

Effets de la castration et de l'immunocastration sur l'axe corticotrope et le système immunitaire des porcs

Caroline LECLERCQ (1,2), Elodie MERLOT (1,2), Françoise THOMAS (1,2), Raphael COMTE (1,2), Armelle PRUNIER (1,2)

(1) INRA, UMR1079, SENAH, 35590 Saint-Gilles, France

(2) Agrocampus Rennes, UMR1079, SENAH, 35000 Rennes, France

caroline.leclercq@rennes.inra.fr

Effets de la castration et de l'immunocastration sur l'axe corticotrope et le système immunitaire des porcs

La castration chirurgicale des porcs est controversée pour des raisons de bien-être animal. Il est donc nécessaire d'étudier les alternatives potentielles comme la production de mâles entiers ou immunocastrés, et de vérifier que ces alternatives ne soulèvent pas de nouveaux problèmes de santé ou de bien-être animal.

Cette étude a été réalisée afin de comprendre les effets des hormones testiculaires sur l'immunité et la réactivité au stress des porcs. Elle se déroule sur 65 animaux répartis en 4 groupes expérimentaux : entiers, castrés chirurgicalement (à 5/6 jours d'âge), vaccinés contre la GnRH (immunocastrés), et castrés puis immunocastrés. Des prises de sang à 3, 4 et 5 mois permettent de valider l'effet des traitements sur les niveaux circulants de stéroïdes sexuels et d'étudier les populations lymphocytaires. Le cortisol est dosé dans la salive pour mesurer l'activité de l'axe corticotrope et la réactivité au stress. Les animaux sont abattus à 5 mois pour déterminer le développement des testicules, des surrénales et du thymus.

Les résultats montrent que l'immunocastration induit une augmentation des concentrations salivaires de cortisol 24 jours après la première injection. La castration chirurgicale semble aussi accroître l'activité surrénalienne.

La castration chirurgicale inhiberait partiellement le fonctionnement thymique des porcs (poids du thymus réduit à 5 mois, diminution du nombre de lymphocytes totaux et altération des pourcentages des différentes sous-populations lymphocytaires sanguines à 4 mois et thymiques au stade d'abattage) alors que les effets de l'immunocastration sont moins clairs.

Les conséquences potentielles de ces modifications sur la santé globale des animaux restent à déterminer.

Effects of castration and immunization against GnRH on the immune system and the adrenocortical axis in pigs

Surgical castration is criticized for welfare reasons. Thus it is necessary to evaluate alternative ways of rearing male pigs such as rearing entire males or immunocastrated animals, and to check that these new production methods do not induce other problems regarding health or welfare.

This study aimed at understanding the effects of testicular hormones on immunity and stress reactivity in pigs. A total of 65 animals were allocated to 4 experimental groups: entire, castrated at 5/6 days of age, immunized against GnRH or castrated then immunized against GnRH. Blood samples were drawn at 3, 4 and 5 months of age to measure sex steroid levels and to analyze populations of lymphocytes. Cortisol was measured in saliva and plasma to evaluate adrenal activity. Pigs were slaughtered at 5 months of age to determine weight of testes, adrenals and thymus.

Results showed higher salivary cortisol in vaccinated males, 24 days after the first injection. Surgical castration also seemed to increase adrenal activity.

Surgical castration seemed to decrease thymic development in pigs (reduced thymic weight at 5 months, decrease in the number of lymphocytes and modifications of sub population percentages in blood at 4 months and in thymus at slaughter).

The effects of immunization against GnRH are less clear. Potential consequences of these changes on global health should be evaluated.

INTRODUCTION

Dans les élevages français, le recours à la castration chirurgicale est systématique pour prévenir les odeurs sexuelles déplaisantes aux consommateurs. Toutefois, la castration chirurgicale pratiquée sans anesthésie dans la première semaine de vie du porc mâle est activement remise en cause pour des raisons de bien-être animal. Il est donc nécessaire de considérer différentes alternatives telles que l'élevage de mâles entiers ou encore de mâles immunocastrés. L'immunocastration est une vaccination dirigée contre la GnRH visant à supprimer la sécrétion des hormones sexuelles. Si l'efficacité de l'immunocastration sur les odeurs sexuelles de la viande de verrat a été démontrée (Dunshea *et al.*, 2001), les conséquences de cette pratique nouvelle en termes de bien-être et de santé animale sont encore méconnues.

Les hormones sexuelles sont en interactions étroites avec le système immunitaire et l'axe corticotrope. Plusieurs études chez l'homme et les rongeurs ont montré que la production et la prolifération des lymphocytes thymiques (Windmill *et al.*, 1993) ainsi que la régulation de l'axe corticotrope (Gaillard et Spinedi, 1998) présentent un réel dimorphisme sexuel. Par exemple, Frank *et al.* (2005) montrent que chez le rat, les femelles ont une prévalence plus forte des maladies auto-immunes ainsi qu'un taux d'immunoglobulines plus élevé que les mâles. Gaillard et Spinedi (1998) affirment que la réponse en corticostérone à l'ACTH est plus importante et plus longue chez les rats femelles que les rats mâles. Ces effets sont similaires chez l'homme ; toutefois peu de données existent chez le porc. Cet article propose donc de comparer différents groupes de porcs mâles, entiers, castrés chirurgicalement et immunocastrés, afin de caractériser les effets de la suppression des hormones testiculaires peu après la naissance (castration chirurgicale) ou à la puberté (immunocastration par vaccination contre la GnRH) sur le développement du thymus et la production de lymphocytes thymiques ainsi que sur l'activité de l'axe corticotrope.

De plus un groupe de porcs castrés puis vaccinés contre la GnRH a été ajouté pour évaluer les effets directs potentiels de la GnRH indépendamment des hormones testiculaires.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1.1. Animaux et procédures expérimentales

Des porcs mâles entiers vaccinés (Cast-/GnRHv+, n = 18) ou non (Cast-/GnRHv-, n = 18) contre la GnRH ainsi que des porcs mâles castrés dans le jeune âge puis vaccinés (Cast+/GnRHv+, n = 15) ou non (Cast+/GnRHv-, n = 14) contre la GnRH ont été élevés dans l'élevage expérimental de l'UMR SENAH, en quatre répétitions successives.

Les animaux sont issus de truies Large-White x Landrace, inséminées avec de la semence de verrats Piétrain. A l'entrée en engraissement, soit vers 70 jours d'âge, les animaux ont été logés en groupes de 2 ou 3 porcs de même traitement. Les porcs ont reçu *ad libitum* un aliment standard de «croissance» (de 35 à 70 kg de poids vif, PV) puis de «finition» (de 70 kg PV à l'abattage). L'accès à l'eau était non limité.

Les porcs des groupes Cast+ ont été castrés chirurgicalement à 5-6 jours d'âge, en suivant la procédure d'usage en élevage porcin. La primo injection et le rappel du vaccin Improvac® (Pfizer, Belgique) pour les porcs Cast-/GnRHv+ et Cast+/GnRHv+ ont eu lieu à 87-90 jours et 115-118 jours d'âge.

Les animaux ont également été immunisés contre la grippe porcine en recevant une primo injection et un rappel du vaccin Gripovac (Merial, France) à 129-132 et 143-146 jours d'âge. A 151-154 jours d'âge (soit à 112 ± 1 kg de poids vif), les porcs ont été transférés à l'abattoir et abattus le lendemain.

1.2. Prélèvements et mesures

Des prélèvements de sang ont été réalisés avant chaque injection du vaccin d'immunocastration (à 87-90, 115-118 jours d'âge) et avant le transfert à l'abattoir (à 151-154 jours d'âge) par ponction dans la veine jugulaire dans des tubes Vacutainers® contenant différents anti-coagulants (EDTA pour les dosages hormonaux et les numérations sanguines, héparine pour la cytométrie et la prolifération lymphocytaire). Des prélèvements de salive ont été réalisés entre les deux vaccins anti-GnRH à 109-114 jours d'âge et après le rappel à 146-149 jours d'âge pour déterminer les variations nyctémérales de la concentration en cortisol salivaire (9h (1) le premier jour, 11h, 17h, 23h puis 5h et 9h (2) le lendemain) et le jour du transfert à l'abattoir (avant transfert vers 13h puis 1h et 3h après transfert).

A l'abattage, le poids vif, le thymus, la rate, le foie, les surrénales et les testicules ont été pesés, et des échantillons de tissus ont été collectés pour des analyses ultérieures.

1.3. Dosages hormonaux et numération sanguine

Le cortisol plasmatique a été mesuré par dosage radio immunologique à l'iode 125 (Immunotech, Prague, République Tchèque) dans le plasma, et par immuno-luminescence (IBL, Hamburg, Germany) dans la salive. L'ACTH a été dosée par ELISA dans le plasma (BIOMERICA, California, USA). La testostérone a été quantifiée par l'automate AIA 360 (TOSOH) selon un immunodosage enzymatique de type compétitif dans le plasma. Les formules sanguines ont été déterminées avec un hématomètre MS-9 (Melet Schloesing, Osny, France).

1.4. Analyses cytométriques

Les cellules mononuclées sanguines ont été isolées sur gradient de ficoll (Sigma-Aldrich). Les cellules thymiques ont été isolées par broyage mécanique du tissu. Après lavage et lyse des érythrocytes, les cellules sont comptées et leur viabilité estimée par un automate (Vi-cell, Beckman Coulter). Les anticorps dirigés contre les marqueurs de surface CD1, CD3, CD4 et CD8 (SouthernBiotech, Birmingham, Alabama) étaient directement couplés à un fluorochrome (Fluorescein, R-phycoerythrinConjugate ou Spectral RedConjugate). L'anticorps dirigé contre le récepteur TCR $\gamma\delta$ (VMRD, Pullman, WA) a été utilisé avec un anticorps secondaire couplé à de l'Alexa Fluor-APC (Life Technologies, Villebon sur Yvette, France). Les marquages directs (le triple marquage CD3 -, CD4 -, CD8 sur cellules sanguines et thymocytes, et le marquage simple CD1 sur thymocytes) ont été réalisés à partir de 0.5 millions de cellules. Le marquage indirect (marquage TCR- $\gamma\delta$) a été réalisé à partir d'un million de cellules. Les marquages ont été réalisés à 4°C avec des incubations de 30 minutes. Les contrôles isotypiques de l'ensemble de ces marquages ont été réalisés en incubant les cellules de la même façon que pour les marquages décrits ci-dessus en remplaçant les anticorps par leurs contrôles isotypiques, utilisés aux concentrations recommandées par le fournisseur. Les cellules ont été ensuite re-suspendues dans 200 μ L de PBS, et transférées dans des

tubes Facs pour leur lecture au cytomètre (MacsQuant Analyser, MiltenyiBiotec, BergischGladbach, Germany). Les résultats ont été analysés avec le logiciel MACS Quantify de MiltenyiBiotec.

1.5. Dosage des lipides dans le thymus : méthode de Floch

Les dosages ont été réalisés sur glace en triplets sur des échantillons de thymus d'environ 2-3 g, dans des tubes de 30 ml. Après éminçage, les échantillons ont été broyés trois fois 15 s à 20 000 tours par minute, au *Polytron*, en ajoutant à chaque broyage 5 ml du mélange de *Folch* (2 volumes de chloroforme pour 1 volume de méthanol). Après ajout de NaCl (0,1 N, 3 ml/échantillon), agitation et décantation, les échantillons ont été centrifugés à 4°C pendant 15 min à 4200 g. La phase organique a été récupérée. Le reste de la phase aqueuse, rincé avec 10 ml du mélange de *Folch*, est à nouveau centrifugé afin de récupérer toute la phase organique contenant les lipides. Après évaporation à 60°C sous air comprimé, la masse de lipides a été mesurée par la différence de poids du ballon avant et après dosage.

1.6. Statistiques

Les mesures de testostérone à 5 mois et du poids des testicules à l'abattage ont montré que la vaccination contre la GnRH n'a pas permis d'inhibition de la fonction testiculaire chez deux mâles entiers. Ces animaux ont donc été retirés des analyses statistiques à 5 mois.

Les données ont été analysées par analyse de variance (ANOVA), en utilisant la procédure MIXED du logiciel SAS (SASInst. Inc., Cary, NC). Certaines variables ont subi une transformation logarithmique (cortisol salivaire, testostérone, ACTH, lipides, leucocytes), racine carrée (cortisol plasmatique, lymphocytes, granulocytes) ou encore arc sinus de la racine du pourcentage (ensemble des variables de cytométrie) pour obtenir une distribution normale.

Pour analyser les effets des traitements sur toutes les variables, les données ont été analysées séparément pour chaque stade. Le modèle utilisé incluait les facteurs « castration », « vaccination anti-GnRH », « répétition » et l'interaction « castration x vaccination anti-GnRH ». Le facteur « répétition » a été déclaré comme un facteur aléatoire. Pour le cortisol salivaire, un modèle en mesures répétées a été utilisé en indiquant l'individu comme unité répétée et en ajoutant les effets de l'heure de prélèvement et les interactions temps x castration, temps x vaccination anti-GnRH, et temps x castration x vaccination anti-GnRH. Le seuil de significativité a été fixé à 5% pour les facteurs principaux. Lorsque la significativité d'une interaction était inférieure à 10%, les comparaisons deux à deux entre les groupes expérimentaux ont été réalisées avec le test de *Bonferroni* (seuil de significativité à 5%). Dans le texte, les tableaux et les figures, les valeurs représentées sont les moyennes ajustées par le modèle statistique ainsi que les valeurs maximales des erreurs standards calculées par le modèle statistique.

2. RESULTATS

2.1. Poids vif et développement sexuel

Le poids vif des animaux à l'abattage est plus élevé chez les animaux Cast- que chez les animaux Cast+ (Tableau 1, $P < 0,01$).

Les concentrations de testostérone sont très faibles ($< 0,6$ ng/ml) chez les porcs Cast+ pendant toute la durée de l'expérience (Figure 1). Parmi les porcs Cast-, les concentrations de testostérone sont similaires dans les deux groupes à 3 et 4 mois d'âge ($P > 0,1$) mais sont inférieures chez les porcs Cast-/GnRHv+ en comparaison des Cast-/GnRHv- à 5 mois d'âge ($P < 0,001$). A l'abattage, une régression du poids des testicules est observée chez les animaux Cast-/GnRHv+ par rapport aux Cast-/GnRHv- (Tableau 1, $P < 0,0001$).

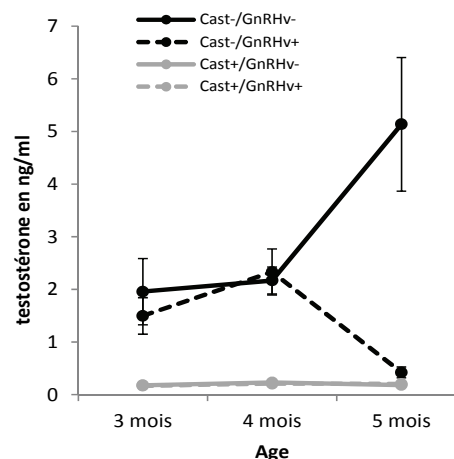


Figure1 - Taux de testostérone plasmatique en fonction de l'âge

2.2. Axe corticotrope

2.2.1. Développement des surrénales

A l'abattage, le poids des surrénales (relatif ou non) est affecté par l'interaction entre castration et vaccination anti-GnRH (respectivement à $P < 0,1$ et $P < 0,05$).

Tableau 1 - Poids vif (kg) et poids relatif des organes exprimés par rapport au poids vif (g/kg) au stade d'abattage.

	Cast-		Cast+		Statistiques ¹	
	GnRHv-	GnRHv+	GnRHv-	GnRHv+	e.s.	P
Poids vif	112	116	106	107	3	C : 0,01
Thymus	4,65	4,18	3,92	4,11	0,21	C : 0,05
Testicules	4,49	1,52	-	-	0,20	V : 0,001
Rate	1,50	1,30	1,43	1,35	0,05	V : 0,01
Foie	17,9	19,9 ^b	17,7 ^a	17,5 ^a	0,4	CxV : 0,05
Surrénales	0,040 ^a	0,042 ^a	0,050 ^b	0,045 ^{ab}	0,002	CxV : 0,06

¹e.s. : maximum de l'erreur standard. a,b : les moyennes suivies de lettres différentes diffèrent à $P < 0,05$. C, V, CxV : effets castration, vaccination et interactions castration x vaccination respectivement.

En effet, le poids relatif des surrénales des porcs Cast+/GnRHv- est supérieur à celui des Cast-/GnRHv- ($P < 0,001$), Cast-/GnRHv+ ($P < 0,01$; Tableau 1) et Cast+/GnRHv+ (en tendance seulement).

2.2.2. Cortisol salivaire

A 4 mois d'âge, les interactions castration x vaccination anti-GnRH ($P < 0,05$) et immunocastration x heure ($P = 0,09$) sont significatives. L'analyse traitement par traitement révèle un effet significatif de l'heure chez les animaux GnRHv- (Cast- : $P < 0,001$; Cast+ : $P < 0,05$) mais pas chez les GnRHv+ (Figure 2). L'analyse heure par heure révèle que les animaux GnRHv+ ont des concentrations significativement plus élevées que les GnRHv- à 23h ($P < 0,001$).

A 5 mois d'âge, l'effet de l'heure ($P < 0,001$) est significatif. En effet, le rythme nyctéméral est souligné par un minimum à 23h suivi d'un maximum atteint à 5h du matin. L'effet de l'interaction castration x vaccination anti-GnRH ($P < 0,001$) est également significatif. Ainsi, les porcs Cast-/GnRHv+ ont des concentrations plus élevées que les animaux Cast+/GnRHv+ ($P < 0,05$) et Cast-/GnRHv- ($P < 0,001$).

Par ailleurs, les porcs Cast+/GnRHv- ont des concentrations supérieures à celles des porcs Cast-/GnRHv- ($P < 0,05$).

A l'abattage, l'effet de l'heure est significatif ($P < 0,05$). Les concentrations en cortisol augmentent une heure après le transfert à l'abattoir indépendamment du traitement expérimental. De plus, les animaux GnRHv+ ont tendance à avoir des concentrations en cortisol salivaire plus élevées que les porcs GnRHv- ($P = 0,09$).

2.2.3. Cortisol et ACTH plasmatiques

Les concentrations de cortisol plasmatique tendent à être plus élevées chez les animaux Cast+ par rapport aux Cast- à 4 mois d'âge ($P = 0,07$, données non présentées). Aucun effet des traitements n'est observé à 3 et 5 mois.

Les concentrations en ACTH sont plus élevées chez les porcs Cast+ que Cast- à 5 mois ($P < 0,05$) mais aucune différence significative n'est observée avant.

Tableau 2 - Compositions lipidique et cellulaire du thymus exprimées respectivement en g pour 100 g de tissus et en % de thymocytes

	Cast-		Cast+		Statistiques ¹	
	GnRHv-	GnRHv+	GnRHv-	GnRHv+	e.s.	P
Lipides	2,0	2,5	3,0	3,1	0,3	C : 0,01
CD1 ⁺	57	61	53	51	4	C : 0,05
CD4 ⁺ CD8 ⁺	45	47	43	41	3	
CD4 ⁺ CD8 ⁻	16	15	17	19	1	C : 0,06
CD4 ⁻ CD8 ⁺	10	10	9	9	1	
TCR $\gamma\delta$	15	16	12	17	2	V : 0,05

¹e.s. : maximum de l'erreur standard ; C, V : effets castration et vaccination respectivement.

2.3. Système immunitaire

2.3.1. Organes lymphoïdes

Le poids relatif ($P < 0,01$) de la rate est affecté par la vaccination contre la GnRH ($P < 0,1$ et $P < 0,01$ respectivement pour les poids absolu et relatif ; Tableau 1) et celui du thymus par la castration chirurgicale ($P < 0,01$ et $P = 0,05$ respectivement pour les poids absolu et relatif). Les porcs GnRHv+ ont des rates plus légères que les GnRHv- ($P < 0,01$) et les Cast+ ont des thymus plus légers que les Cast- ($P = 0,05$).

La composition lipidique du thymus à l'abattage est influencée par la castration chirurgicale (Tableau 2).

En effet, les porcs Cast+ possèdent un thymus plus gras que les Cast- ($P < 0,01$). D'autre part, les analyses cytométriques mettent en évidence un plus grand nombre de thymocytes exprimant CD1 chez les animaux Cast- que chez les Cast+ ($P = 0,05$) alors que la tendance est inverse pour les cellules CD4+ (Tableau 2 ; $P = 0,06$). Enfin la vaccination a un effet significatif sur la sous-population de thymocytes TCR $\gamma\delta$, les individus GnRHv+ présentant plus de thymocytes TCR $\gamma\delta$ que les animaux GnRHv- ($P < 0,05$). Aucun effet des traitements n'est observé pour les proportions de cellules CD8+ et CD4+CD8+.

2.3.2. Mesures immunitaires sanguines

Le nombre de leucocytes totaux et au sein de ce pool, celui de granulocytes n'est pas affecté par les traitements, et ce à aucun des 3 stades étudiés (Tableau 3). Par contre, le nombre de lymphocytes est influencé par la castration à 3 et 4 mois ($P < 0,05$). Les porcs Cast- présentent plus de lymphocytes circulants que les porcs Cast+.

A 3 mois, la castration tend à affecter le pourcentage de lymphocytes T CD4+CD8+ (cellules CD3+CD4+CD8+, $P = 0,08$), de T CD8+ (cellules CD3+CD4-CD8+, $P = 0,05$) et de T CD4-CD8- (cellules CD3+CD4-CD8-, $P = 0,06$). Les porcs Cast- présentent numériquement plus de T CD4+CD8+ et de T CD8+ mais moins de T CD4-CD8- que les porcs Cast+.

A 4 mois, l'interaction castration x immunocastration est significative pour la population de lymphocytes CD3+ ($P = 0,05$) et la sous-population de T $\gamma\delta$ (cellules CD3+TCR $\gamma\delta$ +, $P < 0,05$). Les porcs Cast-/GnRHv- ont plus de lymphocytes T $\gamma\delta$ que les porcs Cast+/GnRHv- ($P < 0,05$). L'effet de la castration ($P < 0,05$) sur la population des lymphocytes T CD4+CD8+ est à nouveau observé.

A 5 mois, l'interaction castration x immunocastration est à nouveau significative sur la sous-population de T $\gamma\delta$ ($P < 0,05$), les Cast-/GnRHv- tendant à avoir plus de T $\gamma\delta$ que les Cast+/GnRHv- ($P = 0,09$). La proportion de lymphocytes T CD4+CD8+ est significativement plus importante chez les porcs Cast- que chez les Cast+ ($P < 0,01$).

3. DISCUSSION

3.1. Efficacité des traitements sur le développement sexuel

3.1.1. Castration

Dans cette étude, les niveaux de testostérone plasmatique sont élevés chez les mâles entiers alors qu'ils sont quasiment indétectables chez les mâles castrés, confirmant que la testostérone provient essentiellement des testicules. Chez les entiers, les taux de testostérone augmentent progressivement avec l'âge et particulièrement au 5^{ème} mois, ce qui correspond à la maturation sexuelle des animaux (Martin *et al.*, 1984).

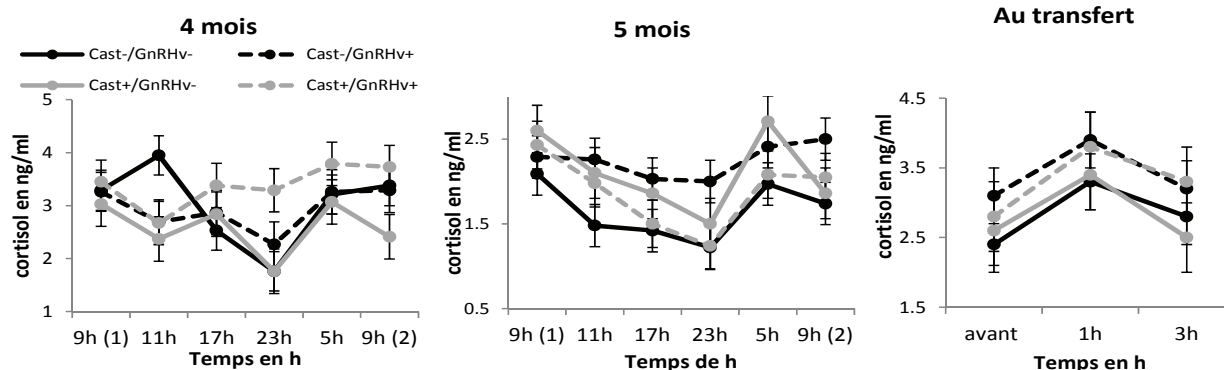


Figure 2 - Concentrations de cortisol salivaire à 4 mois, 5 mois d'âge et lors du transfert à l'abattoir

Tableau 3 - Formule sanguine et sous-populations de lymphocytes T en fonction du traitement et de l'âge

	3 mois					4 mois					5 mois					e.s. ²
	Cast-		Cast+		p ¹	Cast-		Cast+		p ¹	Cast-		Cast+		p ¹	
	GnRHv-	GnRHv+	GnRHv-	GnRHv+		GnRHv-	GnRHv+	GnRHv-	GnRHv+		GnRHv-	GnRHv+	GnRHv-	GnRHv+		
Leucocytes ³	34	30	32	30	C:0,05	28	28	26	26	C: 0,05	26	24	23	24		1
Lymphocytes ³	17	15	14	14		17	16	14	15		17	15	14	15		1
Granulocytes ³	16	15	16	16		11	11	11	10		9	8	8	8		1
CD3+ ⁴	69	69	69	70	C:0,05	74	71	69	73	CxV:0,05	83	80	81	82		1
CD4+ ⁴	20	21	23	20		21	21	25	22		19	21	23	21		1
CD8+ ⁴	24	23	19	20		22	23	20	21		19	20	19	19		2
CD4+CD8+ ⁴	5	7	5	5	C:0,08	6	7	5	6	C: 0,05	6	7	4	5	C: 0,01	1
CD4-CD8-	0,78	0,78	0,82	0,83	C:0,06	0,79	0,78	0,80	0,80		0,85	0,81	0,83	0,85		0,02
TCR γδ+ ^{4,5}	42	42	41	46		42 ^a	39 ^{ab}	33 ^b	41 ^{ab}	CxV: 0,05	59 ^a	54 ^{ab}	52 ^b	57 ^{ab}	CxV: 0,01	2

¹C, V, CxV : effets castration, vaccination et interaction castration x vaccination respectivement. ² : e.s : maximum de l'erreur standard. ³ résultats exprimés en millions de cellules /mm³ de sang. ⁴ : résultats exprimés en % de cellules mononuclées sanguines. ⁵ : a,b : pour un paramètre donné et un âge donné, les moyennes suivies d'une lettre différente diffèrent à P < 0.05.

3.1.2. Immunocastration

L'immunocastration est effective hormis pour 3 porcs que nous avons exclus de l'étude. A **3 et 4 mois**, la vaccination anti-GnRH n'influence pas la concentration en androgènes. Cela est tout à fait logique car seul le rappel du vaccin permet d'obtenir un titrage suffisant d'anticorps anti-GnRH pour inhiber la synthèse des stéroïdes sexuels (Zamaratskaia *et al.*, 2008). Par contre, à **5 mois**, cet effet devient significatif en accord avec les résultats de la bibliographie (Zamaratskaia *et al.*, 2008). De plus, les testicules subissent une involution suite à la vaccination anti-GnRH comme le montre également la littérature (Wagner et Claus, 2004).

3.2. Effets sur l'axe corticotrope

3.2.1. Castration

Chez le rat, les androgènes inhibent la synthèse et la sécrétion des glucocorticoïdes (Williamson *et al.*, 2005). Dans notre étude, les surrénales des animaux Cast+ sont effectivement plus lourdes que celles des porcs Cast-même si l'effet est moins marqué chez les porcs Cast+ ayant subi la vaccination anti-GnRH. De plus les concentrations plasmatiques de cortisol à 4 mois et celles d'ACTH à 5 mois sont plus élevées chez les porcs castrés indépendamment de la vaccination.

La castration des porcs dans le jeune âge permettrait donc de lever l'inhibition par la testostérone sur l'activité du cortex surrénalien.

3.2.2. Vaccination contre la GnRH

Il est vraisemblable que l'immunocastration ait eu un impact sur l'activité de l'axe corticotrope. En effet, le rythme de sécrétion du cortisol salivaire à 4 mois d'âge est altéré chez les animaux ayant reçu le vaccin anti-GnRH : ils ne présentent pas de décroissance des niveaux de cortisol nocturne.

Cet effet étant observable que les animaux aient été ou non préalablement castrés par voie chirurgicale, on ne peut l'expliquer par le fait que l'immunocastration supprime la sécrétion d'hormones testiculaires. Par contre, le vaccin, comme tout autre vaccin, contient un adjuvant qui génère une réponse inflammatoire de l'organisme.

Or la réponse inflammatoire est capable d'activer l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, entraînant une augmentation des taux de cortisol (Webel *et al.*, 1997).

Ainsi, la primo injection pourrait avoir engendré une réaction inflammatoire à long terme responsable de la hausse des taux de cortisol salivaire mesurée 24 jours plus tard. Ce résultat n'est pas observé au niveau du cortisol plasmatique, soit parce que l'intervalle de temps séparant la vaccination de la prise de sang est trop long (28 jours) et que la réaction inflammatoire au vaccin est alors terminée, soit parce que les différences de sécrétion de cortisol ne sont observables qu'au moment où la concentration est normalement très faible, à 23h, alors que les prises de sang avaient lieu le matin.

A 150 jours d'âge, seuls les Cast-/GnRHv+ présentent encore des niveaux de sécrétion de cortisol salivaire supérieurs aux porcs n'ayant pas reçu de vaccin, tandis que les porcs Cast+/GnRHv+ ont retrouvé des niveaux comparables aux animaux non vaccinés contre la GnRH.

Cela pourrait être dû à des différences de réactivité inflammatoire entre ces deux groupes. L'existence d'une réponse inflammatoire persistante chez les GnRHv+ n'est néanmoins à ce stade qu'une hypothèse qui reste à être démontrée.

3.3. Système immunitaire

3.3.1. Effet de la castration.

Chez les rongeurs, la castration d'animaux adultes entraîne une hypertrophie du thymus après la puberté caractérisée par une augmentation du poids du thymus, une prolifération des cellules thymiques plus importante et une réduction de la proportion des cellules matures CD4+CD8- (Radojevic *et al.*, 2007). Ces résultats sur le thymus se retrouvent également chez le porc (Hirakata *et al.*, 2010). Dans notre étude, le thymus est au contraire plus lourd chez les porcs Cast-.

Cette augmentation de poids ne semble pas résulter d'une augmentation de l'adiposité mais bien d'une prolifération accrue des thymocytes immatures (exprimant CD1).

Egalement en opposition avec la littérature, le pool des thymocytes CD4+CD8- est réduit chez les porcs Cast-. Cette contradiction apparente pourrait s'expliquer par un effet des hormones sexuelles sur le thymus dépendant de l'âge.

En effet, la testostérone aurait un rôle activateur sur la mise en place et le développement du thymus jusqu'à la puberté puis inhibiteur après celle-ci (Olsen *et al.*, 1998).

Etant donné le rôle du thymus dans la production des lymphocytes T, il était probable que la castration affecte également la proportion des populations lymphocytaires sanguines. En effet, les porcs Cast- présentent plus de lymphocytes totaux à 3 et 4 mois d'âge. Les analyses cytométriques permettent d'identifier précisément les sous-populations lymphocytaires sanguines d'origine thymique affectées par la castration chirurgicale précoce. Chez les porcs Cast+ de 3 mois d'âge, la castration semble diminuer la production de lymphocytes T CD8+ et surtout de CD4+CD8+, identifiées comme des lymphocytes T mémoires chez le porc. L'accroissement chez les porcs Cast- de la proportion de cellules CD4+CD8+ se maintient jusqu'à 5 mois.

Ainsi les verrats présenteraient un thymus plus gros, produisant plus de lymphocytes T, et une maturation plus rapide de ces lymphocytes T en périphérie. Le fait que la castration ait un effet dès 3 mois peut s'expliquer par la faible sécrétion de testostérone mais également d'œstrogènes produits par les testicules des porcs pré-pubères.

3.3.2. Effet de l'immunocastration

Comme attendu, les porcs GnRHv+ et GnRHv- ne diffèrent pas au niveau immunitaire à 3 mois d'âge, puisqu'ils n'ont pas encore été vaccinés contre la GnRH. A 4 et 5 mois d'âge, des différences apparaissent au niveau des populations de lymphocytes T $\gamma\delta$ thymiques et sanguins. Aucun autre paramètre n'est affecté par l'immunocastration. Au niveau circulant, ces effets sont opposés chez les Cast- et les Cast+. Ceci suggère que les effets de l'immunocastration sur les T $\gamma\delta$ sont indépendants des stéroïdes sexuels, mais passent par la suppression de la GnRH *per se*. En effet, la GnRH est connue pour jouer un rôle immunomodulateur au niveau thymique comme l'ont suggéré Marchetti *et al.* (1998).

CONCLUSION

Cette étude met en évidence l'impact non négligeable des hormones testiculaires sur le développement et le fonctionnement de l'axe corticotrope et du système immunitaire chez des porcs âgés de 3 à 5 mois.

D'une part, la castration chirurgicale semble activer le développement des surrénales. Cette altération peut être interprétée au niveau de l'individu comme une adaptation visant à suppléer l'absence d'androgènes d'origine testiculaire. D'autre part, la castration chirurgicale inhiberait partiellement le fonctionnement du thymus comme le montrent la diminution du nombre de lymphocytes dans le sang à 3 et 4 mois ainsi que la réduction thymique à 5 mois d'âge.

L'immunocastration pourrait accroître l'activité de l'axe corticotrope, mais affecte peu la fonction thymique des porcs. Toutefois les conséquences potentielles de ces modifications sur la santé globale des animaux sont à préciser sur des effectifs plus importants d'animaux.

REMERCIEMENTS

Le travail a été mené avec l'appui financier de l'Agence Nationale de la Recherche dans le cadre du programme Blanc Agronomie, Projet ANR-09-BLAN-0083 ANDRoPIG.

Je tiens à remercier tout particulièrement le personnel de laboratoire, Michel Lefèbvre et Sandrine Jaguelin, ainsi que celui des installations expérimentales, Hervé Demay, Bernard Carrissant, Patrice Roger et Josselin Delamarre, qui ont participé à la collecte des échantillons ; mais également le personnel de l'abattoir Maurice Alix et Jérôme Liger pour leur assistance lors de la collecte des tissus à l'abattage.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dunsha F.R., Colantoni C., Howard K., McCauley I., Jackson P., Long K.A., Lopaticki S., Nugent E.A., Simons J.A., Walker J., Hennessy D.P., 2001. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *J. Anim. Sci.*, 79, 2524-2535.
- Frank J.W., Mellencamp M.A., Carroll J.A., Boyd R.D., Allee G.L., 2005. Acute feed intake and acute-phase protein responses following a lipopolysaccharide challenge in pigs from two dam lines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 107, 179-187.
- Gaillard R.C., Spinedi E., 1998. Sex- and stress-steroids interactions and the immune system: Evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 15, 345-352.
- Hirakata A., Okumi M., Griesemer A.D., Shimizu A., Nobori S., Tena A., Moran S., Arn S., Boyd R.L., Sachs D.H., Yamada K., 2010. Reversal of age-related thymic involution by an LHRH agonist in miniature swine. *Transplant Immunol.*, 24, 76-81.
- Marchetti B., Gallo F., Farinella Z., Tirolo C., Testa N., Romeo C., Moore S.E., 1998. Luteinizing hormone-releasing hormone is a primary signaling molecule in the neuroimmune network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 840, 205-248.
- Martin T.E., Baker B., Miller H.W., Kellogg T.F., 1984. Circulating androgen levels in the developing boar. *Theriogenology*, 21, 357-365.
- Olsen N.J., Viselli S.M., Fan J., Kovacs W.J., 1998. Androgens accelerate thymocyte apoptosis. *Endocrinology*, 139, 748-752.
- Radojevic K., Arsenovic-Ranin N., Kosec D., Pesic V., Pilipovic I., Perisic M., Plecas-Solarovic B., Leposavic G., 2007. Neonatal castration affects intrathymic kinetics of T-cell differentiation and the spleen T-cell level. *J. Endocrinol.*, 192, 669-682.
- Wagner A., Claus R., 2004. Involvement of glucocorticoids in testicular involution after active immunization of boars against GnRH. *Reproduction*, 127, 275-283.
- Weibel D.M., Finck B.N., Baker D.H., Johnson R.W., 1997. Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.*, 75, 1514-1520.
- Williamson M., Bingham B., Viau V., 2005. Central organization of androgen-sensitive pathways to the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Implications for individual differences in responses to homeostatic threat and predisposition to disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 29, 1239-1248.
- Windmill K.F., Meade B.J., Lee V.W.K., 1993. Effect of prepubertal gonadectomy and sex steroid treatment on the growth and lymphocyte populations of the rat thymus. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5, 73-81.
- Zamaratskaia G., Rydhmer L., Andersson H.K., Chen G., Lowagie S., Andersson K., Lundstrom K., 2008. Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac (TM), on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Anim. Reprod. Sci.*, 108, 37-48.