteur GnRH des mammifères vs récepteur GnRH II (Counis, cours de M2).

A la différence du récepteur GnRH II comme rencontré chez le poulet, le récepteur à la GnRH des mammifères ne possède pas la partie C-terminale intracellulaire, ce qui en fait un membre à part de la superfamille des GPCR.

Le récepteur de type I à la GnRH a été cloné pour la première fois en 1992, et des expériences réalisées plus tard dans l'espèce humaine et chez le rat, le mouton, le porc et le cheval ont démontré que ce récepteur était hautement conservé dans le règne animal, avec plus de 80% d'homologie chez les différentes espèces mammifères. Ce récepteur est ainsi constitué de 327 (328 dans d'autres espèces dont l'être humain) acides aminés et présente 7 domaines transmembranaires et une extrémité N-terminale extracellulaire représentant 35 acides aminés

et comprenant deux sites de glycosylation. L'absence de domaine intracytoplasmique fait du récepteur de type I à la GnRH un membre unique de la famille des GPCR. La queue C-terminale de ces récepteurs est en effet un site important de phosphorylation, phénomène typiquement médié par une protéine G couplé à une kinase. La phosphorylation de cette queue C-terminale est en fait le support de la désensibilisation du récepteur et de son internalisation. Ceci n'est cependant pas le cas lorsque l'on considère le récepteur de type I à la GnRH, du fait de l'absence de ce domaine C-terminal intracytoplasmique.

### 3.2 Transduction du signal induit par la GnRH dans la cellule gonadotrope

Comme pour les autres GPCR, la fixation de la GnRH à son récepteur va entraîner un changement de conformation de celui-ci, qui conduit à une dissociation et une activation d'une protéine G hétérotrimérique, qui, dans la cellule gonadotrope, implique généralement la sous-unité  $G\alpha_{q/11}$ .

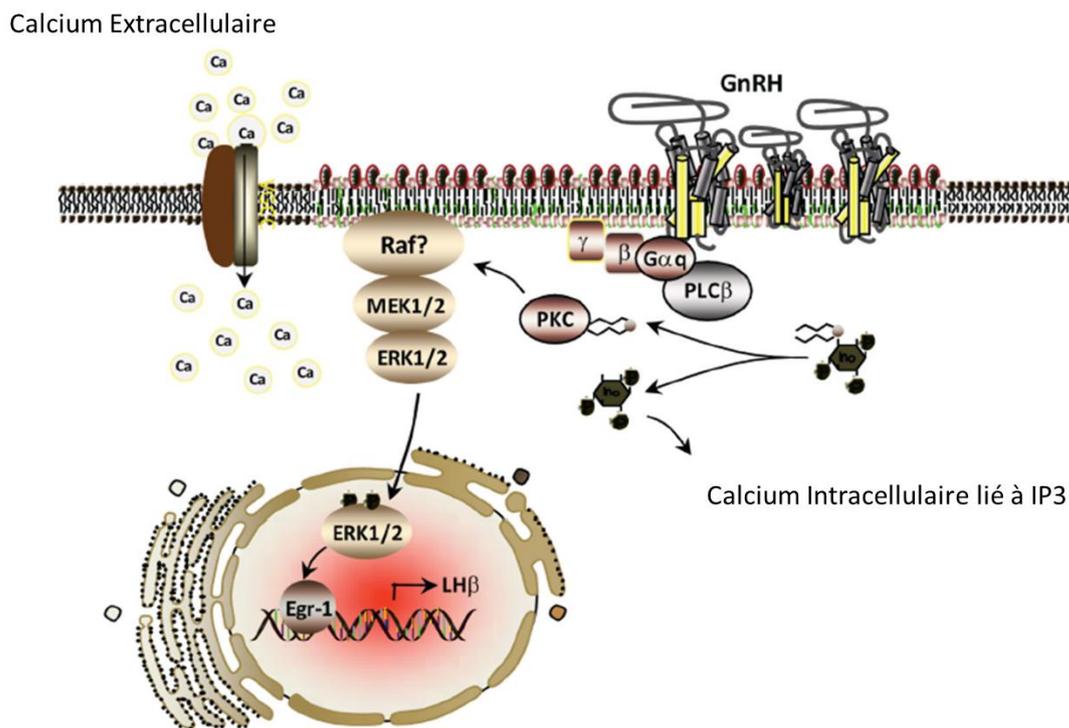


Fig 9: Signalisation intracellulaire suite à l'activation des récepteurs à la GnRH dans la cellule hypophysaire gonadotrope (Bliss et al. 2010).

Dans la cellule gonadotrope, la fixation de GTP sur  $G\alpha_{q/11}$  va conduire à l'activation de la phospholipase PLC $\beta$  et l'élaboration de seconds messagers, phosphatidylinositol-triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG). La formation d'IP3 conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium, résultant de la libération de stocks de calcium

intracellulaires. DAG conduit à l'activation de la protéine kinase C (PKC) et contribue à soutenir l'augmentation du calcium intracellulaire, par l'activation de canaux calciques voltage dépendant. Ces évènements sont les pré-requis pour l'activation de la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ainsi qu'en particulier la voie des ERK (Extracellular signal-regulated kinase). L'organisation de base de ces voies de signalisation est similaire, consistant en fait en un système de transfert de phosphore sur plusieurs niveaux : l'activation commence par la phosphorylation d'une MAP kinase-kinase kinase (MAPKKK), qui phosphoryle et active à son tour une MAP kinase-kinase intermédiaire (MAPKK), qui à son tour active la MAP kinase terminale (MAPK). Les MAP kinases activées phosphorylent un grand nombre de substrats à travers la cellule, incluant des éléments de la machinerie transcriptionnelle, des composants de la chromatine, des structures du cytosquelette et autres enzymes intracellulaires.

#### **4. Conclusion**

Durant les deux dernières décennies, de nombreux détails expliquant le comportement du récepteur à la GnRH et l'action de la GnRH sur les cellules gonadotrophes hypophysaires ont été identifiés. Le récepteur à la GnRH est bien un membre unique de la famille des GPCR et joue un rôle central dans la régulation du fonctionnement de cette cellules.

Alors que la voie de signalisation des ERK est clairement un élément central des mécanismes de régulation de la réponse à la GnRH, cette cascade de signalisation reflète seulement une petite portion du réseau global de signalisation impliquée par un pulse de GnRH. Ces mécanismes restent encore à approfondir pour pouvoir fournir des éléments visant à offrir des solutions pharmacologiques et thérapeutiques pour inhiber ou stimuler la fertilité.

## **Analyse bibliographique :**

# **Utilisation clinique des agonistes de la GnRH chez les carnivores domestiques**

### **Travail associé :**

### **Publications:**

Fontaine E.; Fontbonne A., 2011: Clinical Use of GnRH Agonists in Canine and Feline Species. *Reprod Domest Anim*, 46 344-353.

## 1. Introduction

Synthétisée principalement dans certains neurones situés au niveau de l'aire pré-optique de l'hypothalamus (Counis et al. 2001), la GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone) est l'hormone clé de la fonction de reproduction chez les mammifères. Ce décapeptide, à la structure hautement conservée chez les vertébrés, est sécrété de façon pulsatile dans le système porte hypothalamo-hypophysaire et va alors être véhiculé jusqu'à l'hypophyse où il entraînera la libération dans la circulation systémique des gonadotrophines FSH (Follicle Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone) (Counis et al. 2001). Celles-ci agiront alors au niveau gonadique sur la production des stéroïdes sexuels (principalement testostérone chez le mâle, œstradiol et progestérone chez la femelle). Cette sécrétion pulsatile de GnRH agissant comme un véritable chef d'orchestre, l'usage de molécules analogues (agonistes ou antagonistes) permet d'intervenir sur la fonction de reproduction chez le male et chez la femelle.

Plus de 2000 de ces composés ont été développés au cours des 30 dernières années (Padula 2005). Leur usage s'est généralisé en médecine humaine mais également en médecine vétérinaire (essentiellement chez les animaux de rente cependant). L'utilisation de formes antagonistes en médecine vétérinaire se révèle compliquée : une administration quotidienne de doses importantes (chaque injection coûtant en moyenne environ 50 euros) est requise, et ces composés très hydrophobes peuvent de plus entraîner la formation de nodules au site d'injection voire même dans certains cas des réactions allergiques. Elle est donc de ce fait peu documentée chez le chien et le chat (Gobello 2007). A l'inverse, les formes agonistes ont été largement développées.

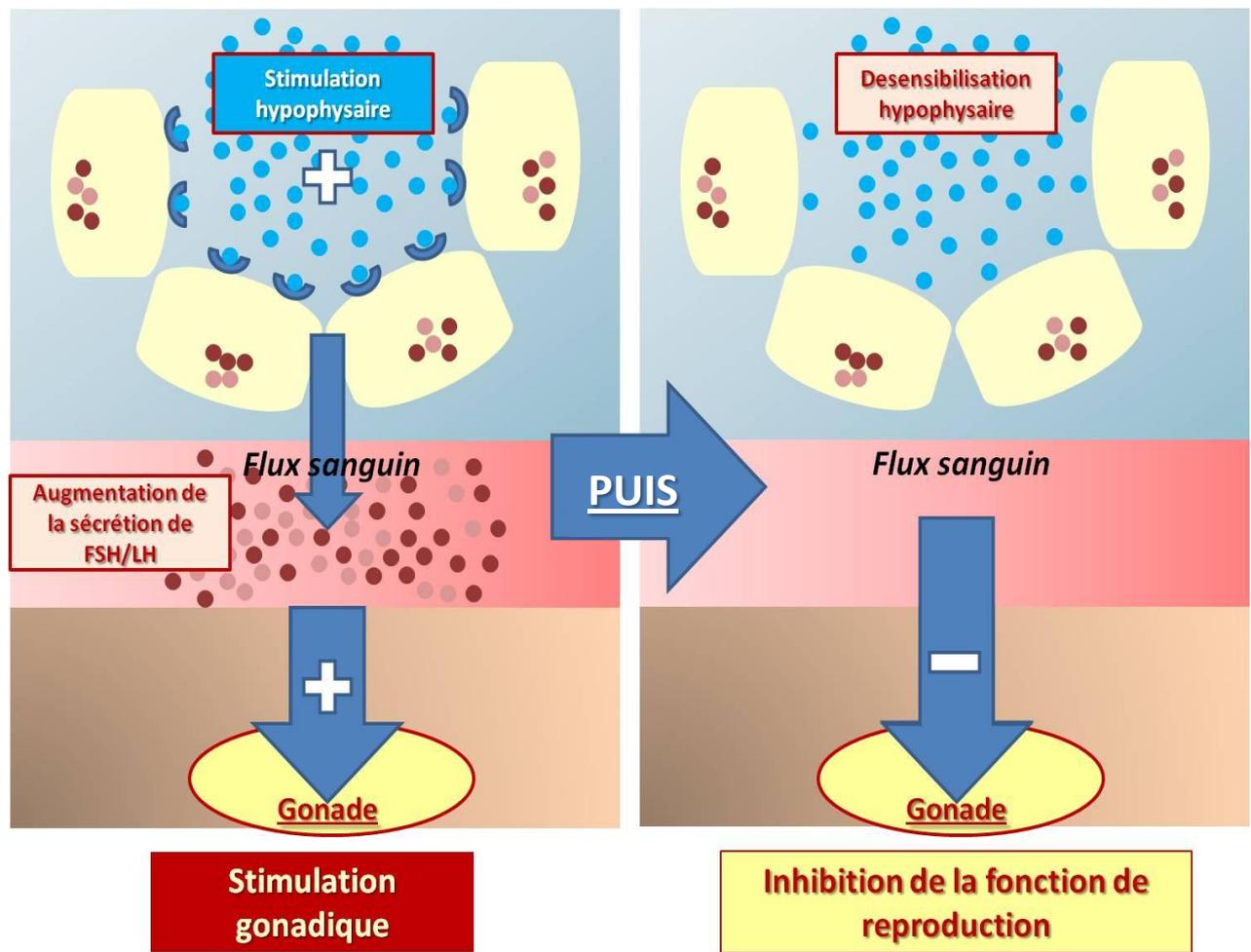
Leur mode d'action peut se décomposer en deux temps (voir Figure 1) :

- L'agoniste va dans un premier temps stimuler la sécrétion des gonadotrophines hypophysaires et par la même occasion, celle des hormones stéroïdes sexuelles ;
- Puis l'administration continue sur plusieurs jours va entraîner une désensibilisation de l'hypophyse, qui conduira à la suppression de FSH et de LH et une mise sous silence de l'axe hypophyso-gonadique. Cette désensibilisation est en fait due à une activation différentielle de certains gènes en fonction de la fréquence des pulses de GnRH. Les gonadotrophines hypophysaires résultent en fait de l'association non covalente d'une sous-unité  $\alpha$  commune et d'une sous-unité LH $\beta$ - et FSH $\beta$ - spécifique. Ces 3 sous-

unités sont encodées par le même gène(Counis 1999). Lorsque la fréquence des pulses de GnRH est faible, la transcription de FSH $\beta$ - est favorisée, alors qu'une haute fréquence favorise la transcription de LH $\beta$ - et de la sous-unité  $\alpha$  (Dalkin et al. 1989, Burger et al. 2002). En revanche, la sécrétion prolongée de GnRH comme obtenue lors de l'administration prolongée de formes agonistes de la molécule, entraîne une diminution du nombre d'ARN messagers codant pour FSH $\beta$ - et LH $\beta$ - suite à un arrêt de transcription associé à une dégradation des transcrits. En parallèle, les niveaux d'ARNm codant pour la sous-unité  $\alpha$  restent constants ou augmentent même légèrement (Lalloz et al. 1988, Rodin et al. 1988, Lerrant et al. 1995).

Ces deux effets sont largement documentés et utilisés aujourd'hui chez l'homme en gynécologie et en andrologie, dans les protocoles de procréation médicalement assistée (Tay 2002), dans un cadre thérapeutique lors d'affections liées aux hormones sexuelles comme le cancer de la prostate (Kuo et al. 2008), la puberté précoce (Yanovski et al. 2003), l'endométriose (Atltintas et al. 2008) ou pour protéger la fonction de reproduction notamment lors de chimiothérapie (Blumenfeld 2007). Chez les carnivores domestiques, la première étude mentionnant l'utilisation d'agonistes de la GnRH remonte à 1982 (Vickery et al. 1982) et ces molécules présentent, dans un contexte clinique, de nombreux intérêts, utilisant aussi bien leur effet stimulant que leur effet stérilisateur.

Après s'être attardés sur les spécificités de ces molécules et de leur utilisation, nous nous intéresserons à leurs effets sur la fertilité, puis à leur utilisation dans un but thérapeutique chez le chien et chez le chat.



*Figure 1 : Mode d'action en deux temps des agonistes de la GnRH sur la fonction de reproduction.*

## 2. Les agonistes GnRH

### 2.1 Structure-fonction

Séquencée en 1971 (Schally et al. 1971), la GnRH est un décapeptide dont la structure est hautement conservée chez les vertébrés. Les formes agonistes diffèrent généralement de la molécule endogène par substitution de un à trois acides aminés. Des D-isomères sont utilisés car ceux-ci offrent une protection accrue face aux peptidases du cerveau et de l'hypophyse : une des principales substitutions porte ainsi sur la glycine en position 6, site préférentiel pour la protéolyse de l'hormone. Les dérivés ainsi synthétisés ont une demi-vie supérieure à la molécule endogène, qui est de l'ordre de 3 minutes (Counis et al. 2001, Padula 2005).

Ces modifications vont également stabiliser la structure tertiaire de la molécule et ainsi augmenter son pouvoir d'action. Les agonistes sont ainsi 15 à 200 fois plus puissants (=ils

entraînent la production de 15 à 200 fois plus de LH et FSH lorsqu'ils sont utilisés) que la molécule endogène (voir tableau 2).

Nom de l'agoniste de la GnRH	Pouvoir de libération par rapport à la molécule endogène	Spécialité
Histréline	200	Vantas®
Nafaréline	200	Synarel®
Lutréline	180	<i>Non commercialisé</i>
Desloréline	150	Suprelorin®4,7mg Suprelorin®9.4mg
Azaglynafaréline	50 à 100	Gonazon®
Buséreléline	15 à 30	Receptal®
Leuprolide	15	Eligard®

Tableau 2 : Puissance des différents agonistes de la GnRH par rapport à la molécule endogène(Gobello 2007).

## 2.2 Mode d'action

### 2.2.1 Sur l'axe hypophysio-gonadique

Comme indiqué dans l'introduction, les agonistes de la GnRH agissent en deux temps. Dans un premier temps, ils entraînent une sécrétion importante de LH et de FSH dans la circulation systémique s'accompagnant d'une augmentation des concentrations des hormones stéroïdes sexuelles. Chez le chien, leur administration entraîne généralement une augmentation rapide de la synthèse de LH dans les 20 minutes qui suivent avec un pic aux alentours de 40 minutes (Junaidi et al. 2007). Si l'agoniste est administré quotidiennement, l'effet stimulant perdure 2 à 4 jours (Vickery et al. 1984, Junaidi et al. 2007). Une étude utilisant de la buséreléline sur des chiens mâles montre qu'alors la testostéronémie augmente en moyenne de 76,7% suite au traitement (Hoffmann 2005). Chez la femelle, l'effet agoniste est le même. Si l'agoniste GnRH est administré de façon quotidienne, les taux de FSH et de LH s'effondrent après 4

jours. Ceci est lié à une désensibilisation de l'hypophyse liée à l'administration continue de l'agoniste. Après 9 jours de traitement avec de la desloréline, les concentrations plasmatiques de FSH et de LH sont basales (Junaidi et al. 2007). L'administration continue d'agonistes de GnRH met ainsi au repos les sécrétions hypophysaires, et de fait, la fonction de reproduction. Ce mécanisme entraîne une véritable stérilisation chimique des individus en moyenne en 15 jours (Hoffmann 2005, Trigg et Yeates 2008). Il est intéressant de noter qu'au niveau hormonal, la situation est radicalement différente de ce qui se passe après une stérilisation chirurgicale. L'utilisation d'un agoniste GnRH entraîne en effet un arrêt de la sécrétion des gonadotrophines alors que lors de stérilisation chirurgicale, l'exérèse des testicules ou des ovaires entraîne une augmentation de la sécrétion de ces gonadotrophines, suite à la disparition du rétrocontrôle gonadique sur l'hypophyse (Fontbonne et al. 2007a).

L'intérêt majeur de ces molécules réside dans le caractère transitoire de leur effet. Ainsi, la mise sous silence de la fonction de reproduction, qu'elle ait lieu chez le mâle ou la femelle, n'est que temporaire et reprend après l'arrêt des effets du traitement (Tremblay et Belanger 1984, Trigg et Yeates 2008), procurant ainsi une stérilisation temporaire et entièrement réversible.

### *2.2.2 Action directe via des récepteurs extra-hypophysaires*

Des récepteurs à la GnRH ont de plus été découverts ailleurs que dans l'hypophyse, notamment au niveau des appareils génitaux femelle (mamelles, ovaires, oviductes, endomètre, prostate) (Cheung et Wong 2008) mais également au niveau de la vessie (Bahk et al. 2008, Coit et al. 2008), des vaisseaux sanguins, de la peau (Welle et al. 2006) ou de l'intestin (Ho et al. 1996). Il est possible que les agonistes de la GnRH aient ainsi une action directe sur ces organes, même si celle-ci n'est pas clairement élucidée. Ceci est d'ailleurs fortement suspecté chez le chien, notamment à travers leurs effets sur la fonction urinaire (Reichler et al. 2006) ou sur les tumeurs mammaires (Pagnini et al. 2002), sur lesquels nous reviendrons plus loin.

### *2.3 Mode d'administration*

Les agonistes GnRH sont tous des décapeptides et de fait présentent une biodisponibilité par voie orale quasi-nulle, proche de 0,1% suite à leur destruction par les sucs gastriques (Padula 2005). Leur utilisation clinique en routine nécessite donc des voies d'administration parentérales.

Les premières études menées utilisaient principalement des solutions injectables par voie intraveineuse ou sous-cutanée, mais ces présentations avaient une faible durée de vie et l'administration quotidienne du produit était nécessaire pour obtenir un effet clinique (Vickery et al. 1982, Vickery et al. 1985, Tremblay and Belanger 1984, Tremblay et al. 1984, Dubé et al. 1987), rendant du coup ces présentations inutilisables en dehors d'un contexte de recherche.

Pour pouvoir utiliser les propriétés de ces molécules dans un cadre clinique, des formes à longue durée d'action ont été développées. Les injections dépôt (leuprolide (Inaba et al. 1998), desloréline (Kutzler 2005)) avaient une durée d'action moyenne d'un mois, certes suffisante pour profiter de l'effet stimulant des agonistes, mais nécessitant néanmoins des administrations régulières lorsque le but fixé était d'obtenir une stérilisation complète de l'individu.

Plusieurs présentations ont été développées pour permettre une libération prolongée de l'agoniste de la GnRH mais deux principales sont particulièrement utilisées : injectables à effet retard (Inaba et al. 1998) et implants permettant de délivrer l'agoniste de la GnRH à un taux constant pendant des durées allant de 3 à 12 mois (Lacoste et al. 1989c, Trigg et al. 2001, Hoffmann 2005, Rubion et al. 2006). Dans notre travail de recherche, la spécialité utilisée était du Suprelorin®4,7mg (Virbac, Carros, France), implant cylindrique de 2,3mm de diamètre et 12mm de long contenant de la desloréline (sous la forme d'acétate de desloréline).

De part leur similarité structurale et une vitesse de dégradation équivalente, les propriétés pharmacocinétiques de la desloréline sont considérées comme proches de celles de l'agoniste de la GnRH buséreline. Il est important de noter que ces paramètres sont difficiles à établir car ces molécules présentent une faible concentration sanguine et une vitesse de dégradation rapide lors de leur passage dans la circulation systémique. Bien que plus stables que la GnRH elle-même, ces formes agonistes sont rapidement absorbées après administration parentérale et éliminées principalement par voie hépatique sous forme de fragments peptidiques et aminoacides (Lahlou et al. 2000).

La demi-vie de la buséreline est environ de 72-80 minutes après administration. Une clairance plasmatique de  $34,3 \pm 5,48$  ml/min/kg est rapportée chez le rat suite à une administration intraveineuse d'une dose de 100µg/kg. L'excrétion de la molécule se fait principalement par voie urinaire. Chez des femmes souffrant d'endométriose et recevant de la buséreline, le

pourcentage de la dose initiale retrouvée dans les urines 24h après administration était de 16,7%, 12,6% et 0,17% respectivement après injections intraveineuses, sous-cutanées et intranasales (Brogden et al. 1990).

Une technique de radio-immunologie (RIA=RadioImmunoAssay) a été mise au point pour déterminer la concentration plasmatique en desloréline chez les chiens ayant été traités avec la molécule. Le seuil minimal de détection de cette technique est de 40pg/mL, et cela a permis d'obtenir des indications sur l'absorption et la distribution de la molécule lors de son administration sous forme d'implant et ce jusqu'à 2,5 mois après son administration.

Dans une première étude, 10 chiens ont été implantés avec des implants contenant 5mg de 1,25I-desloréline. 2 groupes de 5 chiens étaient considérés, chaque groupe recevant des implants issus du même lot de production. Les profils ADME (Absorption-Distribution-Métabolisme-Excrétion) de desloréline chez ces animaux montraient cependant d'importantes différences durant les 40 jours suivant la pose de l'implant, certainement le reflet de l'incapacité actuelle de déterminer correctement la concentration plasmatique en desloréline avec la technique RIA existante. La concentration sanguine en desloréline atteint ainsi un pic vers 7-35 jours après la pose de l'implant. La deslorélinémie passe en dessous de la limite de quantification (40pg/mL) approximativement 50-70 jours après la pose de l'implant (Trigg et Yeates 2008).

La libération de la desloréline sous forme d'implant a également été étudiée chez la souris. Des souris mâles âgées de 8-12 semaines recevaient un implant et étaient par la suite pesées et euthanasiées à différents moments. Quatre semaines après la pose, 31,4% de la desloréline avait été libérée, avec un taux de libération moyen de 52,7 µg/jour. Ce taux diminue durant les 22-26 semaines qui suivent pour se situer en moyenne à 14,9 µg/jour (1999).

Cette vitesse de libération semble plus être liée aux propriétés physico-chimiques de l'implant qu'à l'environnement dans lequel il est placé, ce que des études *in vitro* ont confirmé (Koushik et al. 2003, Koushik et al. 2004). Les différences entre espèces semblent donc être négligeables si tant est que l'implant est positionné dans une zone vascularisée.

## **2.4 Importance de la dose administrée et de la durée**

Mesurer l'efficacité clinique d'un agoniste GnRH nécessite de prendre en compte la dose administrée et la durée d'administration, ces deux paramètres pouvant faire varier la réponse au traitement.

Inaba et al (1996) ont ainsi observé qu'une injection de leuprolide dépôt à la posologie de 1mg/kg était nécessaire pour obtenir une stérilisation chimique chez le chien, alors qu'à la posologie de 0,1 mg/kg, l'agoniste GnRH n'entraînait aucun effet chez le chien mâle. De la même façon, Vickery et al (1985) ont montré qu'avec une dose de 0,5µg/kg/jour de nafaréline, l'effet stérilisant mettait 44 jours pour se mettre en place alors qu'avec 2µg/kg/jour, il ne suffisait plus que de 20 jours. Cet effet dose dépendant a également été constaté chez la chienne où des doses inférieures à 0,6µg/kg/jour de lutréline n'était ainsi pas suffisantes pour induire l'œstrus (Concannon et al. 2006).

Le plus souvent, plus le traitement sera long plus le temps de récupération pour l'animal sera long également. Vickery et al (1984) ont montré que les chiens traités quotidiennement pendant 13 jours avec de la [6-D-(2-naphthyl)alanine]-LHRH (D-Nal(2)6-LHRH) mettaient 42 jours pour récupérer alors que ceux traités 42 jours mettaient au moins 10 semaines.

## **3. Utilisation des agonistes de la GnRH dans le contrôle de la fertilité**

Dans cette partie, nous présenterons les données bibliographiques ayant trait tout d'abord à l'utilisation de ces implants dans le cadre de la stérilisation chimique (que ce soit pour des individus adultes ou prépubères) –indication première de ces composés- puis celles concernant l'induction des chaleurs, liée à l'effet stimulant de départ.

### **3.1 Administration prolongée en vue d'une stérilisation chimique des individus**

La stérilisation des individus est un motif de consultation majeure en clientèle vétérinaire en France : 21,6% des mâles et 42,4% des femelles sont en effet stérilisées (enquête FACCO-SOFRES 2010). La stérilisation chirurgicale, conduisant à l'exérèse des gonades, est aujourd'hui la solution vers laquelle se tourne la majorité des praticiens. Cependant, de nouvelles alternatives médicales ont été développées. Si l'utilisation de progestagènes à longue durée d'action ne fait aujourd'hui plus recette - notamment à cause de leurs effets secondaires marqués chez la femelle (tumeurs mammaires, infections utérines)-, deux alternatives sont aujourd'hui envisageables :

- l'immunocontraception via des vaccins anti-GnRH : cependant les différences dans la réponse vaccinale n'en font aujourd'hui pas une technique fiable (Singh 1985, Gonzalez et al. 1989);
- l'utilisation d'agonistes de la GnRH : celle-ci semble aujourd'hui être une solution plus à même de satisfaire les cliniciens et est aujourd'hui bien documentée, au moins chez les mâles.

Les agonistes GnRH ont été étudiés essentiellement chez le chien. Il est intéressant de voir que quel que soit l'agoniste utilisé, la réponse au traitement est relativement la même chez les individus.

### *3.1.1 Chez le chien mâle adulte*

De nombreuses études ont été menées sur la stérilisation chimique chez le mâle par l'utilisation d'agonistes de la GnRH, la première étude remontant à 1984 (Vickery et al. 1984).

#### *3.1.1.1 Paramètres cliniques*

Toutes les études utilisant des agonistes de la GnRH décrivent une diminution du volume et parallèlement de la consistance des testicules. En général, le volume testiculaire est diminué par 2 à 5 fois dans les 4 à 5 semaines qui suivent l'initiation du traitement, quel que soit l'agoniste de la GnRH utilisé (Tremblay et Belanger 1984, Vickery et al. 1984, Vickery et al. 1985, Trigg et al. 2001). Vickery et al (1985) notent avec l'utilisation de nafaréline à la posologie de 2µg/kg/jour que le volume testiculaire moyen des chiens passe de 18cm<sup>3</sup> avant implantation à 6cm<sup>3</sup> 5 semaines après le début du traitement. L'utilisation d'implants de desloréline de 4,7mg entraîne globalement les mêmes effets, le volume testiculaire étant divisé par trois par rapport au volume initial environ 5 semaines après la pose de l'implant (Trigg et al. 2001).

Dans le même temps, ces études décrivent une perte de consistance des testicules qui deviennent beaucoup plus mous qu'initialement. Hoffmann (Hoffmann 2005), qui utilisait un implant de buséréline emprunté à la médecine humaine, note que cette diminution de la consistance s'observe à partir de 50 jours après l'initiation du traitement.

Romagnoli et al (2005) notent également une baisse de l'agressivité chez les mâles traités, mais ces données sont basées sur des observations cliniques et restent difficiles à objectiver.

### 3.1.1.2 Paramètres hormonaux

Quel que soit l'agoniste utilisé, là aussi les données sont assez similaires. Si l'effet stimulant d'origine entraîne une augmentation des concentrations sériques en FSH et LH dès 20 minutes après le début du traitement avec un pic 40 minutes après (Junaidi et al. 2007), ces valeurs reviennent à la normale dans les 5h qui suivent et s'effondrent en moyenne 2 à 9 jours après (Vickery et al. 1984, Hoffmann 2005, Junaidi et al. 2007). Il en va de même pour la testostéronémie. En utilisant de la [D-Trp6, des-Gly-NH10(2)]LHRH ethylamide, Lacoste et al (Lacoste et al. 1989c) ont montré que suite à l'initiation du traitement, la testostéronémie augmentait de  $1,6\pm 0,2$  à  $3,5\pm 0,6$  ng/mL pendant 5 à 7 jours, puis rejoignait des valeurs basales ( $0,05\pm 0,008$  ng/mL) après trois semaines de traitement. L'utilisation de leuprolide dépôt (Inaba et al. 1996) donne des résultats plutôt proches : les concentrations sériques de LH et de testostérone tombent en dessous des valeurs basales après 2 semaines. Les données concernant les implants de desloréline sont assez similaires : après l'implantation, la testostéronémie devient basale chez 80% des chiens après 17 jours de traitement (Trigg et Yeates 2008). La réponse est cependant très variable d'un individu à l'autre : dans cette même étude, un chien a vu sa testostéronémie devenir basale 32 jours après le début du traitement.

### 3.1.1.3 Paramètres de fertilité

Dès la première étude faite par Vickery et al (Vickery et al. 1984), il avait été montré qu'un traitement par un agoniste de la GnRH entraînait une diminution dramatique du nombre de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Après quatre à six semaines de traitement en moyenne, les animaux deviennent azoospermiques (Tremblay et al. 1984, Vickery et al. 1984, Junaidi et al. 2007).

Le passage à l'état azoospermique se fait cependant progressivement avec une augmentation de la teratozoospermie. Hoffmann (2005) observa ainsi que 30 jours après la pose d'implants de buséréline, le pourcentage de formes anormales dans l'éjaculat augmentait de façon dramatique, passant de  $16,5\pm 5\%$  à  $71,5\pm 22,8\%$ . Trigg et al (2006) rapportent que suite à la pose d'un implant de desloréline, le pourcentage de formes anormales dans la semence augmente de plus de 10 fois, passant en moyenne de 7 à 70% en 35 jours. Des anomalies de flagelle étaient principalement retrouvées.

Même chimiquement stérilisés, les animaux implantés peuvent cependant présenter un comportement de monte sur des femelles en chaleurs. Romagnoli (2006) rapporte des cas

cliniques où des chiens implantés ont sailli plusieurs fois des femelles sans pour autant engendrer de portées par la suite.

#### 3.1.1.4 Paramètres histologiques

Certaines études se sont penchées sur les modifications histologiques occasionnées au niveau testiculaire par l'administration chronique d'agoniste de la GnRH. Les chiens présentent généralement au bout de cinq semaines des tubes séminifères atrophiques et aspermatogéniques, la spermatogenèse étant bloquée au stade spermatogonie (Vickery et al. 1985, Dubé et al. 1987, Hoffmann 2005).

Dubé et al (1987) ont également observé en microscopie électronique une altération des cellules de Sertoli (augmentation du nombre de phagosomes et de gouttelettes lipidiques) et de Leydig (atrophie marquée). A la fin du traitement cependant, les modifications avaient disparu, démontrant bien le caractère réversible de ce traitement.

#### 3.1.1.5 Durée d'action

Comme nous l'avons signalé plus tôt, la durée d'action effective des agonistes GnRH sur la mise au repos de la fonction de reproduction semble être fonction de la dose administrée et de la durée du traitement. Inaba et al (1996) ont observé après une injection de leuprolide à 1 mg/kg un retour complet de la spermatogenèse 20 semaines après. Les implants de 6,6 mg de busérelina utilisés par Hoffmann ont montré une inhibition de l'axe hypophyso-gonadique pendant  $233 \pm 28,2$  jours (Hoffmann 2005). Romagnoli et al (Romagnoli et al. 2005) ont montré qu'en utilisant des implants de 4,7 mg de desloréline, la testostéronémie restait basale pendant près de 180 jours.

Un effet dose peut être suspecté. Si en moyenne les implants de 4,7 mg de desloréline inhibent la sécrétion de testostérone pendant au moins 180 jours chez le chien, la testostéronémie des individus de moins de 10 kg restait basale en moyenne un peu plus de 400 jours, alors que chez les chiens entre 10 et 25 kg, elle le restait environ 300 jours (Trigg et al. 2006).

De plus, la réponse est extrêmement variable d'un individu à l'autre. Trigg et al (2006) ont ainsi observé avec des implants de 4,7 mg de desloréline un individu chez qui la testostéronémie est remontée avant 180 jours, alors que pour certains il a fallu attendre plus de 550 jours. La durée de l'effet sur la testostéronémie s'étale entre 180 et 550 jours.

Paradoxalement ces valeurs sont plus dispersées pour les chiens de moins de 10 kg. Pour les

chiens de plus de 25 kg, la suppression de la testostéronémie n'a jamais été effective plus de 400 jours.

Le retour à la fertilité de ces individus n'a été jusqu'alors déterminé que par réalisation d'un spermogramme. Aucune étude n'a évalué la fertilité de ces mâles traités en saillie ou en insémination. Des observations cliniques ont été faites par Romagnoli (Romagnoli 2006), qui laissent présumer que ces animaux sont capables de reproduire suite à la récupération post-traitement (pouvant aller de 180 à 400 jours après la pose de l'implant), mais ceci reste à objectiver.

### *3.1.2 Chez le chat mâle adulte*

Si les indications semblent importantes, notamment pour les chats de race (les individus non castrés sont en effet générateurs de nuisances au sein de ces élevages - agressions envers les autres mâles, marquage urinaire - ce qui pousse souvent leurs propriétaires à les stériliser), l'utilisation d'agonistes de la GnRH est aujourd'hui très peu documentée chez le chat mâle. Romagnoli (2006) rapporte que chez un chat mâle traité avec un implant de 4,7 mg de desloréline, le diamètre scrotal de l'animal avait diminué de façon spectaculaire 5 mois après, que la concentration en testostérone était basale et que les spicules pénienues, dont la présence est liée à celle de la testostérone, avaient disparues. L'animal ne présentait également plus de libido. Cependant, il ne disposait d'aucune donnée sur sa fertilité, via une analyse de la semence notamment.

Le caractère réversible de la stérilisation par les agonistes de la GnRH chez le chat semble cependant ne pas faire de doute suite aux études menées sur les félidés sauvages, notamment guépards et lions, avec implants de desloréline (Bertschinger et al. 2001, Bertschinger et al. 2002, Bertschinger et al. 2006, Munson 2006). Dans ces espèces, le traitement entraîne un arrêt total de la spermatogenèse après 6 semaines en moyenne et cette action est effective pendant 6 à 12 mois avec un implant de 5 mg, voire jusqu'à deux ans avec un implant de 10 mg.

Chez le chat, des données récentes montrent que suite à l'administration d'un implant de desloréline de 4.7mg, les animaux seraient stérilisés pendant 4 à 18 mois (Goericke-Pesch, comm. pers.). On retrouve dans cette espèce la variabilité interindividuelle observée chez le chien.

### 3.1.3 Chez la chienne adulte

Contrairement au mâle, très peu d'études sont disponibles chez la femelle. Toutes néanmoins donnent des informations assez similaires.

#### 3.1.3.1 Paramètres hormonaux

L'effet du traitement prolongé entraîne, comme chez le mâle une chute des taux sanguins en gonadotrophines FSH et LH. Entre 35 et 40 jours après l'initiation du traitement sur des chiennes en œstrus, une chute de la sécrétion de progestérone est observée par rapport à un diœstrus normal, celle-ci pouvant tomber en dessous de 0,5 ng/mL (McRae et al. 1985, Volkmann et al. 2006a). Cette insuffisance lutéale induite ne permet pas de maintenir bien évidemment une gestation. Wright et al. (2001) ont ainsi observé l'avortement de deux chiennes 40 jours après la pose d'un implant de desloréline en œstrus.

#### 3.1.3.2 Durée d'action

Les mêmes remarques concernant la relation dose-durée de traitement faites pour le mâle pourraient être notées ici. Chez la chienne cependant, très peu de données sont disponibles sur l'influence du poids des individus, la majorité des études ayant été faites sur des beagles.

Dans l'étude de Mc Rae et al (1985), les chiennes n'ont pas présenté de périodes de chaleurs après l'œstrus induit par la pose de l'implant pendant les 18 mois de durée du traitement. A la fin de ce traitement, les chaleurs sont revenues entre 3 et 18 semaines après l'arrêt de la nafaréline, démontrant bien là encore le caractère réversible et l'importante variabilité interindividuelle.

Le stade du cycle auquel le traitement est initié semble avoir une influence. Dans l'étude de Trigg et al (2001), suite à la pose de l'implant de 6 mg de desloréline, les chaleurs revenaient en moyenne  $13,9 \pm 1,9$  mois après sur les chiennes implantées en œstrus,  $14,6 \pm 3,5$  mois sur les chiennes implantées en diœstrus,  $20,4 \pm 3,4$  mois sur les chiennes implantées pendant la gestation. Avec un implant de 12mg, l'œstrus était repoussé à  $15,5 \pm 1,7$  mois après quand l'implantation était faite en diœstrus,  $19,6 \pm 2,5$  mois après quand les chiennes étaient implantées gestantes.

#### 3.1.3.3 Retour à la fertilité

Une seule étude a vérifié le retour à la fertilité des chiennes après traitement prolongé d'agonistes de la GnRH. Trigg et al (2001) ont remis 9 chiennes traitées à la reproduction au premier œstrus qui a suivi la pose de l'implant. Six chiennes ont été gestantes. La mise à la reproduction n'avait cependant pas fait l'objet de suivi de chaleur et de détermination du

moment optimum de mise à la reproduction, si bien que ces résultats sous-estiment peut-être la fertilité post-traitement.

#### *3.1.4 Chez la chatte adulte*

Si chez le chat mâle aucune donnée n'est disponible, chez la chatte trois études ont été réalisées, deux d'entre elles utilisant des implants de desloréline (Munson et al. 2001, Toydemir et al. 2008) et une utilisant un implant de nafaréline (Prohaczik et al. 2008).

##### *3.1.4.1 Durée d'action*

Munson et al (2001) ont observé que les chattes ayant reçu un implant de 6 mg de desloréline ne présentaient pas d'augmentation de la concentration d'œstradiol dans les fécès pendant 8 à 14 mois après leur pose. Un animal a présenté cependant un pic d'œstradiol 4 mois après, ce qui montre que les variations interindividuelles sont, comme chez la chienne, très importantes. Toydemir et al (2008) rapportent une augmentation de la concentration d'œstradiol dans les fécès 16,5 mois après la pose d'un implant de desloréline de 9,4 mg. Une chatte dans cette étude a présenté également une augmentation de l'œstradiolémie 3,5 mois après la pose de l'implant. Cette étude a duré 18 mois au bout desquels tous les animaux ont été stérilisés, et à la fin de cette période aucun animal n'avait présenté de signes de chaleurs (Toydemir et al. 2008).

Lors d'utilisation d'implants de 20mg de nafaréline, les chattes n'ont pas présenté d'élévation de la progestérone pendant 2,5 ans. Cette étude a duré trois ans et à la fin de celle-ci, aucune chatte n'avait présenté de comportement de chaleurs (Prohaczik et al. 2008).

##### *3.1.4.2 Paramètres de fertilité*

Dans l'étude de Toydemir et al, les deux chattes qui ont présenté un comportement d'œstrus suite à la pose de l'implant ont été saillies plusieurs fois mais ont été diagnostiquées non gestantes par échographie un mois après (Toydemir et al. 2008). Aucun dosage de progestéronémie n'avait cependant été réalisé ce qui ne permet pas de dire si elles avaient ovulé ou non. Néanmoins, il est possible que la période lutéale consécutive à un œstrus induit soit plus courte que celle d'un œstrus spontané Ceci n'a à notre connaissance jamais été étudié.

Aucun des animaux des trois études n'a par la suite été remis à la reproduction, si bien qu'aucune donnée ne permet de décrire le retour à la fertilité de ces individus.

#### 3.1.4.3 Paramètres histologiques

A la fin de leur étude, Toydemir et al (2008) ont stérilisé tous les animaux. Les ovaires des chattes traitées ne présentaient aucune structure folliculaire ni corps jaune, contrairement aux individus de leur groupe témoin. Ces ovaires étaient également atrophiés par rapport au groupe contrôle (Toydemir et al. 2008). Il serait néanmoins intéressant d'avoir des informations plus détaillées concernant le type de follicules (primordiaux, primaires, secondaires) rencontrés dans ces ovaires. La suite logique d'une telle étude serait d'étudier les ovaires pour savoir au bout de combien de temps la réversibilité du traitement est observée.

En résumé, trois aspects essentiels ressortent de l'utilisation des agonistes de la GnRH dans le cadre de la stérilisation chimique des individus :

- l'arrêt des sécrétions hormonales et la mise en place effective de la stérilisation s'effectue progressivement et n'est réellement effective que 4-5 semaines après que l'implant ait été administré.
- quelle que soit l'espèce on note une très grande variabilité interindividuelle et aucun paramètre ne semble permettre à l'avance de mieux estimer combien de temps l'animal sera effectivement stérilisé.
- l'effet stérilisant est en général réversible et les données accumulées semblent montrer un retour à la situation d'origine. Cependant si la reprise de la spermatogenèse chez le mâle et le retour des chaleurs chez la femelle sont observés, peu d'éléments concernant la fertilité réelle de ces individus sont aujourd'hui disponibles.

### 3.2 Retarder la puberté: utilisation sur des individus prépubères

Les études de retard de puberté ont été essentiellement réalisées sur des individus femelles, une seule étude à notre connaissance incluant des individus mâles. Toutes ces études ont été réalisées chez le chien, aucune étude n'est disponible chez le chat.

#### 3.2.1 Chez le mâle.

Seuls Lacoste et al. (1989b) ont étudié l'administration chronique d'agonistes de la GnRH ([D-Trp6, des-Gly-NH2(10)]GnRH ethylamide injecté quotidiennement par voie sous-cutanée) sur des chiens mâles prépubères pendant 23 mois (Lacoste et al. 1989b). Pendant le traitement, les concentrations en stéroïdes sexuels étaient basales. Quatorze mois après la fin du traitement, les testicules présentaient le même aspect que celui d'un chien adulte avec une spermatogenèse normale. Deux mâles de l'étude (sur les 23 inclus au départ) ont été mis à la reproduction par la suite, engendrant deux portées.

### 3.2.2 Chez la femelle.

Trois études ont porté sur le retardement de la puberté chez la chienne. L'âge auquel l'animal est traité semble être un paramètre déterminant sur l'apparition d'un œstrus induit. Rubion et al (2006) ont implanté 20 chiennes de  $4,88 \pm 0,32$  mois avec des implants de nafaréline et n'ont noté aucun œstrus induit. Trigg et al (2001) ont fait la même constatation pour les chiennes âgées de 4 mois, mais la pose d'un implant de desloréline à partir de 7 mois entraînait systématiquement un œstrus dans les un à deux mois qui suivaient l'implantation. De même Inaba et al (1998) ont injecté du leuprolide dépôt à 6 chiennes prépubères âgées d'un an et 5 d'entre elles ont présenté un œstrus induit.

Mc Rae et al (1985) ont traité 20 chiennes avec des pompes osmotiques délivrant de la nafaréline pendant 18 mois. Aucune chienne n'a eu ses premières chaleurs durant le traitement, celles-ci survenant entre 3,5 et 4 mois après son arrêt. L'implant de nafaréline de Rubion et al (2006) était également retiré au bout d'un an, et les chiennes ont alors présenté leurs premières chaleurs en moyenne 8,5 mois après, avec des extrêmes allant de 1,2 à 14,3 mois.

En ce qui concerne la fertilité de ces individus, les données divergent quelque peu. Trigg et al (2001) ont fait reproduire les chiennes de leur étude sur le premier œstrus après le traitement, mais aucune n'a été gestante. Ces résultats sont cependant à prendre avec précaution car aucun suivi de chaleur n'avait été réalisé. Mc Rae et al (1985) ont fait reproduire deux chiennes sur le premier œstrus après le traitement et elles ont toutes été gestantes. La fertilité de ces individus stérilisés précocement reste donc à confirmer.

Néanmoins, les données histologiques fournies par Mc Rae et al semblent confirmer la totale réversibilité du traitement. En effet, si chez les chiennes prépubères en cours de traitement ils ne trouvaient que de nombreux follicules primordiaux, quelques follicules primaires et aucun follicule secondaire, quatorze mois après la fin du traitement, des follicules secondaires étaient présents (McRae et al. 1985).

Howe et al (2004) ont observé que les chiens stérilisés très tôt avant 24 semaines d'âge avaient tendance à être légèrement plus grands que leurs congénères stérilisés après ce délai, et qu'ils seraient plus sensibles aux fractures épiphysaires –même si ceci n'a pas été confirmé par des études épidémiologiques à plus grande échelle (Olson et al. 2011)-. L'utilisation sur les individus prépubères d'agonistes de la GnRH n'a pas mis en évidence de signes équivalents. Ni la taille ni le poids des individus n'étaient affectés (Rubion et al. 2006). Il est

cependant intéressant de noter que chez l'homme, les agonistes de la GnRH sont souvent utilisés lors de puberté précoce chez les enfants. Ceux-ci sont souvent de petite taille et ce traitement est utilisé justement pour leur permettre de retrouver une taille « normale » (Feuillan et al. 2001). Et s'il permet effectivement aux enfants atteints de grandir plus, ce traitement est également associé à une déminéralisation plus marquée des os, qui n'est pas sans rappeler ce qui est observé chez le chien. Il serait cependant nécessaire d'étoffer davantage ces études pour avoir une meilleure idée de ce qui se passe chez le chien.

### 3.3 Profiter de l'effet stimulant des agonistes

#### 3.3.1 Induction des chaleurs chez la chienne

L'utilisation de l'effet stimulant des agonistes GnRH pour induire des chaleurs présente un réel intérêt chez la chienne, avec trois principales indications pouvant être dégagées :

- Traitement d'animaux présentant un anœstrus primaire ou secondaire
- Raccourcissement de l'intervalle entre les chaleurs sur une chienne
- Synchronisation des femelles notamment à des visées de transfert embryonnaire

L'induction des chaleurs par les agonistes de la GnRH n'a été explorée que chez la chienne, et aucun travaux n'a été réalisé chez la chatte. Néanmoins, chez les félidés sauvages, des chaleurs ont été induites à l'aide d'implants de desloréline, notamment sur des guépards et des lionnes (Fontbonne et al. 2007b).

##### 3.3.1.1 Temps entre l'initiation du traitement et l'induction de l'œstrus.

Le stade du cycle est un paramètre majeur concernant l'induction de l'œstrus : s'il est effectif sur la majorité des chiennes en anœstrus, une progestéronémie supérieure à 5ng/mL au moment du traitement semble inhiber le phénomène (Trigg et al. 2001).

Il semble néanmoins que pour un protocole donné, la durée entre l'initiation du traitement et le début des chaleurs est assez constante. Avec des pompes à infusion délivrant toutes les 90 minutes 140ng/kg de GnRH pendant 11 à 12 jours, Cain et al (1989) ont obtenu des chaleurs  $5,6 \pm 0,53$  jours sur toutes les chiennes. Inaba et al (1998), en utilisant une injection de leuprolide dépôt à 1mg/kg, ont obtenu des chaleurs sur les 12 chiennes de leur étude, celles-ci apparaissant en moyenne  $10,3 \pm 0,9$  jours après le traitement. Concannon et al (2006) en utilisant de la lutréline ont induit des chaleurs dans 89% des chiennes traitées  $4,8 \pm 0,2$  jours après le début du traitement. Toutes les chiennes de l'équipe de Kutzler, qui utilisait un implant de desloréline, ont été en chaleurs au plus 6 jours après le début du traitement

(Kutzler et al. 2002), les chaleurs apparaissant en général dans les 3 à 5 jours qui suivent la pose de l'implant (Kutzler 2005, Volkmann et al. 2006a).

L'utilisation de préparations injectables pourrait se révéler plus pratique d'utilisation. Néanmoins, l'effet dose-durée devrait alors bien être maîtrisé car si Inaba et al ont obtenu 14 chiennes sur 18 gestantes avec une injection de leuprolide à la dose de 1mg/kg (Inaba et al. 1998), Kutzler a obtenu des résultats controversés avec une préparation injectable de desloréline. Si 3 gestations sur 3 Lakeland terrier avaient pu être obtenues suite à l'injection en intramusculaire de 1,5mg de desloréline, les 9 chiennes beagles traitées de la même façon dans une étude complémentaire ne sont même pas rentrées en chaleurs (Kutzler 2005, Kutzler et al. 2006).

#### 3.3.1.2 Ovulation

La plupart des chiennes traitées ont ovulé sur l'œstrus induit, mais là encore les résultats diffèrent suivant les protocoles. Si Concannon et son équipe n'ont obtenu que 18 ovulations sur les 24 chiennes traitées dans son protocole avec de la lutréline (Concannon 1989) et 59% d'ovulations seulement (Concannon et al. 2006), les autres études sont plus encourageantes. Avec la desloréline toutes les chiennes beagles de Kutzler ont ovulé (Kutzler et al. 2002). 7 chiennes ont ovulé entre 11 et 15 jours après la pose de l'implant, 4 aux alentours de 11 jours. Volkmann et al (2006a), également avec des implants de desloréline ont obtenu des résultats similaires : l'intervalle entre la pose de l'implant et le pic de LH était de 9 à 17 jours, ce qui signifie que l'ovulation se produisait entre 11 et 19 jours après la pose. Inaba et al (Inaba et al. 1998) et Cain et al (1989) n'ont pas déterminé pas le moment de l'ovulation et ont juste mis les chiennes à la reproduction. Néanmoins, les taux de gestation obtenus (14/18 pour Inaba et al, 7/8 pour Cain et al) dans ces deux études confirmaient la capacité des chiennes à ovuler.

#### 3.3.1.3 Fonction lutéale

L'administration prolongée d'agonistes de la GnRH entraîne une insuffisance lutéale liée à une insuffisance gonadotrope. La gestation ne peut alors être conduite jusqu'à son terme, la phase lutéale prenant fin entre 30 et 40 jours après l'initiation du traitement.

Pour éviter ce phénomène, Kutzler et al (2002) ont proposé d'enlever l'implant de desloréline de 2,1mg utilisé dans leur étude après la montée de la progestéronémie. En référence à ce qui était pratiqué chez les juments, les implants étaient posés au niveau de la muqueuse vulvaire (Kutzler et al. 2002) : l'implant ne migrant alors pas, il était alors facile à localiser et à enlever. Cinq chiennes ainsi traitées ont été gestantes, sur les 8 individus que comptait l'étude.

Néanmoins, une des chiennes a perdu sa portée entre 30 et 37 jours post-ovulation. Par la suite, Volkmann et al (2006c) ont observé que les individus absorbaient la majorité de l'agoniste contenu dans l'implant de desloréline de 2,1 mg dans les 10 jours qui suivaient sa pose. Son retrait ne présentait donc que peu d'intérêt. Les chiennes ainsi induites voyaient leur progestéronémie diminuer de façon significative 35 jours après, ce qui pourrait expliquer que la phase lutéale de ces chiennes induites ne soit pas propice au maintien de la gestation. Si la supplémentation par de l'hCG (human Chorionic Gonadotropin) s'est révélée décevante, les traitements classiquement utilisés lors d'insuffisance lutéale chez la chienne seraient envisageables, mais nul n'en fait mention dans un tel contexte.

#### 3.3.1.4 Facteurs de variation de fertilité

Trois paramètres majeurs semblent influencer sur les résultats de fertilité. Si l'effet dose-durée semble bien réel, la molécule utilisée semble également influencer sur les résultats de fertilité. En effet, les études de Concannon avec la lutréline donnent des résultats médiocres : 9 chiennes gestantes sur 24 induites (Concannon 1989), 44% de gestation (Concannon et al. 2006). A l'inverse, le leuprolide à 1mg/kg donne de meilleurs résultats : 14 gestations sur 18 chiennes traitées (Inaba et al. 1998)). Il en va de même pour les implants de 2,1 mg de desloréline : 5 chiennes gestantes sur 8 traitées (Kutzler et al. 2002), 9 gestations sur 13 individus (Volkmann et al. 2006a). Le stade du cycle auquel se déroule l'induction jouerait également un rôle prépondérant. Avec du leuprolide, Inaba et al (1998) ont obtenu 6/6 gestations sur des chiennes induites à 150 jours post-partum, alors qu'une induction à 120 jours post-partum n'entraînait de gestation que dans 3 cas sur 6.

Volkmann et al (2006a) ont essayé de déclencher des œstrus fertiles sur des chiennes en diœstrus en provoquant une lutéolyse à l'aide de prostaglandines puis en utilisant des implants de desloréline de 2,1mg : s'ils ont réussi à induire des chaleurs sur toutes les chiennes, 4 sur 10 seulement ont ovulé et une seule a démarré une gestation : l'embryon a cependant résorbé avant le terme.

Ces données confirment chez la chienne la nécessité, après un diœstrus, d'une période de régénération de l'endomètre pour que la nidation et le maintien de la gestation puissent se faire. Si certaines études nous indiquent que l'endométrium a complètement involué 135 jours après la fin de la phase lutéale (Anderson et Simpson 1973), ces données nécessiteraient d'être confirmées. Il apparaît tout de même que 150 jours après la fin de la phase lutéale, l'induction des chaleurs donne de meilleurs résultats en termes de fertilité.

### 3.3.2 Induction des chaleurs chez la chatte

#### 3.3.2.1 Paramètres cliniques

Les données cliniques recueillies sont très sommaires, notamment concernant l'apparition d'un œstrus induit. Seuls Toydemir et al (Toydemir et al. 2008) rapportent que suite à la pose d'implants de 9,4mg de desloréline, deux chattes ont manifesté un comportement d'œstrus. Aucune donnée n'est cependant fournie sur le délai entre la pose de l'implant et la survenue de cet œstrus, ni sur sa durée. Le frottis vaginal, examen complémentaire de routine pour objectiver les chaleurs chez la chatte, n'a jamais été utilisé. Un examen comme l'échographie ovarienne, qui permet de suivre la croissance folliculaire, pourrait apporter des éléments intéressants. De plus aucune donnée n'est disponible sur l'influence du stade du cycle, alors que celui-ci joue un rôle déterminant chez la chienne.

#### 3.3.2.2 Paramètres hormonaux

Seule la réponse hormonale à la pose de l'implant a été étudiée, principalement par le dosage d'œstrogènes fécaux chez les animaux traités (Munson et al. 2001, Toydemir et al. 2008). Après le démarrage du traitement avec des agonistes de la GnRH, une augmentation de la sécrétion de l'œstradiol dans les fécès était notée pendant la semaine qui suivait. Cette réponse pourrait être assimilable à un œstrus induit, mais nécessiterait une corrélation avec des données cliniques. L'œstradiolémie devient basale 30 jours après l'initiation du traitement.

Prohaczik et al (Prohaczik et al. 2008) ont proposé une approche différente. Les chattes étaient placées avec des mâles vasectomisés. Ainsi si elles entraient en chaleurs, elles pouvaient être saillies et l'ovulation détectée par dosage de progestérone, ceci confirmant alors l'œstrus induit et la capacité d'ovulation. Là aussi la corrélation avec des critères purement clinique manque cruellement, car de nombreux caractères comportementaux (mâles qui ne veulent pas saillir, femelles qui ne se laissent pas faire) peuvent compromettre les données. Ainsi deux chattes sur les six traitées ont présenté une élévation de la progestéronémie suite à la pose, mais il n'est pas impossible que l'œstrus induit les ait toutes concernées.

## **4. Utilisation des agonistes GnRH dans un cadre thérapeutique**

Comme chez l'homme (Surrey 2010, Maheshwari et al. 2011), l'administration prolongée des agonistes de la GnRH peut s'inscrire chez le chien et le chat dans un cadre thérapeutique.

Trois modes d'action sont envisageables:

- Par la stérilisation chimique qu'ils entraînent : ainsi, pour toute affection nécessitant une stérilisation, les agonistes de la GnRH peuvent se présenter comme alternative à une intervention chirurgicale, notamment lorsque les animaux sont trop débilités ou trop âgés pour subir une opération chirurgicale ;
- Par l'insuffisance gonadotrope qu'ils instaurent dans l'organisme ;
- Par un effet direct des agonistes via les récepteurs extra-cérébraux de la GnRH : chez l'homme de nombreuses tumeurs hormono-dépendantes (notamment des tumeurs de l'appareil génital) portent des récepteurs à la GnRH et il a été montré que ces agonistes interféraient avec les mécanismes de prolifération tumorale via une action autocrine et paracrine (Limonta et al. 2001).

Néanmoins, dans le cas de certaines affections hormono-dépendantes, l'effet stimulant de départ peut s'avérer préjudiciable en entraînant une aggravation des symptômes. Dans un but thérapeutique, il apparaît donc important de maîtriser ce phénomène. Aucun protocole n'est aujourd'hui clairement défini mais plusieurs études se sont penchées sur le phénomène aussi bien chez le mâle que chez la femelle et donnent des pistes intéressantes à explorer.

#### **4.1 Utilisation dans un cadre comportemental.**

##### *4.1.1 Dans l'espèce canine*

La stérilisation a longtemps été présentée comme un traitement pour certains comportements gênants. Marquage urinaire, fugue et agressivité sont effectivement des traits générateurs de nuisance pour les propriétaires et leur relation avec les hormones sexuelles, notamment la testostérone, est clairement établie. Ces traits se rencontrent préférentiellement chez les individus mâles (88% des cas d'agression envers l'homme sont dûs à des mâles (Line et Voith 1986)) et motivent le plus souvent la demande de stérilisation.

Néanmoins, s'il semble que la stérilisation diminue le comportement de marquage urinaire et de fugue, l'effet sur l'agressivité est bien moins marqué. Chez le chien mâle, une amélioration n'est perçue que dans 30% des cas (Hart et Hart 1997). Chez les femelles, stériliser des individus déjà agressifs avant 12 mois semble même renforcer ce caractère (O'Farrell et Peachy 1990, Blackshaw 1991).

Hormis les références aux effets dépressifs sur la libido des chiens mâles (Trigg et al. 2001, de Gier et Winke 2010), aucune étude ne s'est attachée aux modifications comportementales consécutives à un traitement par des agonistes de la GnRH. Leur utilisation dans ce contexte pourrait faire l'objet d'études.

#### **4.1.2 Dans l'espèce féline**

Chez les chats, les mêmes indications que chez le chien pourraient être envisagées, notamment en ce qui concerne le marquage urinaire très important chez certains chats mâles non castrés. Là aussi des études complémentaires sont nécessaires pour juger de l'utilité de traitements à base d'agonistes de la GnRH dans cette indication.

### **4.2 Utilisation dans le traitement d'affections liées aux hormones sexuelles**

#### **4.2.1 Affections prostatiques**

Chez l'homme, les agonistes de la GnRH ont d'abord été utilisés pour traiter les cancers de la prostate, le premier cas ayant ainsi été traité en 1979 (Labrie et al. 2006).

Chez le chien, les affections prostatiques sont très fréquentes mais peu sont liées à des processus tumoraux. Près de 80% des chiens âgés présentent une hyperplasie bénigne de la prostate, qui peut dégénérer en prostatite (Krawiec et Heflin 1992, Smith 2008). Un des grands principes du traitement de ces affections est d'obtenir une réduction de la taille de l'organe. Celle-ci est généralement obtenue suite à la chute des concentrations sériques en testostérone qui survient notamment après une castration.

Un traitement au long cours à base d'agonistes de la GnRH entraîne une réduction de 40 à 60% du volume prostatique. Celle-ci est obtenue en 4 à 6 semaines (Vickery et al. 1982, Dubé et al. 1984, Ponglowhapan et al. 2002, Romagnoli 2006) et ce quel que soit l'agoniste utilisé. A la fin du traitement (soit à la fin de la durée d'efficacité de l'implant) la prostate retrouve sa taille normale environ 48 semaines après (Ponglowhapan et al. 2002, Romagnoli 2007).

#### **4.2.2 Tumeurs mammaires**

Les tumeurs mammaires sont le second type de tumeurs les plus fréquentes chez la chienne après les tumeurs cutanées : elles représentent en effet en moyenne 27,1% des tumeurs affectant ces animaux (Cohen et al. 1974, Bastianello 1983, Brodey et al. 1983). Si la stérilisation avant les premières chaleurs reste aujourd'hui la meilleure des préventions, les données quant à son utilité au moment de la découverte des tumeurs sont contradictoires. Sorenmo et al (2000) ont observé que les chiennes stérilisées dans les deux ans avant l'apparition de tumeurs mammaires avaient une durée de vie significativement plus longue (médiane de survie de 755 jours après l'exérèse des tumeurs) que les chiennes stérilisées depuis plus de deux ans (301 jours) ou non stérilisées (286 jours) : la stérilisation des animaux atteints de tumeur mammaire pourrait donc augmenter la durée de vie des animaux de façon significative. Si ces résultats sont en contradiction avec d'autres études qui montrent que la

stérilisation n'a aucun effet sur l'espérance de vie des animaux (Perez Alenza et al. 2000, Philibert et al. 2003), il est intéressant de noter que des données similaires sont néanmoins disponibles chez la femme (Spicer et Pike 2000) et que l'utilisation d'agonistes de la GnRH s'inscrit dans ce cadre.

En pratique, la réalisation simultanée des deux opérations peut s'avérer une procédure lourde. L'utilisation d'agonistes de la GnRH pourrait donc chez la chienne se présenter comme une alternative intéressante.

De plus, Lombardini et al (1999) ont montré que l'utilisation de goséréline, à 60mg/kg toutes les 3 semaines entraînait une diminution de la taille des tumeurs mammaires chez les 9 chiennes traitées de cette étude 3 mois après le début du traitement. La même équipe s'est penchée sur les effets de la goséréline sur des cellules tumorales mammaires de chienne cultivées *in vitro* (Pagnini et al. 2002) et a montré que l'agoniste pouvait en plus inhiber les effets mitogéniques d'un facteur de croissance, l'EGF (Epithelial Growth Factor) qui favorise la croissance des tumeurs mammaires. L'effet sur les tumeurs serait peut-être lié à une action directe de l'agoniste sur les cellules tumorales et non à l'effet stérilisant. Chez l'homme des observations similaires ont été faites (Limonta et al. 2001). D'autres travaux restent donc nécessaires pour bien définir l'utilisation qui pourrait être faite des agonistes de la GnRH dans cette indication.

#### **4.2.3 Ptôse vaginale**

Les ptôses vaginales chez la chienne sont des affections liées aux œstrogènes. Sontas et al (Sontas et al. 2007) rapportent l'utilisation de gonadoréline pour traiter une ptose vaginale sur un Tosa Inu. Administré avec de l'acétate de mégestrol pour contrecarrer l'effet stimulant, après 15 jours de traitement la chienne présentait une régression importante de la masse qui faisait initialement 6 cm de diamètre. Celle-ci ne faisait du coup plus protrusion à l'extérieur du vagin. Cette indication potentiellement intéressante nécessiterait néanmoins d'être approfondie.

### **4.3 Utilisation dans le traitement d'affections liées à la stérilisation chirurgicale**

#### **4.3.1 Incontinence urinaire**

L'incontinence urinaire chez la chienne est une complication pouvant survenir suite à la stérilisation et pouvant affecter jusqu'à 20% des individus, suite à une diminution de la compétence du sphincter urétral (Reichler et al. 2005). Il est avéré aujourd'hui que cette

prédisposition n'est pas liée au déficit en œstrogènes s'installant suite à la stérilisation. En effet :

- Les chiennes traitées aux progestagènes présentent une atrophie ovarienne marquée et une œstradiolémie basale, mais pas de plus grands risques d'incontinence ;
- Les taux d'œstrogènes circulants chez la chienne stérilisée et chez la chienne en anœstrus sont sensiblement les mêmes ;
- Seulement 61 à 65% des chiennes incontinentes répondent à un traitement à base d'œstradiol (Reichler et al. 2003);

L'hypothèse avancée aujourd'hui est que cette incompétence sphinctérienne serait liée, suite à l'exérèse des gonades, à l'augmentation des taux sériques des gonadotrophines LH et FSH consécutive à la perte du rétrocontrôle gonadique sur l'hypophyse. Des récepteurs à ces deux gonadotrophines ont été mis en évidence dans la vessie et l'urètre des chiens et des chiennes, suggérant un rôle dans le métabolisme vésical (Ponglowhapan et al. 2007). Néanmoins, leur mode d'action reste mal connu aujourd'hui. Un effet direct semble peu probable, Reichler et al (2005) ayant montré que les taux de LH et de FSH étaient significativement plus bas chez la chienne stérilisée incontinente que chez la chienne stérilisée continente. Un effet indirect via une diminution du nombre de leurs récepteurs au niveau vésical et urétral est aujourd'hui envisagé. LH et FSH participent en effet au métabolisme de la dégradation du collagène au niveau vésical et cette diminution du nombre de leurs récepteurs s'accompagnerait d'une augmentation du collagène dans la vessie, ce qui diminuerait sa capacité à se contracter (Ponglowhapan et al. 2008). En suivant cette hypothèse quant au mécanisme d'action, la mise au repos de la sécrétion hypophysaire par l'utilisation d'agonistes de la GnRH se présentait comme une solution logique. Ainsi, leuprolide (Reichler et al. 2006), triptoréline, buséréline et desloréline (Reichler et al. 2003) ont été utilisés pour traiter l'incontinence urinaire chez la chienne. Avec le leuprolide (11 chiennes traitées), 71% des chiennes traitées présentaient une amélioration clinique, 50% de ces chiens demeurant continentes pendant plusieurs mois, l'une d'elles le restant même pendant un an (Reichler et al. 2006). Dans une deuxième étude, 12/13 chiennes ont présenté une amélioration ou une restauration de la continence pendant 1,5 mois à 5 ans (Reichler et al. 2003).

Des études récentes font cependant penser aujourd'hui que les agonistes de la GnRH pourraient avoir une action directe sur la fonction vésicale. Reichler et al (2006a) ont observé que suite à un traitement à base de leuprolide, aucune modification n'était notée sur la

pression de fermeture urétrale, alors qu'une action sur la fonction vésicale était observée (le volume vésical moyen sur ces chiennes avait augmenté de 109 à 172mL). Aucune relation n'ayant pu être obtenue entre les concentrations sériques en gonadotrophines et les paramètres urodynamiques, il est probable que l'agoniste de la GnRH exerce un effet direct sur la fonction vésicale.

Il est important cependant de noter que les résultats obtenus avec les traitements à base d' $\alpha$ -agonistes comme la phénylpropanolamine, utilisés en première intention chez la chienne aujourd'hui, sont bien meilleurs que ceux obtenus avec les agonistes de la GnRH seuls : 91,8% des chiennes répondent au traitement (Reichler et al. 2006). Les agonistes de la GnRH doivent plutôt se présenter comme une alternative pour les chiennes présentant des contre-indications à ce traitement (agressivité, problème cardiaque ou difficulté d'administration du traitement, les implants existant aujourd'hui assurant une bonne observance). Sur certains cas répondant mal aux alpha-agonistes, l'association avec des agonistes de la GnRH peut permettre de restaurer la continence. Reichler et al (2003) ont ainsi observé que si 7/12 chiennes ont présenté une amélioration de la continence suite à l'utilisation d'agonistes de la GnRH, l'utilisation conjointe avec un alpha-agoniste restaurait la continence chez toutes les chiennes.

#### *4.3.2 Puppy coat syndrom*

L'augmentation des concentrations plasmatiques en gonadotrophines consécutive à la stérilisation chirurgicale entraîne une modification du ratio phase anagène- phase télogène des follicules pileux. 20% des chiens développent alors des modifications du pelage, connues sous le nom de « puppy coat syndrom ».

L'utilisation d'agonistes de la GnRH entraîne une amélioration de la qualité du pelage dans 79% des cas traités. Si celle-ci était associée avec une augmentation de la phase catagène du poil, sans modification du ratio anagène-telogène, le mécanisme pathophysiologique entraînant ce changement de pelage n'a en revanche pu être élucidé (Reichler et al. 2008).

## 5. Effets secondaires suite à l'administration prolongée d'agonistes de la GnRH.

### 5.1 Prévenir l'effet stimulant de départ

#### 5.1.1 Chez le mâle

Chez le chien mâle, l'utilisation concomitante d'agonistes de la GnRH et d'antiandrogènes comme le flutamide (Lacoste et al. 1988a) ou d'inhibiteurs de la stéroïdogenèse comme le kétoconazole et l'aminoglutéthimide (Lacoste et al. 1988b, Lacoste et al. 1989a) a été étudiée. Lacoste et al ont observé que les chiens recevant dans le même temps du flutamide présentaient les mêmes variations hormonales que les chiens traités uniquement avec des agonistes de la GnRH : cette molécule, qui ne modifiait donc pas l'effet de l'agoniste, pouvait donc être une solution pour prévenir les conséquences de l'effet stimulant primaire (Lacoste et al. 1988a). De même, l'administration concomitante de kétoconazole ou d'aminoglutéthimide inhibe le pic de testostéronémie (Lacoste et al. 1988b, Lacoste et al. 1989a). Après 3 semaines de traitement, l'utilisation conjointe de ces molécules augmente les effets inhibiteurs observés en phase chronique (Lacoste et al. 1988b). Ces études, quoiqu'anciennes, nécessiteraient d'être approfondies et pourraient servir de point de départ à l'élaboration de protocoles visant à inhiber cet effet stimulant primaire.

#### 5.1.2 Chez la femelle

L'effet stimulant des agonistes de la GnRH est, comme nous l'avons déjà vu, plus marqué chez la femelle, se traduisant par une entrée en chaleurs. Trigg et al (2001) ayant constaté que les chiennes traitées avec des implants de desloréline et ayant une progestéronémie supérieure à 5 ng/mL ne présentaient pas d'œstrus induit, l'utilisation de progestagènes semblait toute indiquée. Les résultats obtenus sont néanmoins controversés. Si Wright et al n'ont obtenu aucun œstrus induit en utilisant de l'acétate de mégestrol à 2mg/kg pendant 3 semaines suite à la pose d'un implant de desloréline (Wright et al. 2001), Corrada et al ont avec un protocole identique eu 3/8 chiennes présentant un œstrus entre 26 et 51 jours après la pose de l'implant (Corrada et al. 2006) : le traitement aux progestagènes ne faisait que décaler la survenue de l'œstrus induit. En commençant le traitement 4 jours avant la pose de l'implant, la même équipe a observé quand même 10% d'œstrus induits (Corrada et al. 2006). Sung et al (2006) ont tenté la même expérience en débutant le traitement aux progestagènes 7 jours avant l'administration de l'agoniste mais 4 chiennes sur 5 traitées sont entrées en chaleurs. La durée entre la pose de l'implant et l'entrée en chaleurs était de  $8,4 \pm 1,7$  jours avec des extrêmes de 3

à 19 jours. Dans cette étude, le traitement avec des progestagènes diminuait certes la réponse hypophysaire chez les chiennes implantées (les chiennes ainsi traitées présentant des concentrations en LH significativement plus basses que les chiennes non traitées) mais une augmentation de la réponse ovarienne à la stimulation à la desloréline (les chiennes traitées présentant une oestradiolémie significativement plus haute).

Aujourd'hui donc aucun protocole ne semble satisfaisant pour inhiber l'apparition de l'œstrus induit, ce qui constitue un frein à l'utilisation de ces molécules pour la stérilisation chez la femelle d'une part et son utilisation dans un cadre thérapeutique d'autre part. Néanmoins plusieurs pistes restent envisager. En se basant sur les observations de Trigg et al (2001), l'utilisation de progestérone naturelle pourrait être envisagée soit par voie injectable, soit par voie orale en utilisant de la progestérone micronisée. De même, l'utilisation d'inhibiteurs de la stéroïdogénèse, comme décrite chez le mâle, pourrait être envisagée sur les chiennes, et ces produits, aujourd'hui plus faciles d'utilisation et présentant peu d'effets secondaires, pourraient s'avérer une piste intéressante à explorer.

## **5.2 Autres effets secondaires**

Si certaines réactions locales au site d'injection ont pu être notées chez l'homme, notamment avec de la leuproreline (apparition de granulomes), aucun effet de ce style n'a été référencé chez les carnivores domestiques (Yasukawa et al. 2005). Trigg et al (2001) ont étudié la réaction locale au site d'injection de leur implant de desloréline et celui-ci s'est avéré totalement biocompatible.

Les principales études réalisées chez le chien et le chat montrent que les modifications entraînées au niveau gonadique chez le mâle et chez la femelle sont a priori complètement réversibles suite à l'arrêt du traitement : aucun effet secondaire n'a été noté, mais les données sur la fertilité de ces individus sont peu nombreuses et restent à approfondir. Chez la femme, l'utilisation de ces molécules dans des protocoles de procréation médicalement assistée semble être relativement sûre : peu d'hyperstimulations ovariennes notées, pas d'effets sur les ovocytes, les embryons et les enfants qui y ont été exposés (Tarlatzis et Bili 2004).

Mayerhofer et al (1989) avaient cependant montré que des injections quotidiennes pendant 3 mois avec des agoniste de la GnRH étaient associées avec l'apparition d'anomalies au niveau de la microvascularisation testiculaire (trous de 30 à 500 nm au niveau de l'endothélium et épaissement de la lame basale de certains vaisseaux sanguins). Or 4 mois après l'arrêt du traitement, l'épaississement persistait dans 56,4% des capillaires et 34,4% des veinules

testiculaires. Aucune répercussion clinique n'avait cependant été notée sur les chiens dans cette étude.

Chez l'homme, de nombreux effets secondaires, liés principalement à la déprivation en hormones stéroïdes qu'entraînent ces traitements, sont bien documentées. L'utilisation d'agonistes de la GnRH est ainsi associée au développement d'affections cardiaques (maladies coronariennes et infarctus du myocarde notamment) (Efstathiou et al. 2008, Shahani et al. 2008), de prise de poids et d'augmentation de la masse grasseuse (Smith 2004), de troubles métaboliques (hyperlipidémie, insulino-résistance, athérosclérose (Shahani et al. 2008)), d'atrophie musculaire (Williams et al. 2005), d'ostéoporose augmentant le risque de fractures (Brufsky 2006, Smith 2006), de baisse de forme (Basaria et al. 2002) et même de dépressions (Warnock et al. 1998).

## **6. Conclusion**

Peu de données sont disponibles sur les effets secondaires potentiels de ces molécules en médecine vétérinaire, mais il y a fort à penser qu'ils doivent être proches de ce qui se rencontre chez l'homme. Il nous semble important de connaître ces données et de les prendre en compte avant de proposer ce type de traitement, notamment dans un cadre thérapeutique. De nombreuses applications sont encore à creuser chez le chien (notamment dans le domaine de la cancérologie), tout comme l'intérêt de leur utilisation dans l'espèce féline, mais ces molécules présentent des possibilités énormes qui ne demandent qu'à être étudiées.

# Induction de chaleurs fertiles chez la chienne à l'aide d'implants de desloréline, un agoniste de la GnRH

## **Travail associé:**

### **Publications:**

**Fontaine E**, Mir F, Vannier F, Gérardin A, Albouy M, Navarro C, Fontbonne A. 2011 : Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist. *Theriogenology*. 76(8): 1561-6

### **Présentations orales associées :**

Fontaine E.; Fontbonne A., 2010: Use of deslorelin to control fertility in the bitch. In Symposium deslorelin: deslorelin in practice, 7th EVSSAR Congress. Louvain la Neuve, Belgium, 14th-15th May, p15-17, pp. 15-17.

### **Posters:**

Fontaine E.; Mir F.; Vannier F.; Gerardin A.; Kontadakis K.; Albouy M.; Fontbonne A., 2010: Oestrus induction in anoestrous bitches of various breeds using subcutaneous deslorelin implants 7th EVSSAR Congress. Louvain la Neuve, Belgium, p113.

**Résumé:** Dans cette première partie de notre travail, nous nous sommes attachés à étudier l'utilisation de la desloréline en vue d'induire des chaleurs fertiles chez la chienne. 32 femelles adultes en anœstrus, appartenant à des races variées, ont été recrutées et réparties en deux groupes : dans le premier (G1), les chiennes se trouvaient entre 80 et 160 jours après leurs dernières chaleurs (n=8), alors que dans le second, elles se situaient 200 à 590 jours après celles-ci (n=24). Pour chacune d'entre elles, un implant de desloréline (Suprelorin®4,7mg, Virbac, France) a été inséré par voie sous-cutanée en zone ombilicale, et ovulation, fertilité et taille des portées éventuellement obtenues ont par la suite été étudiées. Tous les animaux ont présenté des signes de chaleurs  $4,3 \pm 1,4$  jours après la pose de l'implant [2 à 7 jours]. Dans le groupe G1, 62,5% des chiennes ont ovulé, contre 83,3% dans le groupe G2. Une chienne a refusé la saillie : comme aucune insémination n'a pu alors être réalisée, cet animal n'a pas été pris en compte dans le calcul du taux de fertilité. Dans le groupe G1, seules 2/8 chiennes ont été diagnostiquées gestantes 21 jours post-ovulation. Cette proportion se portait à 78,3% des animaux pour le groupe G2. En moyenne, des portées de  $6,7 \pm 3,5$  chiots [1 à 14] ont été obtenues. Une insuffisance lutéale a été suspectée chez 5 chiennes. Si deux d'entre elles n'étaient pas gestantes, une sur les trois restantes a cependant mis bas prématurément à 58 jours post-ovulation. Nos résultats ont ainsi mis en évidence l'intérêt de l'utilisation d'implants d'agonistes de la GnRH pour l'induction des chaleurs chez la chienne adulte en anœstrus. Un suivi de phase lutéale est cependant fortement recommandé, certains animaux pouvant voir leur phase lutéale perturbée.

## 1. Introduction

L'induction de chaleurs fertiles chez la chienne est un sujet qui a suscité l'intérêt de plusieurs équipes de recherche à travers le monde au cours de ces trente dernières années (Thun et al. 1977, Wright 1980, Shille et al. 1984, Kutzler 2005, de Gier J 2008).

Aujourd'hui, les principaux protocoles utilisés en pratique courante se basent sur l'utilisation d'agonistes dopaminergiques comme la bromocryptine (Kooistra et al. 1999, Zöldág L 2001, Beijerink et al. 2003) ou la cabergoline (Verstegen et al. 1999, Rota et al. 2003, Spattini et al. 2007) : l'initiation d'un tel traitement entraîne l'entrée en chaleurs de plus de 80% des animaux ainsi traités, associé à des résultats satisfaisants en termes de fertilité. Zoldag et al (2001) ont ainsi obtenu 83% (40/48 individus) de chiennes gestantes après traitement à la bromocryptine, les portées avoisinant  $4,8 \pm 1,6$  chiots. Rota et al (2003) ont obtenu des résultats similaires avec de la cabergoline : 10/12 chiennes (83%) sont entrées en chaleurs et toutes ont été gestantes par la suite (10/10 chiennes) avec en moyenne  $5,2 \pm 0,5$  chiots. Seul inconvénient, ces agonistes dopaminergiques nécessitent une administration quotidienne pouvant aller de 4 à 30 jours selon le stade du cycle auquel le traitement est initié (début, milieu ou fin d'anœstrus) (Verstegen et al. 1999).

Dans cette indication chez les animaux de rente et la jument, une autre alternative consiste en l'utilisation d'agonistes de la GnRH (Noakes et al. 2009), ceux-ci induisant l'entrée en chaleurs suite à la stimulation hypophysaire – augmentation des concentrations sériques des gonadotrophines FSH et LH - consécutive à leur administration (McRae et al. 1985, Trigg et al. 2001, Johnson et al. 2002, Padula et MacMillan 2005). Mais l'existence de formes injectables à courte durée de vie, nécessitant une administration quotidienne en vue d'obtenir l'effet escompté, a longtemps représenté un frein conséquent à leur utilisation chez la chienne (McRae et al. 1985). Le développement d'implants biocompatibles permettant une délivrance prolongée de ces produits a cependant changé la donne et a été utilisé avec succès chez la jument (Johnson et al. 2002), la vache (Padula et MacMillan 2005) et la chienne (Trigg et al. 2001, Trigg et Yeates 2008).

Dans l'espèce canine, les premiers résultats rapportés par Kutzler et al (2005) et Volkmann et al (2006a) semblaient prometteurs. Tous les animaux traités avaient présenté des chaleurs et ovulé suite à un traitement à base d'implants de l'agoniste de la GnRH desloréline (Kutzler 2005, Volkmann et al. 2006a). Les chaleurs étaient détectées 3 à 5 jours après la pose de l'implant, et les résultats de fertilité obtenus s'avéraient plutôt intéressants (5/8 -62%-

chiennes pour Kutzler et al, 9/13 -69%- pour Volkmann et al). Récemment également, une autre étude a pointé du doigt l'intérêt de l'utilisation de ces implants pour l'induction de l'œstrus chez la chienne de race Beagle (Walter et al. 2011).

Cependant et comme nous le soulignons dans notre première partie, ces résultats ont été principalement obtenus sur des chiennes Beagles en œstrus appartenant à des colonies expérimentales, et peu de données ont été publiées concernant l'utilisation de la desloréline à cet effet dans d'autres races canines (Lanna et al. 2010).

Notre but était donc d'évaluer l'utilisation de ces implants contenant de la desloréline dans le cadre de l'induction des chaleurs sur des chiennes adultes de races diverses et d'évaluer les résultats de fertilité dans ces conditions.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Animaux

32 chiennes (3,2±1,4 ans, de 1 à 6 ans, 17 races différentes, aucun antécédent médical) ont participé à cette étude. Trois de ces animaux avaient des antécédents d'infertilité.

Taille	Races correspondantes
Petite taille (<10kg)	Bichon frisé (n=1) ; Carlin (n=1) ; Cavalier King Charles (n=5)
Taille moyenne (10-20kg)	Beagle (n=4) ; Bouledogue français (n=2) ; Mini Bull Terrier (n=1) ; Cocker anglais (n=2)
Grande taille (>20kg)	American Staffordshire Terrier (n=1); Berger Allemand (n=7) ; Berger de Brie (n=1) ; Boxer (n=1) ; Bull Dog (n=1) ; Dobermann (n=2) ; Bull Terrier (n=3) ; Dogue Argentin (n=1) ; Pointer (n=1) ; Rottweiler (n=1).

Tableau 1: Caractéristiques des chiennes ayant participé à l'étude

Comme défini dans la Tableau 1, ces animaux ont été répartis selon leur taille : 7 chiennes (21,9%) ont été considérées de petite taille, 9 (28,1%) comme de taille moyenne et 16 (50%) comme chiennes de grande taille.

Deux groupes ont été considérés : les chiennes dont le début des dernières chaleurs remontait à 80 à 160 jours avant leur entrée dans le protocole (G1, n=8) et celles présentées en anœstrus tardif 200 à 590 jours après le début de leurs dernières chaleurs (G2, n=24).

## 2.2 Critères d'inclusion

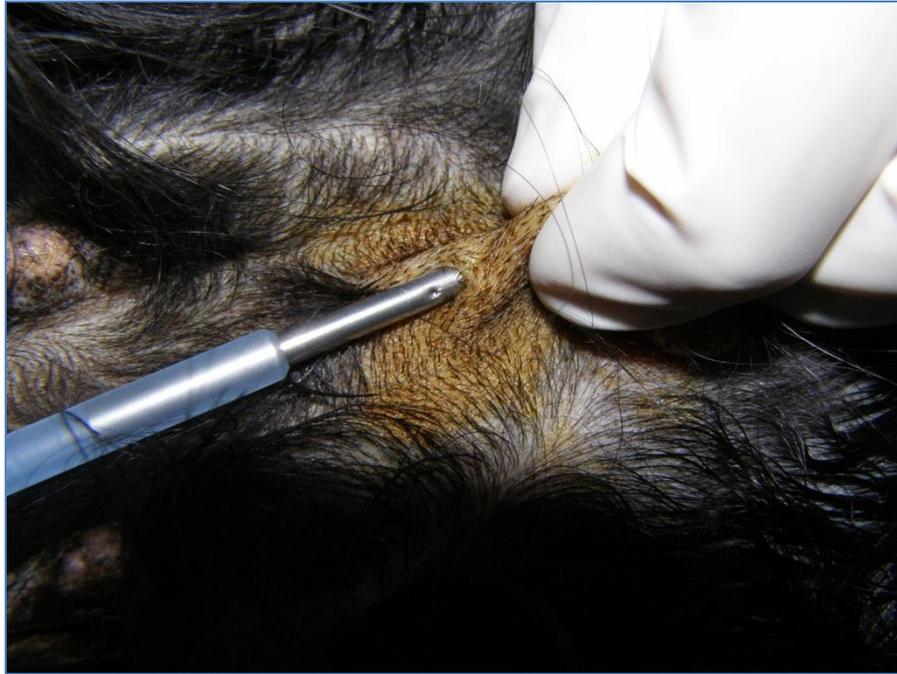
Avant qu'un animal n'intègre le protocole, celui-ci était systématiquement soumis aux examens complémentaires suivants : une cytologie vaginale, une mesure quantitative de la progestéronémie sanguine et une échographie de l'appareil génital (Fontbonne et al. 2008) . Les critères d'inclusion sont listés dans le Tableau 2.

Examens complémentaires	Critères d'inclusion
Frottis vaginal	<p>Pas de signe d'imprégnation œstrogénique</p> <p>Pas de signe d'inflammation</p>
Progestéronémie sanguine	<1 ng/mL
Echographie de l'appareil genital	<p>Pas de structures anechogènes/hypoéchogènes</p> <p>&gt;3mm dans deux ovaires</p> <p>Aucune anomalie utérine</p>

Tableau 2 : Critères d'inclusion dans le protocole.

## 2.3 Traitement

Un implant contenant 4,7mg de desloréline (Suprelorin®, Virbac, Carros, France (Trigg et al. 2001) a ensuite été administré aux chiennes du protocole par voie sous-cutanée en région ombilicale (voir Figure 3). Aucune tranquillisation ni sédation n'était réalisée pour la pose de l'implant. La chienne était placée en décubitus dorsal, sa contention étant assurée par deux aides. La zone ombilicale était ensuite rasée, nettoyée et désinfectée à l'aide d'une solution de polyvidone iodée, puis l'implant était mis en place. Le jour de la pose de l'implant a été considéré comme J0.



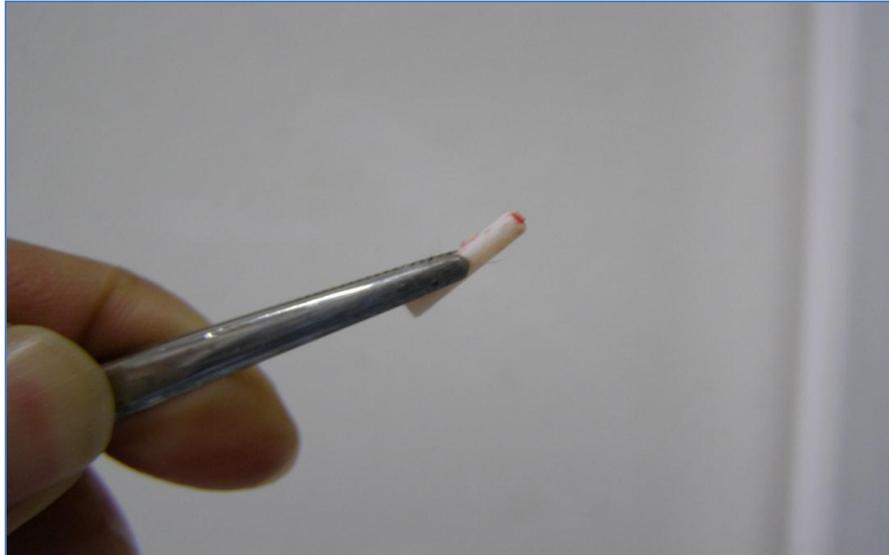
*Figure 3: Pose de l'implant d'agoniste de la GnRH en région ombilicale*

#### **2.4 Détermination du moment de l'ovulation**

Une fois la chienne rentrée en chaleurs, un suivi de sa phase folliculaire a été mis en place pour détecter le moment de l'ovulation à l'aide de mesures quantitatives de la progestéronémie sanguine (Elecys®2010, Roche Diagnostics –concernant la description de la technique de dosage, voir Reynaud et al, 2005) et de réalisation d'échographies ovariennes. Le jour de l'ovulation a été déterminé comme le jour où la progestéronémie a atteint 5-6 ng/mL associé à des signes échographiques d'ovulation (collapsus des follicules ovariens, présence de liquide dans la région pérovarienne) (Fontbonne et al. 2008). La durée (en jours) entre le moment d'implantation de l'animal et celui de son ovulation a été par la suite déterminée.

#### **2.5 Retrait de l'implant**

Le jour de l'ovulation, l'implant a été retiré chirurgicalement (voir Figure 4). Une sédation à l'aide de médétomidine (Domitor®, Pfizer, Santé Animale, Paris, France, 5µg/kg IV) et de butorphanol (Torbugesic®, Fort Dodge Santé Animale, Tours, France 50µg/kg IV) était réalisée avant qu'une petite incision à l'aide d'une lame de scalpel ne soit réalisée au-dessus de la zone où se situait l'implant pour retirer celui-ci. La plaie résultante cicatrisait par seconde intention. Celui-ci était quoiqu'il arrive retiré si, 21 jours après sa pose, aucune ovulation n'était survenue.



*Figure 4 : Retrait de l'implant au moment de l'ovulation.*

## **2.6 Mise à la reproduction**

Les chiennes ont ensuite été mises à la reproduction, et en fonction de ce que désiraient les propriétaires, des saillies naturelles ou des inséminations artificielles en semence fraîche ont été réalisées (pour le descriptif de la technique d'insémination, voir Fontbonne et al, 2007b). Lors d'une insémination artificielle, la qualité de la semence utilisée était toujours évaluée : seule une semence de bonne qualité (mobilité >70%, numération >200 millions de spermatozoïdes, formes anormales <30%) était utilisée (Fontbonne et al. 2007a) Deux mises à la reproduction ont été recommandées pour toutes les chiennes, entre 1 et 3 jours après l'ovulation (Fontbonne et al. 2007a).

## **2.7 Suivi de la phase lutéale**

Les chiennes ont été suivies une fois par semaine durant leur phase lutéale, suivi qui consistait à chaque visite en une évaluation de la progestéronémie et une échographie de l'appareil génital. Si la progestéronémie descendait en dessous de 10 ng/mL avant 50 jours post-ovulation, les chiennes étaient alors suspectes d'insuffisance lutéale : une supplémentation à base de progestérone micronisée (Utrogestan®, Besins International, France 10mg/kg, 3 fois par jour jusqu'à 58 jours post-ovulation) était alors instaurée (Fontbonne et al. 2007a).

## **2.8 Résultats de fertilité**

Un diagnostic de gestation par échographie a été réalisé 21 jours post-ovulation, permettant ainsi de déterminer la fertilité (pourcentage de chiennes gestantes par rapport au nombre de chiennes mises à la reproduction) suite à l'application du protocole. Le pourcentage de chiennes ayant mis bas, la taille des portées et le taux de mortalité néonatale post-partum (au moment de la mise-bas, après une semaine et après deux semaines) ont également été relevés.

Par la suite, ces données ont été comparées aux résultats obtenus dans la population générale consultant dans notre centre (Esparel 2010).

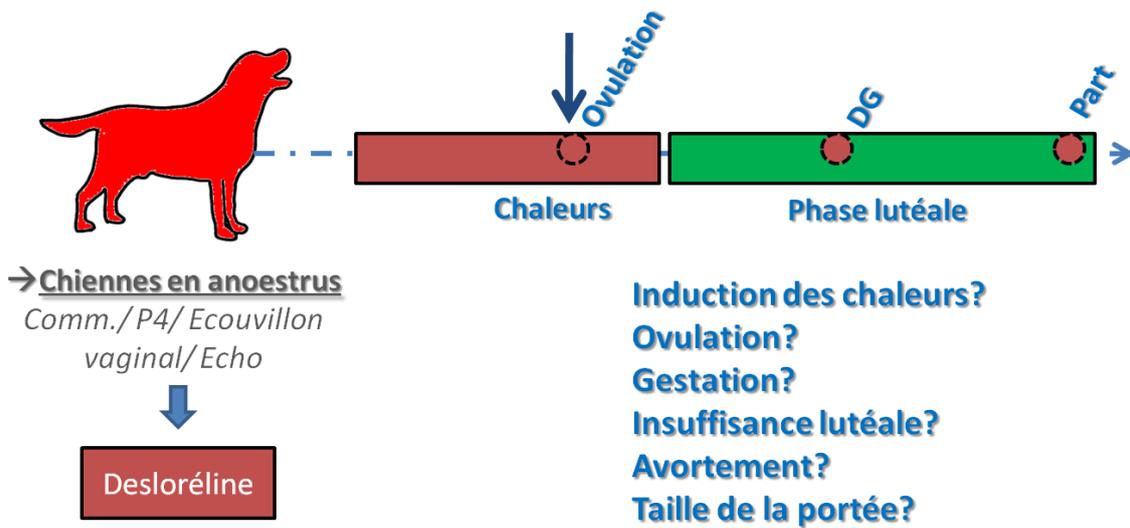


Figure 5 : Résumé du protocole de l'étude

Abréviations : Comm.=commémoratifs/P4=mesure quantitative de la progestéronémie/Echo=échographie/DG= diagnostic de gestation

## 2.9 Analyse statistique

Les données sont retranscrites en moyennes et écart-type (SEM). Une analyse statistique multivariée a été réalisée à l'aide du logiciel R Version 2.15.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Une valeur de  $p < 0,05$  a été considéré comme significative.

## 3. Résultats

### 3.1 Induction des chaleurs

Toutes les chiennes (32/32) ont présenté des signes de chaleurs,  $4,3 \pm 1,4$  jours après la pose de l'implant [2 à 7 jours].

### 3.2 Ovulation

Une ovulation a été observée chez 25/32 chiennes (78,1%),  $11,8 \pm 2,1$  jours après la pose de l'implant [8 à 16 jours]. L'avènement d'un cycle anovulatoire n'est apparu nullement corrélé à l'âge ou la taille des animaux ( $p > 0,05$ ).

Les données concernant G1 et G2 ainsi que leur comparaison avec les données de notre service clinique sont présentées dans la Figure 6.

	<b>G1 (n=8)</b>	<b>G2 (n=24)</b>	<b>Résultats CERCA (n=532)</b>
<b>Ovulation (%)</b>	62.5*	83.3*	-
<b>Fertilité (%)</b>	25*	69.6 (n=23)*	<b>73.5</b>
<b>Mise-bas (%)</b>	12.5*	65.2*	-
<b>Taille des portées</b>	<b>1 portée de 5 chiots</b>	<b>6.7</b>	<b>6.2</b>

Figure 6 : Comparatif des résultats de G1, G2 et de notre centre (Esparel 2010) (\* comparaison entre G1 et G2,  $p < 0.05$ )

### 3.3 Gestation

Une chienne bichon frisé intégrée à l'étude n'a pas pu être saillie et comme aucune insémination artificielle n'a pu également être réalisée sur cette chienne, elle n'a pas été prise en compte dans la suite de l'étude.

Suite aux chaleurs induites par la desloréline, dix-huit chiennes (18/31, soit 58,1%) ont été constatées gestantes. Ce pourcentage était cependant significativement différent entre G1 et G2 (voir Figure 6).

Parmi les chiennes ayant ovulé, 88,2% d'entre elles (15/17) ont été gestantes quand l'ovulation survenait avant 14 jours post-implantation, contre 3/7 après cette date (voir Figure 7).

### 3.4 Insuffisance lutéale

5 chiennes ont été suspectées d'insuffisance lutéale (voir Figure 8) mais ni leur âge, ni leur taille ni le moment du cycle où le traitement par l'agoniste a été administré n'a permis de les démarquer des autres ( $p > 0,05$ ).

Trois chiennes suspectes d'insuffisance lutéale étaient gestantes au moment du diagnostic par échographie. Deux d'entre elles ont été supplémentées avec de la progestérone micronisée et ont mis bas normalement. Une chienne ne l'a pas été et a mis bas prématurément au 58<sup>ème</sup> jour de gestation : aucun autre motif d'avortement particulier n'a pu être déterminé, les chiots étaient mort-nés et avaient un aspect prématuré.

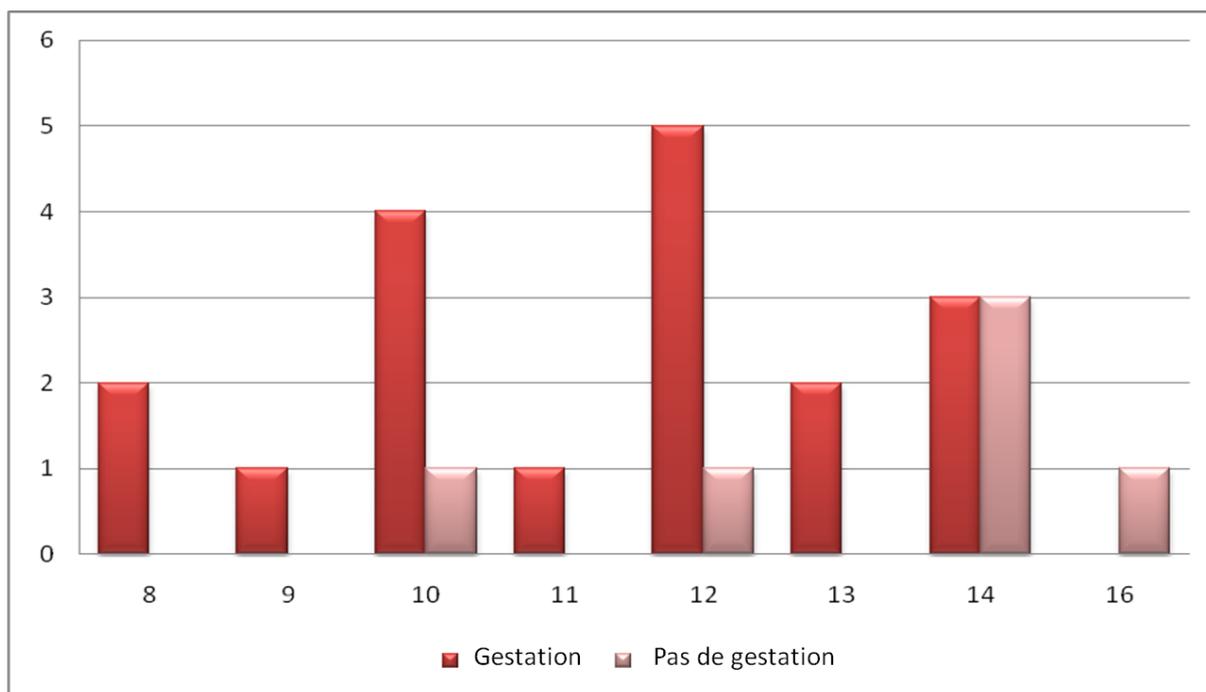


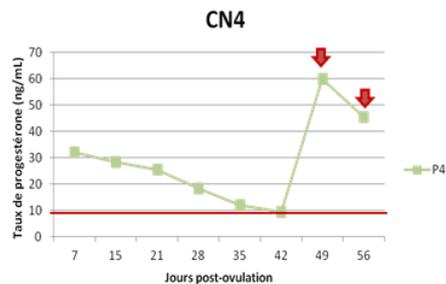
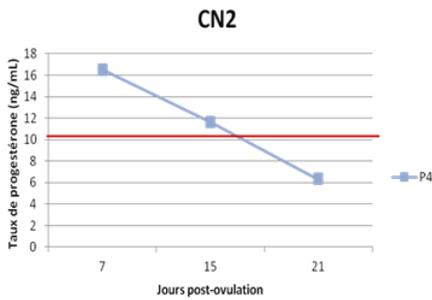
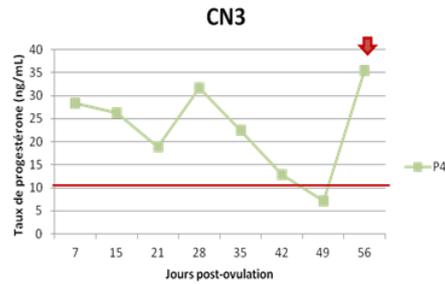
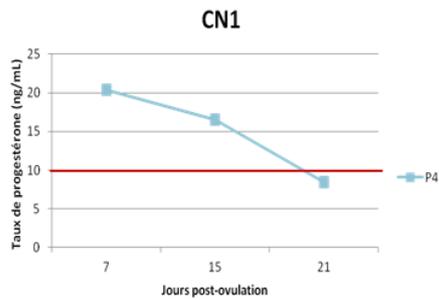
Figure 7: Relation entre l'intervalle pose de l'implant-ovulation et la fertilité (n=31).

### 3.5 Mise-bas/ Taille des portées

Les résultats concernant la mise-bas et la taille des portées sont présentés dans la Figure 7. Une césarienne a été réalisée sur 4 chiennes, une pour un syndrome du chiot unique (Fontbonne et al, 2007b) et 3 à la demande des propriétaires (2 d'entre elles étaient des brachycéphales – 1 Bulldog et 1 Bouledogue Français- et une avait des antécédents de dystocie).

### 3.6 Mortalité néonatale

14/94 chiots étaient mort-nés (14,9%), and seulement 2/88 (2,2%) sont morts avant 15 jours post-partum. Quatre des mort-nés venaient d'une portée de Dogue argentin comportant 14 chiots, ces chiots étaient les quatre derniers à être expulsés. Huit d'entre eux provenaient de la portée de la chienne Cocker suspecte d'insuffisance lutéale et qui a mis bas prématurément à 58 jours de gestation. Les deux autres étaient des chiots Bull-terrier et durant la césarienne, ces animaux ont été sortis de l'utérus mort-nés. Ceux-ci apparaissaient sous-développés en comparaison aux autres individus de la portée.



Chiennes suspectes d'insuffisance lutéale et non gestantes

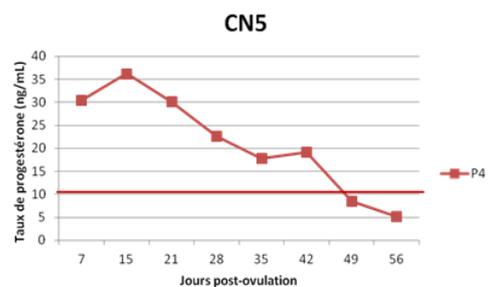
CN1= Berger de Brie, 6 ans  
CN2= Cavalier King Charles, 2 ans

Ces deux chiennes présentaient toutes les deux une progestéronémie inférieure à 10ng/mL au moment du diagnostic de gestation (3 semaines après l'ovulation). Les chiennes n'étant pas gestante, le suivi a été arrêté.

Chiennes suspectes d'insuffisance lutéale et gestantes

CN3= Rottweiler, 5 ans  
CN4= Pointer, 3 ans  
↓ Chiienne sous traitement à base de progestérone micronisée

Ces deux chiennes ont présenté un taux de progestérone inférieure à 10ng/mL 6 (CN 3) et 7 (CN4) semaines après l'ovulation. Une supplémentation à base de progestérone micronisée a été mise en place et les chiennes ont maintenues leurs gestation jusqu'à terme.



Chiienne ayant mis bas prématurément

CN5= Cocker, 6 ans

Cette chienne a présenté une progestéronémie inférieure à 10ng/mL 7 semaines après l'ovulation. Le propriétaire n'a pas souhaité supplémenter l'animal, la chienne a mis-bas prématurément à 58 jours post-ovulation.

Fig 8 : Taux sanguin de progestérone pendant la phase lutéale chez les chiennes suspectes d'insuffisance lutéale (la ligne rouge symbolise la limite à partir de laquelle une insuffisance lutéale est suspectée).

#### 4. Discussion

Dans cette étude, les implants de desloréline se sont révélés une solution efficace en vue d'induire des chaleurs fertiles sur des chiennes adultes traitées. L'induction des chaleurs a en effet été obtenue sur toutes les chiennes en œstrus et a conduit à des taux d'ovulation et de gestation comparables à ceux décrits dans les études utilisant des agonistes dopaminergiques (Zöldág L 2001, Rota et al. 2003).

L'administration des implants en région ombilicale plutôt que dans la muqueuse vestibulaire (Kutzler 2005) s'est avérée intéressante à plus d'un titre. D'un point de vue technique, nous avons trouvé cette localisation plus facile et plus rapide pour l'administration du traitement, du fait qu'aucune sédation ne s'avérait nécessaire. De plus, leur retrait est plus facile que dans la muqueuse vestibulaire (Kutzler et al. 2002, Kutzler 2005). D'ailleurs, Kutzler et al (2009) ont récemment comparé deux sites d'implantation, en sous-cutané entre les épaules (ce qui pourrait être similaire à notre site d'implantation) et dans la muqueuse vestibulaire (Kutzler et al. 2009): aucune différence entre les durées nécessaires pour l'obtention du proœstrus, du pic de LH, du premier frottis de diœstrus et également en terme de nombre de corps jaunes, de nombres de fœtus et de taux de gestation, n'a été mis en évidence, suggérant que ces deux sites sont équivalents. Nous n'avons jamais expérimenté la pose au niveau de la face interne de la cuisse comme décrite par Walter et al (2011), mais le taux de fertilité obtenu dans leur étude différant peu du notre (63,6% de chiennes gestantes pour 11 chiennes contre 58,3% dans notre étude pour 31 chiennes) nous laisse supposer que cette alternative pourrait elle aussi être équivalente.

Nous avons décidé de retirer l'implant au moment de l'ovulation, à la différence de l'équipe de Kutzler qui le retirait au moment du pic de LH (Kutzler et al. 2002, Kutzler 2005). Dans ces études précédentes, cette décision avait été prise de peur que ne s'installe juste avant l'ovulation une suppression des sécrétions hypophysaires – et donc une insuffisance gonadotrope pouvant conduire soit à un défaut d'ovulation soit à une insuffisance lutéale par la suite - suite à une exposition prolongée à la desloréline. Chez les chiens mâles ce phénomène survient généralement entre 12 et 18 jours après la pose de l'implant, les taux de testostérone et de LH atteignant alors des valeurs basales (Trigg et al. 2006, Trigg et Yeates 2008). A ce jour cependant, aucune donnée similaire n'a été rapportée chez la femelle, mais comme chez le mâle, nous suspectons qu'une grande variabilité puisse être retrouvée. Mais cette suppression des sécrétions hypophysaires, si elle survient, pourrait cependant ne pas affecter directement le processus d'ovulation et le maintien des corps jaunes par la suite.

Comme dans les études de Volkmann et al (2006a) et Kutzler et al (2009), le pourcentage de chiennes ayant ovulé était élevé dans notre étude (78,1% des chiennes), alors que l'implant était pourtant retiré beaucoup plus tard : le retrait de l'implant uniquement au moment de l'ovulation ne semble donc pas affecter ce processus. De plus, certaines chiennes maintiennent leur gestation sans que l'implant ne soit retiré (5/8 chiennes dans l'étude de Kutzler et al (2009)), démontrant par la même occasion que cette suppression n'est peut-être pas suffisamment puissante pour induire des insuffisances lutéales chez toutes les chiennes. Bien que, au moins dans certains cas, le retrait de l'implant ne semble pas impératif, nous avons décidé de le retirer au moment de l'ovulation car nous avons observé, lors d'essais préliminaires, que certaines chiennes présentaient des cycles anovulatoires quand l'implant était retiré au moment du pic de LH, peut-être suite à une stimulation trop courte de l'axe hypothalamo-hypophysaire.

Dans notre étude, ces résultats de fertilité étaient proches de ceux rapportés dans la littérature lors de l'utilisation d'agonistes dopaminergiques. Verstegen et al (1999) rapportent 64% de chiennes gestantes après induction des chaleurs à la cabergoline contre 58,1% dans notre étude. Avec les implants d'agonistes de la GnRH cependant, la durée entre la pose de l'implant et l'entrée en chaleurs était plus courte. Toutes les chiennes implantées en anœstrus étaient en chaleurs entre 2 et 7 jours post-implantation, en moyenne environ 4 jours après, quelle que soit leur race, leur âge ou leur taille. Nos données sont dans cette optique en accord avec celles rapportées par Kutzler et al (2005, 2009) et Volkmann et al (2006a), qui ont observé des chaleurs dans les 3 à 5 jours après l'implantation avec un agonistes de la GnRH sur des beagles expérimentaux. Avec de la cabergoline, Verstegen et al (1999) ont rapporté une induction des chaleurs  $20\pm 2$  jours après le début du traitement en anœstrus précoce,  $14\pm 3$  jours en milieu d'anœstrus et  $6\pm 1$  jours en anœstrus tardif. Les implants de desloréline apparaissent donc clairement comme une alternative plus rapide pour induire des chaleurs chez la chienne.

Nous avons également rapporté 7 cycles anovulatoires, comme décrit chez certaines chiennes Beagles traitées à la desloréline (Volkmann et al. 2006a) et avec d'autres GnRH agonistes (Concannon 1989, Concannon et al. 2006). Même si ces cycles anovulatoires semblent survenir plus fréquemment chez des animaux implantés en anœstrus précoce (notre groupe G1), aucune évidence statistique n'a pu être démontrée. Quatre des chiennes qui n'ont pas ovulé ont également été implantées en anœstrus tardif. Il est possible que des chaleurs silencieuses soient survenues sur ces chiennes quelques mois avant le traitement à base de

desloréline. Ces animaux auraient alors été implantés en anœstrus précoce plutôt que tardif. La faible réponse hypophysaire à toute stimulation par la GnRH à ce stade du cycle, comme démontré par Van Haaften et al (1994) pourrait expliquer pourquoi la plupart de ces chiennes n'ont pas ovulé (Van Haaften et al. 1994). Cependant certaines chiennes implantées en anœstrus précoce ont quand même ovulé. Deux d'entre elles ont même été gestantes et une a conduit sa gestation à terme en donnant naissance à 5 chiots. Par conséquent, les facteurs expliquant une absence d'ovulation chez les chiennes traitées à la desloréline ne sont pas clairs. Une sensibilité individuelle est donc fortement suspectée, des résultats rapportés chez la jument montrant de plus que certains individus répondront bien à ce type de stimulation hormonale alors que ce ne sera pas le cas chez d'autres (Samper 2008). Un contexte hormonal particulier (taux élevés d'œstrogènes ou de prolactine (Rosato et Garofalo 2002, George et al. 2008)) pourrait expliquer ce phénomène, mais ces hypothèses restent encore à étudier.

De façon intéressante et comme rapporté dans les études précédentes sur des beagles expérimentaux (Kutzler 2005, Volkmann et al. 2006a, Walter et al. 2011), le temps entre l'implantation et l'ovulation semble plutôt constant. En effet dans notre étude l'ovulation survient en moyenne 11 jours après l'implantation (8 à 16 jours), alors que lors de chaleurs naturelles, ce moment reste toujours très variable pouvant aller de 5 à 30 jours après le début des chaleurs (Arthur et al. 1996). Comme certaines chiennes ovulent dès 8 jours après l'initiation du traitement, le suivi de chaleurs devrait être débuté 6 jours après le début du traitement. Sur cette durée, une différence significative entre les chiennes gestantes et non gestantes a été notée. Quand l'ovulation survenait avant 14 jours post-implantation, 15/17 chiennes étaient gestantes. Bien que l'implant soit retiré 21 jours après son insertion si aucune ovulation n'avait eu lieu (comme décrit dans notre protocole), nous pensons que ceux-ci devraient être retirés au maximum 15 jours après leur pose car il est peu probable qu'une ovulation survienne après.

L'administration prolongée d'agonistes de la GnRH pourrait induire une insuffisance lutéale secondaire à la suppression des sécrétions hypophysaires, la LH étant un des principaux agents lutéotrophes chez la chienne (de Gier et al. 2006). Cependant, aucune donnée sur cet aspect n'a été rapportée chez la chienne. Chez le mâle, cette suppression survient généralement entre 12 à 18 jours après l'implantation (Trigg et al. 2001). Nous suspectons qu'une insuffisance lutéale soit survenue chez 5 chiennes. Une d'entre elle ne recevant pas de supplémentation en progestérone a mis bas prématurément, alors que deux autres ont pu conduire leur gestation à terme grâce à ce traitement. Les corps jaunes étant réfractaires à

toute modification de la concentration sanguine en LH jusqu'à 35 jours de gestation (Fontbonne et al. 2007a), un contrôle de cette progestéronémie devrait être réalisé avant cette date, au moment du diagnostic précoce de gestation et avant 30 jours de gestation. Si cette progestéronémie sanguine est inférieure à 10 ng/mL, une supplémentation devrait être proposée. Si ce n'était pas le cas, des prélèvements sanguins devraient être réalisés chaque semaine ou toutes les deux semaines pour instaurer une supplémentation si nécessaire.

Des portées de taille importante ont principalement été obtenues dans notre étude, la taille moyenne avoisinant les 7 chiots. Seules trois chiennes ont eu un seul chiot, toutes les autres ayant au moins 5 chiots. Parmi celles-ci se trouvaient deux Cavalier King Charles appartenant au même élevage. Le mâle utilisé ne voulant pas saillir, une insémination artificielle a été réalisée, mais l'animal présentait une faible libido lors du prélèvement et sa semence était apparemment très peu concentrée (aucune évaluation précise de celle-ci n'a cependant été réalisée). La troisième chienne était une femelle Rottweiler, saillie par un mâle de 11 ans. La semence de celui-ci n'a pas pu être analysée et sa qualité peut être remise en question. Il nous semble donc important que le facteur mâle soit complètement maîtrisé (analyse détaillée de la semence avant utilisation en saillie ou insémination) pour optimiser les résultats de fertilité lorsqu'un traitement aux agonistes de la GnRH est utilisé.

L'importance de la taille des portées chez la plupart des chiennes par rapport à ce que nous rencontrons dans notre activité quotidienne (Esparel 2010) pourrait être liée à un plus fort recrutement folliculaire en réponse à la stimulation hypophysaire par l'agoniste de la GnRH.

14 morts nés ont été rapportés, dont 8 provenant de la chienne Cocker suspecte d'insuffisance lutéale et n'ayant pas été supplémentée en progestérone. 86/88 des chiots restants ont survécu après 15 jours de vie. Par conséquent, ce traitement à base de desloréline ne semble pas avoir d'influence sur la survie des chiots.

## **5. Conclusion**

Les implants de desloréline induisent des chaleurs fertiles chez les chiennes adultes en anœstrus, quelle que soit la race de celles-ci. Il est préconisé de les utiliser en anœstrus tardif, période du cycle où les meilleurs résultats en termes de fertilité sont obtenus, associés à un suivi de chaleurs pour déterminer de façon précise le moment de l'ovulation. Une anovulation peut survenir dans certains cas. Nous recommandons donc de retirer l'implant 15 jours après son administration si aucune ovulation n'a été obtenue. Les facteurs responsables de cette

anovulation ainsi que les stratégies visant à les contourner restent encore à étudier. La phase lutéale doit être contrôlée, des insuffisances lutéales pouvant survenir chez certaines chiennes.

Lors de la réalisation de cette étude, nous nous sommes cependant rendu compte que certaines chiennes présentaient des profils de sécrétion de progestérone très différents de ceux que nous rencontrions sur les chiennes en chaleurs naturelles. Cet aspect est détaillé dans la partie suivante de notre travail.

# Profils de sécrétion de la progestérone durant le suivi de chiennes induites en chaleurs par des implants de desloréline

## **Travail associé:**

## **Publication:**

**Blood progesterone profiles during timing of ovulation in estrus-induced bitches treated with deslorelin implants**, E. Fontaine, F. Mir, F. Vannier, A Gerardin, M. Albouy, A. Fontbonne. En preparation.

**Résumé:** Les protocoles utilisés pour l'induction des chaleurs chez les mammifères peuvent conduire à des modifications de l'environnement hormonal durant la phase folliculaire induite, d'où des profils hormonaux anormaux pré et post-ovulatoires (insuffisances lutéales). Ceci n'a cependant pas été rapporté chez les chiennes recevant des agonistes de la GnRH dans cette indication. Notre but était donc de comparer les profils de sécrétion pré-ovulatoires de progestérone des chiennes induites en chaleurs suite à l'administration de desloréline à celui de chiennes présentant des chaleurs naturelles. Les chaleurs ont été induites sur 18 chiennes par un implant de desloréline (Suprelorin®4,7mg, Virbac, Carros, France) (G1). Le taux de progestérone sanguin a été dosé pendant les chaleurs qui ont suivi et les profils ont été comparés à ceux de 433 chiennes à chaleurs spontanées suivies dans notre centre clinique (CERCA/ Centre d'Etudes en Reproduction des Carnivores). L'intervalle entre le jour supposé du pic de LH et l'ovulation déterminé par dosage de progestérone était significativement plus long dans G1 que dans G2 ( $p < 0,05$ ). Des profils inhabituels de sécrétion de progestérone ont été retrouvés chez 6/18 chiennes (33,3%) dans G1 et 16/431 chiennes (3,7%) dans G2 ( $p < 0,05$ ). Ces profils certes anormaux ne semblaient pas pour autant interférer avec les résultats de fertilité.

## 1. Introduction

Parmi les mammifères, les chiennes font figure d'exception pour tout ce qui a trait à leur physiologie de la reproduction. En effet, à la différence des autres espèces de mammifères chez lesquelles la sécrétion de progestérone survient après la mise en place des corps jaunes (Noakes et al. 2009), dans l'espèce canine, les cellules de la granulosa des follicules ovariens produisent cette hormone à des taux détectables par les dosages de routine avant l'ovulation (Concannon et al. 1977, Concannon et al. 1989). Aussi, même si le dosage de LH reste considéré comme la technique de référence pour déterminer de façon précise le moment de l'ovulation, les aspects pratiques de la mesure de la progestéronémie sanguine en font aujourd'hui le test le plus fréquemment utilisé en médecine vétérinaire dans cette indication (Goodman 2001).

Le suivi de chaleurs tente de déterminer l'avènement de deux phénomènes : le pic pré-ovulatoire de LH et l'ovulation en elle-même. Même si la relation entre les taux de progestérone et le pic de LH est toujours incertaine chez la chienne, il a été montré que l'augmentation initiale de la progestéronémie sanguine observée durant l'œstrus survient généralement juste avant ou juste après l'augmentation du taux de LH (de Gier et al. 2006). Quand celui-ci survient, les valeurs de la progestérone ont été déterminées à  $1,6 \pm 0,2$  ng/mL (Concannon et al. 1977),  $2,95 \pm 1,2$  ng/mL (Guérin et al. 1997),  $1,21 \pm 0,92$  ng/mL (Concannon et al. 2001), ou  $2,2 \pm 0,18$  ng/mL (Kutzler et al. 2003). D'après England et Concannon (2002), la valeur de 2,0 ng/mL peut être considérée comme correspondant au jour du pic de LH, ou aux 24 heures suivantes. Après ce pic, l'ovulation est supposée se produire 2 à 3 jours plus tard (Phemister et al. 1973, England et Yeager 1993) et cet événement est accompagné de taux de progestérone sanguine variant de 4 à 10 ng/mL (Wright 1991). Indépendamment de leur taille, la plupart des chiennes ovulent à 5-6 ng/mL de progestérone (Marseloo et al. 2004).

Même si ces repères semblent s'appliquer à la plupart des chiennes, certains profils inhabituels peuvent être rencontrés durant un suivi de chaleurs (Meyers-Wallen 2007).

Ceux-ci peuvent être divisés en trois groupes distincts :

- Anovulation : le taux de progestérone commence à augmenter puis n'atteint pas les valeurs d'ovulation et retombe à des valeurs basales.
- Montée lente : l'intervalle entre le jour estimé du pic de LH et l'ovulation est supérieur ou égal à 3 jours (Grellet et al. 2007)

- Variations anormales : les valeurs de la progestéronémie augmentent, puis diminuent avant d'augmenter à nouveau pour atteindre les valeurs d'ovulation

Aucune donnée quantitative concernant la fréquence de ces phénomènes n'est disponible dans la littérature ni pour des chaleurs spontanées, ni suite à des chaleurs induites.

Les protocoles pour induire les chaleurs chez les bovins et équidés sont décrits comme pouvant conduire à des modifications de l'environnement hormonal durant les phases folliculaires qui suivent (Noakes et al. 2009). Des modifications dans les profils de sécrétion de progestérone n'ont pas été décrites lors d'induction par des agonistes dopaminergiques comme la cabergoline, qui est actuellement le traitement de choix lors d'induction de chaleurs chez la chienne (Verstegen et al. 1999). Aucune donnée de ce type n'est également rapportée dans les études où les agonistes de la GnRH ont été utilisés (Kutzler 2005, Volkmann et al. 2006a).

Notre but était donc de comparer les profils de la progestéronémie sanguine des chiennes où l'œstrus avait été induit à celui de chienne qui présentaient un œstrus naturel.

## **2. Matériels et méthodes**

### **2.1 Animaux et traitement**

18 chiennes en anœstrus (G1) ont été induites en chaleurs à l'aide d'un implant de desloréline (Suprelorin®4.7mg, Virbac, Carros, France) comme décrit dans le chapitre précédent (chiennes en anœstrus, implant posé en sous-cutané en région ombilicale) Les 433 chiennes de G2 (données recueillies sur les chiennes suivies de janvier 2005 à décembre 2008) étaient présentées pour un suivi sur des chaleurs naturelles et ont été utilisées comme groupe témoin.

### **2.2 Suivi des chaleurs**

Cinq à six jours après le début des chaleurs (visualisées par l'apparition de pertes vulvaires sanguines), des dosages quantitatifs de la progestéronémie sanguine (P4) ont été réalisés par chimiluminescence (Elecsys®2010, Roche Diagnostics, - voir Reynaud et al, 2009 pour le descriptif de la technique-). Au moins 3 prises de sang sur tube hépariné étaient réalisées chez chaque chienne au cours du suivi, permettant d'estimer le début d'augmentation de la progestéronémie (considéré quand  $P4 \approx 2$  ng/mL) et le jour d'ovulation (considéré quand  $P4 \approx 6$  ng/mL). Chez les chiennes ayant reçu un traitement à base de desloréline, l'ovulation était de plus confirmée par échographie ovarienne (Fontbonne et al. 2008).

### 2.3 Analyse des profils de la progestéronémie sanguine

Les durées entre le jour supposé du pic de LH et le jour de l'ovulation ont été calculées pour toutes les chiennes et les valeurs moyennes évaluées pour chaque groupe.

Trois groupes ont été considérés :

- Profil normal, où l'intervalle entre le jour supposé du pic de LH et l'ovulation est d'environ 2 jours.
- Montée « lente », où cet intervalle est supérieur ou égal à 3 jours.
- Variations inhabituelles, où ces variations durant le suivi de chaleurs semblent aberrantes.

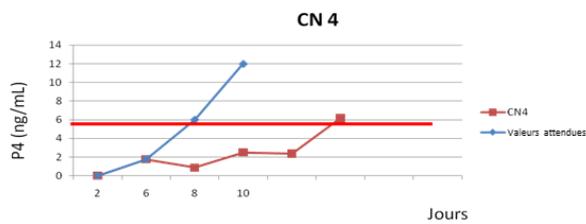
### 2.4 Analyse statistique

Les données ont été retranscrites en moyennes et écart-type. Une analyse statistique multivariée a été réalisée à l'aide du logiciel R Version 2.15.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Une différence significative était considérée quand  $p < 0,05$ .

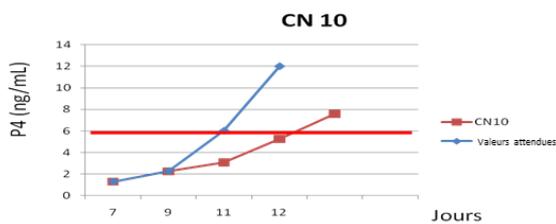
## 3. Résultats

Les profils anormaux (montée lente et variations inhabituelles) de progestérone ont été retrouvés chez 6/18 (33,3%) chiennes induites et chez 16/431 (3,7%) des femelles à chaleurs spontanées. Les 6 profils anormaux de progestérone retrouvés dans G1 sont représentés ci-dessous (Figure 1).

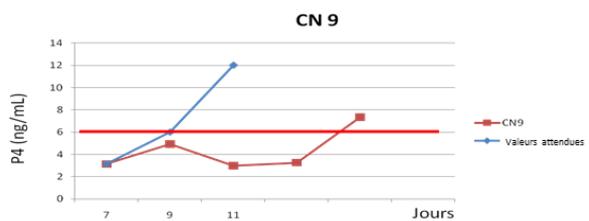
Les données concernant l'intervalle entre le pic de LH supposé et l'ovulation et les proportions des différents types de profils de progestéronémie inhabituels (« montée lente » et « variations inhabituelles ») sont données pour G1 et G2 dans le Tableau 2. L'intervalle entre le jour supposé du pic de LH et l'ovulation était significativement plus long dans G1 que dans G2 ( $p < 0,05$ ). Les profils anormaux de la progestéronémie sanguine étaient également plus fréquemment rencontrés sur les chiennes traitées avec de la desloréline ( $p < 0,05$ ) en comparaison au groupe témoin.



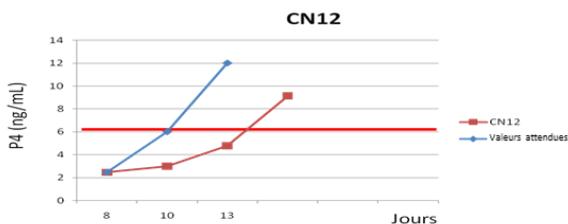
La chienne CN4 présente un profil qualifié de « montée lente », avec une progestéronémie stagnante avant d'atteindre la valeur d'ovulation.



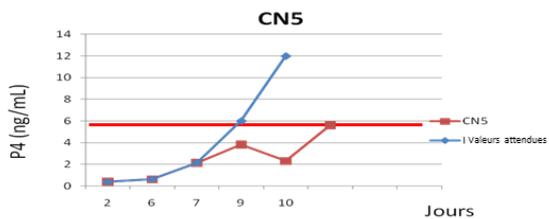
La chienne CN10 présente une montée « lente » : après avoir atteint 2,25ng/mL, la chienne mettra 3 jours pour ovuler.



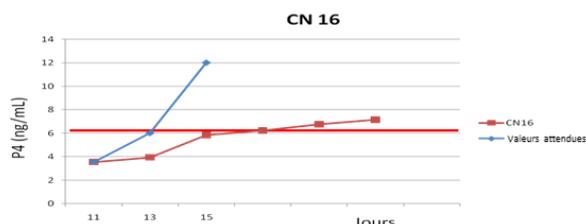
La chienne CN9 présente une variation inhabituelle de la progestéronémie, après être montée à 4,93ng/mL, elle est redescendue à 2,99ng/mL avant de remonter en deux jours à 7,36ng/mL, valeur compatible avec l'ovulation.



La chienne CN12 présente une « montée lente » en progestérone, passant de 2,46ng/mL à des valeurs compatibles avec l'ovulation en 5 jours.



La chienne CN5 présente une variation inhabituelle de la progestéronémie, cette chienne étant montée à 3,82ng/mL avant de revenir à une valeur de 2,3ng/mL puis remonter à 5,6ng/mL, valeur compatible avec l'ovulation.



La chienne CN16 présente une « montée lente », alors qu'elle était à 3,55ng/mL, l'ovulation ne sera constatée par échographie que 5 jours plus tard.

Figure 1: Profils anormaux de progestérone (jours/début des chaleurs) chez les chiennes traitées avec des implants de desloréline (tracé rouge). Le tracé bleu représente les valeurs qui auraient été attendues lors d'une évolution habituelle. La ligne rouge symbolise le taux moyen observé à l'ovulation.

	G1	G2
Intervalle pic de LH supposé et ovulation (jours)	2,7±1,1 *	2,3±0,6 *
Profil habituel (%)	66,7 * (n=12)	96,3 (n=415) *
Montée “lente” (%)	22,2 * (n=4)	2.3 (n=10)*
Variations inhabituelles (%)	11,1 * (n=2)	1.4 (n=6)*

Tableau 2: Paramètres étudiés dans les suivis de chaleurs de G1 et G2 (\*  $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

L'utilisation d'implants de desloréline pour l'induction des chaleurs conduit donc plus souvent à des profils de sécrétion de progestérone inhabituels en phase folliculaire que lors de chaleurs naturelles : une proportion non négligeable des animaux ainsi traités peut donc présenter des différences avec les profils de sécrétion classiquement décrits dans la littérature (Linde-Forsberg et al. 2008). Certains auteurs ont montré une variation diurne des sécrétions de progestérone chez la chienne (Linde-Forsberg et al. 2008) : ce schéma de sécrétion aurait pu jouer un rôle dans les résultats obtenus ici, les prises de sang ayant été réalisées à différents moments de la journée dans notre étude. Cependant les variations observées ici l'ont été en période pré- ou péri-ovulatoire, à contrario des études précédemment citées où celles-ci sont rapportées au moment de l'optimum de fertilité (Marseloo et al. 2004) ou durant le dioestrus (Concannon et al. 1989) : le protocole utilisé semble donc directement impliqué. Le rôle des variations de la sécrétion des gonadotrophines suite à la stimulation hypophysaire par la desloréline pourrait jouer un rôle important dans l'apparition de ces profils anormaux, mais à ce jour chez la chienne aucune donnée à ce sujet n'est rapportée. Ces profils restent donc à étudier.

Il a également pu être confirmé grâce à la conjonction des dosages de progestérone et de l'échographie ovarienne que les chiennes traitées par des implants de desloréline ovulaient à des valeurs similaires que celles soumises à des chaleurs naturelles, et donc assez proche des 6ng/mL décrit par Marseloo et al (2004). Ainsi, même si des profils de sécrétion inhabituels sont retrouvés lors d'induction à la desloréline, le taux au moment de l'ovulation reste le même. Si la réalisation d'échographies ovariennes durant le suivi des chaleurs de ces chiennes peut toujours apporter des détails intéressants comme décrit par Fontbonne (2008), cet

examen n'en est pas pour autant impératif. Le suivi sur la base unique du dosage de progestérone lors d'induction est donc possible.

Il serait utile de se demander à quel point ces modifications hormonales sont susceptibles d'affecter la fertilité des chiennes. Cependant l'impact semble minime car les résultats de fertilité que nous avons obtenus lors de l'utilisation de ce type de protocole sont bons (cf. chapitre précédent du manuscrit sur l'induction des chaleurs à l'aide d'implants de desloréline). De plus, sur les 6 chiennes qui ont présenté ces profils hormonaux inhabituels, seule une d'entre elles est n'a pas été gestante après mise à la reproduction.

## **5. Conclusion**

Les profils de sécrétion de progestérone en période pré- et périovulatoire chez les chiennes traitées à la desloréline semblent différer de façon significative des résultats obtenus sur des chiennes ayant des cycles naturels. Cependant, ces modifications ne semblent pas affecter la fertilité. Pour une meilleure compréhension des mécanismes mis en cause, les profils de sécrétions en gonadotrophines lors de chaleurs induites restent à étudier. Le protocole d'induction des chaleurs utilisé dans notre travail donnant des résultats satisfaisants essentiellement lorsque les chiennes étaient traitées en anœstrus tardif, nous nous sommes intéressés dans la suite de notre travail à définir un protocole visant à obtenir des chaleurs fertiles lors d'induction en anœstrus précoce.

# **Raccourcissement de l'intervalle inter- œstrus chez la chienne un l'aide d'un protocole combinant l'anti-progestérone aglépristone et l'agoniste de la GnRH desloréline.**

## **Travail associé:**

## **Publication:**

**Shortening the interoestrus interval in the bitch using combination of aglepristone and desloréline implants.** E. Fontaine, F. Mir, A Gerardin, M. Albouy, A. Fontbonne. En préparation.

**Résumé:** Le cycle mono-œstrien de la chienne n'alloue dans cette espèce que des périodes restreintes de mise à la reproduction par année. Aussi induire des chaleurs fertiles au début de la période d'anœstrus pourrait permettre de nouvelles stratégies de mise à la reproduction. En combinant les effets de l'anti-progestérone aglépristone et de l'agoniste de la GnRH desloréline, notre but était donc de proposer un protocole capable 1) de réduire de façon significative l'intervalle interœstrus et 2) de permettre la mise à la reproduction dans le même temps. 15 chiennes en milieu de diœstrus ont participé à cette étude et ont été réparties dans deux groupes. Le jour d'inclusion était considéré comme J0. Dans le premier groupe (G1, n=7), les animaux recevaient de l'aglépristone (Alizine®, Virbac, Carros, France), à raison de 10mg/kg deux fois à 24h d'intervalle puis une fois par semaine jusqu'à ce que le niveau de progestérone plasmatique descende en dessous de 2 ng/mL. A J60, un implant de desloréline (Suprelorin®4,7mg, Virbac, France) était administré par voie sous-cutanée dans la région ombilicale. Dans le second groupe (G2, n=8), les animaux ne recevaient pas d'aglépristone et seul l'agoniste de la GnRH était implanté à J60. Les implants étaient retirés le jour de l'ovulation. Des chaleurs ont ainsi été induites chez toutes les chiennes mais l'ovulation n'a été détectée que chez 50% des chiennes du groupe G1 et 62,5% dans le groupe G2. Aucune gestation n'a été observée parmi les chiennes de G1. Une seule chienne de G2 a donné naissance à une portée de 5 chiots. Le temps entre l'implantation et l'entrée en chaleurs, le taux d'ovulation, l'intervalle implantation-ovulation et les taux de fertilité n'étaient pas significativement différents d'un groupe à l'autre. Le protocole combinant aglépristone et desloréline n'améliore donc pas de façon significative les résultats. Si le raccourcissement de l'interœstrus s'est donc révélé effectif, d'autres alternatives doivent être trouvées concernant la fertilité.

## 1. Introduction

Le cycle monoœstrien retrouvé dans l'espèce canine n'autorise que peu de possibilités de mise à la reproduction : en effet, la plupart des chiennes ne présentent que deux périodes de chaleurs par an (Olson et al. 1984, Jöchle 1987). La situation peut même être pire dans certaines races dites primitives comme le Basenji ou les hybrides de loups chez lesquelles une seule période de chaleurs annuelle a lieu (Christiansen 1984, Fontbonne et al. 2007a), nécessitant de la sorte une gestion optimale de la mise à la reproduction pour que celle-ci puisse conduire à une gestation. Sur ces bases physiologiques, le raccourcissement de l'intervalle interœstrus pourrait se révéler d'un grand intérêt, aussi bien d'un point de vue zootechnique en permettant un calendrier de mise à la reproduction beaucoup plus flexible, ainsi que dans une optique de recherche fondamentale car il pourrait être requis dans des protocoles nécessitant le transfert d'embryons comme chez la jument et la vache (Squires et al. 1999, Galli et Lazzari 2008) ou nécessitant la récolte fréquente d'ovocytes canins (van Wagendonk-de Leeuw 2006, Galli et al. 2007).

La mise en place d'un tel protocole nécessite de se confronter à deux aspects spécifiques de la physiologie canine. La première concerne le maintien du corps jaune pendant une durée de deux mois suite à l'ovulation (Concannon et al. 1989), que la chienne soit gestante ou non. La sécrétion de progestérone qui en résulte agit en effet comme un inhibiteur du fonctionnement ovarien. Le second problème est lié à la durée d'involution utérine après cette période d'imprégnation progestéronique. Ainsi, la surface de l'endomètre canin subira systématiquement une desquamation suivie d'une régénération qui sera complète au moins 120 jours après le début des dernières chaleurs (Al-Bassam et al. 1981, Orfanou et al. 2009), soit environ 50 jours après la fin de l'imprégnation en progestérone. Une gestation peut ainsi difficilement se développer si cette condition n'est pas remplie (Wanke et al. 2006).

Aujourd'hui, l'approche la plus intéressante semble résider dans l'utilisation d'agonistes dopaminergiques comme la cabergoline durant la deuxième moitié du diœstrus (n=5) (Jeukenne et Verstegen 1997) ou en anœstrus précoce (n=5) (Verstegen et al. 1999). Dans ces deux études, des chaleurs ont été induites chez 80% des chiennes ainsi traitées entre 20 et 30 jours après l'initiation du traitement. Toutes ces chiennes ont été mises à la reproduction, mais aucune de celles traitées en diœstrus n'a été gestante (peut-être lié à une involution utérine incomplète selon les auteurs), alors que 4 sur les 5 traitées en anœstrus précoce l'ont été et ont mis bas normalement  $4.5 \pm 0.6$  chiots.

Volkman et al (2006b) ont proposé une autre approche, combinant l'utilisation de prostaglandines F2 $\alpha$  pour induire dans un premier temps une lutéolyse et 3-5 jours après, une administration d'un implant sous-cutané de desloréline pour induire les chaleurs, technique qui avait déjà été éprouvée pour induire des chaleurs fertiles chez la chienne (Kutzler 2005). Cependant, même si parmi les 15 chiennes ainsi traitées toutes sont rentrées en chaleurs, seulement 8 sur les 15 ont ovulé et 2 sur les 15 ont finalement été gestantes. Une seule d'entre elles a conduit sa gestation à terme. Les auteurs pensaient que là aussi, ceci pouvait être dû à une involution incomplète de l'endomètre.

Il existe des éléments semblant indiquer que l'utilisation de l'antagoniste des récepteurs à la progestérone aglépristone permette de raccourcir de façon efficace l'intervalle inter-œstrus. Ainsi, toutes les études concernant son utilisation dans la cadre de l'avortement de convenance (Fieni et al. 2001, Galac et al. 2004) ou dans le traitement médical de maladies liées à l'imprégnation de progestérone comme le pyomètre ou l'hyperplasie glandulokystique de l'utérus (Fontaine et al. 2009a) mettent en évidence une diminution significative de l'intervalle interœstrus jusqu'à 3 mois. Cet interœstrus raccourci est par la suite suivi de taux de gestations tout à fait acceptables, même sur des chiennes ayant souffert de maladies comme un pyomètre (Trasch et al. 2003, Jurka et al. 2008, Fontaine et al. 2009a).

Nous avons émis l'hypothèse que l'involution utérine dans l'espèce canine pourrait être liée à la durée de l'imprégnation de progestérone faisant suite à l'ovulation et que la suppression de celle-ci pourrait accélérer ce processus. Sur les bases de notre expérience en termes d'induction des chaleurs avec les implants de desloréline (Fontaine et Fontbonne 2010), nous avons élaboré un protocole combinant aglépristone et desloréline pour raccourcir l'intervalle interœstrus et évaluer les taux de fertilité obtenus.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1 Animaux**

15 chiennes ( $3,7 \pm 1,3$  ans, 5 races différentes –voir Tableau 1) ont participé à cette étude. 9 chiennes beagles appartenaient à notre chenil expérimental alors que les autres femelles appartenaient à des propriétaires. Elles étaient toutes dans leur premier mois de diœstrus, qui avait été déterminé sur la base des commémoratifs recueillis et des taux sanguins de progestéronémie. Le jour d'inclusion était considéré comme J0.

	Groupe 1	Groupe 2
Races	Beagles (n=4) ; Dobermann (n=2)* ; Berger Australien (n=1).	Beagles (n=5) ; Dobermann (n=1) ; Bulldog (n=1); Boxer (n=1)

Tableau 1: Races des chiennes ayant participé à cette étude (\* les deux chiennes Dobermann de G1 avaient été mises à la reproduction aux chaleurs précédentes et n'avaient pas été gestantes).

## 2.2 Traitement

Les chiennes étaient réparties en deux groupes. Dans le premier groupe (G1, n=7), les animaux recevaient de l'aglépristone (Alizine®, Virbac, Carros, France) à la posologie de 10mg/kg par voie sous-cutanée deux fois à 24h d'intervalle, puis une fois par semaine jusqu'à ce que la progestéronémie sanguine chute en dessous de 2ng/mL. A J60, un implant de desloréline (Suprelorin®4,7mg, Virbac) était inséré en sous-cutané en région post-ombilicale (cf chapitre précédent). Les chiennes étaient ensuite suivies pour constater si elles rentraient ou non en chaleurs, et si celles-ci survenaient, un suivi de chaleurs était réalisé à l'aide de mesures quantitatives de la progestéronémie sanguine (Elecsys® 2010, Roche Diagnostics) et d'échographies ovariennes. Comme décrit précédemment dans la partie sur l'induction des chaleurs, les implants étaient retirés chirurgicalement le jour de l'ovulation ou si celle-ci ne survenait pas, 3 semaines après implantation. Dans le 2ème groupe (G2, n=8), les animaux ne recevaient pas d'aglépristone mais étaient directement implantés avec l'agoniste de la GnRH à J60 (après avoir contrôlé que leur taux de progestérone était inférieur à 2ng/mL). Le protocole est résumé dans la Figure 2.

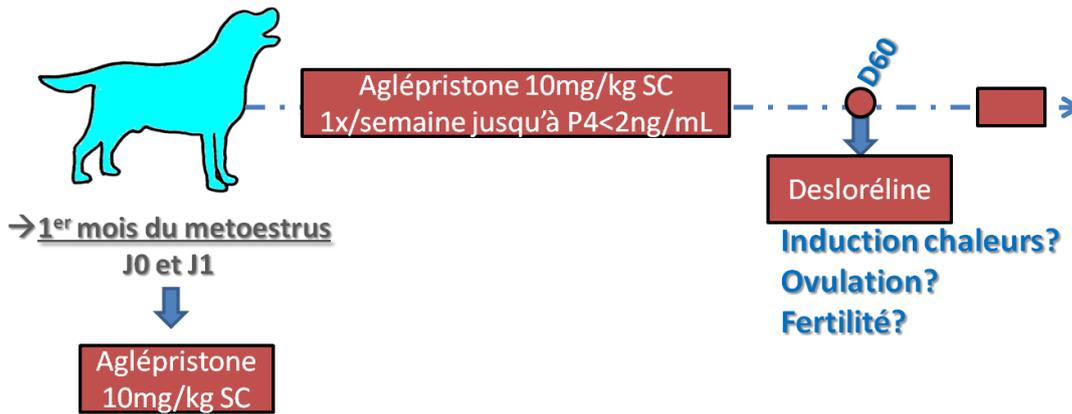


Figure 2 : Protocole utilisé (n=7).

L'intervalle de temps laissé pour l'involution utérine (période comprise entre le début des injections d'aglépristone et la pose de l'implant) a été déterminé pour les chiennes du groupe G1.

Les intervalles entre la pose de l'implant et l'entrée en chaleurs et entre la pose de l'implant et l'ovulation ainsi que les taux d'ovulation ont été déterminés pour les deux groupes.

Des inséminations artificielles par voie intra-utérine étaient ensuite réalisées 1 et 3 jours post-ovulation avec de la semence fraîche (Fontbonne et al. 2007a). Les mâles utilisés étaient connus comme fertiles et la qualité de la semence utilisée était toujours vérifiée avant la réalisation de l'insémination. Si un doute sur cette semence était présent, un autre mâle était utilisé.

Une échographie réalisée 21 jours après l'ovulation permettait de réaliser le diagnostic de gestation. Si les chiennes étaient gestantes, un suivi de la phase lutéale était mis en place, consistant en une évaluation de la progestéronémie sanguine et une échographie génitale une fois par semaine. En cas de suspicion d'insuffisance lutéale (taux de progestérone < 10 ng/mL), les chiennes étaient supplémentées avec de la progestérone micronisée (comme décrit précédemment dans la partie sur l'induction des chaleurs).

### 2.3 Analyse statistique

Les données sont retranscrites en moyennes et écart-type. Une analyse statistique multivariée a été réalisée à l'aide du logiciel R Version 2.15.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative.

### 3. Résultats

Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

Les chiennes de G1 ont reçu des injections d'aglépristone entre 3 et 5 semaines après avoir été incluses dans l'étude (en moyenne pendant  $3,86 \pm 0,6$  semaines).

Une chienne Berger Australien de G1 a été observée en chaleurs à J46 après le début du traitement, et donc avant l'administration de l'implant de desloréline. Cette chienne a ovulé, a été inséminée mais n'a pas été gestante par la suite.

Suite aux injections d'aglépristone, les chiennes du groupe G1 ont eu en moyenne  $62,3 \pm 18,4$  jours qui leur ont été laissés pour que leur utérus involue.

Concernant l'intervalle implantation-entrée en chaleurs et implantation-ovulation ainsi que les taux d'ovulation et de fertilité, aucune différence statistique significative n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes.

Seule une chienne Boxer du groupe G2 a mis bas 5 chiots en bonne santé, toutes les autres chiennes détectées gestantes à l'échographie, aussi bien dans le groupe G1 que G2, ont présenté par la suite des résorptions embryonnaires et n'ont pu maintenir leur gestation à terme. Parmi ces chiennes gestantes, aucune n'a été suspectée d'insuffisance lutéale, qui aurait pu expliquer un arrêt de la gestation.

### 4. Discussion

L'induction des chaleurs a donc été obtenue chez toutes les chiennes de l'étude, montrant que même en anœstrus précoce, l'utilisation d'implants d'agonistes de la GnRH est efficace pour induire une sécrétion conséquente d'œstrogènes par les ovaires canins et une activité folliculaire. Malheureusement, les résultats de fertilité obtenus se sont révélés peu satisfaisants : seulement 4 gestations (2 dans chaque groupe) ont été détectées et une gestation seulement est arrivée à son terme dans G2. Ces résultats sont inférieurs aux 69,6% de gestation que nous avons obtenus avec ces implants d'agonistes de la GnRH en anœstrus tardif (Fontaine et Fontbonne 2010).

Le fort taux d'anovulation rapporté ici (qui était aussi rapporté par Volkmann et al, 2006a où 7 chiennes sur 15 n'avaient pas ovulé) est considéré comme principal responsable de ces mauvais résultats, du fait que seules 3/6 chiennes dans G1 et 5/8 dans G2 ont ovulé sur le cycle induit.

	Aglépristone puis desloréline G1*	Desloréline seule G2
Effectifs	7	8
Intervalle implantation- entrée en chaleurs (jours)	4.9 ± 1.8	3.8 ± 1.2
Taux d'ovulation (%)	50% (3/6)	62.5 % (5/8)
Intervalle implantation- ovulation (jours)	11 ± 3.6	12.2 ± 1.6
Taux de gestation (%)	33.3% (2/6)	25% (2/8)
Taux demise-bas (%)	0%	12,5% (1/8)

Tableau 3 : Résultats obtenus dans les deux groupes de l'étude \* *Une chienne Berger Australien incluse dans ce groupe étant entrée en chaleurs avant l'administration de l'implant de desloréline, elle n'a pas été considérée dans la suite de l'analyse des données.*

Les concentrations en gonadotrophines FSH et LH n'ont pu être évaluées durant cette étude. Une hypothèse avancée pour expliquer ce défaut d'ovulation serait liée aux modifications affectant la survenue du pic de LH – qui est essentiel pour la rupture des follicules (Concannon et al. 1989). Cela pourrait être lié au fait que l'hypophyse se montre plus réfractaire à la stimulation par les agonistes de la GnRH durant l'anœstrus précoce, en comparaison aux autres stages de l'anœstrus (Van Haaften et al. 1994).

Des taux élevés d'œstrogènes sont aussi décrits comme cause d'anovulation chez les mammifères (Beck et al. 2005, Casper et Mitwally 2006). Même si nous n'avons pas observé de signes de chaleurs plus marqués sur les chiennes traitées à la desloréline, on peut se demander si ce cas de figure ne pourrait être envisagé ici, des environnements hormonaux anormaux étant généralement décrits chez les mammifères ayant des cycles induits médicalement (Noakes et al. 2009). Là aussi malheureusement les taux d'œstrogènes n'ont pu être évalués et restent à explorer pour appuyer cette hypothèse.

Une autre hypothèse nous semble cependant plus probable. En effet chez la plupart des mammifères il a été montré que l'occurrence du pic de LH est liée à un rétrocontrôle positif

des œstrogènes au niveau hypophysaire (Noakes et al. 2009). Cependant, ce rétrocontrôle positif ne peut être obtenu chez la chienne que durant une fenêtre bien spécifique qui débute généralement en anœstrus tardif (Klein et al. 2003) soit juste avant l'ovulation. En dehors de cette période, les œstrogènes sont à l'origine d'un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse, qui ne semble pas être en relation avec leurs concentrations. A notre sens les recherches futures devraient donc se concentrer sur des stratégies permettant d'obtenir cette modification de sensibilité, indispensable pour augmenter les taux d'ovulation. Notre hypothèse s'appuie de plus sur le fait que, par la suite, nous avons réussi à obtenir des ovulations sur des chiennes implantées en anœstrus précoce 14 et 18 jours après la pose de l'implant (soit une durée plus longue que ce que nous avons généralement obtenu lorsque nous avons étudié l'induction des chaleurs avec la desloréline) en administrant à ces animaux du citrate de clomifène, molécule à activité anti-œstrogénique et utilisé à cet effet chez la femme (données non publiées). Des travaux complémentaires sont encore nécessaires.

Si l'on considère seulement les chiennes qui ont ovulé, les taux de fertilité obtenus restent faibles. La plupart des chiennes gestantes ont présenté par la suite des résorptions embryonnaires, et aucune d'entre elles n'était liée à une insuffisance lutéale. Nous pensons que, comme décrit par d'autres auteurs (Jeukenne et Verstegen 1997, Volkmann et al. 2006a), une involution utérine insuffisante en est la cause. Contrairement à notre hypothèse de départ, l'utilisation d'aglépristone dans notre protocole n'a permis aucune amélioration en termes de fertilité, malgré un temps apparemment suffisant laissé à l'utérus pour involuer (en moyenne 62 jours dans notre étude contre 50 dans des conditions physiologiques): il ne semble donc pas qu'en mimant ainsi une chute précoce du taux de progestérone, une accélération de l'involution utérine et de la restauration de l'endomètre puisse être obtenue chez la chienne, phénomène qui reste cependant indispensable au démarrage et au maintien d'une la gestation. Les raisons pour lesquelles la chienne Berger Australien est rentrée en chaleurs avant l'administration de l'implant restent inexplicables mais des cas similaires ont déjà été rapportés auparavant (Galac et al. 2004, Fontaine et al. 2009a). En effet, comme mentionné dans notre introduction, le raccourcissement de l'interœstrus a déjà été obtenu en utilisant de l'aglépristone durant le diœstrus, sans que cela semble impacter la fertilité (Fontaine et al. 2009a). Une des hypothèses proposée comme explication est que l'aglépristone puisse contribuer au recrutement folliculaire en stimulant la production de FSH par l'hypophyse, comme cela a été montré précédemment pour un autre antagoniste des récepteurs de la progestérone, la mifépristone (Spitz et al. 1989). Malheureusement, l'utilisation d'aglépristone seule ne permet pas de prédire précisément quand la chienne rentrera en

chaleurs. De plus, il ne semble pas que ce traitement accélère l'involution utérine, comme le suggère le cas de notre Berger Australien restée non gestante, et le fait que la plupart des chiennes gestantes suite à ce type de traitement sont celles qui présentent un interœstrus d'au moins 3 mois, respectant ainsi le temps nécessaire pour une involution utérine complète.

Ainsi à ce jour, aucune solution n'existe pour raccourcir l'inter-œstrus canin tout en y associant des résultats de fertilité corrects. Les meilleurs résultats sont obtenus avec les agonistes dopaminergiques, au moins en anœstrus précoce. La compréhension des mécanismes hormonaux qui régissent l'involution utérine chez la chienne est toujours requise pour définir de nouvelles stratégies.

## **5. Conclusion**

L'utilisation combinée d'aglépristone et d'implants de desloréline n'a pas permis d'obtenir de façon efficace une réduction de l'interœstrus avec une fertilité correcte. Les résultats sont similaires à ce qui peut être obtenu en utilisant des implants de desloréline seuls en anœstrus précoce. Si le raccourcissement de l'inter-œstrus est réalisable, d'autres alternatives doivent être trouvées afin d'améliorer les résultats de fertilité.

# Stérilisation chimique des chiennes à l'aide d'implants de desloréline

## **Travail associé:**

## **Publication:**

**Chemical sterilization using deslorelin implants in adult bitches.** E. Fontaine, F. Mir, F. Vannier, A Gerardin, M. Albouy, A. Fontbonne. En preparation.

## **Présentation orale associée :**

Fontaine E.; Fontbonne A., 2010: Use of deslorelin to control fertility in the bitch. In Symposium deslorelin: deslorelin in practice, 7th EVSSAR Congress. Louvain la Neuve, Belgium, 14th-15th May, p15-17, pp. 15-17.

## **Poster :**

Use of GnRH agonist implants for medical prevention of oestrus in the bitch, E. Fontaine, F. Mir, F. Vannier, A Gerardin, M. Albouy, A. Fontbonne 2010: ACC&D Congress, Dallas, 7th-9<sup>th</sup> April

**Résumé :** L'utilisation d'implants de desloréline (Suprelorin®4,7mg, Virbac) est peu documentée dans l'indication stérilisation chimique chez la chienne adulte. Notre but était donc d'étudier leur intérêt sur des chiennes de taille/race différente, de façon à définir les grandes lignes de leur utilisation en pratique courante. De mars 2009 à juillet 2010, 57 chiennes adultes ( $3,4 \pm 3$  ans ; 26 races différentes ; taille : <10kg – n=13 -, 10-20kg – n=16 -, >20kg - n=28 -) ont été recrutées. 29 chiennes étaient en anœstrus, 15 en diœstrus et 13 en proœstrus/œstrus. Un implant de desloréline (Suprelorin®4,7mg, Virbac, Carros, France) leur était administré par voie sous-cutané en région post-ombilicale et les chiennes étaient ensuite contrôlées 15, 30, 90, 140 et 200 jours après. A chaque visite un frottis vaginal, un dosage de progestérone sanguine et une échographie génitale (ovaires et utérus) étaient pratiqués. L'entrée en chaleurs suite à la pose de l'implant, les effets secondaires rencontrés et la durée d'efficacité étaient par la suite étudiés. 28/29 chiennes implantées en anœstrus ont présenté un œstrus induit, conduisant à une ovulation dans 50% des cas. En diœstrus, 3/15 chiennes sont entrées également en chaleurs. Sur une de ces chiennes, l'implant a été retiré et les chaleurs se sont arrêtées dans la semaine qui a suivi ; les deux autres ont été stérilisées chirurgicalement. Chez les 13 chiennes implantées en proœstrus/œstrus, 2 d'entre elles seulement n'ont pas ovulé. Des effets secondaires directement imputables au traitement ont été relevés chez 13 chiennes (chaleurs persistantes/kystes ovariens, n=8 ; lactation persistante, n=2 ; abattement/perte de poids, n=2 ; réaction allergique, n=1). Ces effets secondaires étaient toujours visualisés dans le mois qui suivait l'administration de l'implant et consécutifs à un œstrus induit. Dans 6 cas, le retrait de l'implant a entraîné une résolution dans les 15 jours. Les autres chiennes ont quant à elles été stérilisées chirurgicalement. A la fin de notre travail, 29 chiennes étaient revenues en chaleurs naturelles suite à la pose de l'implant, en moyenne  $10,2 \pm 5,1$  mois après [2,1 à 23,3 mois]. Dans cette étude, l'âge, la taille et le stade du cycle des animaux n'ont pas influencé la durée d'action. Les implants de desloréline permettent donc de stériliser efficacement les femelles de races variées, tout en offrant une grande innocuité. Cette alternative est intéressante à proposer quand la stérilisation chirurgicale ne peut être envisagée.

## 1. Introduction

La stérilisation chez la chienne est une des procédures les plus couramment pratiquées en médecine vétérinaire en France, son but premier étant la contraception. A cause de l'importance croissante de problèmes de surpopulation canine dans de nombreux pays, cette attitude est parfois renforcée par la mise en place de programmes de stérilisation par les autorités locales ou par certaines associations humanitaires. Le message diffusé aux propriétaires est que toute chienne qui n'est pas destinée à être mise à la reproduction devrait être stérilisée. Du point de vue de la santé animale, cette attitude est à privilégier, les bénéfices de la stérilisation sur l'occurrence de maladies génitales telles les tumeurs mammaires et les affections utérines ayant été prouvés depuis plusieurs décennies (Reichler 2010).

Même si les attitudes diffèrent d'un pays à l'autre (Sontas et al. 2009), l'intervention chirurgicale reste l'option de choix pour la plupart des vétérinaires de par le monde, les techniques d'ovariectomie ou d'ovario-hystérectomie conduisant à une suppression permanente de la fertilité. Cependant et même si ces procédures font aujourd'hui partie d'une certaine routine, elles sont toujours porteuses de certains inconvénients. La nécessité de réaliser une anesthésie générale fait toujours peur à bon nombre de clients et ce même si de nombreuses avancées ont été faites en ce domaine. De plus, certains animaux se révèlent ne pas être de bons candidats à ce type de procédure, comme ceux souffrant d'affections cardiaques avancées ou autre défaillance organique. De plus, le caractère routinier qu'a pris cette intervention fait parfois oublier que le risque chirurgical, même s'il est faible, n'est pas nul : des hémorragies incontrôlées peuvent toujours survenir, surtout chez des chiens de grande taille où le pédicule ovarien peut parfois s'avérer difficile à ligaturer (Fontbonne et al. 2007a). Dans certains cas également, des considérations médicales peuvent amener à peser le rapport bénéfices/risques de la chirurgie. Par exemple, l'incontinence urinaire, qui est un effet secondaire connu de la stérilisation, peut concerner jusqu'à 2/3 des chiennes dans la race Boxer (Reichler et al. 2005) . De ce point de vue, les réels bénéfices offerts par l'option chirurgicale peuvent être remis en question.

De nos jours, un autre aspect doit être pris en compte : les mentalités des propriétaires évoluent. Quand 10 ans auparavant, les clients ne recherchaient qu'une façon de se « débarrasser » de l'expression des chaleurs, aujourd'hui ils se posent de plus en plus de questions quant au caractère invasif de cette opération, et même s'ils sont convaincus des bénéfices, ils sont aujourd'hui demandeurs de nouvelles alternatives. Chez les chiennes

destinées à l'élevage, les propriétaires sont également demandeurs de solutions permettant de suspendre transitoirement les capacités de reproduction.

Des alternatives chimiques qui pourraient remplir ces attentes existent aujourd'hui mais sont aussi porteuses d'inconvénients qui ne les rendent pas attractives. L'immunocontraception, par exemple, est toujours porteuse de grandes attentes (Fayrer-Hosken et al. 2000), mais les vaccins qui ont été développés n'étaient pas suffisamment consistants, leur efficacité étant hautement variable et complètement imprévisible (Kutzler et Wood 2006). Les progestagènes sont sans doute aujourd'hui la solution la plus efficace, des molécules comme l'acétate de medroxyprogesterone (Withers et Whitney 1967, Bryan 1973), l'acétate de mégestrol (Burke et Reynolds 1975) ou plus récemment la proligestone (van Os et al. 1981, Perez et Sutton 1993) ayant prouvé leur efficacité pour suspendre la fonction de reproduction pendant plusieurs mois (Fontbonne et al. 2007a). Cependant, leur utilisation est également associée à de nombreux effets secondaires, liés à l'imprégnation hormonale prolongée, comme hyperplasie glandulokystique de l'utérus, pyométre ou tumeurs mammaires (Sokolowski et Zimbelman 1974, Frank et al. 1979, Concannon et al. 1980). Les progestagènes, même en traitement ponctuel, ne sont donc pas recommandés pour suspendre la fertilité de façon transitoire (van Os et al. 1981).

Comme présenté dans la première partie de ce manuscrit, une alternative intéressante pourrait se trouver dans l'utilisation des agonistes de la GnRH. En effet, ces molécules agissent directement au niveau hypophysaire avec un mécanisme d'action en deux temps. Tout d'abord, leur effet agoniste stimulera la sécrétion hypophysaire de gonadotrophines FSH (Follicle Stimulating Hormone) et LH (Luteinizing Hormone). Ensuite leur administration prolongée entraînera un arrêt de cette sécrétion, entraînant ainsi une complète stérilisation chimique (Trigg et al. 2001, Fontaine et Fontbonne 2011).

Cependant, leur utilisation en pratique vétérinaire a longtemps été limitée, liée au fait que seules des formes injectables à courte durée d'action étaient disponibles sur le marché. De nouvelles possibilités se présentent avec le développement de formes à délivrance prolongée relarguant des agonistes de la GnRH comme l'azagly-nafaréline ou la desloréline durant 6 à 12 mois. Certains de ces implants sont aujourd'hui commercialisés pour la stérilisation chimique réversible chez le chien mâle, où son efficacité a d'ores et déjà été prouvée (Trigg et Yeates 2008).

Peu de données sont disponibles cependant concernant son utilisation chez la femelle. Les études chez la chienne ont montré que les effets de l'agoniste de la GnRH étaient principalement liés au stade du cycle auquel le traitement était administré, et par conséquent à l'environnement hormonal auquel la chienne est soumise. En effet, quel que soit l'agoniste utilisé, les chiennes adultes en anœstrus répondent à l'effet stimulant de départ par une entrée en chaleurs (McRae et al. 1985, Trigg et al. 2001, Fontaine et Fontbonne 2010), alors que pendant le diœstrus, quand la progestéronémie était supérieure à 5ng/mL (Trigg et al. 2001), ce phénomène n'était pas observé (Trigg et Yeates 2008, Romagnoli et al. 2009).

Dans l'étude de Mc Rae et al (1985), aucune période de chaleurs n'avait été observée durant les 18 mois de traitement après induction des chaleurs par un implant. Les chiennes sont revenues en chaleur 3 à 18 semaines après l'arrêt de ce traitement de nafaréline, démontrant alors clairement sa nature réversible. Le stade du cycle auquel le traitement est démarré semble également avoir un impact sur le moment de survenue des chaleurs suivantes. Dans l'étude de Trigg et al (2001), après administration d'un implant de 3 mg de desloréline, les chiennes revenaient en chaleurs en moyenne  $13,9 \pm 1,9$  mois après quand elles étaient implantées en anœstrus,  $14,6 \pm 3,5$  mois après quand elles étaient implantées en diœstrus, et  $20,4 \pm 3,4$  mois plus tard quand elles étaient implantées en gestation. Quand un implant de 12mg était utilisé, l'œstrus était repoussé à  $15,5 \pm 1,7$  mois après quand les chiennes étaient implantées en diœstrus et  $19,6 \pm 2,5$  mois quand les chiennes étaient implantées gestantes. Après disparition du blocage hypophysaire lié aux agonistes de la GnRH et retour en chaleurs, la fertilité de ces chiennes a là aussi été démontrée (Trigg et al, 2001; 2008), menant à de grandes attentes quant à son utilisation dans l'activité clinique quotidienne.

Cependant, l'espèce canine est caractérisée par de grandes variations morphologiques au sein des différentes races qui la composent, et l'on peut se demander à juste titre si des résultats rapportés sur des Beagles d'expérimentation de 10kg peuvent aussi s'appliquer au Chihuahua de 1,5kg ou au Mastiff de 100kg.

Par conséquent, notre but était d'utiliser ces agonistes de la GnRH pour obtenir une stérilisation chimique chez les chiennes et de juger de leur efficacité et de leur durée d'action sur un échantillon composé de chiennes de différentes races.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Animaux

Notre étude s'est déroulée de Février 2009 à Juin 2011, et pendant cette période, 57 chiennes adultes ( $3,4 \pm 3$  ans, de 1 à 16 ans d'âge) ont été recrutées au travers les consultations de Pathologie de la Reproduction de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort (Paris, France). La dernière chienne a été recrutée en Juillet 2010. Toutes ces chiennes étaient en bonne santé et avaient au moins présenté une période de chaleurs.

Ces chiennes ont été classées en fonction de leur taille et considérées comme petites (SMALL <10 kg, 13/57 animaux), moyennes (MEDIUM 10 à 20 kg, 16/57 animaux) ou grandes (LARGE >20kg, 28/57 animaux) (voir Figure 1).

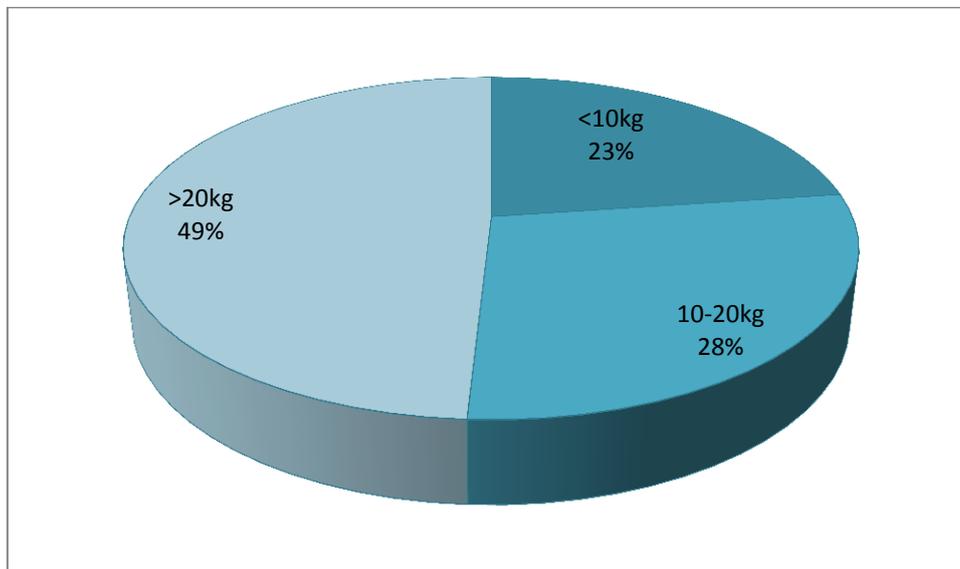


Fig 1 : Répartition des chiennes de l'étude en fonction de leur taille (%)

### 2.2 Critères d'inclusion et définition du stade du cycle.

Avant l'administration du traitement, toutes les chiennes recrutées subissaient un examen clinique de l'appareil génital, un frottis vaginal, un dosage de la progestéronémie (Elecsys® 2010, Roche Diagnostics, Meylan, France), et une échographie du tractus génital interne.

Sur la base de ces commémoratifs et de ces données cliniques, le stade du cycle dans lequel la chienne se situait était ainsi défini, comme décrit dans le Tableau 2. Les chiennes présentant des anomalies génitales (kyste ovarien, hyperplasie glandulokystique de l'utérus, tumeurs mammaires) n'étaient pas incluses.

Parmi les 57 chiennes, 29 étaient en anœstrus, 15 en diœstrus et 13 étaient en pro/œstrus (voir Figure 3).

Stade du cycle		Nombre de chiennes
Anœstrus (P4 < 1ng/mL)	Tardif (> 160 jours après les dernières chaleurs)	12
	Début-Milieu (< 160 jours après les dernières chaleurs)	17
Diœstrus (P4 > 10ng/mL, cytologie vaginale évoquant un diœstrus)		15
Pro-œstrus/Œstrus		13
- Avant ovulation: P4 < 2ng/mL, cytologie vaginale évoquant un pro-œstrus/œstrus		9
- Après ovulation: P4 > 6ng/mL, cytologie vaginale évoquant un œstrus		4

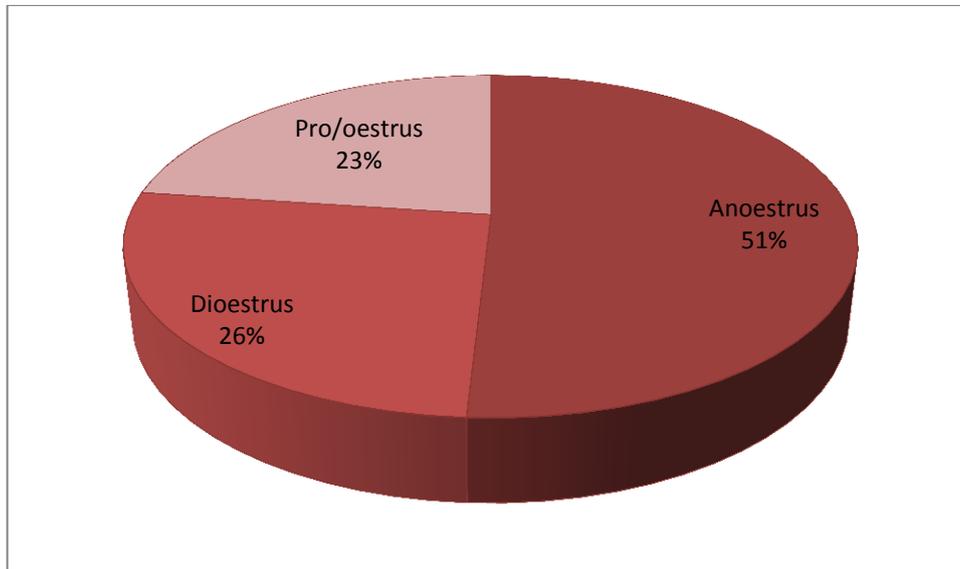
Tableau 2: Détermination du stade du cycle des chiennes participant à l'étude

### 2.3 Administration de l'implant d'agoniste de la GnRH et suivi

Les chiennes recevaient un implant contenant de la desloréline (Suprelorin® 4.7mg, Virbac, Carros, France) par voie sous-cutanée au niveau ombilical comme précédemment décrit dans les autres parties du manuscrit. Les chiennes étaient par la suite vues 15, 30, 90, 140 et 210 jours après l'administration de l'implant (voir Figure 4). A chaque fois qu'elles étaient vues en consultation, un frottis vaginal, une prise de sang pour évaluation de la progestéronémie et une échographie de l'appareil génital interne étaient réalisés. Le protocole utilisé est résumé dans la Figure 4.

Après le dernier contrôle (J210), 3 chiennes ont été réimplantées avec le même type d'implant. Pour toutes les autres, un contact téléphonique régulier était mis en place et dès que les chiennes présentaient des signes évidents de chaleurs (hypertrophie vulvaire, pertes

vulvaires sanguines), l'animal était examiné pour bien confirmer qu'il s'agissait bien de chaleurs naturelles.



*Figure 3: Répartition des chiennes selon leur stade du cycle lors du recrutement*

5 chiennes ont été mises à la reproduction par la suite sur ces chaleurs apparues spontanément pour évaluer leur fertilité. Toutes les autres ont été stérilisées chirurgicalement.

Le taux d'ovulation de ces chiennes a été estimé indirectement lors d'œstrus induit : l'ovulation a été considérée comme effective si la progestéronémie s'élevait au-dessus de 6 ng/mL de progestérone.

Pour les chiennes qui ont été réimplantées par la suite, l'occurrence d'un œstrus induit a également été réévaluée suite à l'administration du nouveau traitement.

#### **2.4 Effets secondaires**

Les effets secondaires rencontrés ont tous été relevés et chaque chienne chez laquelle un tel effet a été rapporté par ses propriétaires a été soumise à une exploration médicale pour confirmer ou non le lien entre cette expression clinique décrite par le propriétaire et le traitement qui avait été administré.

Quand les effets secondaires semblaient être directement reliés à la desloréline, l'implant était immédiatement retiré et/ou une stérilisation chirurgicale était alors réalisée.

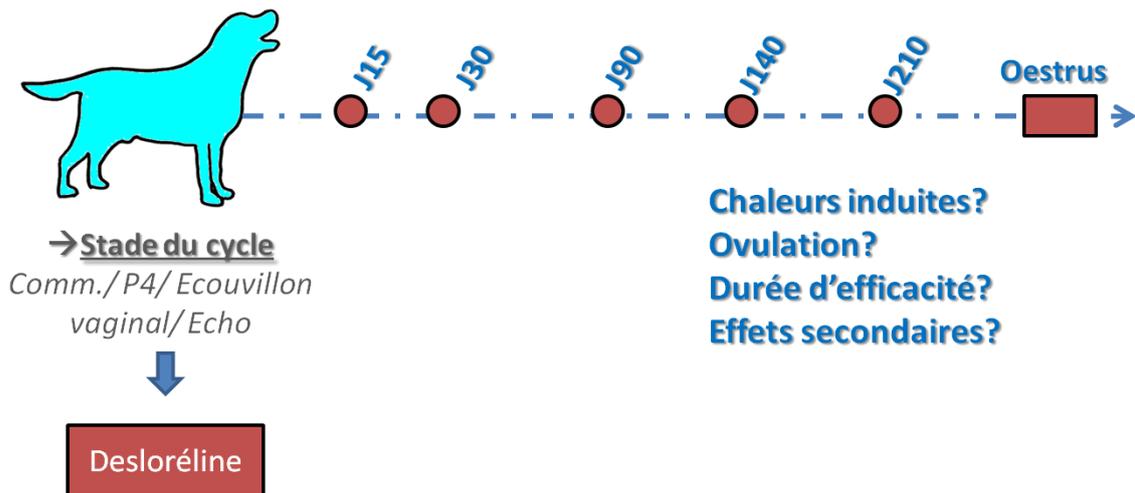


Figure 4 : Protocole utilisé dans l'étude stérilisation chimique à l'aide de desloréline.

Abbréviations : Comm. =commémoratifs/P4=progestéronémie/Echo= échographie/J...=jour après la pose de l'implant

## 2.5 Durée d'efficacité

### 2.5.1 Chiennes n'ayant reçu qu'un seul implant

La durée d'efficacité du traitement a été définie comme l'intervalle entre l'administration de l'implant et l'avènement d'un nouvel épisode de chaleurs naturelles. Celui-ci a été calculé en mois.

Notre travail sur cette étude ayant pris fin en juin 2011, un certain nombre d'animaux n'ayant pas encore déclaré de chaleurs naturelles n'ont pu être inclus dans ce calcul. Aussi afin de se faire une meilleure idée de la durée pendant laquelle la stérilisation à l'aide de desloréline pouvait se maintenir, tous les animaux ont été répartis en fonction de la période pendant laquelle ils n'ont pas exprimé de chaleurs : <180 jours, 180 à 365 jours et > 365 jours.

Les variations de cette durée liées à l'âge, la taille de l'animal et le stade du cycle au cours duquel eut lieu l'implantation ont également été étudiées.

### 2.5.2 Chiennes ayant reçu plusieurs implants (n=3)

Ces chiennes ont été considérées séparément. Si des chaleurs naturelles étaient obtenues durant l'étude, l'intervalle entre l'administration de l'implant et ce jour était défini comme la durée d'efficacité.

## 2.6 Analyse statistique

Les données sont retranscrites en moyennes et écart-type. Une analyse statistique multivariée a été réalisée à l'aide du logiciel R Version 2.15.1 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Une valeur de  $p < 0,05$  était considéré comme significative.

## 3. Résultats

### 3.1 Induction des chaleurs

Les résultats concernant l'induction des chaleurs suite à la pose de l'implant en fonction du stade du cycle auquel les chiennes étaient traitées sont présentés dans la Figure 5.

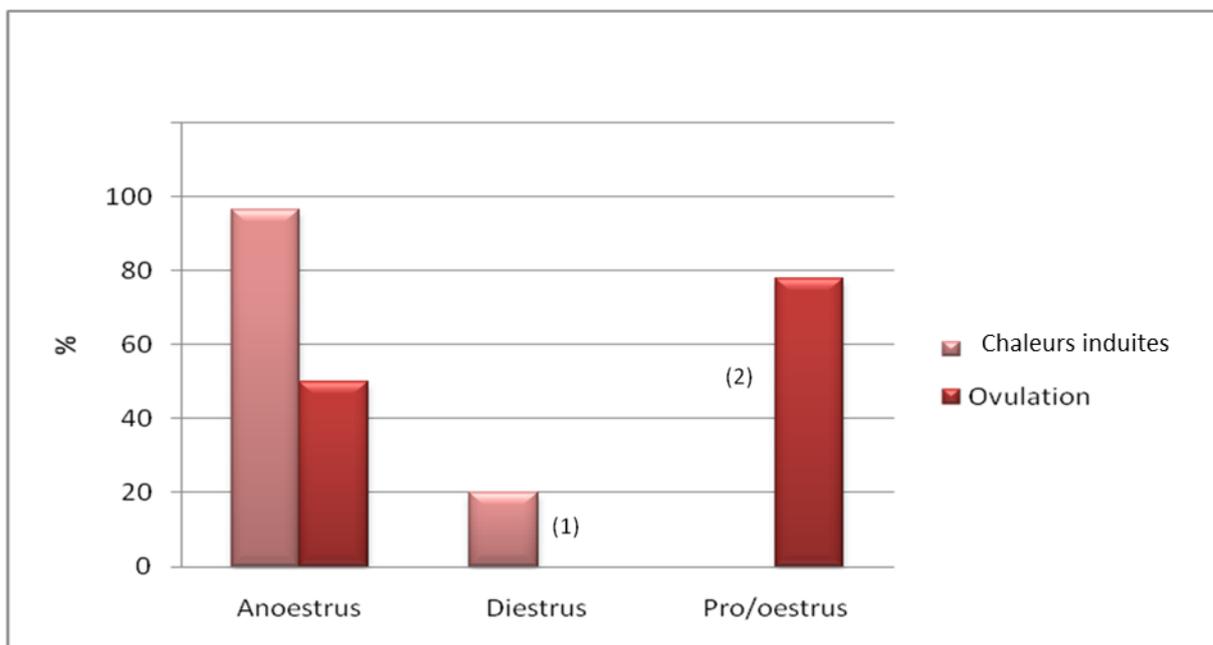


Figure 5 : Entrée en chaleurs et ovulation en fonction du stade du cycle auquel l'implant était administré.

(1) Il n'a pas été possible de déterminer s'il y avait une activité folliculaire et une ovulation sur les chiennes entrées en chaleurs après avoir été implantées en diœstrus : aucune structure folliculaire n'a été observée à l'échographie, la progestéronémie est restée élevée comme pour une chienne en diœstrus et lorsque celles-ci ont été stérilisées aucun follicule n'a été cependant macroscopiquement visible à la surface des ovaires.

(2) *Aucune chaleur induite n'a évidemment été notée sur les chiennes implantées en pro/oestrus, ces chiennes étant déjà en chaleurs .*

28 sur 29 chiennes implantées en anœstrus ont présenté un œstrus induit dans les 15 jours qui ont suivi l'administration de l'implant, et ceci a également été le cas pour 3 chiennes implantées sur les 15 en diœstrus. Toutes ces chiennes en diœstrus présentaient des taux de progestérone supérieurs à 20 ng/mL et l'une d'entre elle était même au-delà de 60 ng/mL (les progestéronémies de ces chiennes étaient respectivement de 22, 34ng/mL, 25,1ng/mL et >60ng/mL). Pour une de ces chiennes, l'implant a immédiatement été retiré et la chienne stérilisée chirurgicalement.

Des cycles anovulatoires ont été rapportés chez 14/28 chiennes implantées en anœstrus qui avaient présenté un œstrus induit. Parmi celles-ci, 10/14 étaient considérées comme étant en début-milieu d'anœstrus. L'âge et la taille des chiennes ne semblaient pas influencer ce paramètre ( $p>0.05$ ).

De tels cycles anovulatoires ont été rapportés sur 2/9 chiennes implantées en pro/œstrus avant l'ovulation.

Aucune des trois chiennes réimplantées n'a présenté d'œstrus induit après la seconde administration de l'implant. Une chienne a été réimplantée deux fois et n'a jamais présenté d'œstrus induit quand le troisième traitement lui a été administré.

### **3.2 Effets secondaires**

Des effets secondaires ont été rapportés par les propriétaires chez 23/57 chiennes (40,3%) après le traitement. Tous sont apparus dans le premier mois suivant l'administration de l'implant. Tous les effets secondaires sont présentés dans la Figure 6. Hormis l'abatement et la perte de poids rapportés à J30, tous les autres effets secondaires étaient présents au contrôle à J15.

Les effets secondaires n'ont cependant été imputés à l'implant que dans 13/23 cas qui sont détaillés ci-dessous dans la Figure 7. L'âge, la taille de l'animal et le stade du cycle auquel les animaux étaient implantés n'influaient nullement sur la fréquence et la probabilité d'apparition d'effets secondaires.

Effets secondaires rapportés	N	Incidence (%)
Chaleurs persistantes/Kystes ovariens	7	12,2
Lactation	5	8,8
Modifications du comportement	3	5,2
Vomissement	3	5,2
Abattement, perte de poids	2	3,5
Polyuropolydipsie	1	1,7
Cystite	1	1,7
Réaction allergique	1	1,7

Tableau 6: Effets secondaires rapportés dans le mois suivant l'administration de l'implant chez 57 chiennes

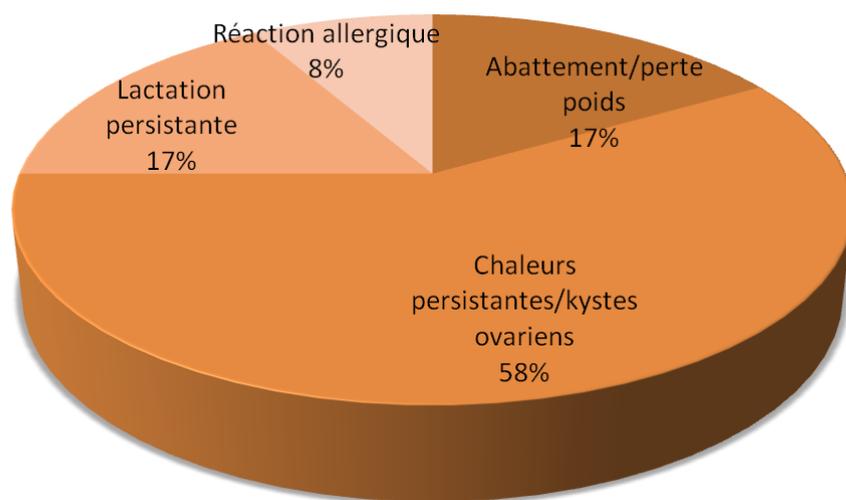


Figure 7: Effets secondaires potentiellement liés au traitement à base de desloréline (n=13 chiennes)

### 3.2.1 Chaleurs persistantes/ Kystes ovariens

On parle de chaleurs persistantes quand l'œstrus induit dure plus d'un mois sans qu'une ovulation ne survienne. Ce phénomène a été observé chez 7 chiennes (les détails sont présentés dans le Tableau 8). Chez deux chiennes seulement, ces chaleurs persistantes ont été associées à la présence de kystes ovariens qui ont été confirmés par échographie ovarienne. Ces deux animaux ont été stérilisés chirurgicalement. Les 5 chiennes restantes ne présentaient aucune structure ovarienne kystique à l'échographie. 3 d'entre elles ont également été stérilisées chirurgicalement. Sur les deux individus restant, l'implant seul a d'abord été enlevé, et l'œstrus induit s'est arrêté de lui-même dans la semaine qui a suivi.

Age (années)	Taille (n=7)		Stade du cycle (n=7)	
[2-13]				
6,1±3,9	<10kg	2	Anœstrus	3
	10-20kg	1	Diœstrus	2
	>20kg	5	Œstrus (avant ovulation)	2

Tableau 8: Détails concernant les chiennes présentant des chaleurs persistantes après administration de l'implant de desloréline.

### 3.2.2 Lactation persistante

5 chiennes ont présentées des lactations (voir Tableau 6) mais seules 2 chiennes ont présenté une lactation persistante. Une lactation persistante a été définie comme une sécrétion de lait qui n'a pu être stoppé malgré 15 jours de traitement avec l'antiprolactinique cabergoline (Galastop®, CEVA-Santé Animal, Libourne, France). Ces chiennes ont été implantées en toute fin de diœstrus alors qu'elles étaient encore en lactation.

Ces deux chiennes présentaient de plus un œstrus induit quand les signes de lactation ont été détectés. Aucune d'entre elles n'avait ovulé quand l'inefficacité du traitement à la cabergoline a été notifiée. Pour ces deux animaux, l'implant a été retiré et l'expression des chaleurs a cessé dans la semaine qui a suivi. Une semaine plus tard, un traitement de cabergoline a à nouveau été mis en place et cette fois-ci été couronné de succès. Ces chiennes ont par la suite été stérilisées chirurgicalement.

### **3.2.3 Abattement et perte de poids**

2 chiennes de grande taille (5 ans chacune) ont présenté un abattement, une perte de poids et une baisse d'appétit suite au traitement. Une d'entre elles avait été implantée en chaleurs après ovulation et la seconde avait été implantée en œstrus précoce et présenté un œstrus induit qui avait conduit à une ovulation.

Ces chiennes ont été référées au service de Médecine Interne et comme aucune affection particulière n'avait pu être mise en évidence, la décision de retirer l'implant a été prise. Une amélioration a été notée un mois après le retrait chez chaque animal, et une stérilisation chirurgicale a ensuite été réalisée.

### **3.2.4 Réaction allergique**

Une chienne Jack Russell qui avait été réimplantée 6 mois après l'administration du premier implant a présenté une réaction allergique qui a été diagnostiquée quelques jours après l'injection du second implant. L'implant a été retiré et s'en est suivie une amélioration des signes cliniques. La chienne a par la suite été stérilisée chirurgicalement.

## **3.3 Durée d'efficacité pour les chiennes ayant reçu un seul implant (n=54)**

A la fin de notre travail, le suivi était complètement terminé pour 44/54 chiennes: 29 d'entre elles ont ainsi eu un suivi complet et ont présenté des chaleurs naturelles, 12 ont vu le suivi stoppé à cause d'un effet secondaire et 10 n'étaient toujours pas revenues en chaleurs. 1 chienne, un Cavalier King Charles, est morte 6 mois après l'administration de l'implant durant une anesthésie générale. Cette chienne n'avait jusqu'à lors pas présenté de chaleurs naturelles. 1 chienne croisée a eu un accident de voiture au tout début du protocole et a été retirée de l'étude. 1 autre chienne a été retirée de l'étude car son propriétaire a décidé après administration de l'implant qu'il ne voulait plus faire partie du protocole.

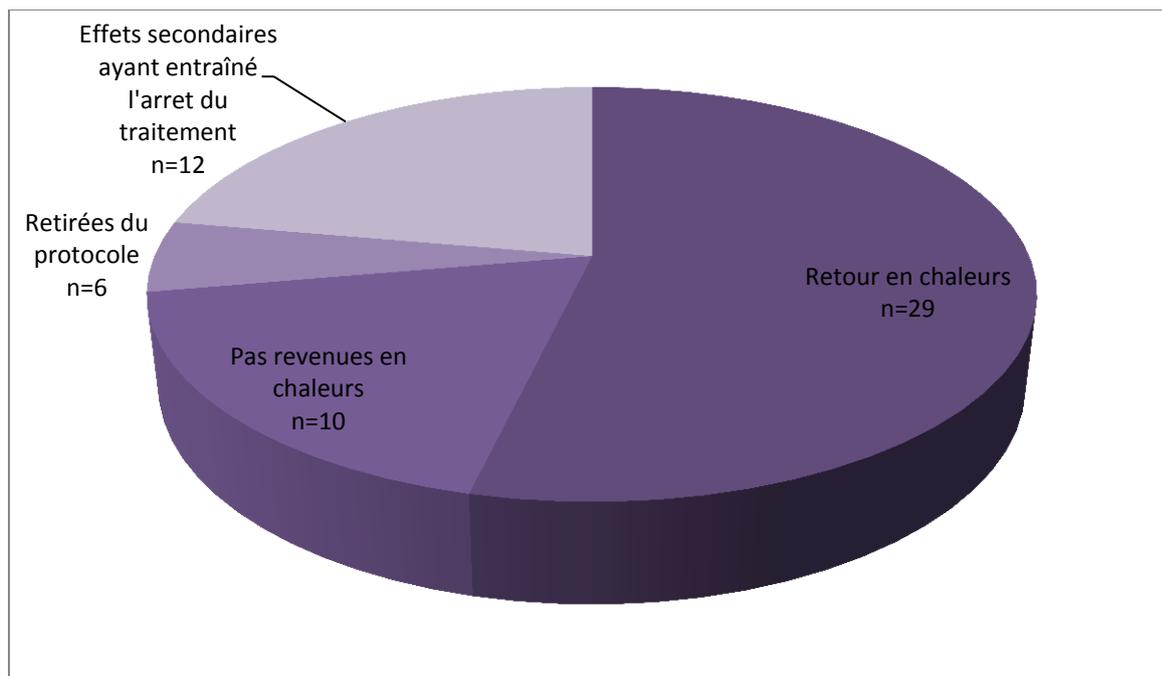


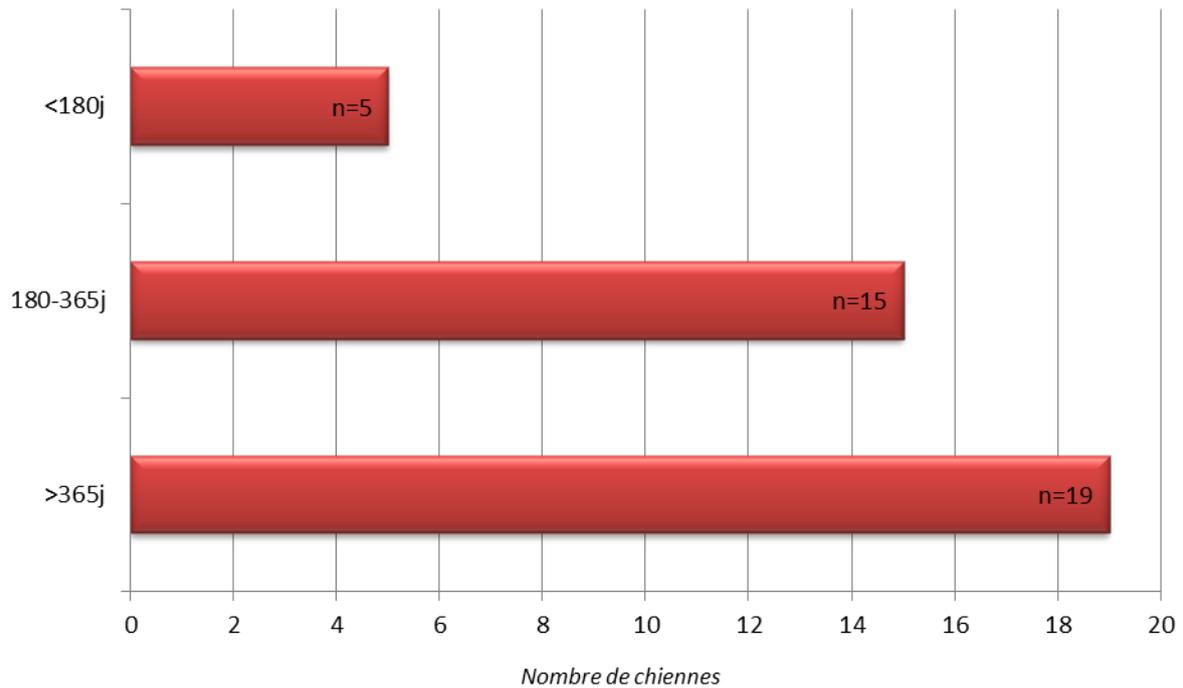
Figure 9 :Etat d'avancement du protocole à la fin de notre travail.

### 3.3.1 Chiennes ayant reçu un seul implant.

29 des 54 chiennes n'ayant reçu qu'un seul implant ont présenté des chaleurs naturelles avant la fin de notre période de travail. La durée moyenne d'efficacité du traitement de stérilisation chimique était pour ces chiennes de  $10,2 \pm 5,1$  mois, allant de 2,1 à 23,3 mois, mais 10 autres chiennes n'étaient toujours pas revenues en chaleurs soit plus de 365 jours après.

La répartition des chiennes en fonction de la durée pendant laquelle des chaleurs naturelles n'ont pas été observées est représentée dans la Figure 10.

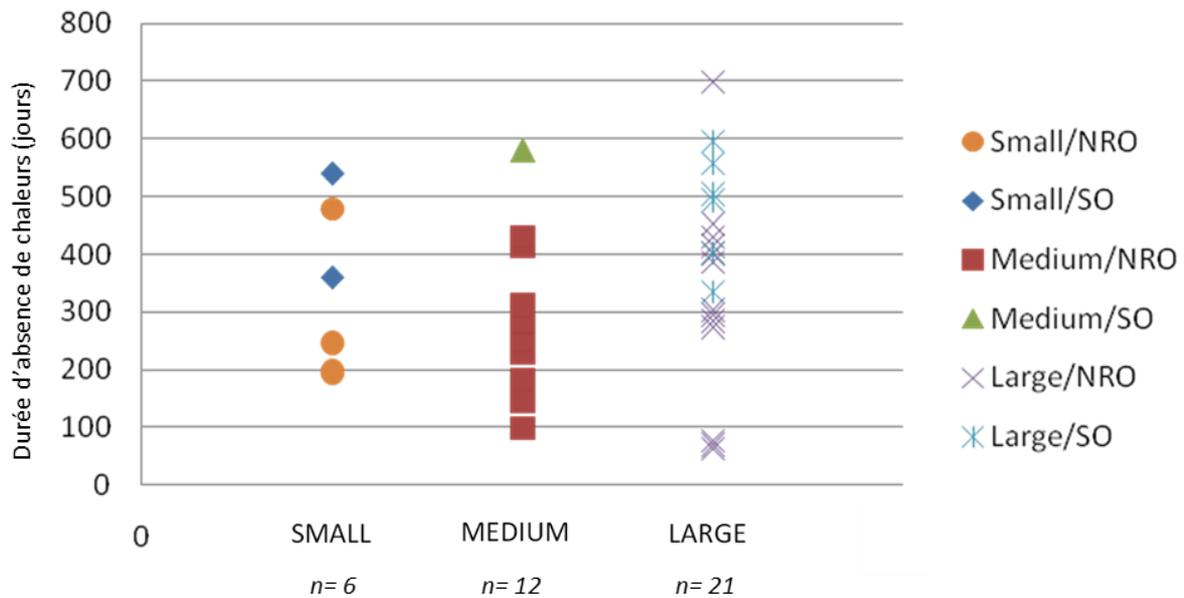
5 chiennes (12,8%) ont présenté des chaleurs naturelles avant 180 jours après l'administration de l'implant (allant de 63 à 146 jours). Trois d'entre elles avaient été implantées en œstrus après l'ovulation et ont été vues en chaleurs 70, 77 et 99 jours après l'administration de l'implant. 15 (38,5%) ont présenté des chaleurs naturelles entre 180 et 365 jours (allant de 183 à 364 jours) et 19 (48,7%) ont présenté celles-ci plus de 365 jours après la pose de l'implant.



*Figure 10 : Durée pendant laquelle aucune période de chaleurs naturelle n'a été constatée chez les chiennes traitées à la desloréline (n=39).*

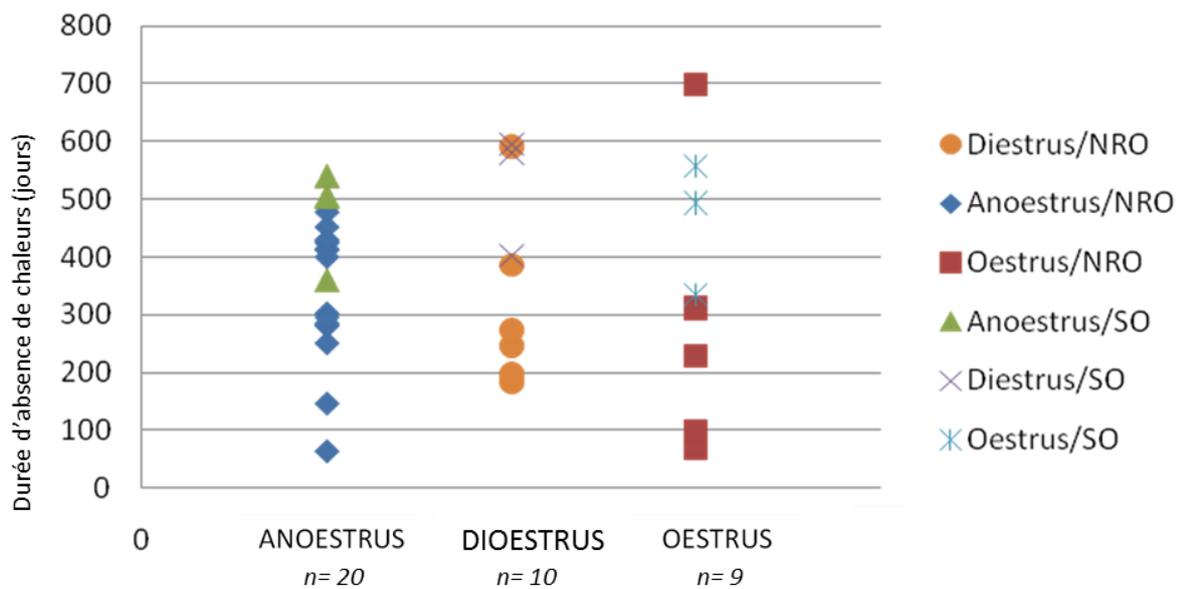
Les durées pendant lesquelles les animaux ont pu être considérés comme stérilisés chimiquement en fonction des paramètres taille de l'animal et stade du cycle au moment de la pose de l'implant sont présentés dans les Figures 11 et 12.

Concernant la durée d'absence d'expression de chaleurs, aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant les effets que pourraient jouer l'âge, de la taille de l'animal et le stade du cycle dans lequel il a été mis sous traitement.



NRO= Retour en chaleurs observé  
SO= Toujours en observation

Figure 11: Durée pendant lesquelles l'absence de chaleurs a été constatée en fonction de la taille de l'animal (SMALL=<10kg ; MEDIUM=10-20kg ; LARGE=>20kg).



NRO= Retour en chaleurs observé  
SO= Toujours en observation

*Figure 12: Durée pendant lesquelles l'absence de chaleurs a été constatée en fonction du stade du cycle où l'animal a été implanté.*

### **3.3.2 Retour à la fertilité**

Parmi les 5 chiennes remises à la reproduction lors de leur retour en chaleurs, 3 chiennes ont été gestantes et ont eu respectivement 2, 6 et 10 chiots. Les deux autres chiennes ont bien ovulé mais n'ont pas été gestantes.

### **3.4 Chiennes ayant reçu plusieurs implants (n=3)**

1 chienne est revenue en chaleurs 556 jours après la pose du premier implant (2 implants avaient été reçus au total à 6 mois d'intervalle). Cette chienne n'a pas été remise à la reproduction.

1 chienne n'était toujours pas revenue en chaleurs à la fin de notre période d'observation, aucune chaleur n'ayant été observée pendant 799 jours (3 implants reçus au total à 6 mois d'intervalle).

## **4. Discussion**

A notre connaissance, ce travail est le premier à étudier l'utilisation d'implants de desloréline pour obtenir une stérilisation chimique sur un large échantillon de chiennes de différentes races/taille, les données disponibles se limitant essentiellement à des chiennes Beagles d'expérimentation (Trigg et Yeates 2008) ou à des petits groupes d'animaux (Romagnoli et al. 2009).

### **4.1 Induction des chaleurs et ovulation**

Un œstrus induit est survenu chez 28 des 29 chiennes implantées en anœstrus, quel que soit le stade de celui-ci (début, milieu ou fin). Ce pourcentage est similaire à ce que nous avons obtenu dans les précédentes études réalisées avec ces implants pour induire des chaleurs fertiles (cf. chapitres précédents de ce manuscrit). Cet œstrus induit ne conduit cependant pas systématiquement à une ovulation, en particulier quand les chiennes sont implantées en début ou milieu d'anœstrus (10 chiennes sur 14 soit 71,4% implantées à ce stade n'ont pas ovulé durant les chaleurs induites), ce qui est identique à ce qui a été observé dans les autres études que nous avons réalisées (voir chapitres précédents de ce manuscrit). L'explication de ce phénomène réside sans doute dans la moins grande réceptivité de l'hypophyse aux stimulations par des agonistes de la GnRH à ce stade du cycle, comme cela a été précédemment démontré dans l'espèce canine (Van Haften et al, 1994). De plus, la réponse de l'hypophyse à la stimulation par les œstrogènes à ce stade du cycle est elle aussi modifiée. En

effet, durant les chaleurs, les œstrogènes agissent par un rétrocontrôle positif sur l'hypophyse qui permet l'avènement du pic de LH, élément indispensable à l'ovulation. Or celui-ci ne semble survenir uniquement que chez les chiennes à partir de la fin de l'œstrus pendant une fenêtre bien précise variable suivant les individus. Avant ce stade, les œstrogènes ont en fait un rétrocontrôle négatif sur l'hypophyse, et par conséquent bloquent le pic de LH et donc l'ovulation (Noakes et al. 2009). Nous n'avons trouvé aucune explication au fait qu'une des chiennes traitée en œstrus n'ait pas présenté d'œstrus induit suite à la pose de l'implant. La perte de l'implant a été suspectée mais celui-ci était toujours bien palpable en région ombilicale. Cette chienne est de plus revenue en chaleurs 146 jours après la pose de l'implant. Il n'est pas à exclure que l'implant n'ait tout simplement pas été actif.

Le diœstrus a été présenté comme le stade du cycle le plus intéressant pour initier ce type de traitement lorsqu'une stérilisation chimique est souhaitée, l'imprégnation de l'organisme par la progestérone lors de ce stade pouvant inhiber le fonctionnement ovarien et donc inhiber l'induction des chaleurs (Trigg et Yeates 2008). Un seuil de 5 ng/mL de progestérone avait même été présenté comme la valeur au-dessus de laquelle aucune induction de chaleurs ne pouvait survenir (Trigg et Yeates 2008). Cependant, nous avons obtenu un déclenchement de chaleurs sur trois chiennes implantées en diœstrus, et toutes présentaient un taux de progestérone plasmatique dépassant 20 ng/mL, l'une étant même supérieure à 60 ng/mL de progestérone. Même si peu d'animaux semblent concernés, ce phénomène peut s'avérer hautement problématique car il entraîne la sécrétion d'œstrogènes dans un environnement fortement imprégné en progestérone, environnement qui est connu pour être favorable au développement de pyomètres (Fontbonne et al. 2007a). Si de tels cas d'induction d'œstrus chez des chiennes implantées en diœstrus venaient à se présenter, le retrait de l'implant serait donc de suite à envisager.

Des cycles anovulatoires ont été obtenus chez 2 chiennes implantées en œstrus quand la progestérone était inférieure à 2ng/mL. Cela pourrait être lié au fait que les chiennes étaient à ce moment très éloignées de l'ovulation et que l'effet stérilisant de l'implant ait pu se mettre en place avant que l'ovulation ne se produise. Cependant, cela ne semble pas être la règle, 7 des 9 chiennes traitées à ce stade ayant ovulé par la suite même si implantées avant l'ovulation. Dans la majorité des cas, il ne semble donc pas qu'implanter une chienne pendant les chaleurs modifie le déroulement du cycle en cours. Nous ne nous sommes pas ici attachés à détailler les modifications qui pourraient survenir pendant le cycle lutéal. Néanmoins, comme nous l'avons rapporté nos précédents chapitres, une chute précoce de la

progesteronémie peut être observée chez certaines de ces chiennes, liée à l'arrêt de sécrétions des gonadotrophines. Il existe néanmoins une grande variabilité individuelle, et aucun paramètre ne permet à l'heure actuelle de faire de quelconques prédictions à cet égard.

#### 4.2 Effets secondaires

Les effets secondaires rapportés ne semblent liés à l'implant que dans 13 cas. Dans 9 cas sur 13, ces effets secondaires étaient liés aux chaleurs induites à la suite de la pose de l'implant (chaleurs persistantes et lactation persistante liées aux chaleurs induites). Par conséquent, les chaleurs induites sont directement la cause de la majorité de ces effets secondaires, que celles-ci surviennent suite à une implantation en anœstrus ou en diœstrus comme expliqué plus haut. La mise en place de stratégies pour enrayer ce phénomène est donc d'un intérêt capital pour pouvoir justifier de l'utilisation de l'effet stérilisant des agonistes de la GnRH. Un point très intéressant est que le retrait de l'implant s'est toujours soldé par un arrêt des signes dans la semaine qui a suivi. De plus, tous les effets secondaires rapportés ont été observés dans le mois qui a suivi l'implantation. Un contrôle de l'animal dans le mois qui suit la pose de l'implant semble donc s'imposer pour vérifier si oui ou non des effets secondaires se sont développés.

Des affections utérines (pyomètre principalement) ont été rapportées dans d'autres études concernant l'utilisation de ces implants chez la chienne (Palm et Reichler 2010, Arlt et al. 2011). Or ici, cette affection n'a jamais été observée. Nous pensons que cela est lié aux contrôles réalisés avant le recrutement des individus, les chiennes présentant des anomalies utérines à l'échographie étant systématiquement exclues. Un contrôle de l'appareil génital interne par échographie serait donc à pratiquer avant d'implanter les chiennes.

Abattement et pertes de poids ont été rapportés chez deux animaux, sans que ces symptômes n'aient pu être reliés à aucune autre affection. L'état général des animaux s'étant amélioré suite au retrait de l'implant, le rôle de l'agoniste de la GnRH a été avancé. De plus, ce type d'effets secondaires a été rapporté dans l'espèce humaine lors de traitement avec des agonistes de la GnRH pendant une longue durée. Même si cet effet semble concerner peu d'individus, il semble indispensable de le connaître.

La réaction allergique décrite suite à la pose du deuxième implant est difficile à comprendre, la GnRH étant un décapeptide de petite taille et donc stimulant peu le système immunitaire - c'est d'ailleurs une des raisons pour laquelle l'immunostérilisation contre la GnRH est difficile à obtenir. La chienne n'est pas rentrée en chaleurs suite à la pose de ce second

implant, aucune signe clinique ni aucun signe d'imprégnation œstrogénique sur les frottis vaginaux n'ayant été détectée. Même s'il semble bon de le garder en mémoire, cet effet n'a concerné qu'un animal sur notre population de 57 (et un seul animal sur les 173 impliqués dans l'ensemble des études que nous avons menées).

#### **4.3 Durée de la stérilisation chimique.**

Comme pour les chiens mâles, une très grande variabilité a été retrouvée concernant la durée d'efficacité à la suite de l'utilisation d'un seul implant, celle-ci pouvant aller de 63 à 699 jours. L'implant dosé à 4,7mg de desloréline est cependant supposé agir au moins 6 mois, or 5 chiennes sont rentrées en chaleurs avant cette période. Même si aucune différence statistique n'a pu être démontrée (sans doute à cause du faible nombre d'individus considérés ici), implanter les chiennes en œstrus après l'ovulation pourrait favoriser ce type de retour en chaleurs précoce. Cependant, aucun facteur favorisant une durée d'action plus longue n'a pu être mis en évidence et il semble que l'implantation puisse s'envisager à n'importe quel stade du cycle.

### **5. Conclusion**

Les implants de desloréline se présentent donc comme une alternative intéressante à la stérilisation chirurgicale. Les principaux effets secondaires rencontrés sont liés à l'œstrus induit et surviennent généralement dans le mois qui suit la pose. Traiter les chiennes en dioœstrus reste actuellement la meilleure option pour limiter ce risque d'induction de chaleurs. Aussi le développement de stratégies visant à prévenir ce phénomène sont-elles indispensables pour démocratiser son utilisation. Néanmoins celle-ci peut d'ores et déjà s'envisager en prévoyant un contrôle dans le mois qui suit la pose de l'implant pour s'assurer qu'aucune anomalie ne se soit développée sur l'animal ainsi traité. L'arrêt rapide des symptômes après retrait de l'implant permet de plus d'envisager sereinement l'utilisation de ce produit dans ce cadre précis.

Nous ne disposons pas d'assez de données concernant la fréquence à laquelle ces implants doivent être ré-administrés. Romagnoli et al (2009) suggèrent de réimplanter les animaux tous les 4,5-5 mois mais des études complémentaires sur une plus longue durée restent nécessaires pour donner des réponses concrètes.

Quand ils sont utilisés en vue d'obtenir une stérilisation chimique, le principal inconvénient de ces implants réside dans l'apparition d'un œstrus induit. C'est pourquoi dans la suite de notre travail nous nous sommes attachés à rechercher des solutions pour prévenir celui-ci.

# Prévention de l'œstrus induit suite à l'utilisation d'implants d'agonistes de la GnRH sur des chiennes adultes en anœstrus

## Travail associé:

## Publications:

**Use of anti-oestrogens and aromatase inhibitors to prevent heat induction in anoestrous bitches treated with deslorelin implants.** E. Fontaine, F. Mir, F. Vannier, A. Fontbonne En preparation

**Use of osaterone acetate to prevent heat induction in anoestrous bitches treated with deslorelin implants.** E. Fontaine, F. Mir, F. Vannier, A. Fontbonne En préparation

## Poster:

**Use of anti-oestrogens and aromatase inhibitors to prevent heat induction in anoestrous bitches treated with deslorelin implants.** E. Fontaine, F. Mir, F. Vannier, A. Fontbonne 2011: ESDAR Congress, Antalya, 9<sup>th</sup>-11<sup>th</sup> September

**Résumé :** Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les implants de desloréline se présentent comme une alternative intéressante à la stérilisation chirurgicale. Néanmoins, les principaux effets secondaires rencontrés sont liés à l'entrée en chaleurs qu'ils peuvent induire. Aussi le développement de stratégies visant à prévenir celle-ci sont-elles indispensables pour faciliter son utilisation. Notre étude a donc eu ici pour but d'évaluer l'efficacité de ces 3 molécules à mode d'action différents : un inhibiteur de l'aromatase, (anastrozole) , un anti-œstrogène (clomifène) et un progestagène (osatérone) pour atteindre cet effet. 27 chiennes en anœstrus ont donc été traitées à l'aide d'un implant de desloréline (Suprelorin®4,7 mg, Virbac, Carros, France) comme défini dans les précédents chapitres de notre manuscrit. Elles recevaient dans le même temps 1) G1 (n=3) :anastrozole 0,1mg/kg per os pendant 15 jours ( Arimidex®, Astrazeneca, Rueil-Malmaison , France), 2) G2 (n=8) : clomifène 5mg/kg per os pendant 15 jours (Clomid®, Sanofi-Aventis, Paris, France) ou 3) G3 : n=16 osatérone 0,5mg/kg pendant 2 jours ( Ypozane®, Virbac, France). Dans G1, seule 1/3 chienne n'a pas présenté de signes de chaleurs et toutes ont ovulé. Dans G2, aucun saignement vulvaire n'a été observé chez 6/8 chiennes, alors que sur les 2 autres il est apparu 7 et 8 jours après la pose de l'implant. Cependant 5/8 de ces chiennes ont ovulé entre 16 et 18 jours après la pose de l'implant. Dans G3, 11/16 chiennes n'ont présenté ni signes de chaleurs ni ovulation. Dans ces trois groupes, aucun effet secondaire n'a de plus été rapporté suite au traitement à base de desloréline. Même si aucun traitement fiable pour prévenir systématiquement l'entrée en chaleurs suite à l'utilisation d'un implant de desloréline n'a pu être mis en place, l'utilisation de l'osatérone se présente aujourd'hui comme une des meilleures alternatives qu'il conviendrait en pratique d'utiliser.

## 1. Introduction

Sur les 78 chiennes traitées en anœstrus par des implants de desloréline dans les précédents chapitres de ce manuscrit, 77 sont entrées en chaleurs. L'utilisation de ces implants à visée contraceptive se heurte donc à deux problèmes : il est tout d'abord difficile de proposer en pratique ce type de stérilisation chimique quand la première motivation des clients pour ce type d'acte n'est pas le contrôle de la fertilité, mais l'inhibition des manifestations des chaleurs (pertes de sang notamment). De plus, les principaux effets secondaires retrouvés lors de l'utilisation de ces implants en vue d'obtenir une stérilisation chimique sont liés à cet œstrus induit : œstrus persistants liés ou non à des kystes ovariens et lactations persistantes réfractaires aux traitements classiques ont ainsi été mises en évidence dans notre précédente étude (voir partie précédente du manuscrit). D'autres équipes ont également mis en évidence le développement d'affections utérines notamment des pyomètres (Palm et Reichler 2010). Aussi le développement de stratégies pour prévenir l'apparition de ces chaleurs induites est-elle indispensable pour développer cette alternative.

Trigg et al (2001) ayant constaté que les chiennes traitées avec des implants de desloréline et ayant une progestéronémie supérieure à 5 ng/mL ne présentaient pas d'œstrus induit, l'utilisation de progestagènes semblait toute indiquée. Les résultats obtenus sont néanmoins controversés. Si Wright et al (2001) n'ont obtenu aucun œstrus induit en utilisant de l'acétate de mégestrol à 2mg/kg pendant 3 semaines suite à la pose d'un implant de desloréline, Corrada et al (2006) ont avec un protocole identique eu trois chiennes présentant un œstrus entre 26 et 51 jours après la pose de l'implant : le traitement aux progestagènes ne faisait que décaler l'œstrus induit. En commençant le traitement 4 jours avant la pose de l'implant, la même équipe a quand même observé 10% d'œstrus induit (Corrada et al. 2006). Sung et al (2006) ont tenté la même expérience en débutant le traitement 7 jours avant la pose de l'implant mais 4 chiennes sur 5 traitées sont entrées en chaleurs. La durée entre la pose de l'implant et l'entrée en chaleurs était de  $8,4 \pm 1,7$  jours avec des extrêmes de 3 à 19 jours. Dans cette étude, le traitement avec des progestagènes diminuait certes la réponse hypophysaire chez les chiennes implantées (les chiennes ainsi traitées présentant des concentrations en LH significativement plus basses que les chiennes non traitées) mais augmentait également la réponse ovarienne à la stimulation à la desloréline (les chiennes traitées présentant une oestradiolémie significativement plus haute).

Aujourd'hui donc, aucun protocole ne semble satisfaisant pour inhiber l'apparition de l'œstrus induit, ce qui constitue un frein à l'utilisation de ces molécules pour la stérilisation chez la

femelle d'une part et son utilisation dans un cadre thérapeutique d'autre part. Néanmoins plusieurs pistes restent envisager. Les signes de chaleurs étant essentiellement liés aux œstrogènes, la réduction voire l'inhibition de leurs effets pourrait s'envisager. L'utilisation dans ce cadre d'anti-œstrogènes comme le clomifène ou d'inhibiteurs de leur enzyme de conversion l'aromatase comme l'anastrozole, utilisés en médecine humaine dans le traitement des cancers du sein hormono-dépendants, pourrait s'envisager. Cette alternative n'a par ailleurs jamais été étudiée. L'utilisation de progestagènes de dernière génération est également une solution qu'il faut considérer. Ces produits, aujourd'hui plus faciles d'utilisation et présentant peu d'effets secondaires (Mieda et al. 1994), pourraient s'avérer une piste intéressante à explorer.

Dans le but de prévenir cet œstrus induit, nous avons donc décidé d'investiguer trois différentes stratégies :

- l'utilisation de l'inhibiteur de l'aromatase anastrozole (Exp1)
- L'utilisation de l'anti-œstrogène clomifène (Exp1)
- l'utilisation d'un progestagène, l'acétate d'osatérone (Exp2).

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1 Expérience 1

11 chiennes de race Beagle ont pris part à cet essai. Toutes se situaient en anœstrus, celui-ci étant défini sur la base des dernières chaleurs et de la progestéronémie ( $P4 < 1\text{ng/mL}$ ). Toutes les chiennes ont reçu un implant de desloréline (Suprelorin®4,7mg, Virbac, Carros, France) au niveau de l'ombilic comme décrit dans les parties précédentes de ce manuscrit. Un traitement a été débuté le même jour : 1) G1 (n=3) : anastrozole, inhibiteur de l'aromatase, à la posologie de 0,1 mg/kg (Arimidex®, Astrazeneca, France) 2) G2 (n=8) : acétate de clomifène, anti-œstrogène, à la posologie de 5mg/kg ( Clomid®, Sanofi-Aventis, France). Chaque traitement était délivré par voie orale pendant 15 jours. Les chiennes étaient suivies durant le traitement et revues 30 jours après la pose de l'implant. Frottis vaginaux, endoscopies vaginales et dosages quantitatifs de progestérone ainsi qu'échographies ovariennes étaient réalisées pour détecter d'éventuels signes de chaleurs et, en cas d'œstrus induit, si une ovulation survenait.

## 2.2 Expérience 2

16 chiennes ont pris part à cette essai, 5 Beagles d'expérimentation et 11 chiennes de clients (2,4±2,2 ans, 6 races différentes, 2 croisées). Ce groupe était désigné comme G3.

Le protocole utilisé était ici exactement similaire à celui utilisé dans Exp1, le traitement administré aux chiennes étant cependant remplacé par l'administration d'acétate d'osatérone (Ypozane®, Virbac). Cette molécule était administrée *per os*, à la posologie de 0,5mg/kg pendant 2 jours (durée de traitement nécessaire pour obtenir une efficacité d'environ 15 jours de la molécule).

Les beagles étaient suivies tous les jours pendant 15 jours puis une fois par mois jusqu'à détection des chaleurs. Les chiennes de clients n'étaient revues que 3 semaines après la pose de l'implant et administration du traitement. Les clients étaient questionnés sur l'entrée en chaleurs de leur animal et un dosage de la progestéronémie était alors réalisé pour voir si une ovulation avait eu lieu.

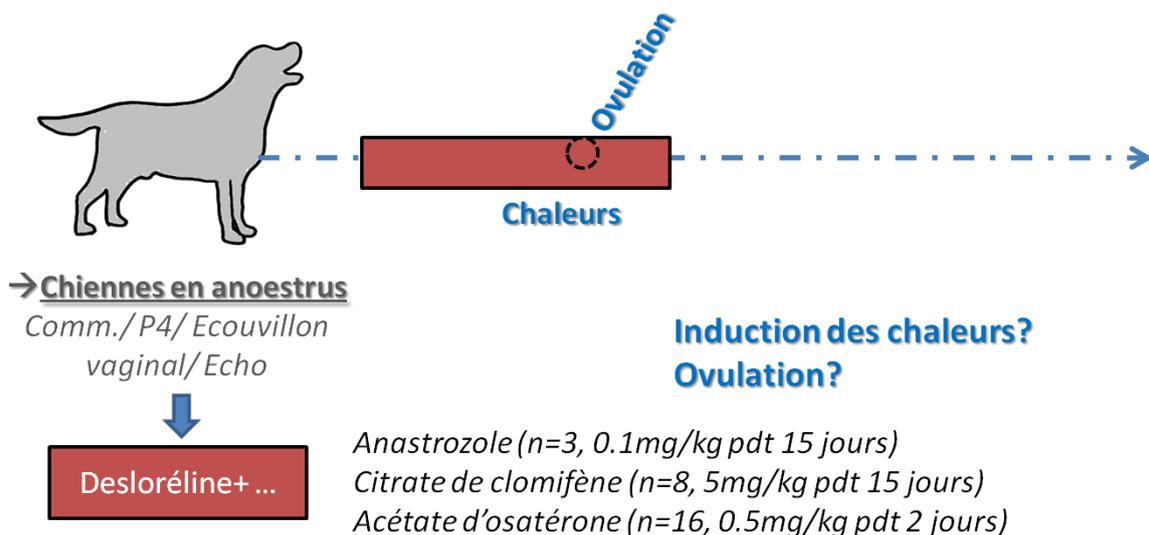


Figure 1 : Protocole utilisé pour prévenir l'apparition de l'œstrus induit.

## 2.3 Données analysées

Pour tous ces protocoles, ont été par la suite définis :

- Le pourcentage de chiennes entrant en chaleurs.
- Les effets secondaires rencontrés.
- Quand cela a été possible, la durée pendant laquelle les chiennes n'ont pas présenté de chaleurs.

### 3. Résultats

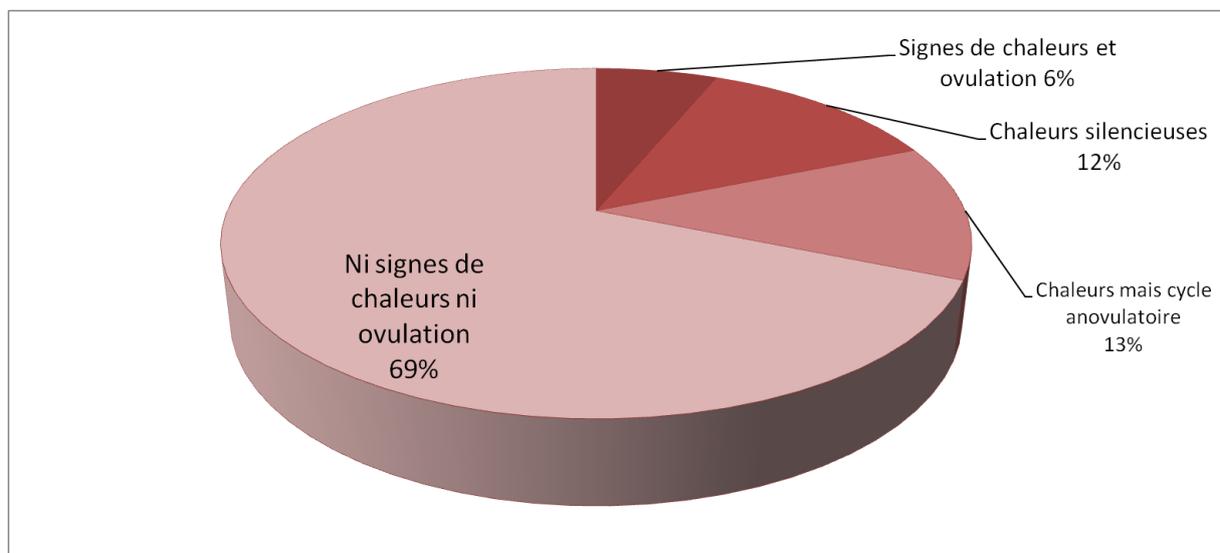
#### 3.1 Expérience 1

Dans G1 (n=3), 1 chienne n'a présenté aucun signe de chaleurs, alors que les deux autres ont présenté des pertes vulvaires sanguines ainsi qu'une kératinisation de l'épithélium vaginal 5 et 6 jours après la pose de l'implant.

Dans G2 (n=8), l'absence de pertes vulvaires sanguines suite à la pose de l'implant a été constaté chez 6/8 chiennes, alors que chez les 2 restantes, elles ont été constatées 7 et 8 jours après la pose de l'implant. Une kératinisation de l'épithélium vaginal a été observée chez toutes les chiennes de ce groupe, mais l'aspect endoscopique caractéristique de chiennes en pro-œstrus/œstrus n'a été observé que chez les deux chiennes ayant présenté des pertes vaginales. L'ovulation a été détectée chez 5/8 chiennes de ce groupe, entre 16 et 18 jours après la pose de l'implant. Aucun effet secondaire n'a été rapporté sur aucune des chiennes ayant pris part à ce protocole.

#### 3.2 Expérience 2

Le détail des résultats est donné dans la Figure 2. 13chiennes sur 16 (soit 81,25%) n'ont pas présenté de signes de chaleurs. 2 de ces 13 chiennes ont cependant eu des chaleurs silencieuses, ce qui a été confirmé par le fait qu'elles avaient ovulé. Parmi les 3 chiennes restantes qui ont présenté des signes extérieurs de chaleurs, une seule a ovulé. Le protocole utilisé ici pour prévenir l'entrée en chaleurs et l'ovulation a ainsi été efficace chez 11/16 chiennes, soit dans 68,75% des cas.



*Figure 2 : Résultats obtenus suite à l'utilisation d'osatéronne sur les chiennes recevant un implant de desloréline (n=16).*

A la fin de la période de suivi, seules 3 chiennes étaient revenues en chaleurs 145, 283 et 332 jours après la pose de l'implant. La durée d'absence d'expression des chaleurs était située entre 180 et 365 jours pour 9/16 chiennes (soit 56,25%) et >365 jours pour 6/16 chiennes (soit 37,5%)

Aucun effet secondaire n'a été rapporté sur les animaux durant ce protocole.

#### **4. Discussion**

L'inhibiteur de l'aromatase anastrozole n'a pas permis d'empêcher l'œstrus induit suite à la pose d'un implant d'agoniste de la GnRH (voir chapitres précédents de ce manuscrit) alors que l'utilisation de l'acétate de clomifène, molécule à activité anti-œstrogène, n'a donné des résultats que chez 3/8 chiennes. Avec ce dernier, même si un effet anti-œstrogénique a été observé chez la plupart des chiennes, un effet partiellement œstrogénique a été détecté au niveau vaginal, ce qui est similaire à certaines études précédemment réalisées sur le sujet (Gobello 2006). De plus, le blocage ovarien induit par cette molécule disparaissait dès l'arrêt du traitement, conduisant alors à une ovulation. Par conséquent, ces molécules ne peuvent être considérées comme des solutions thérapeutiques valables pour empêcher l'induction de l'œstrus chez la chienne en anœstrus.

Alors que les 3 chiennes de G1 traitées avec l'anastrozole et 5 chiennes sur 8 de G2 traitées avec le clomifène ont présenté des chaleurs, de bien meilleurs résultats ont été obtenus lors de l'utilisation de l'acétate d'osatéronne (5 chiennes sur 16 uniquement étant en chaleurs). Notre choix s'était porté sur cette molécule car celle-ci était proche de la chlormadinone, un progestagène connu pour avoir des effets moindres au niveau utérin et donc moins susceptible d'engendrer des troubles comme pyométre ou hyperplasie glandulokystique (Curran et al. 2004). La posologie de cette molécule avait été adaptée sur la base de données pharmacocinétiques (fournies par le laboratoire commercialisant la molécule) pour obtenir une durée d'efficacité d'environ 15 jours dans l'organisme. Cette durée de 15 jours avait été décidée empiriquement car chez le chien mâle, elle correspond en moyenne à la durée pendant laquelle l'hypophyse doit être exposée à la desloréline pour obtenir l'arrêt de sa sécrétion en gonadotrophines FSH et LH (Trigg et al. 2001). Comme nous l'avons précisé dans les parties précédentes cependant, cette donnée n'est pas connue chez la chienne et reste à déterminer, ce

qui permettra peut-être de mieux appréhender les protocoles à mettre en place pour prévenir l'œstrus induit.

Il nous semble néanmoins qu'à ce jour l'utilisation de progestagènes demeure la meilleure façon de bloquer le fonctionnement ovarien et à ce titre, ce type de protocole est à recommander lorsqu'il convient de rechercher une stérilisation chimique temporaire à l'aide d'agonistes de la GnRH sur une chienne adulte en anœstrus. Néanmoins, il est important de noter que malgré tout, des chaleurs ainsi qu'une ovulation peuvent survenir (31,25% des chiennes dans notre étude) et qu'à ce titre, il semble important de contrôler l'animal dans le mois qui suit la pose de l'implant pour s'assurer qu'aucun effet secondaire ne se développe.

Il est également intéressant de noter que contrairement à ce que nous avons obtenu dans l'étude précédente où nous administrions l'implant seul à des femelles adultes, lorsqu'un traitement concomitant a été appliqué pour bloquer l'entrée en chaleurs, aucun effet secondaire nécessitant notamment le retrait de l'implant n'a été rapporté.

## **5. Conclusion**

Il n'existe donc à ce jour aucun protocole fiable à 100% pour prévenir l'apparition de chaleurs induites sur des chiennes adultes traitées à la desloréline en anœstrus. Si les inhibiteurs de l'aromatase et les anti-œstrogènes ne présentent visiblement aucun intérêt dans cette optique, l'utilisation des progestagènes de dernière génération comme l'osatérone se justifie lorsqu'une solution fiable pour enrayer le phénomène est recherchée. Certes, cette alternative ne prévient pas tous les cas, mais reste aujourd'hui la meilleure solution que tout vétérinaire peut appliquer.

# Utilisation d'implants d'agonistes de la GnRH sur des chiennes prépubères

## **Travail associé:**

## **Publication:**

**Use of GnRH agonist implants in prepubertal bitches . E. Fontaine, F. Mir, F. Vannier, A. Fontbonne** En preparation

**Résumé :** L'utilisation des agonistes de la GnRH en termes de stérilisation chimique chez la chienne se heurte aux problèmes liés à l'œstrus induit –et relaté dans les précédents chapitres. Aucune alternative fiable à 100% n'existe aujourd'hui chez la chienne adulte. Pourtant, une autre solution pouvant être envisagée consiste à implanter des individus prépubères, chez lesquels en effet la stimulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire par l'agoniste de la GnRH ne conduit pas à une induction des chaleurs, du fait de l'immaturité du système reproducteur. 24 chiennes ( $4,2 \pm 0,6$  mois, 2,8 à 5,3 mois) ont donc été recrutées et divisées en deux groupes : G1 (n=13), où les animaux recevaient un implant contenant 4,7mg de desloréline (Suprelorin®4,7mg, Virbac, Carros, France), et G2 (n=11) où un implant de 9,4mg leur était administré (Suprelorin®9,4mg, Virbac, Carros, France). Aucune de ces chiennes n'a déclaré de chaleurs suite à la pose de l'implant. A la fin de notre période de travail, seules 2 chiennes de G1 étaient revenues en chaleurs, 426 et 513 jours après l'administration du traitement. Chez 85% de ces individus, aucun épisode de chaleurs n'avait été observé pendant plus d'un an. Les chiennes de G2 ayant toutes été implantées entre 11 et 200 jours avant la fin de notre travail, les données n'étaient pas encore suffisamment exhaustives pour être analysées. Néanmoins aucune chienne des deux groupes n'a présenté le moindre effet secondaire suite au traitement. L'immaturité physiologique du système reproducteur des individus prépubères permet donc d'obtenir une stérilisation chimique efficace et durable à l'aide des agonistes de la GnRH, sans pour autant être confronté aux effets secondaires potentiels retrouvés chez les individus adultes.

## 1. Introduction

Nous avons souligné dans la partie précédente l'importance de prévenir l'entrée en chaleurs des chiennes lorsqu'un traitement à base d'agonistes de la GnRH est utilisé dans le cadre de la stérilisation chimique. Comme nous l'avons expliqué dans la partie précédente, aucune alternative fiable à 100% n'est aujourd'hui disponible chez la chienne adulte.

Une autre alternative consiste à implanter des individus prépubères, chez lesquels en effet la stimulation de l'axe hypothalamo-hypophysaire par l'agoniste de la GnRH ne conduit pas à une induction des chaleurs, du fait de l'immaturité du système reproducteur (Noakes et al, 2009).

L'âge auquel l'animal est traité semble être un paramètre déterminant sur l'apparition d'un œstrus induit. Rubion et al (2006) ont traité des chiennes de  $4,88 \pm 0,32$  mois avec des implants d'azagly-nafaréline et n'ont noté aucun œstrus induit. Trigg et al (2001) ont fait la même constatation pour les chiennes âgées de 4 mois, mais la pose d'un implant de desloréline à partir de 7 mois entraînait systématiquement un œstrus dans les un à deux mois qui suivaient l'implantation. De même Inaba et al (1998) ont injecté du leuprolide dépôt en excipient huileux à 6 chiennes prépubères âgées de un an et 5 d'entre elles ont présenté un œstrus induit.

Néanmoins les études à ce sujet ne comportaient que des chiennes d'expérimentation et comme mentionné dans nos précédentes études, il est alors difficile d'extrapoler à tous les membres de l'espèce canine qui est marquée par cette très grande variabilité anatomique et morphologique. Nous avons donc tenté de vérifier si l'utilisation de ces agonistes de la GnRH pouvait, dans le cadre de la stérilisation chimique, se vérifier et s'utiliser sur des individus femelles qui n'avaient pas encore atteint leur puberté.

## 2. Matériels et méthodes

Seules des chiennes impubères de moins de 6 mois ont été recrutées au travers du service de Vaccinations de l'Ecole Vétérinaire d'Alfort pour participer à cette étude. 24 chiennes ( $4,2 \pm 0,6$  mois, 2,8 à 5,3 mois) ont été réparties en deux groupes :

- G1 (n=13), dans lequel les individus ont tous reçu un implant de desloréline de 4,7mg (Suprelorin®4,7mg, Virbac, France), qui délivre l'agoniste de la GnRH pendant une durée d'environ 6 mois ;

- G2 (n=11), dans lequel individus ont reçu un implant de 9,4mg (Suprelorin®9,4mg, Virbac, France), pour lequel l'agoniste est délivré à la même vitesse mais pendant environ 12 mois.

Toutes les chiennes ont été implantées par voie sous-cutanée en région post-ombilicale, comme présenté dans les chapitres précédents. Un contact téléphonique régulier était établi avec les clients et les chiennes étaient revues dès l'expression de leurs premières chaleurs.

### **3. Résultats**

Aucune chienne n'est entrée en chaleurs dans les trois semaines qui ont suivi la pose de l'implant, et ce quel que soit l'implant utilisé.

Aucun de ces animaux n'est revenu en chaleurs avant 6 mois après la pose de l'implant. Sur les chiennes implantées avec des implants de 4,7mg, seules deux chiennes étaient revenues en chaleurs au moment de l'arrêt de notre travail, 426 et 513 jours après la pose de l'implant. Aucun examen n'a été fait pour s'assurer que ces chiennes avaient ou non ovulé.

Concernant les chiennes ayant reçu des implants de 9,4mg, là aussi aucun animal n'est revenu en chaleurs sur notre période d'étude. Cependant, ces chiennes avaient toutes été implantées entre 11 et 200 jours avant que notre travail ne s'arrête, aussi est-il nécessaire d'attendre encore au moins un an pour pouvoir tirer des données fiables de cette partie de l'étude.

Aucun effet secondaire n'a été rapporté sur aucune des chiennes participant à cette étude.

### **4. Discussion**

La meilleure solution à ce jour pour éviter l'entrée en chaleurs suite à la pose d'un implant d'agoniste de la GnRH semble donc bien être d'implanter des chiennes prépubères. Dans ce cas précis et quelle que soit la race de l'animal, nous n'avons en effet jamais obtenu d'entrée en chaleurs.

Différentes questions pourraient néanmoins se poser sur l'utilisation de ce protocole sur des individus d'un si jeune âge. En ce qui concerne leur fertilité, nous n'avons pu l'évaluer ici. Il serait intéressant de s'y attarder car les données de la littérature divergent quelque peu. Trigg et al (2001) ont fait reproduire les chiennes de leur étude sur le premier œstrus après le traitement, mais aucune n'a été gestante. Ces résultats sont cependant à prendre avec précaution car aucun suivi de chaleur n'avait été réalisé (Trigg et al. 2001). Mc Rae et al (1985) ont fait reproduire deux chiennes sur le premier œstrus après le traitement et elles ont

toutes été gestantes (McRae et al. 1985). La fertilité de ces individus stérilisés précocement reste donc à confirmer.

Néanmoins, les données histologiques fournies par Mc Rae et al semblent confirmer la totale réversibilité du traitement. En effet, si chez les chiennes prépubères en cours de traitement ils ne retrouvaient que de nombreux follicules primordiaux, quelques follicules primaires et aucun follicule secondaire, quatorze mois après la fin du traitement, des follicules secondaires étaient présents (McRae et al. 1985).

Howe et al (2004) ont observé que les chiens stérilisés très tôt avant 24 semaines d'âge avaient tendance à être légèrement plus grands que leurs congénères stérilisés après ce délai, et qu'ils seraient plus sensibles aux fractures épiphysaires. L'utilisation sur les individus prépubères d'agonistes de la GnRH n'a pas mis en évidence de signes équivalents. Ni la taille ni le poids des individus n'étaient affectés (Rubion et al. 2006). Il est cependant intéressant de noter que chez l'homme, les agonistes de la GnRH sont souvent utilisés lors de puberté précoce chez les enfants. Ceux-ci sont souvent de petite taille et ce traitement est utilisé justement pour leur permettre d'atteindre une taille normale. Et s'il permet effectivement aux enfants atteints de grandir plus, ce traitement est également associé à une déminéralisation plus marquée des os (Feuillan et al. 2001), qui n'est pas sans rappeler ce qui est évoqué sur le chien (Howe et al. 2004). Les études ayant été réalisées portant sur peu d'individus, il serait nécessaire de les étoffer davantage.

## **5. Conclusion**

L'immaturation physiologique du système reproducteur des individus prépubères permet d'obtenir une stérilisation chimique efficace à l'aide des agonistes de la GnRH sans pour autant être confronté aux effets secondaires potentiels retrouvés chez les individus adultes et surtout sans obtenir d'œstrus induit, qui reste aujourd'hui la principale limite à l'utilisation de ces molécules. Certains points restent à éclaircir mais les premiers résultats présentés ici sont encourageants, d'autant plus que la durée d'efficacité d'un seul implant semble beaucoup plus longue que ce que l'on retrouve lorsque le même usage est reporté sur un individu adulte.

## **Discussion générale- Perspectives**

## 1. Objectifs du travail

Alors que jusqu'à présent, l'utilisation d'implants délivrant de façon prolongée des agonistes de la GnRH avait été peu documentée chez la chienne, les différentes études que nous avons menées nous ont permis d'obtenir des données sur 173 animaux (dont 24 beagles d'expérimentation).

Ces molécules offrent des possibilités thérapeutiques intéressantes, aussi bien en reproduction assistée qu'en termes de contraception. Notre travail a eu pour but de détailler ces deux aspects, tout d'abord en travaillant sur l'induction de chaleurs fertiles à l'aide de ces implants de desloréline puis d'étudier comment ils pourraient être utilisés pour proposer une stérilisation chimique.

## 2. Induction de chaleurs fertiles chez la chienne

La maîtrise du moment de mise à la reproduction est un élément essentiel en reproduction assistée chez la chienne. En effet, la principale cause d'infertilité dans cette espèce reste la mauvaise détermination du moment de l'ovulation (Fontbonne et al. 2007a). Alors que les protocoles d'induction de chaleurs sont couramment utilisés chez les animaux de rente (Noakes et al, 2009) ceux-ci sont principalement réservés chez la chienne aux individus présentant des retards de chaleurs conséquents (durée de l'interœstrus supérieure de 2 mois par rapport à sa valeur normale) (Fontbonne et al. 2007a).

En utilisant ces implants sur des chiennes en œstrus, nous avons réussi à obtenir 100% d'entrée en chaleurs. Le principal problème rencontré sur ces chaleurs induites était lié au fait que 21,9% de ces chiennes présentaient des chaleurs anovulatoires et que même s'il semblait y avoir une tendance à retrouver ce phénomène préférentiellement lors d'induction en œstrus précoce (37,5% des chiennes présentaient des chaleurs anovulatoires quand traitées à ce stade contre 16,7% quand traitées en œstrus tardif), aucun critère ne permet aujourd'hui d'anticiper à l'avance comment les chiennes se comporteront en termes d'ovulation. Si aucune ovulation n'est survenue après 15 jours, nos données nous conduisent à penser que la chienne ne portera vraisemblablement pas et que l'implant doit être retiré car il n'y a plus aucun bénéfice à espérer. Même si nous avons eu quelques cas où l'utilisation de clomifène, un anti-œstrogène utilisé en médecine humaine lors de troubles de l'ovulation, nous a permis d'obtenir des ovulations après 15 jours, ces chiennes n'ont pas été gestantes par la suite. Un suivi hormonal complet durant cette phase d'induction (en particulier s'intéressant aux profils sanguins des gonadotrophines) pourrait permettre de mieux comprendre le phénomène et de mieux cerner les stratégies thérapeutiques à adopter. Ces dosages n'ont pu

être effectués au cours de notre travail de thèse mais les différents prélèvements réalisés ont tous été conservés et leur réalisation reste d'actualité pour continuer le travail déjà effectué et compléter les données.

La fertilité ultérieure sur ces individus ainsi traités reste également à étudier. Des observations faites notamment chez la jument laissent en effet penser que celle-ci pourrait chez certains individus être affectée (B. Siliart, comm. pers.).

La durée entre la pose de l'implant et le moment de l'ovulation s'est révélé très reproductible, les chiennes ovulant  $11,8 \pm 2,1$  jours après l'administration du traitement et ce quel que soit l'animal considéré. Aucun critère (en particulier la taille) ne semble influencer cet intervalle dans notre étude. Il est intéressant de noter que le résultat a été le même quelle que soit la taille de l'animal traité. Il est possible que la dose de desloréline délivrée par l'implant soit bien supérieure à la dose efficace nécessaire pour obtenir l'induction des chaleurs et pourrait ainsi jouer un rôle dans les différents résultats observés. Il serait intéressant dans le futur de s'attarder à déterminer cette dose efficace et voir si alors, celle-ci peut influencer sur les paramètres de fertilité. Ce traitement permet cependant déjà d'envisager une véritable synchronisation intéressante à plus d'un titre dans l'espèce canine. En effet, un tel protocole est un pré-requis à la mise en place de procédures de transfert embryonnaire chez la chienne. L'utilisation de ce genre de techniques à des fins de recherche ou pour des chiennes à haute valeur génétique et souffrant d'infertilité d'origine utérine (Fontaine et al. 2009b) est quelque chose qui s'en trouverait facilité, la synchronisation entre le récipient et le receveur étant un élément clé de ces protocoles (Noakes et al, 2009). Le développement de techniques non-invasives notamment par le biais de l'endoscopie génitale chez la chienne (Fontaine et al. 2010) pourrait définitivement permettre la mise en place de cette biotechnologie de la reproduction dans l'espèce canine. Ce protocole est également quelque chose qui peut s'envisager dans toute démarche d'infertilité chez la chienne. La première recommandation faite est généralement de mettre en place un suivi de chaleurs pour déterminer le moment de l'ovulation de façon précise (Fontbonne et al. 2007a). La maîtrise du cycle offerte par ces protocoles permet de faciliter la détermination du moment de la mise à la reproduction et même de tenter de planifier les événements : l'optimal de fertilité chez la chienne se situant environ 48h après l'ovulation (Reynaud et al, 2009), il est tout à fait envisageable de planifier une saillie ou une insémination en prenant en compte que suite à la pose de l'implant, l'ovulation surviendra environ 12 jours après. Nous avons expérimenté cette approche sur quelques chiennes suite à notre étude avec des résultats encourageants : à chaque fois nous

avons été capable de prédire la fenêtre de mise à la reproduction. Cet aspect n'est pas retrouvé lorsque des dopamine agonistes comme la cabergoline sont utilisés pour l'induction des chaleurs dans l'espèce canine (Verstegen et al. 1999).

On peut même imaginer voir plus loin : chez la chienne la durée de gestation est d'environ  $63 \pm 1$  jours post-ovulation (Mir et al. 2011). Connaître le moment de la mise-bas est un paramètre crucial pour limiter le risque de mortalité néonatale (Fontaine et al. 2007, Levy et al. 2009) . En maîtrisant le moment de l'ovulation chez la chienne, il devient possible, de même, planifier à l'avance le moment optimal en termes de mise-bas.

### **3. Stérilisation chez la chienne**

42,4% des chiennes sont stérilisées en France, ce qui en fait un des motifs les plus fréquents de consultation vétérinaire. L'utilisation des implants d'agonistes de la GnRH se présente donc comme une véritable alternative non-invasive à la solution chirurgicale qui reste aujourd'hui privilégiée.

Le principal frein aujourd'hui chez la chienne est lié aux chaleurs induites qui peuvent survenir suite à la pose de cet implant : les effets secondaires que nous avons rencontrés (chaleurs persistantes, lactations persistantes) peuvent lui être directement imputés. En effet 109 chiennes ont présenté des chaleurs induites suite au traitement par ces implants dans nos études. 97,2% d'entre elles (106/109 individus) étaient en œstrus au moment de la pose de l'implant. 3 chiennes étaient en diœstrus : même si ce stade semble donc mieux convenir pour administrer aux chiennes ce traitement, il est important de garder à l'esprit qu'occasionnellement, des chaleurs induites peuvent néanmoins survenir à ce stade du cycle (3 chiennes sur 15 dans nos études). Nous nous sommes attachés à prévenir cet œstrus induit à l'aide de différentes alternatives médicales. L'acétate d'osatérone s'est présentée comme la meilleure solution médicale pour lutter contre ce problème mais néanmoins, 5 chiennes sur 16 ont quand même présenté un œstrus induit. La meilleure option reste aujourd'hui de traiter les chiennes alors qu'elles sont encore pré-pubères (aucune chaleur induite sur les 24 individus traités dans notre étude) mais les effets sur la croissance de l'animal restent à évaluer.

Les données que nous avons collectées nous permettent cependant d'utiliser aujourd'hui le potentiel de ces agonistes de la GnRH dans leur aspect contraception. En effet certains individus présentés pour stérilisation présentent parfois des contre-indications cardiaques/rénales à toute intervention chirurgicale. Après avoir défini le stade du cycle

auquel l'animal se trouve il devient alors possible de proposer la meilleure solution en termes de stérilisation (implant seul si la chienne est en dioestrus ou implant couple a de l'osatéronne si la chienne est en anœstrus).

De la même façon la stérilisation est parfois recommandée a titre thérapeutique : dans certaines affections comme l'épilepsie, le rôle que peuvent jouer les hormones sexuelles n'est pas clair en médecine des animaux de compagnie alors qu'il est évoqué chez l'homme (Herzog et al. 2011). Il en est de même pour certaines affections dermatologiques comme l'alopecie X (Lloyd et Cerundolo 2001) et même certains comportements dérangeants pour le propriétaire (agressivité notamment). Si celle-ci est parfois conseillée, elle peut parfois aggraver le problème existant. L'utilisation des implants d'agonistes de la GnRH se révèle extrêmement intéressante car dans ce cadre elle peut être utilisée comme un véritable test diagnostique. Si une amélioration nette est notée suite à leur utilisation, la stérilisation définitive pourra par la suite être envisagée.

Il reste nécessaire de déterminer quelle fréquence de réadministration devrait être adoptée pour maintenir l'effet sur le long terme. Les implants de 9,4mg désormais commercialisés permettront certainement une durée d'efficacité prolongée, qui pourrait se révéler particulièrement intéressante dans les zones où les populations d'animaux errants sont importantes et représentent un risque pour l'homme. En effet un des paramètres clés pour gérer les problèmes liés à ces animaux errants repose sur la possibilité de les stériliser pour éviter leur multiplication incontrôlée. Les campagnes de stérilisation chirurgicale, quand elles sont organisées, ne permettent cependant pas de toucher tous les animaux concernés. L'utilisation de ces implants pourrait être une solution intéressante car ils sont beaucoup plus rapides à administrer et permettrait de toucher une plus grande population. La majorité de ces animaux ont une durée de vie moyenne de trois ans et si les implants de desloréline permettent d'obtenir une stérilisation pendant une durée équivalente, leur utilisation dans ce cadre serait complètement justifiée.

#### **4. Autres perspectives**

Nous avons essentiellement travaillé sur l'espèce canine mais les mêmes questions et les mêmes possibilités pourraient être étudiées dans l'espèce féline, ou les mêmes thématiques sont rencontrées, que ce soit en reproduction assistée ou en termes de contraception.

Les effets anti-mitotiques associés aux GnRH-agonistes pourraient également s'avérer intéressants en cancérologie vétérinaire, un domaine qui reste pour l'instant à explorer.



# Conclusion

En ce qui concerne l'induction des chaleurs chez la chienne, les implants de desloréline se positionnent aujourd'hui comme une alternative séduisante : les résultats de fertilité obtenus diffèrent en effet peu de ceux obtenus avec des agonistes dopaminergiques, qui jusqu'à là étaient considérés comme la meilleure solution. Certains points nécessitent encore d'être éclaircis, notamment les problèmes liés aux cycles anovulatoires. A ce sujet, l'utilisation d'anti-estrogènes (comme en procréation médicalement assistée chez la femme) pourrait s'avérer utile, mais reste encore à étudier. Il semble néanmoins que la réduction de l'intervalle interœstrus chez la chienne à l'aide de ces implants ne puisse encore être envisagée. En effet, aucun protocole ne permet à ce jour de réduire le temps nécessaire à l'involution utérine chez la chienne. Lorsque ces implants sont donc utilisés en anœstrus précoce dans le but de réduire l'intervalle entre chaleurs, l'involution n'est souvent pas complète et même si des chaleurs ovulantes sont obtenues, la plupart des chiennes s'avèrent incapables de maintenir leur gestation. Tant qu'aucune solution n'aura été trouvée, le raccourcissement de l'intervalle inter-œstrus chez la chienne ne pourra être sereinement envisagé.

Ces implants se présentent aujourd'hui comme une alternative à considérer lorsqu'une stérilisation chimique chez la chienne est souhaitée. Le principal inconvénient rencontré aujourd'hui est lié au fait que chez les chiennes implantées en anœstrus, quasiment toutes auront des chaleurs induites. Et la majorité des effets secondaires rencontrés y sont liés. Aucun protocole ne permet aujourd'hui de complètement empêcher ce phénomène chez la chienne adulte, même si l'utilisation de progestagènes comme l'osatéronne permettent de diminuer le nombre d'entrées en chaleur de façon significative. En ce sens, la pose de l'implant sur des chiennes prépubères semble être une solution d'avenir, car chez ces individus, aucune entrée en chaleurs n'a été rapportée. Néanmoins, les paramètres liés à la croissance et à la fertilité de ces chiennes restent à étudier.

Ces implants de desloréline ouvrent donc de nouvelles possibilités dans la gestion de la reproduction des carnivores domestiques. De nombreux points restent encore à élucider, et nul doute que de nombreuses découvertes sont encore à venir à leur sujet.

Nos travaux se sont uniquement penchés sur l'utilisation d'agonistes de la GnRH mais il est également intéressant de noter que la fréquence des pulses de GnRH est elle-même en partie contrôlée par les kisspeptines. L'utilisation de ces composés dans l'espèce canine pourrait également dans le futur, proposer de nouvelles solutions dans le cadre du contrôle de la fertilité.

## Bibliographie

- 1999: Deslorelin. D-Trp-LHRH-PEA, LHRH agonist analogue, Somagard. *Drugs R D*, 2 420-422.
- Al-Bassam M., Thomson R.; O'Donnell L., 1981: Involution abnormalities in the postpartum uterus of the bitch. *Vet Pathol*, 18 208-218.
- Anderson A.; Simpson M., 1973: The ovary and reproductive cycle of the dog (Beagle). Geron-X Inc., Los Atos, CA.
- Arlt S., Spankowsky S.; Heuwieser W., 2011: Follicular cysts and prolonged oestrus in a female dog after administration of a deslorelin implant. *N Z Vet J.*, 59 87-91.
- Arthur G. H., Noakes D. E., Pearson H.; Parkinson T. J., 1996: Infertility in the bitch. In: W. Saunders, (ed), *Veterinary Reproduction and Obstetrics, Philadelphia*, 516-543.
- Atltintas D., Kokcu A., Tosun M., Cetinkaya M.; Kandemir B., 2008: Comparison of the effect of cetorelix, a GnRH antagonist, and leuprolide, a GnRH agonist, on experimental endometriosis. *J Obstet Gynaecol Res.*, 34 1014-1019.
- Bahk J., Kim M., Park M., Lee H., Lee J., Chung B.; Min S., 2008: Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor in bladder cancer epithelia and GnRH effect on bladder cancer cell proliferation. *Urol Int.*, 80 431-438.
- Basaria S., Lieb J. n., Tang A., DeWeese T., Carducci M., Eisenberger M.; Dobs A., 2002: Long-term effects of androgen deprivation therapy in prostate cancer patients. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 56 779-786.
- Bastianello S., 1983: A survey on neoplasia in domestic species over a 40 year period from 1935-1974 in the Republic of South Africa. VI. Tumors occurring in dogs. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 50 199-220.
- Beck J., Boothroyd C., Proctor M., Farquhar C.; Hughes E., 2005: Oral anti-oestrogens and medical adjuncts for subfertility associated with anovulation. *Cochrane Database Syst Rev*, 25 CD002249.
- Beijerink N., Dieleman S., Kooistra H.; Okkens A., 2003: Low doses of bromocriptine shorten the interestrous interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration. *Theriogenology*, 60 1379-1386.
- Bertschinger H., Asa C., Calle P., Long J., Bauman K., DeMatteo K., Jochle W., Trigg T.; Human A., 2001: Control of reproduction and sex related behaviour in exotic wild carnivores with the GnRH analogue deslorelin: preliminary observations. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 57 275-283.
- Bertschinger H., Jago M., Nothling J.; Human A., 2006: Repeated use of the GnRH analogue deslorelin to down-regulate reproduction in male cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *Theriogenology*, 66 1762-1767.
- Bertschinger H., Trigg T., Jochle W.; Human A., 2002: Induction of contraception in some African wild carnivores by downregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin. *Reproduction Suppl*, 60 41-52.
- Blackshaw J., 1991: An overview of types of aggressive behavior in dogs and methods of treatment. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 30 351-361.
- Bliss P., Navratil A., Xie J.; Roberson M., 2010: GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol*, 31 322-340.
- Blumenfeld Z., 2007: How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRh agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes or ovaries. *The Oncologist*, 12 1044-1054.
- Brodey R., Goldschmidt M.; Roszel J., 1983: Canine mammary neoplasms. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 19 61-90.
- Brogden R., Buckley M.; Ward A., 1990: Buserelin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and clinical profile. *Drugs*, 39 399-437.
- Brufsky A., 2006: Management of cancer-treatment-induced bone loss in postmenopausal women undergoing adjuvant breast cancer therapy: a Z-FAST update. *Semin Oncol.*, 33 S13-17.

- Bryan H., 1973: Parenteral use of medroxyprogesterone acetate as an antifertility agent in the bitch. *Am J Vet Res*, *34* 659-663.
- Burger L., Dalkin A., Aylor K., Haisenleder D.; Marshall J., 2002: GnRH pulse frequency modulation of gonadotropin subunit gene transcription in normal gonadotropes - Assessment by primary transcript assay provides evidence for roles of GnRH and follistatin. *Endocrinology*, *143* 3243-3249.
- Burke T.; Reynolds H. J., 1975: Megestrol acetate for estrus postponement in the bitch. *J Am Vet Med Assoc*, *167* 285-287.
- Cain J., Lasley B., Cain G., Feldman E.; Stabenfeldt G., 1989: Induction of ovulation in bitches with pulsatile or continuous infusion of GnRH. *J Reprod Fertil*, *39* 143-147.
- Casper R.; Mitwally M., 2006: Review: aromatase inhibitors for ovulation induction. *J Clin Endocrinol Metab*, *91* 760-771.
- Cheung L.; Wong A., 2008: Gonadotrophin-releasing hormone: GnRH receptor signaling in extrapituitary tissues. *FEBS J*, *275* 5479-5495.
- Christiansen I. J., 1984: *Reproduction in the dog and cat*. Baillière Tindall, pp7-8, London.
- Cicchione N.; Kaiser U., 2009: The biology of gonadotroph regulation. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, *16* 321-327.
- Ciechanowska M., Lapot M., Mateusiak K.; Przekop F., 2010: Neuroendocrine regulation of GnRH release and expression of GnRH and GnRH receptor genes in the hypothalamus-pituitary unit in different physiological states. *Reprod Biol*, *10* 85-124.
- Cohen D., Reif J.; Brodey R., 1974: Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplasia observed in a veterinary hospital. *Cancer Res*, *34* 2859-2868.
- Coit V., Dowell F.; Evans N., 2008: Neutering affects mRNA expression levels for the LH- and GnRH-receptors in the canine urinary bladder. *Theriogenology*, [epub ahead of print].
- Concannon P., 1989: Induction of fertile oestrus in anoestrus dogs by constant infusion of GnRH agonist. *J Reprod Fertil Suppl*, *39* 149-160.
- Concannon P., Altszuler N., Hampshire J., Butler W.; Hansel W., 1980: Growth hormone, prolactin, and cortisol in dogs developing mammary nodules and an acromegaly-like appearance during treatment with medroxyprogesterone acetate. *Endocrinology*, *106* 1173-1177.
- Concannon P., Hansel W.; McEntee K., 1977: Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod*, *17* 604-613.
- Concannon P., McCann J.; Temple M., 1989: Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fertil Suppl*, *39* 3-25.
- Concannon P., Temple M., Montanez A.; Newton L., 2006: Effects of dose and duration of continuous GnRH agonist treatment on induction of estrus in beagle dogs: competing and concurrent up-regulation and down-regulation of LH release. *Theriogenology*, *66* 1488-1496.
- Concannon P., Tsutsui T.; Shille V., 2001: Embryo development, hormonal requirements and maternal responses during canine pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl*, *57* 169-179.
- Corrada Y., Hermo G., Johnson C., Trigg T.; Gobello C., 2006: Short-term progestin treatment prevent estrous induction by a GnRH agonist implant in anestrous bitches. *Theriogenology*, *65* 366-373.
- Counis R., 1999: Gonadotropin synthesis. In: J. Neill; E. Knobil, (eds), *Encyclopedia of Reproduction*. Acad. Press Vol 2: pp 507-520.
- Counis R., Combarrous Y., Chabot V.; Taragnat C., 2001: Régulation de la synthèse et de la libération des gonadotropines hypophysaires, Chapitre 3. In: INRA, (ed), *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. pp. 64-84.
- Curran M.; AJ W., 2004: Ethinylestradiol/chlormadinone acetate. *Drugs*, *64* 751-760.
- Dalkin A., Haisenleder D., Ortolano G., TR. E.; Marshall J., 1989: The frequency of gonadotropin-releasing hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, *125* 917-924.
- de Gier J B. N., Kooistra HS, Okkens AC, 2008: Physiology of the canine anoestrus and methods for manipulation of its length. *Reprod Domest Anim*, *43* 157-164.

- de Gier J., Kooistra H., Djajadiningrat-Laanen S., Dieleman S.; Okkens A., 2006: Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17 beta, progesterone, prolactin and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology*, *65* 1346-1359.
- de Gier J.; Winke C., 2010: Use of deslorelin to control hypersexuality in male dogs. in Symposium deslorelin: deslorelin in practice, 7th EVSSAR Congress. Louvain la Neuve, Belgium, May 14th-15th, p9-10, pp. 9-10.
- Dubé D., Assaf A., Pelletier G.; Labrie F., 1987: Morphological study of the effects of an GnRH agonist on the canine testis after 4 months of treatment and recovery. *Acta Endocrinol (Copenh.)*, *116* 413-417.
- Dubé J., Frenette G., Tremblay R., Tremblay Y.; Bélanger A., 1984: Involution of spontaneous benign prostatic hyperplasia in the dogs under influence of a chronic treatment with a LHRH agonist. *Prostate*, *5* 417-423.
- Dungan H., Clifton D.; Steiner R., 2006: Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. *Endocrinology*, *147* 1154-1158.
- Efstathiou J., Bae K., Shipley W., Hanks G., Pilepich M., Sandler H.; Smith M., 2008: Cardiovascular mortality after androgen deprivation therapy for locally advanced prostate cancer: RTOG 85-31. *J Clin Oncol.*, [Epub ahead of print].
- England G.; Concannon P., 2002: Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations. Concannon PW, England G, Verstegen J and Linde-Forsberg C: Recent advances in small animal reproduction. International Veterinary Service ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)). Ithaca, New York.
- England G.; Yeager A., 1993: Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy *J Reprod Fertil Suppl*, *47* 107-117.
- Esparel A., 2010: Contribution à l'étude de la reproduction chez la chienne: analyse des dossiers des chiennes suivies au Centre d'Etude en Reproduction des Carnivores à l'ENVA de 2005 à 2008. Thèse Med Vet, Créteil, Maisons-Alfort.
- Fayrer-Hosken R., Dookwah H.; Brandon C., 2000: Immunocontrol in dogs. *Anim Reprod Sci*, *2* 365-373.
- Feuillan P., Jones J., K B., Klein K.; Jr C. G., 2001: Follow-up of children and young adults after GnRH-agonist therapy or central precocious puberty. *J Endocrinol Invest.*, *24* 734-736.
- Fieni F., Martal J., Marnet P., Siliart B., Bernard F., Riou M., Bruyas J.; Tainturier D., 2001: Hormonal variation in bitches after early or mid pregnancy termination with aglepristone (RU534). *J reprod Fertil Suppl*, *57* 243-248.
- Fontaine E., 2009: Les analogues de la GnRH sont une alternative a la sterilisation chirurgicale. *Semaine Veterinaire*, *1350*.
- Fontaine E., 2010: La sterilisation n'est pas forcément chirurgicale. *Semaine Veterinaire*, *1418*.
- Fontaine E., 2011: La desloreline peut induire des chaleurs chez la chienne. *Semaine Veterinaire*, *1456*.
- Fontaine E., Bassu G., Levy X., Grellet A.; Fontbonne A., 2009a: Fertility after medical treatment of uterine diseases. 12th EVSSAR annual Symposium. Wroclaw, Poland.
- Fontaine E.; Fontbonne A., 2010: Use of deslorelin to control fertility in the bitch. in Symposium deslorelin: deslorelin in practice, 7th EVSSAR Congress. Louvain la Neuve, Belgium, 14th-15th May, p15-17, pp. 15-17.
- Fontaine E.; Fontbonne A., 2011: Clinical Use of GnRH Agonists in Canine and Feline Species. *Reprod Domestic Anim*, *46* 344-353.
- Fontaine E., Levy X., Grellet A., Luc A., Bernex F., Boulouis H.; Fontbonne A., 2009b: Diagnosis of endometritis in the bitch: a new approach. *Reprod Domestic Anim.*, *44* 196-199.
- Fontaine E., Million C., Levy X., Grellet A.; Fontbonne A., 2007: Risk factors affecting parturition and neonatal mortality: a retrospective study on 1615 bitches. 5th annual Symposium of EVSSAR. 1st-3rd June, Estoril, Portugal.

- Fontaine E.,Mir F.,Vannier F.,Bukowczan P.,Sanchez V.; Fontbonne A., 2010: Development of a transcervical hysteroscopic technique in the bitch. 7th EVSSAR Congress, p112.
- Fontaine E.,Mir F.,Vannier F.,Gerardin A.,Albouy M.,Navarro C.; Fontbonne A., 2011: Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist. *Theriogenology*, *76* 1561-1566.
- Fontbonne A.,Levy X.,Fontaine E.,Bachelier R.,Bernex F.,Atam-Kassigadou S.,Guffroy M.,Leblond E.; Briant E., 2008: Induction of parturition with aglepristone in various sized bitches belonging to different breeds. 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Vienna, Austria, p86-87.
- Fontbonne A.,Levy X.,Fontaine E.; Gilson C., 2007a: Guide pratique de reproduction clinique canine et féline, Editions Med'com, 272p.
- Fontbonne A.,Levy X.,Fontaine E.; Routier J., 2007b: L'insémination artificielle chez les félinés. *Bull. Acad. Vet. Fr.*, *160* 143-151.
- Frank D.,Kirton K.,Murchison T.,Quinlan W.,Coleman M.,Gilbertson T.,Feenstra E.; Kimball F., 1979: Mammary tumors and serum hormones in the bitch treated with medroxyprogesterone acetate or progesterone for four years. *Fertil Steril*, *31* 340-346.
- Galac S.,Kooistra H.,Dieleman S.,Cestnik V.; Okkens A., 2004: Effects of aglepristone, a progesterone receptor antagonist, administered during the early luteal phase in non pregnant bitches. *Theriogenology*, *62* 494-500.
- Galli C.,Colleoni S.,Duchi R.,Lagutina I.; Lazzari G., 2007: Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by in vitro procedures ranging from in vitro maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci*, *98* 39-55.
- Galli C.; Lazzari G., 2008: The manipulation of gametes and embryos in farm animals. *Reprod Domest Anim*, *43* 1-7.
- George K.,Nair R.; Tharyan P., 2008: Ovulation triggers in anovulatory women undergoing ovulation induction. *Cochrane Database Syst Rev*, *16* CD006900.
- Gobello C., 2006: Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: a review. *Theriogenology*, *66* 1560-1567.
- Gobello C., 2007: New GnRH analogs in canine reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, *100* 1-13.
- Gonzalez A.,Allen A.,Post K.,Mapletoft R.; Murphy B., 1989: Immunological approaches to contraception in dogs. *J Reprod Fertil., Suppl* *39* 189-198.
- Goodman M., 2001: Ovulation timing: concepts and controversies. *Vet Clin North Am Small Animl Pract*, *31* 219-235.
- Grellet A.,Baron F.,Fontaine E.,Levy X.; Fontbonne A., 2007: Plasma progesterone profile of german shepherd bitches during the preovulatory period: a retrospective study. 5th Annual symposium of EVSSAR. 1st-3rd June, Estoril, Portugal.
- Guérin C.,Maurel M.; Launais M., 1997: Use of an immunoenzymatic assay to detect the luteinizing hormone peak in bitches. *J Reprod Fertil Suppl*, *51* 177-281.
- Hart B.; Hart L., 1997: Selecting, raising and caring for dogs to avoid problems aggression. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, *8* 1129-1134.
- Herzog A.,Smithson S.,Fowler K.,Krishnamurthy K.,Sundstrom D.,Kalayjian L.,Heck C.,Oviedo S.,Correl-Leyva G.,Garcia E.,Gleason K.; Dworetzky B., 2011: Premenstrual dysphoric disorder in women with epilepsy: relationships to potential epileptic, antiepileptic drug, and reproductive endocrine factors. **Epilepsy Behav.**, *21* 391-396.
- Ho J.,Nagle G.,Mathias J.,Clench M.,Fan X.,Kalmaz G.,Sallustio J.; Eaker E., 1996: Presence of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) receptor mRNA in rat myenteric plexus cell. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, *113* 817-821.
- Hoffmann B., 2005: New drugs to control canine and feline reproduction. FECAVA-Voorjaarsdagen: International Congress, 15-17 April 2005: EVSSAR Precongress Day, April 14, p11-14. Amsterdam, NTH, pp. 11-14.

- Howe L.,Slater M.,Boothe H.,Hobson H.,Holcom J.; Spann A., 2004: Long term outcome of gonadectomy performed at an early age or traditionnal age in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, *218* 217-221.
- Inaba T.,Tani H.,Gonda M.,Nakagawa A.,Ohmura M.,Mori J.,Torii R.,Tamada H.; Sawada T., 1998: Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology*, *49* 975-982.
- Inaba T.,Umehara J.,Mori J.,Torii R.,Tamada H.; Sawada T., 1996: Reversible suppression of pituitary testicular function by a sustained release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate) in dogs. *Theriogenology*, *46* 671-677.
- Jeukenne P.; Versteegen J., 1997: Termination of dioestrus and induction of oestrus in dioestrous nonpregnant bitches by the prolactin antagonist cabergoline. *J Reprod Fertil Suppl*, *51* 59-66.
- Jöchle W., 1987: The sexual cycle in the bitch: recent insights and impact on therapy and reproduction control. *Tierarztl Prax.* , *15* 295-300.
- Johnson C.,Thompson D. J.; Cartmill J., 2002: Pituitary responsiveness to GnRH in mares following deslorelin acetate implantation to hasten ovulation. *J Anim Sci.*, *80* 2681-2687.
- Junaidi A.,Williamson P.,Cummins J.,Martin G.,Blackberry M.; Trigg T., 2003: Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue deslorelin for reversible long term contraception in male dogs. *Reprod Fertil Dev*, *15* 317-322.
- Junaidi A.,Williamson P.,Martin G.,Stanton P.,Blackberry M.,Cummins J.; Trigg T., 2007: Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinising hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod Fertil Dev*, *19* 891-898.
- Jurka P.,Max A.,Hawrynska K.; Snochowski M., 2008: Age related pregnancy results and further examination of bitches after aglepristone treatment of pyometra. *Reprod Dom Anim*, [*Epub ahead of print*] doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01288.x.
- Klein R.,Schams D.,Failing K.; Hoffmann B., 2003: Investigations on the re-establishment of the positive feedback of oestradiol during anoestrus in the bitch. *Reprod Domest Anim*, *38* 13-20.
- Kooistra H.,Okkens A.,Bever M.,Popp-Snijders C.,van Haaften B.,Dieleman S.; Schoemaker J., 1999: Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle-stimulating hormone in beagle bitches. *J Reprod Fertil*, *117* 387-393.
- Koushik K.,Dhanda D.,Cheruvu N.; Kompella U., 2004: Pulmonary delivery of deslorelin: large-porous PLGA particles and HPbetaCD complexes. *Pharm Res.*, *21* 1119-1126.
- Koushik K.,Sunkara G.,Gwilt P.; Kompella U., 2003: Pathways and kinetics of deslorelin degradation in an airway epithelial cell line (Calu-1). *Pharm Res*, *20* 779-787.
- Kramanovic L.,Hu L.,Leung P.,Feng H.; Catt K., 2009: The Hypothalamic GnRH Pulse Generator: Multiple Regulatory Mechanisms. *Trends Endocrinol Metab*, *20* 402-408.
- Krawiec D.; Heflin D., 1992: Study of prostatic disease in the dogs: 177 cases. *J Am Vet Med Ass*, *8* 1119-1122.
- Kuo Y.,Goodwin J.; Shahinian V., 2008: Gonadotrophin-releasing hormone agonist use in men without a cancer registry diagnosis of prostate cancer. *BMC Health Serv Res*, *14* 146.
- Kutzler M., 2005: Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology*, *64* 766-775.
- Kutzler M.,Lamb S.; Volkmann D., 2009: Comparison between vestibular and subcutaneous insertion of deslorelin implants for oestrus induction in bitches. *Reprod Dom Anim*, *44* 83-86.
- Kutzler M.,Stang B.,Waldvogel R.; Holthofer P., 2006: Administration of a single or multiple doses of injectable long acting deslorelin (GnRH analogue) does not induce oestrus in bitches. 5th Biannual EVSSAR Congress. Budapest, Hungary, 7th-9th April, p280.
- Kutzler M.,Wheeler R.,Lamb S.; Volkmann D., 2002: Deslorelin implant administration beneath the vulvar mucosa for the induction of synchronous estrus in bitches. 3rd EVSSAR European Congress. Liege, Belgium, p96.
- Kutzler M.; Wood A., 2006: Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, *66* 514-525.

- Kutzler M.,Yeager A.,Mohammed H.; Meyers-Wallen V., 2003: Accuracy of canine parturition date prediction using fetal measurements obtained by ultrasonography. *Theriogenology*, *60* 1309-1317.
- Labrie F.,Bélanger A.,Luu-The V.,Labrie C.,Simard J.,Cusan L.,Gomez J.; Candas B., 2006: Gonadotropin-releasing hormone agonist in the treatment of prostate cancer. *Endocrine Reviews*, *26* 361-379.
- Lacoste D.,Caron S.,Bélanger A.; Labrie F., 1989a: Effect of 3-week treatment with [D-Trp6,des-Gly-NH10(2)]LHRH ethylamide, aminoglutethimide, ketoconazole or flutamide alone or in combination on testicular, serum, adrenal and prostatic steroid levels in the dog. *J Steroid Biochem*, *33* 233-241.
- Lacoste D.,Dubé D.,Bélanger A.,Trudel C.; Labrie F., 1989b: Normal gonadal function after 23 months of treatment of prepubertal male and female dogs with the GnRH agonist [D-Trp, des-Gly-NH]GnRH ethylamide. *J Androl.*, *10* 456-465.
- Lacoste D.,Labrie F.,Dubé D.,Bélanger A.,Tice T.,Gilley R.; Pledger K., 1989c: Reversible inhibition of testicular androgen secretion by 3-, 5- and 6-month controlled-release microsphere formulations of the LH-RH agonist [D-Trp6, des-Gly-NH10(2)]LH-RH ethylamide in the dog. *J Steroid Biochem*, *33* 1007-1011.
- Lacoste D.,St-Arnaud R.,Bélanger A.; Labrie F., 1988a: A pure antiandrogen does not interfere with the LHRH agonist-induced blockade of testicular androgen secretion in the dog. *Mol Cell Endocrinol.*, *56* 141-147.
- Lacoste D.,St-Arnaud R.,Caron S.,Bélanger A.; Labrie F., 1988b: The rise in testicular androgens during the first days if treatment with an LHRH agonist in the dog can be blocked by aminoglutethimide or ketoconazole. *J Steroid Biochem*, *31* 963-970.
- Lahlou N.,Carel J.,Chaussain J.; Roger M., 2000: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of GnRH agonists: clinical implications in pediatrics. *J Pediatr Endocrinol Metab.*, *13* 723-737.
- Lalloz M.,Detta A.; Clayton R., 1988: Gonadotropin-releasing hormone desensitization preferentially inhibits expression of the luteinizing hormone  $\alpha$ -subunit gene *in vivo*. *Endocrinology.*, *122* 1689-1694.
- Lanna L.,Marques J. A.; Douglas R., 2010: Effect of deslorelin on the induction of estrus in anestrus bitches. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, *62* 615-621.
- Lerrant Y.,Kottler M.,Bergametti F.,Moumni M.,Blumberg-Tick J.; Counis R., 1995: Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitization in a manner similar to that of gonadotropin  $\alpha$ - subunit genes in normal and castrated rat pituitary. *Endocrinology.*, *136* 2803-2808.
- Levy X.,Fontaine E.,Grellet A.,Segalini V.; Fontbonne A., 2009: Planned Caesarean-sections in the bitch using aglepristone before the parturition drop of progesterone: a new approach. *Reprod. Dom. Ani.*, *44* 182-184.
- Limonta P.,Montagnani Marelli M.; Moretti R., 2001: LHRH analogues as anticancer agents: pituitary and extrapituitary sites of action. *Expert Opin Investig Drug Saf*, *10* 709-720.
- Linde-Forsberg C.,Ström Holst B.; Forsberg M., 2008: Daily Progesterone Fluctuations During the Estrous Cycle in the Bitch. Proceedings of the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biannual European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress. Vienna, Austria, [www.ivis.org](http://www.ivis.org).
- Line S.; Voith V., 1986: Dominance aggression of dogs towards people: behavior profile and response to treatment. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, *16* 77-83.
- Lloyd D.; Cerundolo R., 2001: Alopecia X in dogs. *Vet Rec.*, *148* 60.
- Maheshwari A.,Gibreel A.,Siristatidis C.; Bhattacharya S., 2011: Gonadotrophin-releasing hormone agonist protocols for pituitary suppression in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*, *10* CD006919.
- Marseloo N.,Fontbonne A.,Bassu G.,Riviere S.,Leblanc B.,Rault D.,Biourge V.; Chastant-Maillard M., 2004: Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the

- determination of the time of ovulation in bitches. 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, Brazil, pp75-7.
- McRae G., Roberts B., Worden A., Bajka A.; Vickery B., 1985: Long term reversible suppression of oestrus in bitches with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J Reprod Fertil.*, *74* 389-397.
- Meyers-Wallen V., 2007: Unusual and abnormal canine estrous cycles. *Theriogenology*, *68* 1205-1210.
- Mieda M., Ohta Y., Saito T., H T., Shimazawa E.; Miyasaka K., 1994: Antiandrogenic activity and endocrinological profile of a novel antiandrogen, TZP-4238, in the rat. *Endocr J.*, *41* 445-452.
- Mir F.**, Billault C., Fontaine E., J. S.; Fontbonne A., 2011: Estimated pregnancy length from ovulation to parturition in the bitch and its influencing factors: a retrospective study in 162 pregnancies. *Reprod Domest Anim.*, *46* 994-998.
- Munson L., 2006: Contraception in felids. *Theriogenology*, *66* 126-134.
- Munson L., Bauman J., Asa C., Jochle W.; Trigg T., 2001: Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. *J Reprod Fertil.*, *Suppl 57* 269-273.
- Noakes D., Parkinson T., England G.; Arthur G., 2009: *Veterinary reproduction and obstetrics.* WB Saunders, 960p, Philadelphia.
- O'Farrell V.; Peachy E., 1990: Behavioural effects of ovariohysterectomy on bitches. *J. Small Anim. Pract.*, *31* 595-598.
- Olson P., Husted P., Allen T.; Nett T., 1984: Reproductive endocrinology and physiology of the bitch and queen. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, *14* 927-946.
- Olson P., Kustritz M.; Johnston S., 2011: Early-age neutering of dogs and cats in the United States (a review). *J Reprod Fertil Suppl.*, *57* 223-232.
- Orfanou D., Ververidis H., Pourlis A., Fragkou I., Kokoli A., Boscos C., Taitzoglou I., Tzora A., Nerou C., Athanasiou L.; Fthenakis G., 2009: Post-partum involution of the canine uterus - gross anatomical and histological features. *Reprod Domest Anim*, *44* 152-155.
- Padula A., 2005: GnRH analogues- agonists and antagonists. *Anim. Reprod. Sci.*, *88* 115-126.
- Padula A.; MacMillan K., 2005: Reproductive performance of early postpartum Holstein cows where oestrus was synchronised following chronic GnRH agonist treatment. *Aust Vet J.*, *83* 163-167.
- Pagnini U., Florio S., Crispino L., Pagnini G., Colangelo D., Rocco D., Pacilio C., Pacilio M., Macaluso M.; Giordano A., 2002: Direct effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist on the growth of canine mammary tumour cells. *J. Cell. Bioch.*, *85* 470-481.
- Palm J.; Reichler I., 2010: Effectiveness of deslorelin acetate for the suppression of heat in the bitch. 7th EVSSAR Congress Louvain La Neuve, Belgium, 14th-15th May, p87.
- Perez V.; Sutton D., 1993: Recent investigations of the efficacy and safety of proligestone for the prevention of oestrus and pseudopregnancy in bitches. *J Reprod Fertil Suppl*, *47*.
- Perez Alenza M., Peña L., del Castillo N.; Nieto A., 2000: Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J. Small Anim. Pract.*, *41* 287-291.
- Phemister R., Holst P., Spano J.; Hopwood M., 1973: Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol Reprod*, *8* 74-82.
- Philibert J., Snyder P., Glickman N., Glickman L., Knapp D.; Waters D., 2003: Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. *J Vet Int Med*, *17* 102-106.
- Ponglowhapan S., Church D.; Khalid M., 2008: Differences in the proportion of collagen and muscle in the canine lower urinary tract with regard to gonadal status and gender. *Theriogenology*, *70* 1516-1524.
- Ponglowhapan S., Church D., Scaramuzzi R.; Khalid M., 2007: Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone receptors and their transcribed genes (mRNA) are present in the lower urinary tract of intact male and female dogs. *Theriogenology*, *67* 353-366.
- Ponglowhapan S., Lohachit C., Swangchan-uthai T.; Trigg T., 2002: The effect of the GnRH agonist deslorelin on prostatic volume in dogs. 3rd EVSSAR European Congress. Liege, Belgium, May 2002, p150.

- Prohaczik A.,Rubion S.,Miller L.,Fagerstone K.; Driancourt M., 2008: Novel non steroidal long term contraceptive approaches for queens. 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Vienna, Austria, 9th-11th July, p184-186.
- Reichler I., 2010: Benchmarking Surgical Sterilization 4th International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods of Pet Population Control. Dallas, Texas, pp 60-8.
- Reichler I.,Hubler M.,Jochle W.,Trigg T.,Piché C.; Arnold S., 2003: The effect of GnRH analogs on urinary incontinence after ablation of the ovaries in dogs. *Theriogenology*, *60* 1207-1216.
- Reichler I.,Hung E.,Jochle W.,Piché C.,Roos M.,Hubler M.; Arnold S., 2005: FSH and LH plasma levels in bitches with differences in risk for urinary incontinence. *Theriogenology*, *63* 2164-2180.
- Reichler I.,Jochle W.,Piché C.,Roos M.; Arnold S., 2006: Effect of a long acting GnRH analogue or placebo on plasma LH/FSH, urethral pressure profiles and clinical signs of urinary incontinence due to sphincter mechanism incompetence in bitches. *Theriogenology*, *66* 1227-1236.
- Reichler I.,Welle M.,Eckrich C.,Sattler U.,Barth A.,Hubler M.,Nett-Mettler C.,Jochle W.; Arnold S., 2008: Spaying-induced coat changes: the rôle of gonadotropins, GnRH and GnRH treatment on the hair cycle of female dogs. *Vet Dermatol*, *19* 77-87.
- Rodin D.,Lalloz M.; Clayton R., 1988: Gonadotropin-releasing hormone regulates follicle-stimulating hormone  $\alpha$ -subunit gene expression in the male rat. *Endocrinology*, *125* 1282-1289.
- Romagnoli S., 2006: Deslorelin in small animal andrology. 5th Biannual congress, European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR). Budapest, Hungary, 7-9 April, p204-207.
- Romagnoli S., 2007: Diagnostic work-up and medical therapy of canine prostatic diseases. ESAVS Reproduction II, Zurich, Switzerland, 10-14th September 2007.
- Romagnoli S.,Nassuato C.,Stelletta C.,Mollo A.,Gelli D.; Lorenzon A., 2005: Serum testosterone concentrations and scrotal diameter in male dogs treated with deslorelin implants. FECAVA-Voorjaarsdagen: International Congress, Amsterdam 15-17 April 2005: EVSSAR Precongress Day, April 14,p27-28. Amsterdam, NTH.
- Romagnoli S.,Stelletta C.,Milani C.,Gelli D.,Falomo M.; Mollo A., 2009: Clinical use of deslorelin for the control of reproduction in the bitch. *Reprod Dom Anim*, *44* 36-39.
- Rosato F.; Garofalo P., 2002 [Hyperprolactinemia: from diagnosis to treatment]. *Minerva Pediatr*, *54* 547-552.
- Rota A.,Mollo A.,Marinelli L.,Gabai G.; Vincenti L., 2003: Evaluation of cabergoline and buserelin efficacy for oestrous induction in the bitch. *Reprod Domest Anim*, *38* 440-443.
- Rubion S.,Desmoulins P.,Rivière-Godet E.,Kinziger M.,Salavert F.,Rutten F.,Flochay-Sigognault A.; Driancourt M., 2006: Treatment with a subcutaneous GnRH agonist containing controlled release device reversibly prevents puberty in bitches. *Theriogenology*.
- Samper J., 2008: Induction of estrus and ovulation: why some mares respond and others do not. *Theriogenology*, *70* 445-447.
- Schally A.,Arimura A.,Kastin A.,Matuso H.,Baba Y.,Redding T.,Nair R.; Debeljuk L., 1971: Gonadotrophin releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle stimulating hormones. *Science*, *67* 2730-2734.
- Shahani S.,Braga-Basaria M.; Basaria S., 2008: Androgen deprivation therapy in prostate cancer and metabolic risk for atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.*, *93* 2042-2049.
- Shille V.,Thatcher M.; Simmons K., 1984: Efforts to induce estrus in the bitch, using pituitary gonadotropins. *J Am Vet Med Assoc*, *184* 1469-1473.
- Singh V., 1985: Active immunization of female dogs against Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) and its effects on ovarian steroids and estrus suppression. *Indian J Expl Biol*, *23* 667-672.
- Smith J., 2008: Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis and treatment. *Theriogenology*, *70* 375-383.
- Smith M., 2004: Osteoporosis and obesity in men receiving hormone therapy for prostate cancer. *J Urol.*, *172* S52-56; discussion S56-57.

- Smith M., 2006: Treatment-related osteoporosis in men with prostate cancer. *Clin Cancer Res*, *12* 6315s-6319s.
- Sokolowski J.; Zimbelman R., 1974: Canine reproduction: effects of multiple treatments of medroxyprogesterone acetate on reproductive organs of the bitch. *Am J Vet Res*, *35* 1285-1287.
- Sontas B., Kaygısız F., Senünver A.; Ekici H., 2009: Control of reproduction in small animals: a survey of veterinarians' practices and beliefs. 6th EVSSAR Annual Symposium. Wrocław, Poland, pp76.
- Sontas H., Gelli D., Milani C., Mollo A.; Romagnoli S., 2007: Treatment of vaginal hyperplasia with GnRH and megestrol acetate in a Tosa Inu bitch. 5th Annual Symposium of EVSSAR. Estoril, Portugal, 1st-3rd June, p107.
- Spattini G., Borghi V., Thuróczy J., Balogh L., Scaramuzzi R.; De Rensis F., 2007: Follicular development and plasma concentrations of LH and prolactin in anestrus female dogs treated with the dopamine agonist cabergoline. *Theriogenology*, *68* 826-833.
- Spicer D.; Pike M., 2000: Future possibilities in the prevention of breast cancer: luteinizing hormone releasing hormone agonists. *Breast Cancer Res.*, *2* 264-267.
- Spitz I., Shoupe D., Sitruk-Ware R.; Mishell D. J., 1989: Response to the antiprogesterone RU 486 (mifepristone) during early pregnancy and the menstrual cycle in women. *J Reprod Fertil Suppl.*, *37* 253-260.
- Squires E., McCue P.; Vanderwall D., 1999: The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, *51* 91-104.
- Surrey E., 2010: Gonadotropin-releasing hormone agonist and add-back therapy: what do the data show? *Curr Opin Obstet Gynecol.*, *22* 283-288.
- Tarlatzis B.; Bili H., 2004: Safety on GnRH agonists and antagonists. *Expert Opin Drug Saf*, *3* 39-46.
- Tay C., 2002: Use of gonadotrophin-releasing hormone agonists to trigger ovulation. *Hum Fertil (Camb)*. *5* G35-37; discussion G38-39, G41-48.
- Thackray V., Mellon P.; Coss D., 2010: Hormones in Synergy: Regulation of the Pituitary Gonadotropin Genes. *Mol Cell Endocrinol.*, *314* 1-24.
- Thun R., Watson P.; Jackson G., 1977: Induction of estrus and ovulation in the bitch, using exogenous gonadotropins. *Am J Vet Med*, *38* 483-486.
- Toydemir T., Kiliçarslan M.; Olgaç V., 2008: The effect of GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats. 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Vienna, Austria, 9th-11th July, p262-263.
- Trasch K., Wehrend A.; Bostedt H., 2003: Follow-up examinations of bitches after conservative treatment of pyometra with the antigestagen aglepristone. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, *50* 375-379.
- Tremblay Y.; Belanger A., 1984: Reversible inhibition of gonadal functions by a potent gonadotrophin-releasing hormone agonist in adult dog. *Contraception*, *30* 483-497.
- Tremblay Y., Belanger A., Labrie F., Frenette G., Dubé J.; Tremblay R., 1984: Characteristics of the inhibitory effect of chronic treatment with an LHRH agonist on testicular steroidogenesis in the dog. *Prostate*, *5* 631-638.
- Trigg T., Doyle A., Walsh J.; Swangchan-uthai T., 2006: A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology*, *66* 1507-1512.
- Trigg T., Wright P., Armour A., Williamson P., Junaidi A., Martin G., Doyle A.; Walsh J., 2001: Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J Reprod Fertil., Suppl* *57* 255-261.
- Trigg T.; Yeates K., 2008: The development and use of deslorelin implants to suppress fertility- a synopsis and further advances. 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Vienna, Austria, 9th-11th July, p265-266.
- Van Haaften B., Bevers M., Van den Brom W., Okkens A., Van Sluijs F., Willemsse A.; Dieleman S., 1994: Increasing sensitivity of the pituitary to GnRH from early to late anoestrus in the beagle bitch. *J Reprod Fertil*, *101* 221-225.

- van Os J., van Laar P., Oldenkamp E.; Verschoor J., 1981: Oestrus control and the incidence of mammary nodules in bitches, a clinical study with two progestogens. *Vet Q*, 3 46-56.
- van Wagtendonk-de Leeuw A., 2006: Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, 65 914-925.
- Vanderlip S., Wing A., Felt P., Linkie D., Rivier J., Concannon P.; Lasley B., 1987: Ovulation induction in anoestrous bitches by pulsatile administration of gonadotrophin-releasing hormone. *Lab. Anim. Sci.*, 37 459-464.
- Verstegen J., Onclin K., Silva L.; Concannon P., 1999: Effect of stage of anestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist cabergoline in dogs. *Theriogenology*, 51 597-611.
- Vickery B., McRae G.; Bonasch H., 1982: Effect of chronic administration of a highly potent LHRH agonist on prostate size and secretory function in geriatric dogs. *Prostate*, 3 123-130.
- Vickery B., McRae G., Briones W., Roberts B., Worden A., Schanbacher B.; Falvo R., 1985: Dose-response studies on male reproductive parameters in dogs with nafarelin acetate, a potent LHRH agonist. *J. Androl.*, 6 53-60.
- Vickery B., McRae G., Briones W., Worden A., Seidenberg R., Schanbacher B.; Falvo R., 1984: Effects of an LHRH agonist analog upon sexual function in male dogs. Suppression, reversibility and effect of testosterone replacement. *J. Androl.*, 5 28-42.
- Volkman D., Kutzler M., Wheeler R.; Krekeler N., 2006a: The use of deslorelin implants for the synchronization of estrous in diestrous bitches. *Theriogenology*, 66 1497-1501.
- Volkman D., Kutzler M., Wheeler R., Krekeler N., Klewitz J.; Lamb S., 2006b: Failure of hCG to support luteal function in bitches after estrus induction using deslorelin implants. *Theriogenology*, 66 1502-1506.
- Walter B., Otzdorff C., Brugger N.; Braun J., 2011: Estrus induction in Beagle bitches with the GnRH-Agonist implant containing 4.7 mg Deslorelin. *Theriogenology*, [Epub ahead of print].
- Wanke M., Loza M.; Rebuelto M., 2006: Progestin treatment for infertility in bitches with short interestrus interval. *Theriogenology*, 66 1579-1582.
- Warnock J., Bundren J.; Morris D., 1998: Depressive symptoms associated with gonadotropin-releasing hormone agonists. *Depress Anxiety*, 7 171-177.
- Welle M., Reichler I., Barth A., Forster U., Sattler U.; Arnold S., 2006: Immunohistochemical localization and quantitative assessment of GnRH-, FSH- and LH- receptor mRNA expression in canine skin: a powerful tool to study the pathogenesis of side effects after spaying. *Histochem Cell Biol.*, 126 527-535.
- Williams M., Hernandez J.; Thompson I., 2005: Luteinizing hormone-releasing hormone agonist effects on skeletal muscle: how hormonal therapy in prostate cancer affects muscular strength. *J Urol*, 173 1067-1071.
- Withers A.; Whitney J., 1967: The response of the bitch to treatment with medroxyprogesterone acetate. *J Small Anim Pract*, 8 265-271.
- Wright P., 1980: The induction of oestrus and ovulation in the bitch using pregnant mare serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin. *Aust Vet J.*, 56 137-140.
- Wright P., 1991: Practical aspects of the estimation of the time of ovulation and of insemination in the bitch. *Aust Vet J*, 68 10-13.
- Wright P., Verstegen J., Onclin K., Jochle W., Armour A., Martin G.; Trigg T., 2001: Suppression of the oestrous responses of bitches to the GnRH analogue deslorelin by progestin. *J Reprod Fertil.*, 263-268.
- Yanovski J., Rose S., Municchi G., Pescovitz O., Hill S., Cassoria F.; Cutler G. J., 2003: Treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone agonist in adolescents with short stature. *N Eng J Med*, 348.
- Yasukawa K., Sawamura D., Sugawara H.; Kato N., 2005: Leuprorelin acetate granulomas: case reports and review of the literature. *Br J Dermatol.*, 152 1045-1047.
- Zöldág L F. S., Csáky I, Bersényi A, 2001: Fertile estrus induced in bitches by bromocryptine, a dopamine agonist: a clinical trial. *Theriogenology*, 55 1657-1666.

