



HAL
open science

Le kisspeptide : nouvelle molécule pour la maîtrise du cycle chez la jument ?

Caroline Decourt

► **To cite this version:**

Caroline Decourt. Le kisspeptide : nouvelle molécule pour la maîtrise du cycle chez la jument ?. Sciences du Vivant [q-bio]. Université François Rabelais (Tours), 2012. Français. NNT: . tel-02809338

HAL Id: tel-02809338

<https://hal.inrae.fr/tel-02809338>

Submitted on 6 Jun 2020

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.

Copyright

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

Equipe : Neurobiologie intégrative de la reproduction
Physiologie de la Reproduction et des Comportements
UMR INRA-CNRS-Université de Tours-IFCE

THÈSE

présentée par :

Caroline DECOURT

soutenue le 8 mars 2012

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

**Le kisspeptide : nouvelle molécule pour la
maîtrise du cycle chez la jument ?**

THÈSE dirigée par :

M. CARATY Alain

Ingénieur de Recherche (HDR), INRA, Nouzilly

THÈSE co-encadrée par :

M^{me} BRIANT Christine

Inspecteur Santé Publique Vétérinaire, IFCE, région Centre

RAPPORTEURS :

M. AURICH Jörg

Professeur (HDR), Ecole Vétérinaire de Vienne, Autriche

M. DRIANCOURT Marc-Antoine

Directeur scientifique (HDR), Merck santé animale, Angers

JURY :

M. AURICH Jörg

Professeur (HDR), Ecole Vétérinaire de Vienne, Autriche

M^{me} BRIANT Christine

Inspecteur Santé Publique Vétérinaire, IFCE, région Centre

M. CARATY Alain

Ingénieur de Recherche (HDR), INRA, Nouzilly

M. CHEVRIER Claude

Professeur, Université François Rabelais, Tours

M. DRIANCOURT Marc Antoine

Directeur scientifique (HDR), Merck santé animale, Angers

M. TOUTAIN Pierre Louis

Professeur (HDR), Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse

INVITE :

M^{me} QUINTON Hélène

Docteur vétérinaire, CREAVIA, Rennes

Remerciements

Cette thèse a été menée dans le cadre d'une convention Cifre entre l'unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements (UMR PRC) de l'INRA de Nouzilly et la coopérative d'élevage de l'ouest, URCEO. Je tiens donc à remercier tout naturellement M. **Benoît Malpaux** et M. **Florian Guillou**, directeurs successifs de l'unité PRC, ainsi que Messieurs **Thomas Krychowski** et **Thierry Simon**, directeurs successifs d'URCEO-CREAVIA, et Mme **Hélène Quinton**, vétérinaire chez URCEO de m'avoir permise de réaliser cette thèse.

Je remercie également les membres du jury : messieurs **Jörg Aurich**, **Marc-Antoine Driancourt**, **Pierre-Louis Toutain**, **Claude Chevrier** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Après toutes ces années passées à l'INRA, d'abord en tant que stagiaire en master 1 puis master 2 et enfin en tant que doctorante, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont fait partie de mon quotidien, et plus particulièrement :

Christine Briant pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse et pour toute l'aide qu'elle m'a apportée lors des expériences de perfusion et dans les corrections du manuscrit. Je la remercie pour son implication dans cette thèse, pour son enthousiasme et nos nombreuses discussions!

Alain Caraty, pour avoir accepté d'être le directeur « administratif » de ma thèse, mais au final d'y avoir consacré du temps ! Je le remercie chaleureusement de m'avoir formée aux marquages et dosages des hormones, mais également pour tous ses conseils avisés, sa disponibilité et son soutien pour la dernière ligne droite !

Les membres de l'équipe ER2, pour toutes les discussions scientifiques ou non scientifiques lors des poses déjeuner. Merci notamment à **Massimiliano Beltramo** et **Laurence Dufourny**, directeurs de l'équipe, pour leur dynamisme scientifique et leur sympathie, à **Hugues Dardente** pour ses remarques pertinentes, à **Catherine Taragnat** d'avoir pris du temps pour répondre à mes questions, à **Didier Chesneau** et **Didier Lomet** pour m'avoir éclairée lors de mes problèmes de dosages ou de compteurs et de m'avoir épaulée lors de mes premiers marquages, à **Stéphanie Martinet** pour sa très grande aide lors des expériences, son enthousiasme et sa disponibilité.

Les personnes qui ont relu avec attention ce manuscrit : **Christine Briant**, **Alain Caraty**, **Laurence Dufourny**, **Claude Fabre-Nys**, **Hugues Dardente**. Merci pour leurs corrections et leurs conseils avisés.

Le personnel de la jumenterie, à commencer par **Guy Duchamp** pour son aide dans la pose des cathéters et des « maillots de bain » sur les ponettes parfois très tôt le matin, et les nombreuses échographies (à droite... droite !) tous les jours de la semaine, mais aussi pour toutes nos discussions passionnantes.

Fabrice Reignier pour la pose de nombreux cathéter à la perfection, **Philippe Barrière** et **Thierry Blard** pour les échographies, **François Stieau** et **Yvan Gaudé** pour leur soutien culinaire, **Adélaïde Touchard** qui s'est énormément investie dans mes protocoles. Sans oublier ceux partis à la retraite pendant ma thèse, **Bernard Bruneau** pour m'avoir formée à l'échographie ainsi que **Jacky Mérigard**. Un grand merci à tous pour votre aide dans la surveillance des ponettes de jour comme de nuit, la semaine comme le week-end, et tout ça dans une perpétuelle bonne humeur !

L'équipe de l'**atelier**, pour la fabrication des pompes et leurs réparations parfois dans l'urgence ! Et merci **Gaël** d'avoir installé un lit dans les stalles !

A toute l'équipe de l'**hôpital** avec une pensée particulière pour **Luc**, pour toutes les stérilisations de cathéters et désolée d'avoir bouché la machine à laver avec les couvres-cou !

Yves Tillet pour sa disponibilité et de m'avoir initiée à la neuroanatomie.

Monique Otogalli pour son aide lors de mes tous premiers dosages et pour sa bonne humeur.

Lionel Lardic pour avoir passé du temps à mettre au point le nouveau dosage œstradiol et pour toutes nos discussions constructives.

Michèle Magistrini, pour son soutien permanent, depuis mon stage de Master 1 !

Daniel Guillaume, pour toutes nos discussions enrichissantes.

Thérèse Hirribaren pour toutes mes commandes un peu compliquées parfois, et pour son aide lors des problèmes de livraison !

Sophie, Béatrice, Maurice, Thierry, Ghislaine, Marie-Laure, Patricia, Marie-Françoise ainsi que les informaticiens **Jean-Yves** et **Julien**. Merci à tous pour tous les services fournis.

Tous les étudiants qui ont participé aux nombreuses expériences de perfusion : **Yacine, Cyrielle, Maud, Abdou, Achraf**, avec une pensée toute particulière pour **Bénédicte**!

Elodie, Sarah, Sophie, Samia pour leur soutien permanent et leur amitié, avec une pensée particulière pour mes colocataires de bureau **JB** et **Séverine** sans qui ce dernier aurait été nettement moins agréable!

Enfin, la réalisation de cette thèse n'aurait sans doute pas été possible sans le soutien inconditionnel de toute ma famille et je leur en suis très reconnaissante. Un grand merci en particulier à mon compagnon pour sa patience, son soutien et ses encouragements, à ma fille pour son incroyable gaîté contagieuse, et à ma maman pour sa disponibilité à toute heure !

Résumé

Dans l'espèce équine, la maîtrise du cycle ovarien de la jument est un enjeu économique important. Les éleveurs sont demandeurs de nouveaux traitements moins chers, moins contraignants et plus efficaces. La découverte récente du système kisspeptide/GPR54 est probablement l'une des plus importantes dans le domaine de la reproduction, depuis la découverte de la GnRH. Le kisspeptide (KP), ligand du GPR54, agit en amont des neurones à GnRH pour induire la libération de la GnRH. Les premières manipulations pharmacologiques de l'axe gonadotrope par le KP chez la brebis sont très prometteuses, puisqu'une perfusion i.v. de KP est capable de synchroniser les ovulations à l'heure près chez la brebis cyclique, et d'induire un cycle suivi d'une ovulation chez la brebis en anœstrus. L'objectif de ma thèse a donc été, chez la jument, de mettre en évidence le KP et le lien entre le KP et la GnRH au niveau de l'hypothalamus, et de définir les applications potentielles du KP pour la maîtrise du cycle pendant la période de cyclicité et d'anœstrus.

Dans un premier temps nous avons défini les conditions optimales de sécrétion des gonadotropines pendant la période de cyclicité. Une perfusion i.v. de KP pendant 6 heures permet de stimuler plus efficacement la LH et la FSH plasmatique en début de phase folliculaire. Nous avons ensuite montré qu'une perfusion i.v. de KP de plus longue durée (72 heures ou durée d'un cycle), administrée depuis le début de la phase folliculaire, ne permettait pas de raccourcir ou synchroniser les cycles dans la mesure où la stimulation des gonadotropines n'est pas maintenue pendant toute la durée de la perfusion, mais pendant une dizaine d'heures uniquement. Il semble donc difficile de synchroniser le cycle de la jument pendant la période de cyclicité, probablement à cause de longueur de la phase folliculaire comparée à celle de la brebis. Nous avons alors fait l'hypothèse que si une perfusion de 72 heures était appliquée pendant la période pré-ovulatoire, la stimulation de LH serait suffisante pour synchroniser les ovulations. Cependant, la stimulation de la LH par le KP est physiologique ce qui nécessiterait que le follicule pré-ovulatoire soit mature pour ovuler en réponse à cette stimulation. Enfin, après la stimulation transitoire de la LH, l'hypophyse est toujours capable de répondre à une injection de GnRH par une stimulation de la LH, pendant une perfusion de KP, et il semblerait qu'un des facteurs limitant se situerait au niveau hypothalamique.

Par ailleurs, nous avons entrepris des essais de stimulation des gonadotropines en période d'anœstrus dans le but d'induire des cycles en contre saison. Le KP est capable de stimuler la LH de la même façon qu'en période de cyclicité, mais avec une amplitude moindre. En revanche les niveaux en LH réaugmentent ensuite, et se maintiennent pendant toute la durée de la perfusion de KP (72 heures). Ces résultats suggèrent que le stock hypophysaire en LH se vide pendant les premières heures de perfusion, puis qu'une synthèse *de novo* de la LH se met en place, en fonction de la dose. Pour conclure, chez la jument cyclique, la manipulation pharmacologique du cycle par le KP ne semble pas constituer un traitement d'avenir. En revanche, chez la jument en anœstrus, l'utilisation du KP, ou de ces agonistes, pour induire un cycle, semble présager des perspectives intéressantes.

Abstract

In the equine species, control of the ovarian cycle of the mare is an important economic issue. The farmers are seeking for new treatments less expansive, less restrictive and more efficient. The recent discovery of the kisspeptide/GPR54 system is probably one of the most important in reproduction, since the discovery of GnRH. The kisspeptin (KP), ligand of GPR54, acts upstream of GnRH neurons to induce the release of GnRH. The first pharmacological manipulation of the gonadotropic axis by the KP in ewes are very hopeful, since i.v. infusion of KP is able to synchronize ovulation during cyclicity, and induce a cycle followed by an ovulation during anoestrus. The aim of my thesis was therefore, in the mare, to highlight the KP and the link between KP and GnRH, in the hypothalamus, and identify potential applications for KP in the control of the cycle during the period of cyclicity and anoestrus.

Initially we defined the optimal conditions of gonadotropin secretion during the period of cyclicity. An i.v. infusion of KP for 6 hours more effectively stimulates LH and FSH plasma during the early follicular phase. Then we showed that a longer i.v. infusion of KP (72 hours or during a cycle) administered since the beginning of the follicular phase, did not shorten or synchronize cycles in that the stimulation of gonadotropins is not maintained for the duration of the infusion, but for ten hours only. It is therefore difficult to synchronize the cycle of the mare during the period of cyclicity, probably because of the length of the follicular phase compared to the ewes. We then hypothesized that if 72 hours infusion was applied during the pre-ovulatory, LH stimulation would be sufficient to synchronize ovulation. However, the stimulation of LH by the KP is physiological which would require a mature pre-ovulatory follicle to ovulate in response of this stimulation. Finally, after the transient stimulation of LH, the pituitary is still able to respond to an injection of GnRH stimulation of LH during infusion of KP, and it seems that the hypothalamic level would be one of the limiting factors.

In addition, we began to test stimulation of gonadotropins in anestrus period in order to induce cycles during anoestrus. The KP is able to stimulate LH in the same way that during cyclicity period, but with smaller amplitude. In contrast, LH levels increase again next, and remain for the duration of the infusion of KP (72 hours). These results suggest that the pituitary stock of LH was emptied during the first hours of infusion, and that a *de novo* synthesis of LH is set up, depending on the dose. In conclusion, in cyclic mares, pharmacological manipulation of the cycle by the KP does not seem to be a future treatment. However, in the anoestrus mare, the use of the KP, or these agonists to induce a cycle, seems to predict some interesting perspectives.

AVANT PROPOS

Publications scientifiques

Decourt C., Tillet Y., Caraty A., Franceschini I., Briant C., (2008) Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus interactions with GnRH neuronal system. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 36 (3-4), 131-137

Schauer S.N., Briant C., Ottogalli M., **Decourt C.**, Handel I.G., Donadeu F.X., (2011) Supplementation of equine early spring transitional follicles with luteinizing hormone stimulates follicle growth but does not restore steroidogenic activity. *Theriogenology* 75 (6), 1076-1084

Caraty A., **Decourt C.**, Briant C., & Beltramo M. : Kisspeptins and the reproductive axis: potential applications to manage reproduction in farm animals. Revue soumise pour publication à Domestic Animal Endocrinology.

Communication internationale

Decourt C.V., Merzouki Y., Duchamp G., Bruneau B., Caraty A., Briant C., (2010) Effects of constant intravenous kisspeptin administration on luteinizing hormone release in cyclic mares. *Animal Reproduction Science (International Symposium on Equine Reproduction (ISER 2010). 26-30 July 2010, Lexington, Kentucky, USA)* 121 (1-2), Supplément 1 p:S65-S67

Communications nationales

Decourt C., Merzouki Y., Bouakkaz A., Duchamp G., Bruneau B., Caraty A., Briant C., (2010) Essais de maîtrise du cycle chez la jument, avec le kisspeptide. *Journées de la Recherche Equine (36ème Journée de la Recherche Equine. 4 mars 2010, Paris)* 36, 81-85

Decourt C., Briant C., Caraty A., Cateau M.L., Tillet Y., (2007) Mise en évidence du kisspeptide dans l'espèce équine. *34ème Colloque de la Société de Neuroendocrinologie. 25-27 septembre 2007, Tours Poster P-8, p:43*

Vidament M., Le Foll Y., Rosen C., Bayle J.C., Yvon J.M., Bruneau B., Margat A., Wimel L., Cuir F., Larry J.L., Arnaud G., Marquet C., **Decourt C.**, Gatesoupe P., Duchamp G., (2009) Fertilité du sperme d'étalon conservé 24 à 72 h lors d'utilisation d'une boîte de transport jetable ou lors d'ovulation retardée. *Journée de la Recherche Equine (35ème Journée de la Recherche Equine. 26 février 2009, Paris)* 35, 67-78

Vidament M., Ferry B., Laine A.L., Wimel L., Miszczak F., Burger D., Briant C., **Decourt C.**, Caraty A., (2010) L'injection journalière d'un agoniste de GnRH restaure la fonction de reproduction chez les étalons castrés à long terme par une immunisation anti-GnRH. *Journée de la Recherche Equine (36ème Journée de la Recherche Equine. 4 mars 2010, Paris)* 36, 71-80

Table des matières

Préambule.....	1
Synthèse bibliographique.....	4
I. Principales caractéristiques de la reproduction chez la jument.....	5
A. En saison de reproduction	6
1. Cycle ovarien : aspects endocriniens	7
2. La croissance folliculaire	15
3. La dynamique d'un cycle	16
4. Les variations physiologiques du cycle.....	20
B. L'œstrus saisonnier.....	23
C. Les traitements de maîtrise du cycle chez la jument.....	27
1. En période de cyclicité	27
2. En période d'œstrus	31
II. Le kisspeptide	35
A. Nomenclature	35
B. Biochimie	36
1. Les différentes formes du kisspeptide.....	36
2. Les voies de signalisation du GPR54.....	37
C. Distribution du kisspeptide et de son récepteur	37
D. Rôles physiologiques du kisspeptide.....	39
E. Sites d'action du kisspeptide	41
F. Les neurones à kisspeptide, centre intégrateur de différents signaux ?	44
1. Interactions GnRH-stéroïdes : le lien manquant ?	44
2. Interactions photopériode-KP	47
3. Interactions métabolisme-KP	48
G. Les effets de l'administration du kisspeptide.....	49
1. Efficacité des différentes formes.....	50
2. Efficacité des différents modes d'administration.....	50
3. Quelles sont les applications du kisspeptide dans la maîtrise du cycle chez la femelle ?.....	53
Objectifs de la thèse.....	55
Matériels et méthodes communs aux expériences effectuées chez la jument ...	58

Chapitre I : Mise en évidence du kisspeptide chez la jument.....	69
1. Introduction.....	70
2. Résumé de l'article.....	71
3. Discussion de l'article dans le contexte bibliographique actuel	80
Chapitre II : Expériences préliminaires.....	82
A. <i>Expérience 1 : injection i.v. unique de mKP-10 ou de eKP-10 chez des brebis.....</i>	83
1. Protocole expérimental.....	83
2. Résultats/discussion	83
B. <i>Expérience 2 : injections i.v. uniques successives de eKP-10 chez des ponettes en anœstrus saisonnier.....</i>	84
1. Protocole expérimental.....	85
2. Résultats/discussion	85
C. <i>Expérience 3 : perfusion de eKP-10 (0,5 mg/h pendant 6 heures) chez des ponettes en anœstrus saisonnier.....</i>	87
1. Protocole expérimental.....	87
2. Résultats/discussion	88
D. <i>Expérience 4 : Stabilité du eKP-10 dans le système de perfusion.....</i>	89
1. Protocole expérimental.....	90
2. Résultats/discussion	90
Chapitre III : Le kisspeptide chez la jument cyclique	92
Partie 1 : Optimisation du choix du stade du cycle et de la dose lors de perfusions de courte durée (3 à 6 heures).	93
<i>Expérience 1 : Perfusion de eKP-10 (2,5 mg/h pendant 6 heures) à différents stades de la phase folliculaire.....</i>	94
1. Introduction - Objectifs	95
2. Matériel et méthodes	96
3. Résultats	97
4. Discussion	98
<i>Expérience 2 : Perfusion de eKP-10 (6 mg/h pendant 6 heures) à différents stades de la phase folliculaire.....</i>	100
1. Introduction - Objectifs	101
2. Matériel et méthodes	101
3. Résultats	103

4. Discussion	106
<i>Expérience 3 : Perfusion de différentes doses de eKp-10 en début de phase folliculaire.</i>	111
1. Introduction - Objectifs	112
2. Matériel et méthodes	112
3. Résultats	113
4. Discussion	114
Partie 2 : Approche des effets sur le cycle par une perfusion de moyenne durée (72 heures)	116
<i>Perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h ou 6 mg/h pendant 72 heures, en début de phase folliculaire</i>	117
1. Introduction-Objectifs	118
2. Matériel et méthodes	118
3. Résultats	120
4. Discussion	124
Partie 3 : Essais de maîtrise du cycle	129
<i>Expérience 1 : Essais de synchronisation des ovulations</i>	130
1. Introduction	131
2. Matériel et méthodes	131
3. Résultats	132
4. Discussion	136
<i>Expérience 2 : Essai d'induction de l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire</i>	139
1. Introduction-Objectifs	140
2. Matériel et méthodes	141
3. Résultats	142
4. Discussion	144
Partie 4 : Essai d'identification des mécanismes impliqués dans la sécrétion transitoire des gonadotropines lors d'une perfusion de eKP-10 en début de phase folliculaire.	149
1. Introduction-Objectifs	150
2. Matériel et méthodes	151
3. Résultats	153
4. Discussion	154
Chapitre IV : Essais en période d'anœstrus saisonnier	157
1. Introduction-Objectifs	158

2. Matériel et méthodes	159
3. Résultats	160
4. Discussion	165
Discussion générale/Conclusion	170
Références bibliographiques	182
Annexes	203
Résumé	213
Résumé en anglais	213

Abréviations

AMM : autorisation de mise sur le marché

AMPc : adenosine monophosphate cyclique

ARNm : acide ribonucléique messenger

AUC : area under the curve

APO : aire préoptique

ARC : noyau arqué

AVPV : noyau périventriculaire antéroventral

BSA : bovine serum albumine

COX-2 : cyclo-oxygénase 2

DYN : dynorphine

E2 : œstradiol

ER α : récepteur alpha pour l'œstradiol

ER β : récepteur beta pour l'œstradiol

FSH : hormone folliculo-stimulante (Folliculo Stimulating Hormone)

GnRH : gonadolibérine (Gonadotropin Releasing Hormone)

GPR54 : récepteur du kisspeptide

hCG : choriogonadotropine humaine

i.c.v. : intra-cérébro-ventriculaire

IGF-1 : insulin-like growth factor 1

i.m. : intra-musculaire

i.p. : intra-péritonéale

i.v. : intra-veineux

KNDY : population neuronale co-exprimant le kisspeptide, la neurokinine B et la dynorphine

Kiss1 : gène non humain du kisspeptide

KISS1 : gène humain du kisspeptide

KP : kisspeptide

LCR : liquide céphalo rachidien

LH : hormone lutéinisante (Luteinizing Hormone)

NKB : neurokinine B

NMDA : N-Methyl-D-Aspartate

NPY : neuropeptide Y

P4 : progestérone

PGF2 α : prostaglandine F2 α

RFRP : RFamide-related peptide

SD : standard deviation = écart type

s.c. : sous-cutané

SEM : standard error of the mean = écart standard à la moyenne

VEGF : vascular endothelial growth factor

Liste des annexes

Annexes	203
Annexe 1 : Protocole de dosage de la eLH	204
Annexe 2 : Protocole de dosage de la eFSH	206
Annexe 3 : Protocole de dosage du 17 β -œstradiol dans le plasma	208
Annexe 4 : Protocole de dosage de la progestérone dans le plasma	210
Annexe 5 : Protocole de dosage du kisspeptide	211

Préambule

L'objectif des éleveurs de chevaux est de produire un poulain par an et par jument. Cet objectif est facilement atteint si les juments sont mises à la reproduction en liberté avec l'étalon. Cependant, la production d'animaux compétitifs associée à la diffusion d'une génétique internationale a conduit à un développement important, au cours des 30 dernières années, de l'insémination artificielle. La mise en œuvre de cette technique nécessite de maîtriser le moment de l'ovulation en tenant compte des caractéristiques du cycle de la jument.

La jument est saisonnée, et sa période d'activité sexuelle se situe généralement entre avril et octobre. La durée de la gestation étant de 11 mois, il convient donc d'utiliser au mieux les cycles disponibles après le poulinage pour optimiser les chances de féconder la jument. Pour l'espèce équine, la législation impose que l'âge de tous les animaux change au 1^{er} janvier. Ainsi, un poulain né le 1^{er} janvier et un poulain né le 31 décembre de la même année auront tous les deux un an au 1^{er} janvier de l'année suivante. Les poulains nés en début d'année seront généralement plus performants que ceux nés en fin d'année. Les éleveurs ont donc intérêt à mettre leur jument à la reproduction le plus tôt possible dans la saison, ce qui nécessite que la jument soit déjà cyclique. Or, le début de la saison sexuelle est très variable entre les juments et pour une même jument au fil des années. Enfin, pour les juments de compétition de haut niveau, qui bénéficient du transfert d'embryon, la saison de reproduction correspond également à la période des compétitions.

Les méthodes de reproduction doivent donc être adaptées à ces différentes contraintes. La mise des juments sous lumière (traitement lumineux simulant les jours longs) dès le milieu ou la fin décembre permet d'avancer la date de la première ovulation courant mars. Cependant cette technique, qui nécessite une mise en place bien en amont de la saison de reproduction, est relativement peu employée. Pendant la saison de reproduction, l'insémination artificielle est largement utilisée. Néanmoins, elle doit être effectuée de façon optimale dans les 24 heures précédant l'ovulation, et s'il s'agit de semence congelée dans les 6 heures. Or, la prédiction du moment de l'ovulation est difficile du fait de la durée de l'œstrus, de sa variabilité, et du moment de l'ovulation par rapport au début de l'œstrus. Différents traitements et techniques sont donc utilisés de façon courante : traitements de synchronisation de l'œstrus, échographies transrectales pour le suivi de la croissance folliculaire, traitements d'induction de l'ovulation administrés en présence d'un follicule pré-ovulatoire, pour programmer l'ovulation en moyenne 36 heures plus tard. Cependant, la mise en place d'un tel suivi est lourde, coûteuse et ne donne pas entière satisfaction. De plus certains traitements

utilisant des hormones d'origine animale risquent à plus ou moins long terme d'être supprimés.

Ces besoins exprimés par la filière équine ont donc contribué à l'ouverture de nouvelles voies de recherches portant sur la mise au point de traitements moins onéreux, moins contraignants, et plus efficaces, pour maîtriser le cycle de la jument. C'est dans ce contexte qu'ont été entreprises les études sur le kisspeptide, molécule découverte en 2003 comme ayant un rôle majeur dans le contrôle de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien.

Synthèse bibliographique

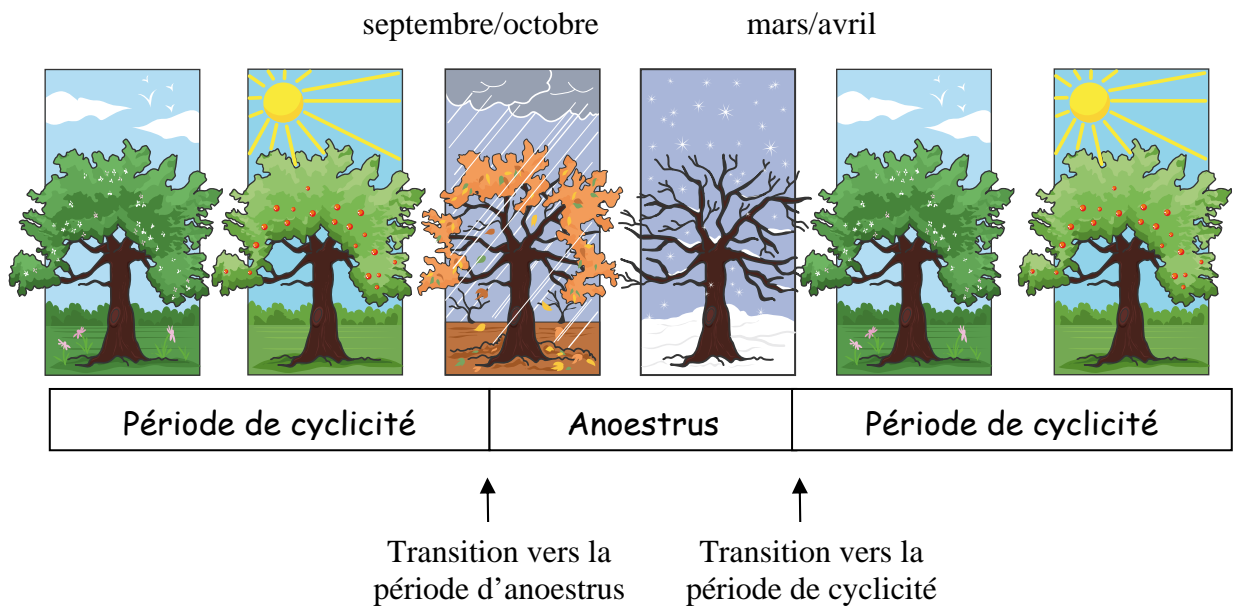


Figure 1.1 : Représentation schématique du cycle annuel de reproduction chez la jument.

I. Principales caractéristiques de la reproduction chez la jument

Dans l'espèce équine, l'activité de reproduction des femelles est saisonnée afin de permettre la naissance des poulains au printemps, lorsque les conditions alimentaires et climatiques sont les plus favorables. Cette saisonnalité est contrôlée essentiellement par la photopériode. Une photopériode de longue durée (14 h 30 à 16 h de lumière par jour) stimule la reprise de l'activité ovarienne de la jument.

Le cycle annuel de reproduction chez la jument comporte 2 périodes (**figure 1.1**):

- La période de **reproduction**, caractérisée par une succession de cycles ovariens (centrée autour du solstice d'été).
- La période d'**anœstrus saisonnier**, qui peut être divisée en 3 parties :
 - La **transition vers l'inactivité ovulatoire saisonnière** (aux alentours de l'équinoxe d'automne) caractérisée par la présence de gros follicules qui n'ovulent pas à cause du déficit en LH.
 - L'**inactivité ovulatoire saisonnière** que nous appellerons **anœstrus saisonnier** caractérisée par une absence de cycles ovariens (centrée autour du solstice d'hiver).
 - La **transition vers la saison sexuelle** (aux alentours de l'équinoxe de printemps) caractérisée par une augmentation de la sensibilité folliculaire à la LH.

Cependant, environ 20% des femelles ne présentent pas d'anœstrus saisonnier et sont donc cycliques toute l'année (Diekman *et al.*, 2002).

Il existe une variabilité dans la durée de ces 4 périodes, principalement influencée par l'alimentation (Salazar-Ortiz *et al.*, 2011) ou encore la température (Palmer, 1978). Dans les climats tempérés, les juments sont en majorité cycliques d'avril à octobre (Ginther *et al.*, 1972). Nous ne détaillerons ci-dessous que les périodes au cours desquelles nous avons étudié les effets du kisspeptide, soit A) la saison de reproduction et B) l'anœstrus saisonnier.

A. En saison de reproduction

La saison sexuelle est caractérisée par une succession de cycles d'une durée d'environ 22 jours chez la jument, jusqu'à l'établissement d'une gestation ou la fin de la saison sexuelle. Un cycle est défini comme l'intervalle entre deux ovulations précédées d'œstrus et/ou d'un niveau de progestérone inférieur à 1 ng/ml, et suivies d'une élévation des niveaux de progestérone.

Un cycle est conventionnellement divisé en deux phases :

- la phase lutéale (correspond approximativement au dioestrus), de durée relativement constante (14 à 15 jours), pendant laquelle le corps jaune formé après l'ovulation sécrète de la progestérone, hormone responsable du comportement de refus de l'accouplement envers l'étalon.
- la phase folliculaire (correspond approximativement à l'œstrus), de durée extrêmement variable (3 à 12 jours), pendant laquelle la jument est réceptive à l'étalon. Cette phase correspond à la croissance folliculaire terminale et aboutit à l'ovulation.

La durée du cycle ovarien chez la jument présente donc une très grande variabilité comparée aux autres mammifères (Ginther *et al.*, 1972). Cette variabilité est visible entre juments mais également pour une même jument au cours de la saison. En effet, les cycles sont plus longs en début et fin de saison sexuelle, et plus courts en milieu de saison c'est-à-dire pendant l'été. Cette variation de longueur des cycles est principalement due à la durée de l'œstrus (Ginther, 1974). Pour une même jument, le diamètre du follicule pré-ovulatoire varie peu (Cuervo-Arango et Newcombe, 2008).

La durée de la phase lutéale chez la jument est du même ordre de grandeur que dans d'autres espèces saisonnées telle que la brebis. En revanche la phase folliculaire chez la jument est longue comparée à la brebis chez laquelle la phase folliculaire dure 2 à 3 jours, et cette différence semble due au temps nécessaire pour que le follicule atteigne sa taille pré-ovulatoire. Le follicule pré-ovulatoire mesure 35 à 45 mm voire plus chez la jument alors qu'il ne mesure que 5 à 8 mm chez la brebis. La jument et la femme ont en commun une phase folliculaire longue qui aboutit à une mono-ovulation (Carnevale, 2008).

1. Cycle ovarien : aspects endocriniens

Le cycle œstral est contrôlé par l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien. Au niveau hypothalamique, la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) exerce une action directe sur le lobe antérieur de l'hypophyse pour stimuler la sécrétion des hormones hypophysaires LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicle-Stimulating Hormone). Le ratio LH:FSH présent dans la circulation sanguine dépend de la fréquence des pulses de GnRH et des rétrocontrôles des stéroïdes sexuels.

a) Au niveau hypothalamique : la GnRH

La GnRH est produite principalement par les cellules de l'hypothalamus médio-basal dont les fibres projettent vers l'éminence médiane (Melrose *et al.*, 1994). La libération pulsatile de la GnRH se fait dans le système porte hypophysaire. De ce fait, même si une infime partie de la GnRH est susceptible de passer dans la circulation sanguine, elle n'est pas détectable du fait des faibles concentrations et de sa demi-vie qui n'est que de 5 à 10 minutes (Conn *et al.*, 1987). Dans l'espèce équine, une technique peu invasive permet la récupération de sang veineux dans le sinus sous-hypophysaire par canulation de la veine faciale superficielle (Alexander et Irvine, 1987). En théorie, cette technique permet de doser la LH et la FSH en sortie d'hypophyse, donc à des concentrations plus élevées que dans le plasma, et de mettre en évidence la pulsativité de ces hormones. D'après les auteurs, elle permet également de doser la GnRH, après passage par l'hypophyse, car la fraction de GnRH retenue par l'hypophyse serait minime (Irvine et Alexander, 1987). Cependant, depuis la mise au point de cette technique, très peu d'études ont été conduites afin de mesurer la sécrétion pulsatile de la GnRH au cours du cycle. Enfin, cette technique, bien que peu invasive, reste délicate et nécessite une certaine expérience ce qui limite le nombre d'équipes la maîtrisant.

Ainsi, Alexander et Irvine ont montré que 98% des pulses de GnRH étaient suivis par un pulse de LH (Alexander et Irvine, 1987). La fréquence des pulses de GnRH varie au cours du cycle. Elle est basse au cours de la phase lutéale avec un pulse toutes les 2 heures environ, puis la fréquence augmente jusqu'à un pulse toutes les 30 minutes le jour de l'ovulation (Irvine et Alexander, 1994; Silvia *et al.*, 1995).

La sécrétion de GnRH est modulée par le rétrocontrôle des stéroïdes sexuels mais la présence du récepteur alpha de l'œstradiol (ER α) et du récepteur de la progestérone sur les neurones à

GnRH n'a pour l'instant jamais été montrée chez le cheval, ni dans d'autres espèces. Par conséquent, les mécanismes de rétrocontrôle passeraient par des structures en amont des neurones à GnRH, dont le système opioïdérique. Au cours de la phase lutéale le système opioïdérique inhibe la sécrétion de GnRH, et donc la libération de LH, alors que pendant la phase folliculaire ce système est inactif, permettant ainsi une augmentation de la sécrétion de GnRH et de LH (Aurich *et al.*, 1995).

b) Au niveau hypophysaire : les gonadotropines FSH et LH

Biochimie

La eFSH (FSH équine) et la eLH (LH équine) sont des glycoprotéines d'un poids moléculaire de l'ordre de 33,2 kDa et 33,5 kDa respectivement. Elles sont composées de 2 sous unités (α et β) associées entre elles par des liaisons non covalentes. La sous-unité α est commune aux hormones glycoprotéiques et comprend 96 acides aminés, tandis que la sous unité β est spécifique et comprend 117 acides aminés pour FSH et 149 pour LH (Sherwood et McShan, 1977).

Le contenu en acides sialiques de la FSH est semblable à celui de nombreuses espèces (5 à 7 %), alors que celui de la eLH est plus élevé (6 à 7 % chez le cheval, 2 % chez l'homme) (Clifford H.G, 1983; Matteri *et al.*, 1986). Les glycoprotéines possèdent sur chacune de leurs chaînes glycosidiques en position la plus externe des résidus d'acide sialique, suivis de résidus de galactose, protégeant ainsi de la liaison avec les récepteurs au galactose présents au niveau des cellules hépatiques (Clifford H.G, 1983). Les acides sialiques, en empêchant la liaison avec les récepteurs des cellules hépatiques, entraînent une faible clairance, comprise entre 0,20 et 0,28 ml/kg/min pour la eFSH, et entre 0,17 et 0,59 ml/kg/min pour la eLH, et une demi-vie assez longue, comprise entre 267 et 304 minutes pour la eFSH, et entre 101 et 319 minutes pour la eLH (Irvine, 1979; Briant *et al.*, 2004). A titre de comparaison, la demi-vie de la LH ovine est de l'ordre de 20 minutes, et celle de la FSH ovine de 120 minutes. Enfin, il a été montré chez le rat et le porc que l'élimination des gonadotropines se faisait par filtration glomérulaire (Combarous Y, 2001; Klett *et al.*, 2003).

La LH est polymorphique chez la jument, et les isoformes diffèrent par leur contenu en acide sialique ce qui affecte leur point isoélectrique, leur demi-vie et leur bioactivité relative (Irvine,

1979). Enfin, la proportion des différentes formes semble varier au cours du cycle (Alexander et Irvine, 1982).

Modalités de sécrétion

Dans l'espèce équine, les cellules sécrétrices sont situées au niveau de la pars distalis et de la pars tuberalis. Certaines sont monohormonales (produisent et stockent FSH ou LH), d'autres sont bihormonales (produisent et stockent FSH et LH). La majorité des cellules sont bihormonales (Eagle et Tortonese, 2000).

Le dosage hormonal des gonadotropines dans le sinus veineux sous-hypophysaire montre que les sécrétions de la eFSH et de la eLH sont pulsatiles. Pendant la phase lutéale, la fréquence des pulses de eFSH et eLH est de 1,8 et 0,6 pulses par 8 heures respectivement, et pendant la phase folliculaire cette fréquence augmente à 6,8 et 7,4 pulses par 8 heures respectivement pour chaque hormone. Pendant la période péri-ovulatoire, 83 % des pulses de eLH sont associés à un pulse de eFSH (Alexander et Irvine, 1987).

Cette observation n'est possible que dans le sinus veineux sous-hypophysaire car dans le sang périphérique, à cause de la demi-vie longue des hormones, les pulses s'additionnent et deviennent indiscernables (Fitzgerald *et al.*, 1985).

Variations au cours du cycle

La **figure 1.2** résume l'évolution des concentrations plasmatiques de LH, FSH, E2 et P4 au cours du cycle de la jument (Ginther *et al.*, 2008a; Jacob *et al.*, 2009), et la **figure 1.3** présente les mêmes hormones au cours du cycle de la brebis (Driancourt et Levasseur, 2001). Des différences sont visibles entre ces deux espèces.

➤ FSH

Chez la jument, un pic de FSH apparaît en milieu de phase lutéale et son amplitude est importante. Les concentrations plasmatiques de FSH sont maximales 10 à 13 jours avant l'ovulation, et rejoignent leur niveau basal 8 jours avant l'ovulation (Evans et Irvine, 1975). La FSH est alors déprimée sous l'effet du rétrocontrôle négatif de l'œstradiol et de l'inhibine. Ce pic de FSH n'est pas concomitant avec un pic de LH, et il serait responsable du recrutement des follicules.

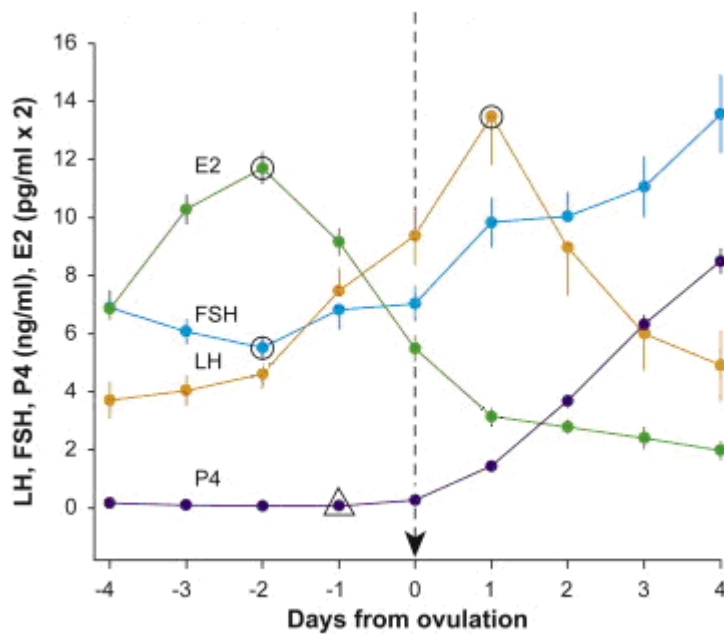
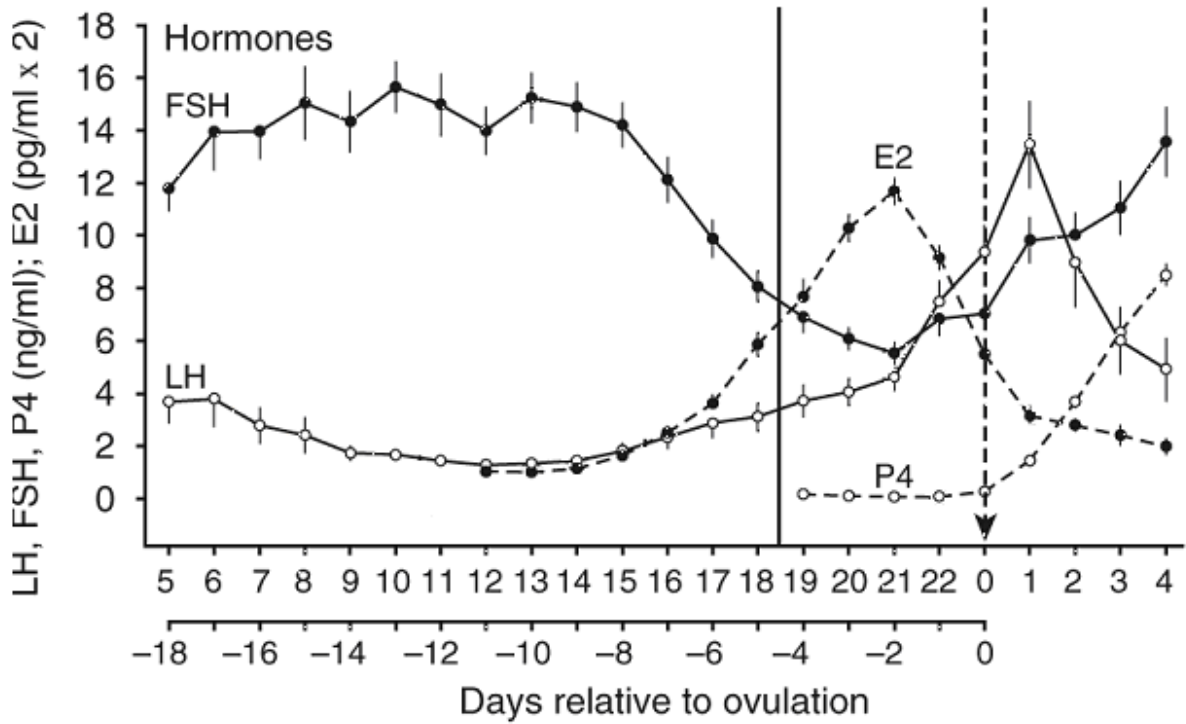


Figure 1.2 : En haut : moyennes \pm SEM des concentrations plasmatiques en LH, FSH, E2 et P4 pendant le cycle. En bas : détail des changements notables de ces concentrations pendant les 4 jours avant et après l'ovulation. Les symboles ronds représentent la transition entre des changements significatifs de concentrations, le symbole triangle représente le début d'une augmentation de la P4. Adapté de (Ginther *et al.*, 2008; Jacob *et al.*, 2009).

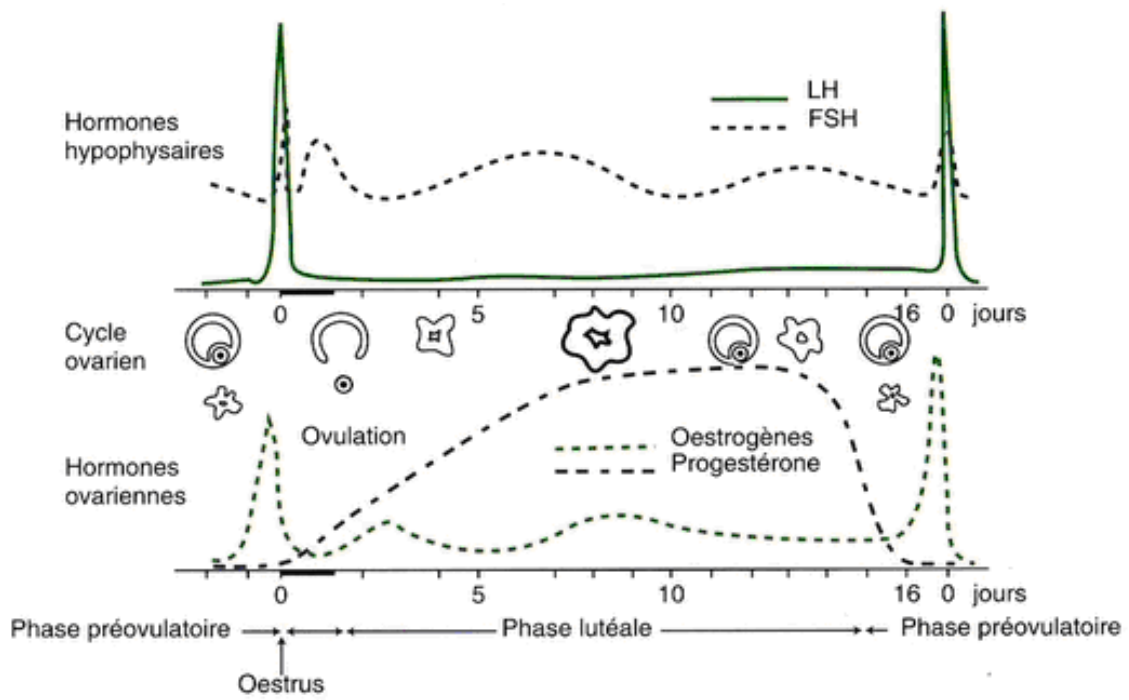


Figure 1.3 : Evolution des concentrations plasmatiques hormonales au cours du cycle sexuel chez la brebis. Adapté de (Driancourt et Levasseur, 2001).

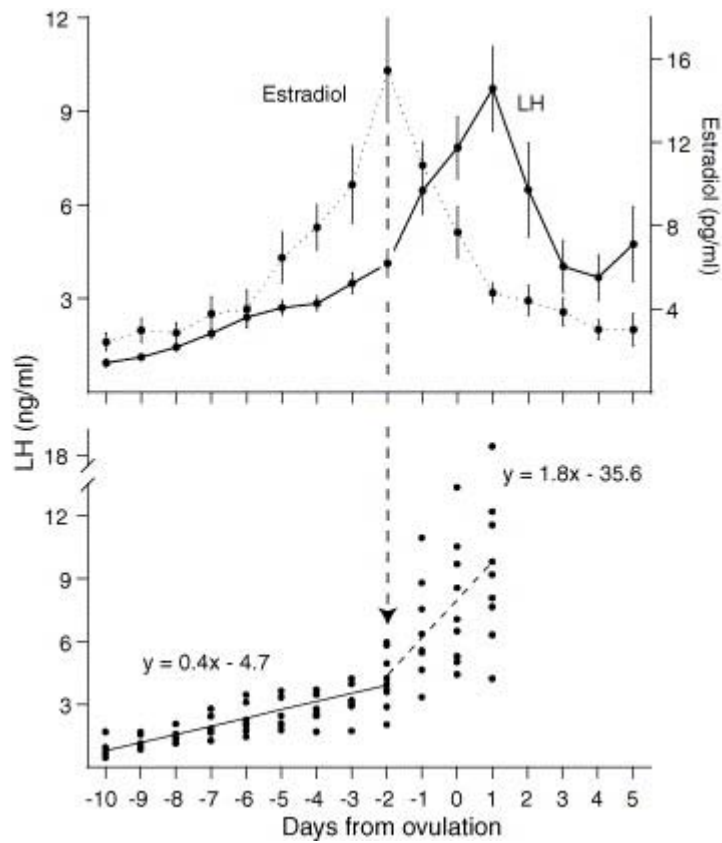


Figure 1.4 : Profils des concentrations plasmatiques moyennes (\pm SEM) en LH et E2 (n=9) et régressions linéaires pour les concentrations plasmatiques en LH durant la montée progressive de LH, puis durant la phase ascendante du pic de LH (Ginther *et al.*, 2006).

Un second pic peut lui succéder, avec des concentrations plasmatiques qui commencent à s'élever avant l'ovulation, parallèlement à la montée de LH. L'amplitude de ce pic est plus faible que celle du 1^{er}, et atteint des concentrations maximales 2 à 3 jours après l'ovulation.

Ce type de profil, appelé bimodal, est le plus souvent observé en début de saison sexuelle, alors que le profil unimodal (seul le premier pic de FSH est présent) est observé plus tard dans la saison (août-octobre) (Turner *et al.*, 1979). Il est à noter que des injections journalières de fortes doses d'œstradiol (10 mg/jour par voie i.m.) depuis le lendemain de l'ovulation jusqu'à l'ovulation suivante, induisent un profil de sécrétion de FSH de type unimodal (Burns et Douglas, 1981).

Chez la brebis, un premier pic de FSH est observé 24 heures avant l'ovulation et il est suivi d'un second pic juste après l'ovulation.

➤ LH

Chez la plupart des espèces domestiques, telle que la brebis, le pic de la LH est pré-ovulatoire puisqu'il survient 24 à 48 heures avant l'ovulation, et la durée du pic ne dure que quelques heures. La jument, au contraire, présente un pic péri-ovulatoire d'environ 6 jours qui commence avant l'ovulation et se termine après. L'évolution des concentrations plasmatiques de LH peut être divisée en deux segments (**figure 1.4**). La LH commence à augmenter très progressivement quelques jours avant le début de l'œstrus (Irvine *et al.*, 1998), à des taux d'environ 0,4 ng/ml/jour de J14 à J22 (J = jour du cycle après l'ovulation précédente) (Ginther *et al.*, 2006). L'augmentation de la sécrétion de LH se poursuit ensuite à des taux plus importants de 1,8 ng/ml/jour de J22 jusqu'au lendemain de l'ovulation (Ginther *et al.*, 2006). Cependant, les données de la littérature révèlent des taux de LH variables d'une étude à l'autre en fonction du dosage et des hormones utilisées comme référence.

La sécrétion de LH est transitoirement interrompue après l'ovulation à cause de la résorption de l'œstradiol, provenant du fluide folliculaire, qui se déverse dans la cavité péritonéale au moment de l'ovulation (**figure 1.5**) (Ginther *et al.*, 2010). Les valeurs maximales en LH sont atteintes 1 à 2 jours après l'ovulation. Après l'ovulation, le feedback négatif exercé par la progestérone entraîne la diminution des concentrations plasmatiques de LH (Greaves *et al.*, 2001) qui atteignent le niveau de base 4 à 6 jours après l'ovulation (Irvine *et al.*, 1998).

Cette diminution des concentrations plasmatiques de LH ne semble pas être due à une internalisation des récepteurs à la GnRH, comme cela est le cas chez d'autres espèces domestiques telle que la brebis (Crowder *et al.*, 1986). Malgré une forte homologie du

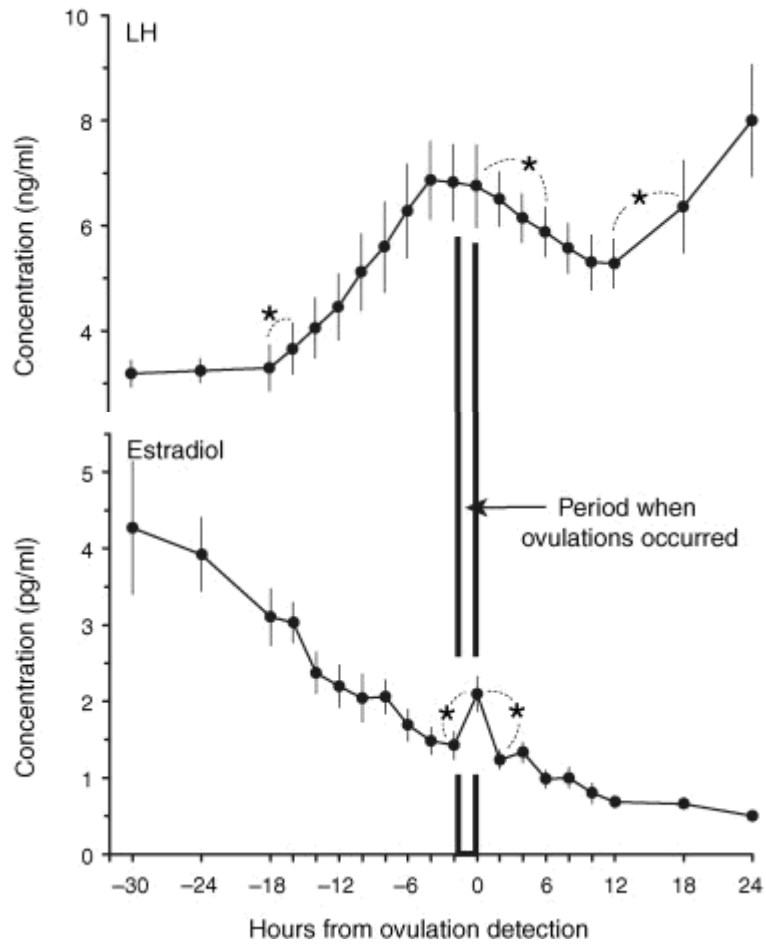


Figure 1.5 : Evolution des concentrations plasmatiques en LH (en haut) et E2 (en bas) au moment de l'ovulation. Les deux barres parallèles représentent la période pendant laquelle l'ovulation a eu lieu (Ginther *et al.*, 2010).

récepteur de la GnRH avec celui d'autres espèces (> 85%), le récepteur équin présente un taux extrêmement faible d'internalisation lorsqu'il est exposé de façon continue à son ligand comparé aux autres espèces. Cette résistance à la « down-regulation » pourrait refléter une évolution nécessaire pour la stimulation prolongée des gonadotropines afin de permettre le remodelage ovarien pour le développement folliculaire et l'ovulation (Porter et Sharp, 2002). Enfin, la présence de quantités importantes de LH après l'ovulation a été proposée comme participant au maintien du corps jaune (Ginther, 1992) mais cette hypothèse est controversée (Briant *et al.*, 2003).

c) Au niveau ovarien : les stéroïdes sexuels

Les follicules en croissance sont associés à une production d'œstrogènes, et le corps jaune à une production de progestagènes. Chez la jument, dans le fluide folliculaire, le 17β -œstradiol est l'œstrogène ovarien majeur, et la progestérone, le progestagène ovarien majeur. En revanche, dans le plasma ou dans l'urine ce sont les métabolites de l'estrone qui prédominent (Ginther, 1992).

➤ Les œstrogènes

Au cours du cycle ovarien de la jument, les quantités d'œstrogènes sont bien corrélées avec l'activité ovarienne, la réceptivité sexuelle et les modifications du tractus génital (Ginther, 1992). La stéroïdogénèse, effectuée par les cellules de la granulosa et de la thèque interne dans l'ovaire, change au cours des différents stades du cycle. Les taux d'œstrogènes circulants commencent à s'élever 6 à 8 jours avant ovulation, et marquent le début de l'œstrus. Plusieurs formes d'œstrogènes sont présentes au cours de l'œstrus (17β -œstradiol, estrone, sulfate d'estrone). Cependant, seul le 17β -œstradiol (E2) régule l'action de la GnRH sur l'hypophyse et module ainsi la sécrétion des gonadotropines (Noden *et al.*, 1975).

Les concentrations plasmatiques d'œstrogènes totaux sont maximales ($3,5 \pm 0,3$ ng/ml) 2 jours avant l'ovulation puis diminuent jusqu'à 1 jour après ovulation ($2,2 \pm 0,3$ ng/ml), pour augmenter légèrement pendant les 5 jours suivants ($2,7 \pm 0,3$ ng/ml) et atteindre le niveau de base ($1,6 \pm 0,3$ ng/ml) au moment de la lutéolyse (Daels *et al.*, 1991). Le profil des concentrations plasmatiques de l'E2 évolue de la même façon pendant la phase folliculaire, mais à des concentrations 100 fois moins importantes (Palmer et Terqui, 1977). Cependant,

l'E2 n'augmente pas pendant le diœstrus. Cette différence semble être due aux œstrogènes sécrétés par le corps jaune (Daels *et al.*, 1991).

Etant donné que le profil de l'E2 évolue en parallèle avec celui des œstrogènes totaux au cours de la phase folliculaire, le dosage radio-immunologique des œstrogènes est préférentiellement utilisé. En effet, le dosage de l'E2 nécessite une étape d'extraction qui limite le nombre d'échantillons pouvant être analysés en une seule fois.

Dans différentes espèces domestiques, en fonction du stade du cycle, l'E2 exerce un rétrocontrôle négatif ou positif sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope afin de réguler la sécrétion de LH (Lindzey *et al.*, 2006). Chez la brebis, différentes approches montrent qu'une augmentation de l'E2 a une action positive sur l'induction du pic pré-ovulatoire de GnRH et de LH (Caraty *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1997). Ainsi, chez la jument, il était admis jusqu'à présent que le pic de LH qui induit l'ovulation était dû au rétrocontrôle positif exercé par le pic d'E2. Une étude *in vitro* sur des cellules de l'hypophyse antérieure a montré que la stimulation de la LH par l'E2 n'était pas directe, mais passait par l'intermédiaire de la GnRH (Baldwin *et al.*, 1991). De plus, une injection d'E2 au tout début de l'œstrus a une action positive sur la sécrétion de LH (Garcia et Ginther, 1975).

Néanmoins, des données plus récentes suggèrent que le rétrocontrôle de l'œstradiol au cours du cycle serait uniquement négatif et permanent chez la jument (Ginther *et al.*, 2007). Les follicules exercent un effet négatif, par l'intermédiaire notamment de l'E2, sur la sécrétion de la LH au cours du pic péri-ovulatoire, comme le montrent les expériences d'ablation de follicules supérieurs à 6 mm depuis le 7^{ème} jour post ovulation (Ginther *et al.*, 2005b) ou de traitement avec de l'E2 exogène (Ginther *et al.*, 2007). Les travaux de Ginther et collaborateurs montrent que la dose d'E2 utilisée est une des explications possibles à cette divergence de résultats avec les études précédentes qui utilisaient des doses supra-physiologiques. En effet, lorsque le contenu en E2 présent dans le fluide folliculaire du follicule pré-ovulatoire se déverse dans la cavité péritonéale, les concentrations plasmatiques de LH diminuent. Cette quantité d'E2 est comparable à la quantité d'E2 exogène requise pour un effet négatif sur la sécrétion de LH (Ginther *et al.*, 2008b). Enfin, cette hypothèse expliquerait l'augmentation très progressive des concentrations plasmatiques en LH au cours du cycle, suivie par une augmentation de LH plus rapide après le pic pré-ovulatoire de l'E2, soit 2 jours avant l'ovulation (Ginther *et al.*, 2006). Ces nouvelles données remettent en cause le dogme du rétrocontrôle positif de l'œstradiol chez la jument, et soulèvent alors la question

du ou des facteurs qui seraient impliqués dans le déclenchement du pic péri-ovulatoire de LH chez la jument.

➤ La progestérone

Pendant la phase folliculaire, les concentrations plasmatiques en progestérone (P4) ne dépassent pas 1 ng/ml. Les concentrations intra-folliculaires de P4 dans le follicule dominant augmentent déjà 2 jours avant l'ovulation (Belin *et al.*, 2000). La première augmentation significative de la P4 plasmatique (aux alentours de 14 ng/ml) est visible en moyenne 12 à 24 heures après ovulation (Plotka *et al.*, 1975; Nagy *et al.*, 2004). La P4 plasmatique atteint ses concentrations maximales (aux alentours de 35 ng/ml, variable selon les juments), 5 à 8 jours après l'ovulation. Les taux diminuent ensuite très progressivement jusque 13 à 14 jours après l'ovulation. Au moment de la lutéolyse, 15 à 17 jours après l'ovulation, les concentrations de P4 diminuent brutalement sous l'effet de la sécrétion de la prostaglandine $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$), pour atteindre un niveau plasmatique inférieur à 1 ng/ml.

La progestérone exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de LH. Cependant, contrairement à d'autres espèces domestiques telle que la brebis, la P4 n'inhibe pas complètement la folliculogénèse et l'ovulation chez la jument.

➤ Les androgènes

Les cellules de la thèque produisent des androgènes qui sont aromatisés par les cellules de granulosa en œstradiol. La production des androgènes, induite par la LH, est stimulée par l'IGF-1 (insulin-like growth factor 1). La biodisponibilité d'IGF-1 ainsi que les concentrations plasmatiques d'E2 sont supérieures chez les juments bien nourries comparées aux juments restreintes (Salazar-Ortiz *et al.*, 2011). Ce résultat est en accord avec les travaux menés chez la vache montrant que la biodisponibilité de l'IGF-1 augmente chez les animaux bien nourris, entraînant ainsi un recrutement par la FSH d'un nombre plus important de follicules et une stimulation de la prolifération ou de la capacité stéroïdogénique des cellules de la thèque et de la granulosa (Diskin *et al.*, 2003).

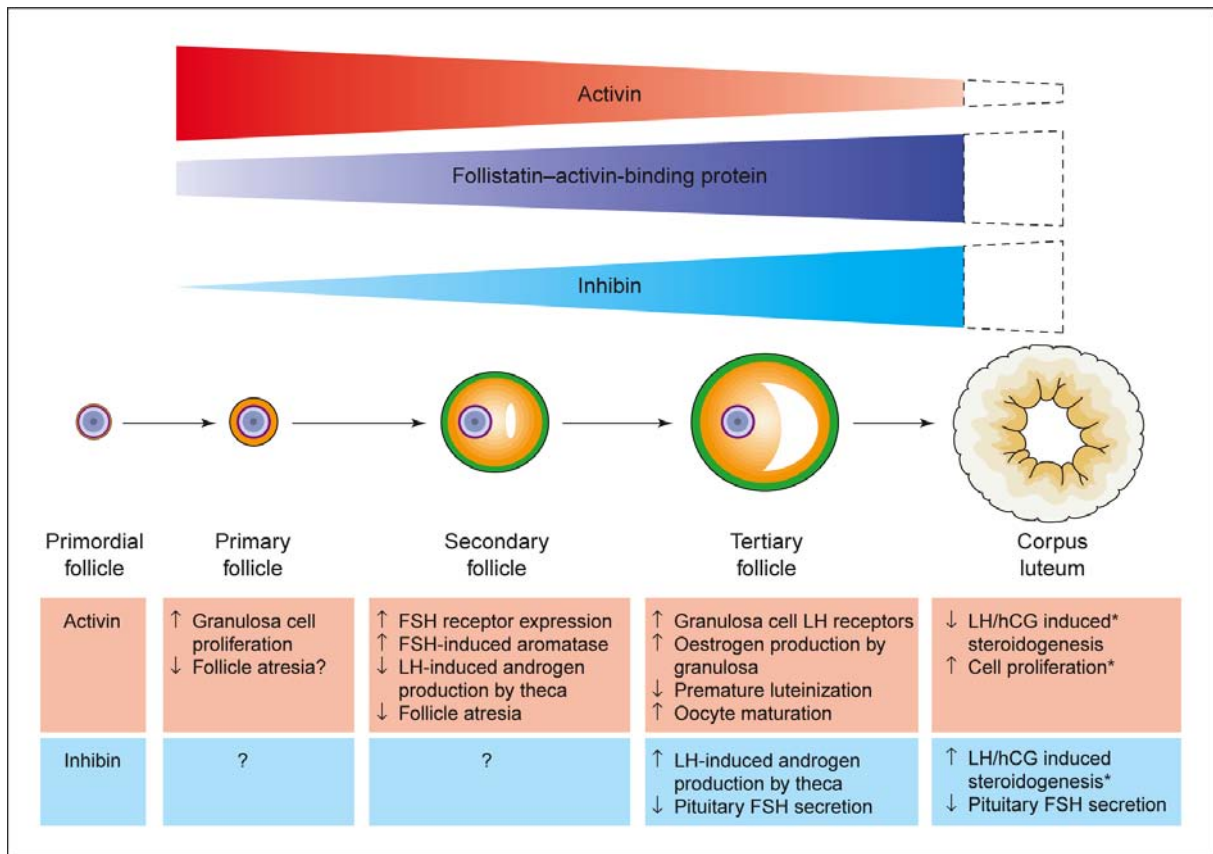


Figure 1.6: Evolution des concentrations d'inhibine, d'activine et de follistatine, et rôles respectifs au cours de la croissance folliculaire (Knight et Glister, 2001).

d) Inhibines, activines et follistatines

L'évolution de la concentration des inhibines, activines et follistatines, ainsi que leurs rôles respectifs au cours de la croissance folliculaire sont résumés **figure 1.6**.

Les inhibines se présentent généralement sous forme dimériques composées d'une sous-unité αC glycosylée, et d'une des deux sous-unités β_A ou β_B non glycosylée. La sous-unité libre αC n'a pas d'activité inhibitrice envers la FSH, contrairement aux formes liées d'inhibine A ($\alpha C-\beta_A$) et B ($\alpha C-\beta_B$) qui inhibent sélectivement la synthèse de la sous-unité β de la FSH (Robertson *et al.*, 1986; Knight *et al.*, 1989). Chez la jument, les concentrations plasmatiques de FSH et l'immunoréactivité de l'inhibine sont inversement corrélées ($r = -0,55$) (Bergfelt *et al.*, 1991), et une immunisation passive anti-inhibine entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de FSH (Nambo *et al.*, 1998; Briant, 2004). Les concentrations d'inhibine commencent à augmenter 7 à 12 jours après ovulation et contribuent, avec l'E2, à la dépression de la FSH. Puis, les concentrations d'inhibine diminuent au début du pic de LH, et sont basses le jour ou le lendemain de l'ovulation suivante. Des quantités importantes d'inhibine et du précurseur de la sous-unité αC (pro- αC) sont retrouvées dans la circulation sanguine au moment de la rupture du follicule et pendant les 4 à 8 heures suivantes, probablement dues à l'absorption du liquide folliculaire (Nagaoka *et al.*, 1999). Le liquide folliculaire des follicules supérieurs à 30 mm contient une grande quantité d'inhibines pro- αC et A. En revanche, le liquide folliculaire des petits (inférieurs à 15 mm) et moyens (15 à 30 mm) follicules contient peu d'inhibines A, B et pro- αC (Tanaka *et al.*, 2000).

Les activines sont également des protéines dimériques, mais comportent 2 sous-unités β . Il existe 3 types d'activines, l'activine A ($\beta_A\beta_A$), l'activine B ($\beta_B\beta_B$), et l'activine AB ($\beta_A\beta_B$). Au cours de la croissance folliculaire, l'expression des activines est inversement corrélée à celle des inhibines. Les activines sont produites par les cellules de la granulosa des follicules immatures, et agissent sur les cellules de la granulosa de follicules plus matures qui ont acquis l'activité aromatasase, en les sensibilisant à la FSH. La FSH stimule la production d'activines. Les activines sont des inhibiteurs de la synthèse des androgènes par les cellules de la thèque dans les petits follicules, et inhibent la lutéinisation dans les follicules matures (Knight et Glistler, 2001).

Les follistatines sont des glycoprotéines monomériques liant avec une haute affinité les activines par leurs sous-unités β (et à un moindre degré les inhibines), neutralisant ainsi leur activité biologique (Knight et Glister, 2001).

2. La croissance folliculaire

Anatomiquement, les ovaires de la jument diffèrent de ceux d'autres espèces domestiques de par leur taille (35 à 120 cm³ de volume), leur poids (40 à 80 g), et la présence d'une fosse ovulatoire (Kimura *et al.*, 2005). Les follicules équins développent un antrum dès 0,3 mm de diamètre (Driancourt *et al.*, 1982), et le plus petit follicule qui peut être détecté par échographie transrectale mesure 2 mm de diamètre. Cependant, ces mesures ont été effectuées avec un appareil 2D et il serait intéressant de réaliser de nouvelles mesures à l'aide d'un appareil 3D équipé ou non d'un Doppler afin d'éliminer toute confusion possible avec des vaisseaux sanguins. La durée nécessaire à un follicule pour passer d'une taille de 0,1 mm à 1 mm est de 2 cycles environ (Driancourt, 1979).

La folliculogénèse lente, dite basale, est suivie d'une folliculogénèse rapide, dite terminale. Cette folliculogénèse terminale, caractérisée par la croissance périodique de cohortes de follicules aussi appelées vagues folliculaires, est très conservée entre espèces domestiques (Driancourt, 2001). On distingue 2 types de vagues folliculaires, majeures ou mineures selon qu'elles aboutissent ou non à une ovulation. Chez la jument, une ou deux vagues folliculaires majeures sont observables au cours d'un cycle (Ginther, 1992). Généralement, la vague folliculaire majeure qui aboutit à l'ovulation démarre au moment de la lutéolyse soit en milieu de cycle, 13 à 14 jours après l'ovulation. Une autre vague folliculaire peut émerger en tout début de phase lutéale, dans approximativement 25% des cas (Bergfelt et Ginther, 1993). Le follicule dominant de cette vague devrait être anovulatoire, or certaines juments peuvent ovuler même en présence de concentrations élevées de progestérone. L'incidence de ce phénomène unique à l'espèce équine est plus forte chez les juments de sport que chez les juments de races poneys (Ginther, 2000). Enfin, des vagues folliculaires mineures (généralement le diamètre du plus gros follicule est inférieur à 30 mm) ont été identifiées à différents stades du cycle avec une incidence inférieure à 25 % (Bergfelt et Ginther, 1993).

La succession d'évènements au cours d'une vague folliculaire est identique entre les espèces domestiques (recrutement, sélection, dominance), seule leur durée diffère.

Le recrutement correspond à l'émergence d'une vague folliculaire, qui débute lorsqu'un follicule atteint le diamètre de 6 mm (Ginther *et al.*, 2001), mais dans une autre étude, ce diamètre a été estimé à 13 mm (Ginther *et al.*, 2003). Le recrutement d'une cohorte intervient au cours d'une période de 3 jours. Un nombre variable de follicules va croître simultanément, à une vitesse moyenne de 1,5 à 2 mm par jour. Le nombre de follicules émergents dans une vague folliculaire varie en fonction de différents facteurs tels que la saison (Donadeu et Ginther, 2003).

La sélection est définie comme la croissance préférentielle d'un follicule (occasionnellement 2). Elle est caractérisée par la différence de diamètre entre les 2 plus gros follicules de la cohorte, lorsque le plus gros follicule atteint approximativement 22 mm (Ginther *et al.*, 2003). Ce phénomène intervient 6 à 7 jours avant l'ovulation. Le follicule sélectionné va continuer de croître, à la vitesse de 3 mm par jour, alors que le reste des follicules de la cohorte va arrêter de croître et rentrer en atresie. Tous les follicules ont la même capacité à devenir dominants, mais cette capacité est perdue 48 heures après la sélection du follicule dominant (Gastal *et al.*, 2004).

La dominance est caractérisée par la croissance du follicule dominant jusqu'à 35-45 mm en moyenne, voir plus, et ce paramètre est relativement constant au cours des cycles pour une même jument (Cuervo-Arango et Newcombe, 2008). La vitesse de croissance est de 3 mm par jour. Le follicule dominant acquiert la capacité d'ovuler en réponse à une stimulation de la LH (endogène ou exogène). Pendant cette période de dominance sont observées la croissance et la maturation terminales du (ou occasionnellement des) follicule(s) pré-ovulatoire(s), la régression par atresie des autres follicules de la cohorte, et le blocage du recrutement de nouveaux follicules (Driancourt, 2001).

3. La dynamique d'un cycle

Avant le recrutement, la croissance et la régression des petits follicules (< 10 mm) se fait indépendamment des gonadotropines ou du statut physiologique de la jument. Le

développement folliculaire est sous la dépendance de divers facteurs de croissance (Fair, 2003).

Le début du **recrutement** est marqué par la dépendance des follicules vis-à-vis des gonadotropines, lorsque ceux-ci atteignent approximativement 10 mm de diamètre (Driancourt, 2001). L'émergence de chaque vague folliculaire est associée à un pic de FSH. La dépendance d'une vague folliculaire vis-à-vis de la FSH a été montrée chez la jument par l'incapacité des follicules à croître au-delà de 15 mm, après suppression de la FSH par injection intraveineuse (i.v.) de fluide folliculaire (Bergfelt et Ginther, 1985). Il est à noter que les préparations de fluide folliculaire sont susceptibles de contenir de l'inhibine, et qu'il n'est pas exclu que l'arrêt de croissance des follicules soit due à l'action de l'inhibine plutôt qu'à une suppression de la FSH. Le pic de FSH associé à la vague folliculaire atteint ses valeurs maximales lorsque la taille du plus gros follicule est d'environ 13 mm (Gastal *et al.*, 1997). Par la suite, les concentrations de FSH diminuent sous l'effet de l'inhibine produite par les follicules approchant les 13 mm (Donadeu et Ginther, 2001), et sous l'effet de la follistatine, produite en quantité croissante au fur et à mesure de la croissance folliculaire (Singh et Adams, 1998), qui se lie à l'activine, diminuant ainsi sa disponibilité. Malgré la diminution des concentrations de FSH, celle-ci supporte la croissance des follicules de la cohorte, jusqu'à ce que le plus gros follicule atteigne approximativement 22 mm. La LH semble peu impliquée dans le recrutement, dans la mesure où celui-ci intervient pendant la phase lutéale, dans un environnement où la pulsativité de la LH est réduite (Driancourt, 2001).

L'initiation de la **sélection** est marquée par une augmentation préférentielle dans le follicule dominant des taux d'IGF-1, d'activine, d'inhibine et d'œstradiol (Beg et Ginther, 2006). Les concentrations d'IGF-1 augmentent 12 heures avant le début de la sélection, alors que l'activine, l'inhibine et l'œstradiol augmentent 24 heures après (Ginther *et al.*, 2005a). Un autre facteur interviendrait dans la sélection, le Vascular Endothelium Growth Factor (VEGF). Les niveaux de VEGF augmentent préférentiellement dans le plus gros follicule et leur augmentation serait due, au moins en partie, à l'IGF-1 (Ginther *et al.*, 2004). Le VEGF est impliqué dans l'augmentation de la vascularisation du futur follicule dominant, avant le début de la sélection (Acosta *et al.*, 2004), ce qui probablement augmente la disponibilité des gonadotropines circulantes pour ce follicule.

Simultanément, lorsque le plus gros follicule a atteint 22 mm, celui-ci acquiert une sensibilité accrue aux gonadotropines (Ginther *et al.*, 2003) due aux quantités plus importantes d'IGF-1

dans ce follicule (Spicer *et al.*, 2005). De plus, le follicule dominant produit de grandes quantités d'inhibine et d'œstradiol, renforçant ainsi l'atrésie des autres follicules de la cohorte (Donadeu et Ginther, 2001). Le rôle critique que jouent les faibles taux de FSH dans les mécanismes de sélection a été mis en évidence chez la jument par administration de FSH (Squires, 2006) ou encore par immunisation anti-inhibine (McCue *et al.*, 1992; Briant, 2004), entraînant le développement de plusieurs follicules ovulatoires par absence de sélection.

De récentes études montrent que la jument n'est pas aussi dépendante vis-à-vis de la LH, que d'autres espèces domestiques, pour la croissance et le développement du follicule dominant pendant les 48 heures qui suivent le début de la sélection (Checura *et al.*, 2010). Il semblerait que la LH n'intervienne pas dans les mécanismes de sélection, mais plutôt dans la croissance du follicule dominant après la sélection. Une étude menée par Bergfelt et collaborateurs a montré qu'une suppression de la LH, provoquée par une administration de P4 pendant 14 jours depuis le 10^{ème} jour après l'ovulation, entraînait la régression du follicule dominant (Bergfelt *et al.*, 2001). Une autre étude menée par Briant et collaborateurs a montré qu'une administration d'un antagoniste de GnRH (antarelix) par voie i.v. 2 fois par jour au moment où le follicule atteint 32 mm entraînait la régression du follicule dominant (Briant *et al.*, 2003).

De plus, le follicule dominant est celui qui comporte le plus grand nombre de récepteurs à la LH comparé aux autres follicules (Fay et Douglas, 1987; Goudet *et al.*, 1999). Ces récepteurs sont déjà présents sur les cellules de granulosa quand le follicule atteint 5 mm, et leur quantité augmente au fur et à mesure que le diamètre folliculaire augmente (Goudet *et al.*, 1999).

La sélection est donc caractérisée par :

- 1) une augmentation de la dépendance du follicule dominant envers la LH
- 2) une augmentation des concentrations libres d'IGF-1 dans le liquide folliculaire due à une moindre liaison avec les IGF binding proteins (IGFBP) contrairement aux autres follicules de la cohorte (Gerard et Monget, 1998)
- 3) une augmentation de l'inhibine
- 4) une augmentation de l'E2.

La **dominance**, ou phase pré-ovulatoire, est sous la dépendance de la LH, qui est déterminante dans la croissance finale du follicule et dans le développement de sa capacité à ovuler en réponse à un pic de LH (Donadeu et Watson, 2007). La LH va également stimuler la production d'androgènes par les cellules de la thèque. Le follicule pré-ovulatoire présente une stéroïdogenèse maximale. L'augmentation de la quantité d'aromatase (enzyme de conversion

des androgènes en œstrogènes) induit une synthèse plus importante de 17β -œstradiol. La progestérone, sécrétée par les cellules de la granulosa en réponse à des taux élevés de LH, augmente, et participerait en tant que substrat à une sécrétion accrue d'E2 (Sirois *et al.*, 1991). Les fortes concentrations de P4 et d'E2 sont associées à des quantités accrues d'IGF-1. De plus, l'IGF-1 est capable de stimuler *in vitro* la production 1) de la P4 par les cellules de granulosa, 2) d'androgènes par les cellules de la thèque, 3) de l'E2 par les cellules de granulosa dans certaines espèces (Spicer et Echtenkamp, 1995).

L'**ovulation** est dépendante de l'augmentation préalable de la LH. Cependant, l'ovulation peut avoir lieu après une augmentation relativement faible de la LH endogène. En effet, l'injection d'un antagoniste de GnRH, en présence d'un follicule pré-ovulatoire de 32 mm, induit la suppression de la quasi-totalité du pic péri-ovulatoire de LH mais n'empêche pas l'ovulation de se produire. Il semblerait ainsi qu'une augmentation des concentrations plasmatiques de LH correspondant environ au quart de la valeur du pic soit suffisante pour permettre l'ovulation (Briant *et al.*, 2003).

Les concentrations de P4 dans le fluide folliculaire augmentent pendant la phase pré-ovulatoire, et juste avant ovulation, le rapport E2/P4 s'inverse.

Les concentrations plasmatiques de P4 augmentent plus rapidement après ovulation chez la jument que chez la brebis, et il semble que l'hypothalamus de la jument réponde relativement lentement au rétrocontrôle négatif exercé par la P4. Une étude montre que le rétrocontrôle négatif de la P4 ne serait effectif qu'entre 2 et 3 jours après ovulation (Irvine et Alexander, 1997). Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi les concentrations plasmatiques de LH continuent à augmenter après l'ovulation pour atteindre un maximum 1 à 2 jours après ovulation puis diminuent lentement pour atteindre les niveaux de phase lutéale environ 4 jours après ovulation (Ginther, 1992).

Au niveau moléculaire, le processus de l'ovulation fait intervenir différentes cascades d'évènements dont certaines sont abordées ci-dessous.

Des études menées sur des cellules de granulosa de rat montrent que la LH, en se fixant à ses récepteurs, entraîne une augmentation des taux intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et d'inositol triphosphate (IP3) (Davis *et al.*, 1986). Il s'ensuit l'activation d'une protéine kinase (AMPC dépendante) qui induit une cascade de phosphorylations et

d'activation de facteurs de transcription qui vont réguler l'expression des gènes-cibles (Richards et Hedin, 1988) et modifier l'activité stéroïdienne.

L'ovulation est associée à une réaction de type inflammatoire (Espey, 1980). La synthèse de cytokines inflammatoires, de prostaglandines et de cortisol augmente dans le follicule pré-ovulatoire au moment de l'ovulation. L'interleukine-1 (IL-1) activerait notamment la synthèse de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et induirait de ce fait la production de prostaglandines par les cellules de granulosa (Martoriati et Gerard, 2003; Gerard *et al.*, 2004).

Enfin, chez la jument, la rupture du follicule se produit au niveau de la fosse ovulatoire. Contrairement à d'autres espèces, le cortex qui est le site de développement des follicules est en position interne, et la medulla qui constitue la zone vascularisée est en position externe et forme une tunique fibreuse recouvrant l'ovaire. Seule la fosse ovulatoire est dépourvue de cette tunique fibreuse (Ginther, 1992).

La **lutéolyse** est provoquée par la prostaglandine $\text{PGF}_{2\alpha}$. La $\text{PGF}_{2\alpha}$, ou ses analogues, entraîne la régression du corps jaune dans les 24 heures si celui-ci est âgé d'au moins 5 jours. Chez la jument, l'injection intra musculaire (i.m.) d'un analogue de la $\text{PGF}_{2\alpha}$ induit une diminution des concentrations plasmatiques de P4 qui atteignent des valeurs de $1,2 \pm 0,4$ ng/ml dans les 24 heures suivant l'injection (Noden *et al.*, 1978). Il est à noter que les mêmes effets sont observés lors d'une lutéolyse non induite. Une stimulation transitoire de la LH est observée dans les 30 minutes post injection, et le retour au niveau basal est observé 4 heures après (Noden *et al.*, 1978). Des données plus récentes montrent une stimulation transitoire de la sécrétion de LH et de FSH au niveau du sinus veineux sous-hypophysaire, environ 7 ± 1 min après l'injection de $\text{PGF}_{2\alpha}$, non associée à un pulse de GnRH (Irvine et Alexander, 1997). Ces données suggèrent que la $\text{PGF}_{2\alpha}$ stimulerait directement l'inositol triphosphate dans les cellules gonadotropes, comme c'est le cas chez la brebis (Denning-Kendall et Wathes, 1994).

4. Les variations physiologiques du cycle

Le cycle peut présenter des variations naturelles dues à différents facteurs tels que l'état d'engraissement, l'âge ou encore la race. En voici quelques exemples :

L'apport nutritionnel influence la croissance folliculaire et les taux de LH chez la jument. En effet, l'intervalle de temps entre une injection de PGF2 α et l'ovulation est plus court chez les juments de race poney « bien nourries » ($9,2 \pm 0,6$ jours) que chez les juments de race poney « restreintes » ($11,6 \pm 0,5$ jours), et les valeurs plasmatiques maximales du pic péri-ovulatoire de LH sont plus élevées chez les « bien nourries » ($7 \pm 1,2$ ng/ml) que chez les « restreintes » ($4,7 \pm 0,5$ ng/ml) (Salazar-Ortiz J., 2004).

L'âge peut influencer la longueur des cycles. Les juments âgées (> 20 ans) présentent un intervalle inter-ovulation qui peut être plus long que celui des juments jeunes (5 à 7 ans) : ceci serait dû à une vitesse de croissance du follicule dominant plus lente (Carnevale *et al.*, 1993). Une réduction de l'activité folliculaire et de la fréquence des ovulations peut être observée chez les juments âgées de 25 ans ou plus, associée à une augmentation des concentrations plasmatiques de LH et de FSH pendant la phase folliculaire. Il a été suggéré que les concentrations élevées de FSH accélèrent l'épuisement du réservoir de follicules primordiaux, comme cela est le cas chez la femme (Carnevale, 2008).

La saison influence la taille du follicule pré-ovulatoire, avec une taille plus importante en début de saison sexuelle (février) et une taille plus petite en fin de saison (fin août) (Morel *et al.*, 2010). La persistance du corps jaune semble être plus fréquente à l'automne probablement due à une diminution du signal permettant la libération de prostaglandines (King *et al.*, 2010). La persistance des corps jaunes se manifeste par un allongement de la phase lutéale qui dure en moyenne 60 jours, mais peut varier de 35 à 95 jours (Stabenfeldt *et al.*, 1974).

Une corrélation existe entre certains phénomènes et **la race**, comme en témoignent les exemples suivants :

Les ovulations multiples :

Chez la jument, l'incidence des ovulations multiples est de 2 à 30 %. Parmi ces ovulations multiples, la grande majorité est double (99 %). La race « pur sang » présente l'incidence la plus élevée d'ovulations multiples (20 à 30 %) et les races « poney » la plus faible (2 %) (Ginther, 1992). Il y aurait également un effet saison puisque la fréquence des ovulations multiples semble être plus importante à partir de juillet jusqu'à la fin de la saison (Wesson et Ginther, 1981). La répétabilité des ovulations multiples chez un même individu est élevée et

peut atteindre 75 % des cycles, ce qui suggère une prédisposition génétique. Cependant, l'héritabilité de ce caractère n'est que de 0,06 dans le troupeau expérimental de l'INRA de Nouzilly (Briant, 2004). Les doubles ovulations sont associées à une concentration élevée en E2, et une concentration faible en FSH. La concentration en LH n'est pas différente de celle des cycles présentant une ovulation simple (pour revue (Ginther *et al.*, 2008a)).

Les doubles ovulations ne sont pas souhaitables dans l'espèce équine, sauf bien sûr pour les juments impliquées dans des protocoles de transferts d'embryons. En effet, chez la jument les gestations gémellaires sont suivies généralement d'une mortalité embryonnaire ou d'un avortement.

Les ovulations en phase lutéale

L'ovulation chez la jument peut avoir lieu au cours de la phase lutéale. Ce type d'ovulation est observé dans environ 21 % des cycles, et n'est pas accompagné de signes de chaleurs, du fait de la présence de la progestérone (Ginther, 1992). Là encore le pourcentage varie en fonction de la race, avec une incidence élevée chez les juments de race « pur sang » et « quarter-horse » et une incidence faible chez les juments de race « poney ».

Enfin, d'autres variations naturelles sont observées, sans lien évident avec l'un des différents facteurs évoqués précédemment. Il s'agit des follicules anovulatoires. Dans la littérature, il existe une certaine confusion entre les termes de follicules hémorragiques et lutéinisés, mais ils sont tous deux considérés comme étant des follicules anovulatoires atteignant une taille importante. De plus, l'échographie 2D utilisée en routine ne permet pas de les différencier avec certitude. La terminologie utilisée en médecine humaine pour désigner ce type de follicule est plus claire puisqu'ils sont dénommés follicules lutéinisés non rompus ou LUF (luteinized unruptured follicle).

➤ Les follicules hémorragiques (HAFs)

A l'échographie, ces follicules se développent normalement jusqu'à la taille ovulatoire et peuvent atteindre une taille supérieure à 45 mm, mais ne se rompent pas et leur cavité se remplit de sang. Il en résulte donc une anovulation. Toutefois, les concentrations plasmatiques de P4 atteignent des valeurs supérieures à 1 ng/ml chez 85,7 % des juments présentant des HAFs, traduisant l'apparition d'une structure lutéale (McCue, 2002). L'incidence des HAFs est relativement faible (5 à 8 %), Ce phénomène semble être répétable pour une même jument, et serait associé à une concentration plasmatique élevée en LH (Ginther *et al.*, 2008c). Dans la

littérature, c'est ce terme de follicules hémorragiques qui est généralement désigné pour faire référence aux follicules anovulatoires.

➤ Les follicules lutéinisés

Ce type de follicules peut également atteindre une taille importante (> 45 mm). Tout comme le HAF, le follicule lutéinisé ne se rompt pas mais celui-ci se remplit peu à peu de cellules sécrétant de la progestérone (McKinnon et Voss, 1993).

B. L'anœstrus saisonnier

Sous nos latitudes, l'anœstrus saisonnier a lieu généralement entre octobre et mars. Il est caractérisé au niveau anatomique par une diminution de la taille des ovaires due à l'absence ou à la réduction de l'activité folliculaire, et au niveau endocrinien par de faibles concentrations plasmatiques de LH et de P4.

La photopériode gouverne la sécrétion de la mélatonine produite la nuit par la glande pinéale. Chez les espèces à reproduction saisonnée, la photopériode est un facteur environnemental prédominant pour synchroniser l'activité saisonnée de reproduction. Elle restreint la fertilité des animaux à un moment précis de l'année, qui, en fonction de la durée de gestation de l'espèce considérée, permet d'obtenir les naissances des jeunes lorsque les conditions environnementales sont favorables. Les espèces de jours longs, telles que le cheval ou le hamster, ont une activité de reproduction qui va être stimulée lorsque les jours sont longs et les nuits courtes. Inversement, pour les espèces de jours courts telles que le mouton, l'activité de reproduction est stimulée lorsque les jours sont courts et les nuits longues.

Chez les espèces de jours longs, la mélatonine sécrétée en plus grande quantité lors des longues nuits d'hiver contribue à la réduction de la sécrétion de la GnRH. Le rythme circadien de sécrétion de la mélatonine est aboli lorsque les juments sont exposées à une obscurité constante. La sécrétion de mélatonine présente alors des fluctuations en libre-cours (Kilmer *et al.*, 1982).

Chez la jument, selon Hart et collaborateurs, le contenu hypothalamique de GnRH, mesuré après extraction du tissu hypothalamique, varie au cours des saisons, avec une diminution

significative du contenu hypothalamique en GnRH en décembre (Hart *et al.*, 1984). Cependant, d'autres groupes n'observent pas de variation saisonnière significative dans la quantité totale de GnRH au niveau de l'hypothalamus (Strauss *et al.*, 1979; Silvia *et al.*, 1986), mais une variation dans le contenu en GnRH des différentes régions étudiées (Strauss *et al.*, 1979). Les différentes études portant sur l'analyse du contenu hypothalamique en GnRH ne permettent donc pas d'établir avec certitude si des variations saisonnières existent. En revanche, toutes s'accordent sur le fait que le nombre de récepteurs à la GnRH au niveau de l'hypophyse antérieure est relativement constant au cours des saisons (Hart *et al.*, 1984; Silvia *et al.*, 1986; Townsend *et al.*, 2009).

La sécrétion de la GnRH, mesurée par la technique de perfusion push-pull au niveau de l'hypothalamus médio-basal, est significativement plus faible pendant l'anœstrus chez la jument (Sharp et Grubaug, 1987). De même, il est clairement établi que chez la brebis, l'anœstrus saisonnier est caractérisé par la diminution de la fréquence des pulses de GnRH (Barrell *et al.*, 1992). Cependant, l'analyse des résultats issus d'une récente étude chez la jument, utilisant la cannulation de la veine faciale superficielle afin de récupérer du sang veineux hypophysaire, montre que la pulsativité de la GnRH serait constante au cours des saisons, et ne serait donc pas impliquée dans l'initiation de la saison d'anœstrus. En effet le profil et l'amplitude de sécrétion de la GnRH sont constants au cours des saisons. Par contre, la concentration de la LH et l'amplitude des pulses de LH dans le sinus veineux sous-hypophysaire sont réduits, mais pas la fréquence des pulses de LH. Ces résultats suggèrent ainsi que la sensibilité à la GnRH des cellules hypophysaires à la LH serait réduite pendant la saison d'anœstrus (Cooper *et al.*, 2006). Cependant, un certain nombre de réserves peuvent être faites concernant les conclusions de cette étude. En effet, elle ne prend pas en compte le fait qu'une partie de la GnRH est fixée à ses récepteurs et qu'une autre est probablement dégradée. De plus, une perte non négligeable de GnRH est probablement effective du fait de toutes les ramifications veineuses de l'hypophyse.

Au niveau de l'hypophyse, il n'existe pas de variations saisonnières dans la densité des cellules gonadotropes au niveau de la pars distalis chez la jument. En revanche, au niveau de la pars tuberalis, la densité des cellules gonadotropes est diminuée par 5 pendant la période d'anœstrus saisonnier (Tortonese *et al.*, 2001). Il n'y a pas de variation saisonnière de la densité de cellules bihormonales. En revanche, la densité de cellules monohormonales est plus faible pendant l'anœstrus saisonnier (9,7% des cellules gonadotropes contre 22,5 % pendant la saison sexuelle) (Eagle et Tortonese, 2000).

Cette hétérogénéité dans la distribution et le stockage des hormones gonadotropes FSH et LH traduit une régulation différentielle de ces hormones au cours des saisons.

Le contenu hypophysaire en FSH semble relativement constant au cours des saisons, alors que des variations du contenu hypophysaire en LH sont observées (Hart *et al.*, 1984).

Pendant la saison d'anœstrus, les concentrations plasmatiques (Garcia et Ginther, 1976) et hypophysaires (Hart *et al.*, 1984) de LH sont significativement plus faibles. De récentes études montrent qu'au niveau de la pars distalis, en période d'anœstrus, le nombre de cellules non-gonadotropes tend à être augmenté, alors que le nombre de cellules gonadotropes à LH ne varie pas, ou très peu (Tortonese *et al.*, 2001), ce qui a pour conséquence une diminution de la proportion de cellules gonadotropes à LH (Townsend *et al.*, 2009). Il existerait donc un décalage entre le taux de synthèse et la libération de la LH chez la jument, pendant la saison d'inactivité.

Pendant la saison d'anœstrus chez la jument, l'acide ribonucléique messager (ARNm) de la sous-unité β de la FSH est augmenté, et l'ARNm de la sous-unité α (commune à LH et FSH) est diminué (Townsend *et al.*, 2009). Ce résultat est cohérent avec la pulsativité de la GnRH qui est réduite pendant l'anœstrus (Sharp et Grubbaugh, 1987), induisant ainsi préférentiellement l'expression de la sous-unité β de eFSH (Kaiser *et al.*, 1997). De plus, l'inhibine diminue la transcription de l'ARNm de FSH β chez la brebis (Clarke *et al.*, 1993), or les taux d'inhibine sont bas chez la jument pendant l'anœstrus (Donadeu et Ginther, 2002). Il n'est donc pas surprenant que l'amplitude des pulses et les concentrations plasmatiques de la FSH soient élevées pendant la période d'anœstrus chez la jument (Hines *et al.*, 1991). Enfin, il est à noter que des variations saisonnières de la sécrétion des gonadotropines sont observées chez des juments ovariectomisées (Fitzgerald *et al.*, 1983), suggérant ainsi que ces variations sont en partie indépendantes des stéroïdes ovariens.

Dans l'environnement hormonal de l'anœstrus saisonnier, seuls sont présents sur les ovaires de petits follicules, généralement inférieurs à 15 mm de diamètre. Cependant, des vagues folliculaires mineures peuvent émerger périodiquement avec un plus gros follicule inférieur à 21 mm. Les concentrations plasmatiques d'E2 sont généralement basses pendant l'anœstrus, et n'augmentent pas avec l'émergence des vagues folliculaires successives (Oxender *et al.*, 1977). Cependant, quelques fluctuations des concentrations plasmatiques d'E2 peuvent être observées sans pour autant être associées à des vagues folliculaires (Donadeu et Ginther, 2002).

Malgré les taux bas d'œstrogènes, certaines juments présentent des signes d'œstrus pendant l'anœstrus profond (follicules inférieurs à 15 mm) mais aussi pendant la période de transition vers la saison sexuelle (follicules supérieurs à 21 mm) (Palmer et Jousset, 1975; Donadeu et Ginther, 2002). Ce comportement d'œstrus serait dû aux androgènes produits par les surrénales (Ginther, 1992), puisqu'il est également observé chez des juments de race poney ovariectomisées (Asa *et al.*, 1980).

La faible stéroïdogénèse des follicules durant l'anœstrus est probablement due à une diminution de la vascularisation des follicules (contenu pauvre en VEGF), et au faible développement des cellules de la thèque, produisant ainsi moins d'androgènes (Watson et Al-Zi'abi, 2002), ainsi qu'aux taux de LH relativement bas (Garcia et Ginther, 1976).

Cette diminution du développement folliculaire est attribuée au déficit en LH ou à une sensibilité différente aux gonadotropines, plutôt qu'à un déficit en FSH (Donadeu et Watson, 2007). Enfin, au cours de la transition vers l'anœstrus saisonnier, la diminution de la biodisponibilité en IGF-1 dans le fluide folliculaire empêcherait le follicule d'acquérir la compétence à ovuler (Watson *et al.*, 2004), et cette diminution d'IGF-1 serait fortement influencée par l'état nutritionnel de la jument (Salazar-Ortiz *et al.*, 2011).

Après avoir présenté certaines caractéristiques endocriniennes et folliculaires de l'anœstrus saisonnier, il est intéressant d'évoquer brièvement les variations de la LH, de la FSH et de l'E2 lors de la reprise de la cyclicité.

Lors de la transition de l'anœstrus saisonnier vers la saison sexuelle, les concentrations plasmatiques et l'amplitude des pulses de FSH qui étaient élevées pendant l'anœstrus (Hines *et al.*, 1991), diminuent progressivement pendant les 60 derniers jours de l'anœstrus, et plus fortement durant les 20 derniers jours (Freedman *et al.*, 1979). Les auteurs de cette étude suggèrent que la sensibilité des follicules à la FSH augmenterait aux abords de la saison sexuelle. De plus, comme cela est le cas chez la brebis, une augmentation des isoformes de la FSH ayant un temps moyen de résidence plus long pourrait avoir lieu lors du passage de l'anœstrus vers la saison sexuelle (Moore *et al.*, 2000).

Les concentrations plasmatiques et le contenu hypophysaire en LH, faibles pendant l'anœstrus saisonnier, commencent à augmenter peu de temps avant la première ovulation (Silvia *et al.*, 1986).

Nous avons vu précédemment que les concentrations plasmatiques d'E2 présentaient quelques fluctuations non synchrones avec les vagues folliculaires observées pendant l'anœstrus saisonnier (Donadeu et Ginther, 2002). En revanche, pendant la phase de transition vers la

saison sexuelle, l'E2 plasmatique augmente légèrement avec la croissance de gros follicules (25-40 mm) (Watson et Al-Zi'abi, 2002).

C. Les traitements de maîtrise du cycle chez la jument

Dans les paragraphes précédents, nous avons décrit les principales caractéristiques de la reproduction chez la jument. Pendant la saison sexuelle, la durée des cycles présente des variations incompatibles avec une prédiction fiable du moment précis de l'ovulation. Or, les techniques actuelles d'élevage font appel principalement à l'insémination artificielle et nécessitent donc une parfaite synchronisation entre l'ovulation et l'insémination. En fonction de la qualité de la semence, de son mode de conservation et de la fertilité de la jument, l'insémination doit être réalisée dans les 6 à 48 heures avant l'ovulation.

Le principe des traitements de maîtrise du cycle chez la jument est de pouvoir s'affranchir de la variabilité de la phase folliculaire en maîtrisant le début des chaleurs ou encore le moment de l'ovulation, afin d'optimiser la prédiction de l'ovulation, et augmenter ainsi les chances de conception d'un embryon. La plupart de ces traitements nécessite néanmoins un suivi échographique des juments.

1. En période de cyclicité

a) Synchronisation de l'œstrus

Le principe est d'induire l'œstrus d'une jument ou d'un groupe de juments à un moment donné, afin de prédire ou de synchroniser le démarrage de l'œstrus. Cependant, ce processus ne permet pas la synchronisation des ovulations. Différents traitements sont applicables pendant la saison de reproduction, et peuvent être utilisés seuls ou combinés avec d'autres traitements. Sont représentés ci-dessous quelques exemples de traitements :

- Les progestagènes (ex : l'altrenogest = Régumate équin ®, Intervet, Beaucouze, France):

Une étude montre qu'une administration orale de 27 mg d'altrenogest par jour pendant 15 jours permet la suppression de l'œstrus chez 94 % des juments traitées. Après l'arrêt du

traitement, les juments présentent un œstrus dans un délai moyen de 4,4 jours (Webel et Squires, 1982).

Selon les recommandations du fournisseur, la posologie par voie orale est de 0,044 mg d'altrenogest par kg de poids vif et par jour, pendant 8 à 10 jours. Environ 90 % des juments présentent des signes d'œstrus dans les 5 jours après l'arrêt du traitement, et 60 % des juments ovulent dans les 11 à 14 jours après l'arrêt du traitement.

Le principe est de maintenir les juments en phase lutéale, en induisant l'atrésie de tous les follicules dépendants de la LH. A l'arrêt du traitement, la levée de l'inhibition entraîne le recrutement d'une nouvelle vague folliculaire. Cependant, la reprise de la croissance folliculaire est très variable selon les juments, et certaines montrent une croissance folliculaire sous traitement. Il n'est donc pas possible de synchroniser efficacement les ovulations avec ce traitement (Lofstedt et Patel, 1989).

- Les analogues de la prostaglandine F2 α (ex : le luprostiol = Prosovin[®], Intervet, Beaucouze, France):

La posologie est de 7,5 mg de luprostiol (soit 1 ml de Prosovin[®]) par voie i.m, en une seule injection.

Ce traitement entraîne la régression du corps jaune fonctionnel dans les 24 heures, si le corps jaune est âgé d'au minimum 5 jours. L'œstrus apparaît alors dans les 2 à 4 jours après le traitement, et l'ovulation dans les 7 à 12 jours qui suivent (Loy *et al.*, 1979). Là encore la synchronisation efficace de l'ovulation n'est pas possible, du fait de la variabilité de la durée de la phase folliculaire chez la jument, et du diamètre du plus gros follicule lors de la lutéolyse.

Ces 2 traitements peuvent être combinés selon un protocole, mis au point par l'INRA de Nouzilly et proposé par les Haras Nationaux, consistant à administrer le Régumate[®] Equin pendant 8 jours, suivi par une injection unique de Prosovin[®], suivi ou pas d'une injection de Chorulon[®] afin de déclencher l'ovulation dans les 48 heures. Bien que la fertilité ne semble pas altérée suite à ce type de traitement, l'ovulation ne peut pas être prédite au jour près notamment à cause de la variabilité de réponse au progestagène (Régumate[®] Equin).

Profils plasmatiques de la LH et de l'E2 suite à l'administration de hCG (hormone chorionique humaine)

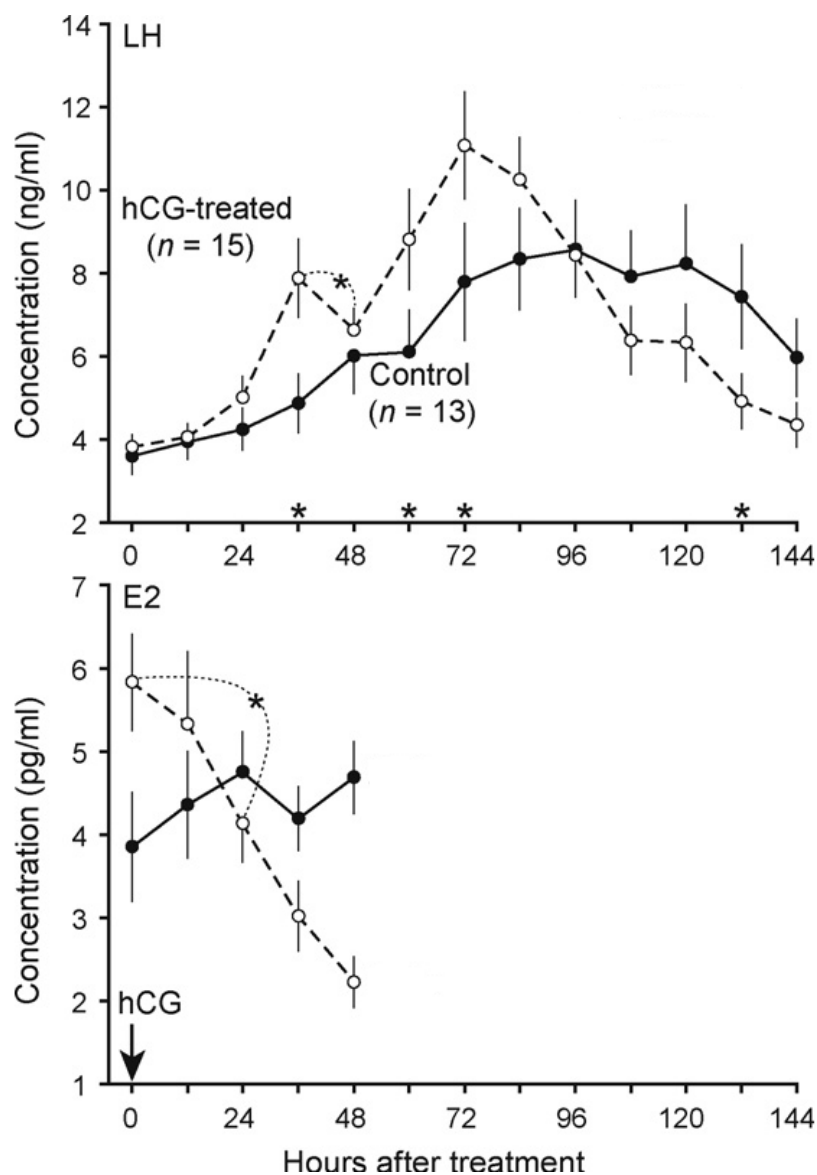


Figure 1.7 : Evolution moyenne (\pm SEM) des concentrations plasmatiques de LH et d'E2 suite à une administration de 2500 UI d'hCG par voie i.v. à des juments présentant d'un follicule pré-ovulatoire de 35 mm et d'un utérus œdémateux. Les ovulations sont constatées entre 12 et 48 heures après l'injection chez les traitées hCG, et dans les 48 à 108 heures chez les témoins. D'après (Ginther *et al.*, 2009).

b) Induction de l'ovulation pendant l'œstrus

Nous avons vu que différents traitements existent pour synchroniser l'œstrus, mais il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement permettant de synchroniser les ovulations. En revanche, il est possible d'induire l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire à l'aide de différentes molécules.

Chez la jument, le follicule en croissance devient sensible à une dose ovulatoire de LH vers 32 mm (Ginther, 1992) et les remaniements au niveau du follicule sont visibles 30 heures après administration de l'hormone chorionique humaine (hCG) (Kerban *et al.*, 1999).

L'ovulation est observée en moyenne 36 heures après une administration par voie i.v. de eLH recombinante (Yoon *et al.*, 2007) ou d'une molécule à activité LH comme hCG (Ginther, 1992). Les délais relativement courts semblent refléter une maturation accélérée du follicule pré-ovulatoire, probablement à cause d'une stimulation supra-physiologique due à une activité LH importante de ces molécules. Lors de ces administrations de fortes doses de LH exogène, le follicule ovule quelque soit le niveau d'E2 présent à ce moment là. De plus il est intéressant de souligner qu'une injection d'hCG entraîne une diminution immédiate des concentrations plasmatiques d'E2 (**figure 1.7**) (Ginther *et al.*, 2009).

Les analogues de la GnRH peuvent être également utilisés pour induire l'ovulation chez la jument cyclique. L'acétate de buséréline, par exemple, est un analogue synthétique de la GnRH. Ses effets sur la sécrétion des hormones LH et FSH sont 20 à 170 fois supérieurs à ceux de la GnRH, et sa demi-vie est également plus longue.

Les traitements d'induction d'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire sont donc généralement appliqués en présence d'un follicule en croissance supérieur à 35 mm chez la jument, et supérieur à 33 mm chez la jument poney, en présence d'un utérus œdémateux reflétant la sécrétion d'œstrogènes. Ces traitements nécessitent donc un suivi échographique des juments afin de repérer le follicule pré-ovulatoire.

Les molécules énumérées ci-dessous ont une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France pour l'espèce équine. Leur administration est associée à un suivi échographique des juments afin de suivre la croissance du follicule pré-ovulatoire :

L'hormone chorionique humaine (hCG) = Chorulon® (Intervet, Beaucouze, France)

La buséréline (analogue de la GnRH) = Réceptal® (Intervet, Beaucouze, France)

Tableau 1.1 : Différents traitements ayant une AMM en France, pour l'induction de l'ovulation d'un follicule de taille préovulatoire (au minimum 33-35 mm de diamètre) et en présence d'un utérus œdémateux. D'après (Barrier-Battut *et al.*, 2001; Samper, 2008).

	Chorulon® (hCG)	Réceptal® (buséreléline)	Ovuplant® (desloréline)
Posologie	Une injection de 1500 UI par voie i.v.	<ul style="list-style-type: none"> • 4 injections de 20 µg par voie i.v. toutes les 12 heures, ou • 3 injections de 13.3 µg par voie i.v. toutes les 6 heures 	Insertion sous-cutanée de l'implant contenant 2,1 mg de Desloréline
Résultats	Entre 75 et 85 % d'ovulation dans les 48 heures suivant l'injection (la moyenne étant de 36 à 38 heures)	<ul style="list-style-type: none"> • 90 % d'ovulation dans les 48 heures après la première injection • 60 % d'ovulation dans les 48 heures après la première injection 	Jusqu'à 95 % des juments ovulent dans les 36 à 48 heures
Avantages	Efficacité intéressante Fertilité des cycles traités identique aux cycles témoins	Pas de formation d'anticorps	Pas de formation d'anticorps
Inconvénients	Des injections répétées au cours d'une même saison, ou des doses élevées (> 2500 UI) peuvent induire la formation d'anticorps du fait de l'origine humaine de l'hormone.	Coût des injections répétées Contrainte des injections répétées	Coût élevé Nécessité de retirer l'implant au bout de 48 heures si la jument n'a pas été fécondée, sinon risque d'augmentation de l'intervalle inter-oestrus

La desloréline (analogue de la GnRH) = Ovuplant® (Arnolds Veterinary Products Limited, Royaume-Uni.)

Les protocoles d'administration de ces 3 molécules, les résultats qu'elles permettent d'obtenir ainsi que leurs avantages et inconvénients sont synthétisés dans le **tableau 1.1**. Seules y sont indiquées les posologies actuellement utilisées par les vétérinaires praticiens. Les profils plasmatiques, notamment ceux de la LH, suite à l'administration de hCG, buséréline ou desloréline, sont présentés **figure 1.7**, **figure 1.8** et **figure 1.9** respectivement.

Parmi ces différents traitements, le Chorulon® est celui qui est actuellement le plus utilisé. Cependant, du fait que l'hormone est extraite de l'urine de femmes enceintes, ce produit risque d'être à plus ou moins long terme retiré du marché pour des raisons d'éthique et/ou sanitaires. De plus, cette molécule ne s'inscrit pas dans une démarche de «reproduction assistée sans hormone d'origine biologique» qui devient une préoccupation sociétale majeure. Enfin, il semblerait qu'il y ait une tendance ($P = 0,054$) à ce que les juments traitées avec le Chorulon® développent plus de follicules anovulatoires que les juments non traitées (Cuervo-Arango et Newcombe, 2009).

Au plan expérimental, d'autres traitements ont été proposés mais ne disposent pas d'AMM :

- une injection de 25 mg d'extraits hypophysaires équins par voie i.m., réalisée 2 fois par jour depuis le 5^{ème} jour après ovulation, augmente le nombre d'ovulations chez 70% des jument traitées, avec en moyenne 3 ovulations par jument (Woods et Ginther, 1983; Alvarenga *et al.*, 2001; Scoggin *et al.*, 2002). Par ailleurs, une injection unique de 60 mg d'extraits hypophysaires équins par voie i.v. ou s.c., réalisée lorsque le follicule pré-ovulatoire atteint 35 mm, permet d'obtenir une ovulation dans les 24 à 48 heures qui suivent chez 86 % des juments (Duchamp *et al.*, 1987).

Cette préparation, contenant à la fois LH et FSH, est issue de la purification des extraits hypophysaires équins selon la méthode décrite par Guillou et Combarous (Guillou et Combarous, 1983). Les inconvénients de ces préparations sont d'une part la variabilité des taux de LH (6 à 10 %) et de FSH (2 à 4 %) entre les différents lots, et d'autre part le nombre important d'hypophyses nécessaires (6 g d'extrait par hypophyse), rendant sa commercialisation impossible (Squires, 2006). De plus, l'origine de ce type de préparation engendre des interrogations quant à leur sécurité sanitaire.

Profils plasmatiques de la LH suite à l'administration de buséréline (analogue de la GnRH)

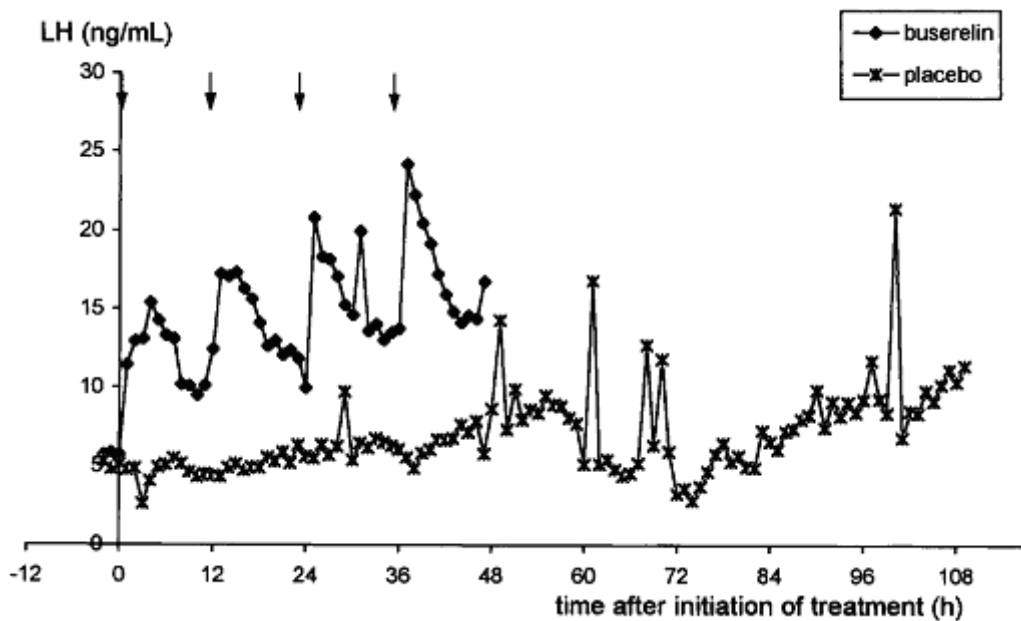


Figure 1.8 : Evolution moyenne des concentrations plasmatiques de LH chez des juments recevant 4 injections de buséréline (40 μ g) (n = 5) ou de placebo (n = 5) à 12 heures d'intervalle, en présence d'un follicule pré-ovulatoire de 33 mm. D'après (Barrier-Battut *et al.*, 2001).

Profils plasmatiques des gonadotropines suite à l'administration de desloréline (analogue de la GnRH)

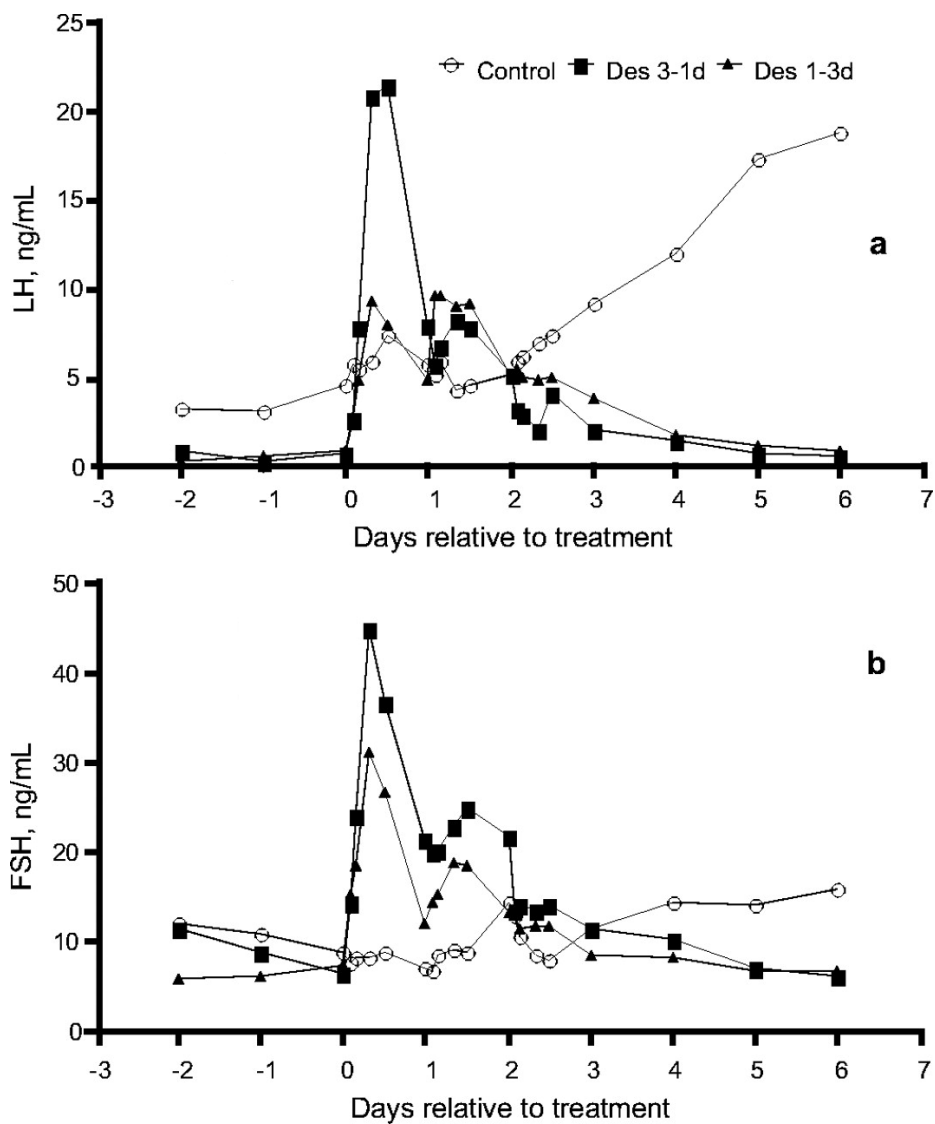


Figure 1.9 : Evolution moyenne des concentrations plasmatiques de LH (a) et FSH (b) de 21 juments recevant un ou plusieurs implants contenant de la desloréline en présence d'un follicule > 30 mm lors du premier œstrus de la saison sexuelle. Lot Des 3-1 d = 3 implants contenant de la desloréline sont insérés en 1 fois ; Lot Des 1-3 d = 1 implant contenant de la desloréline est inséré chaque jour pendant 3 jours. Un implant contient 2,1 mg de desloréline. D'après (Johnson *et al.*, 2003).

- une injection unique d'acétate de buséréline (6,3 mg d'acétate de buséréline, soit 6 ml de Suprefact®, Aventis Pharma, Francfort, Allemagne) par voie s.c. induit l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire dans les 24 à 48 heures dans 89% des cas, contre 27% chez les témoins (Levy et Duchamp, 2007).

- une administration unique de eLH recombinante (0,75 ou 0,96 mg) par voie i.v. provoque l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire dans les 48 heures (dans 80% à 90% des cas respectivement) (Yoon *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces données montre que les traitements actuellement disponibles en France, pour la maîtrise du cycle de la jument pendant la période de cyclicité, présentent certaines limites. La synchronisation des ovulations et l'induction de l'ovulation à l'heure près restent donc des préoccupations majeures dans le domaine de la reproduction équine.

2. En période d'anœstrus

La problématique est un peu différente pendant la période d'anœstrus car l'intérêt va plutôt être d'induire un cycle en contre-saison plutôt qu'une synchronisation de l'ovulation à l'heure près, même si une estimation assez précise du moment de l'ovulation reste souhaitable.

Quelques exemples de traitement utilisable chez la jument en anœstrus ou en période de transition vers la saison sexuelle sont évoqués ci-dessous.

Mise sous lumière :

Une des principales méthodes consiste à fournir un éclairage de 10 lux pendant 14h30 par jour dès le solstice d'hiver (21 décembre) et pendant 35 jours pour espérer observer les premières ovulations à partir du 1^{er} mars, soit environ 70 jours plus tard (Guillaume *et al.*, 2000).

Il est également possible d'avancer la sortie d'anœstrus en exposant les juments à un flash de lumière artificielle d'une heure, si ce flash a lieu au moment approprié : soit entre 9 h 30 et 10 h 30 après le début de l'obscurité (Palmer *et al.*, 1982). L'inconvénient est que le moment du flash doit être ré-ajusté régulièrement en fonction de l'horaire de la tombée de la nuit.

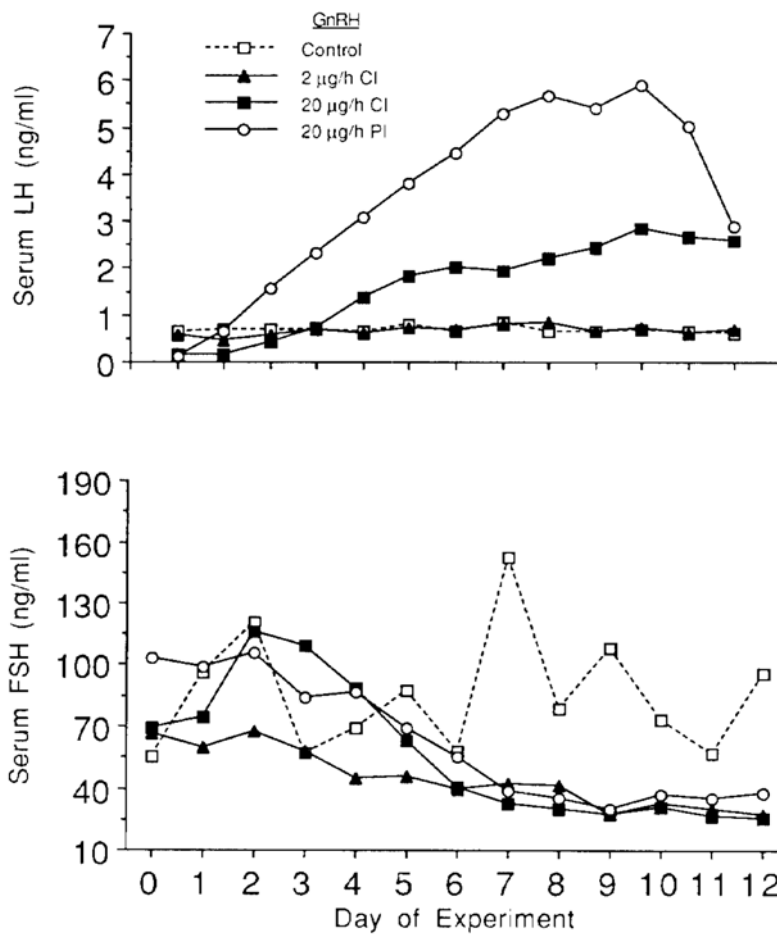


Figure 1.10 : Evolution des concentrations plasmatiques de LH et FSH suite à une perfusion continue (CI) d'une dose de 2 ou 20 µg/h de GnRH natif, en comparaison avec une perfusion pulsatile (PI) d'une dose de 20 µg/h. La perfusion est administrée par voie i.v. à J0 jusqu'à ovulation. Seules les juments des lots 20 µg CI et PI ovulent pendant la perfusion vers J 9,4 et J 12,2 respectivement (Becker et Johnson, 1992).

Cette méthode est donc simple d'utilisation car le traitement lumineux est réalisé par l'éleveur, et peu coûteuse. En revanche, elle nécessite une anticipation de la part des éleveurs qui doivent se soucier de la mise à la reproduction de leur jument dès le mois de décembre, et nécessite également de rentrer les juments tous les soirs au box. De plus, la date de la première ovulation est très variable entre les individus.

Traitement utilisant la GnRH native ou ses analogues :

➤ GnRH native

Chez la jument en anœstrus profond, une administration de GnRH sous forme d'implant sous-cutané à la posologie de 100 ng par kg et par heure (soit environ 50 µg/h) pendant 28 jours, peut induire l'ovulation dans les 15 à 27 jours chez 70% des juments (Hyland *et al.*, 1987). Chez les juments en anœstrus peu profond, ce traitement peut induire un cycle suivi d'une ovulation $18,6 \pm 2$ jours après le début du traitement contre $41,9 \pm 6$ jours chez les juments témoins (Hyland *et al.*, 1987).

Des données plus récentes montrent qu'en période de transition vers la saison sexuelle, l'administration d'un implant sous cutané de GnRH à la posologie de 100 µg/h pendant 2 périodes consécutives de 14 jours est capable d'induire une ovulation. Lorsque les implants sont posés en février, les juments retournent en anœstrus après l'arrêt du traitement alors que lorsque les implants sont posés en mars, les juments restent cycliques après l'arrêt du traitement (Thorson, 2010).

La GnRH native peut également être administrée en perfusion i.v. chez des juments en anœstrus (**figure 1.10**). Il a été montré qu'une perfusion pulsatile de GnRH était plus efficace qu'une perfusion continue. Une même dose de 20 µg/h administrée par perfusion continue ou pulsatile entraîne un cycle suivi d'une ovulation respectivement après $12,2 \pm 0,7$ jours et $9,4 \pm 0,7$ jours après le début du traitement (Becker et Johnson, 1992).

➤ Les analogues de la GnRH

L'administration d'un analogue de la GnRH (ICI 118 630), présentant une efficacité clinique 100 fois supérieure à celle de la GnRH native, sous forme d'implant sous cutané pendant 28 jours, est capable d'induire l'ovulation. Cependant, les ovulations sont observées

entre 3 et 18 jours après l'insertion de l'implant. Une très grande variabilité de la réponse est observée, qui dépend également de la dose utilisée (Allen *et al.*, 1987).

Il est possible d'induire l'ovulation chez la jument pendant la période de transition vers la saison sexuelle, en administrant 40 µg de busérelina par voie i.m. toutes les 12 heures. L'ovulation est obtenue 10 à 25 jours après le début du traitement (Harrison *et al.*, 1990). Cependant, ce protocole est très contraignant.

D'une façon générale, les traitements utilisant la GnRH chez les juments présentant des follicules inférieurs à 15 mm sont rarement efficaces et sont associés à une perte embryonnaire précoce importante (58 %) due à un environnement hormonal réduit et donc à une fonction lutéale inadaptée (Bergfelt et Ginther, 1992).

En résumé, l'utilisation de la GnRH native ou de ses analogues permettent l'induction de l'ovulation mais de façon très aléatoire pendant la période d'inactivité ovarienne saisonnière. Ces traitements ne sont pas efficaces pour la sortie d'ancestrus puisque les juments retournent en inactivité après le traitement. Cependant, lorsque le traitement est appliqué en mars, l'ovulation induite est suivie d'une reprise de la cyclicité.

Extraits hypophysaires :

Chez la jument poney en ancestrus, une étude a montré qu'une stimulation de la croissance folliculaire suivie d'une ovulation pouvait être induite chez 87% des juments recevant deux injections par jour d'extraits hypophysaires équins pendant 14 jours (Douglas *et al.*, 1974). Une autre étude a révélé qu'une injection journalière d'extraits hypophysaires équins par voie sous cutanée pendant 14 jours permettait d'induire des ovulations multiples (Lapin et Ginther, 1977).

Cependant, les traitements utilisant les extraits hypophysaires équins ne sont utilisables que dans un cadre expérimental puisqu'ils ne sont pas commercialisés pour les raisons évoquées précédemment (raisons sanitaires et d'approvisionnement). Il n'y a donc pas d'avenir pour ce type de traitement.

LH :

Au tout début de la transition de l'anœstrus saisonnier vers la cyclicité, il a été montré qu'une administration de LH chez des juments présentant un follicule de 20 mm était capable de stimuler la croissance folliculaire sans pour autant induire une reprise de la stéroïdogénèse. S'il est possible d'induire l'ovulation du follicule pré-ovulatoire avec une administration de hCG, cette ovulation est isolée car la reprise de la cyclicité n'a pas lieu (Schauer *et al.*, 2011).

En conclusion, la plupart des traitements actuellement disponibles en France (ayant une AMM) pour maîtriser le cycle de la jument en période de cyclicité ou d'anœstrus saisonnier ne donnent pas entière satisfaction pour au moins une des raisons suivantes : 1) variabilité de réponse au traitement importante, 2) protocole d'administration contraignant, 3) coût élevé.

Cette première partie de synthèse bibliographique, sur la reproduction de la jument, illustre l'originalité de cette espèce en ce qui concerne notamment les profils endocriniens au cours du cycle, et souligne la difficulté de prédire l'ovulation et de maîtriser le cycle. La seconde partie de la synthèse bibliographique a pour objectif de montrer quel pourrait être l'intérêt d'une molécule comme le kisspeptide pour la maîtrise du cycle chez la jument. Cette partie fait l'état de nos connaissances sur ce peptide au moment de l'écriture de ce manuscrit (2011), cette synthèse pouvant être rapidement obsolète compte tenu du nombre de publications en continuelle augmentation.



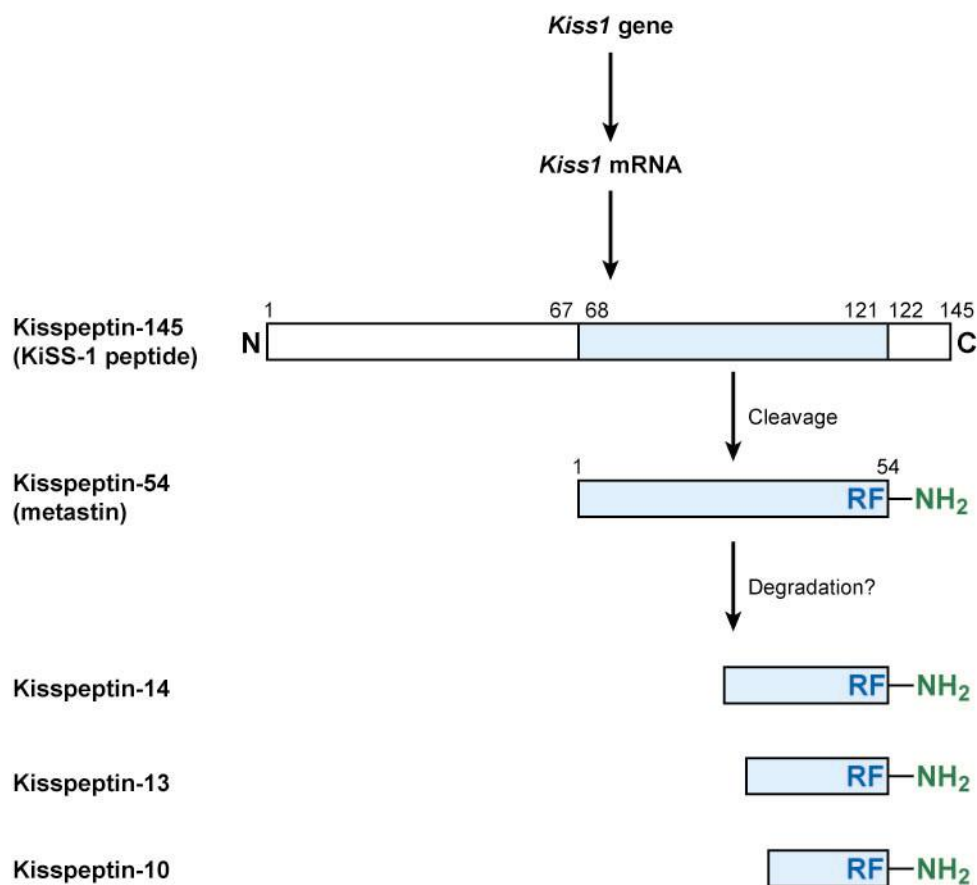
Image 1 : Le célèbre chocolat : Hershey's KISSES®

II. Le kisspeptide

Le gène KISS1 a été découvert en 1996 par une équipe basée à Hershey en Pennsylvanie (Lee *et al.*, 1996). Les auteurs l'ont nommé ainsi pour faire référence aux célèbres chocolats les « Hershey's KISSES » fabriqués dans la chocolaterie de la ville (**image 1**). En 2001, quatre groupes indépendants ont identifié le kisspeptide, produit du gène KISS1, comme étant un ligand de haute affinité pour le récepteur orphelin GPR54 (Clements *et al.*, 2001; Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). Ce récepteur a été décrit pour la première fois chez le rat, en 1999 (Lee *et al.*, 1999).

A. Nomenclature

Depuis la découverte de ce peptide et de son récepteur, de nombreuses publications ont vu le jour mais certaines ambiguïtés peuvent apparaître en fonction de la nomenclature utilisée pour distinguer le gène, de l'ARNm et de la protéine. De même, différents noms peuvent être utilisés pour le récepteur à savoir AXOR12, hOT7T75, GPR54, KISS1R, KiSS1R et metastin receptor. Une nomenclature a été proposée (Gottsch *et al.*, 2009; Kirby *et al.*, 2010), et nous essaierons de la respecter dans ce manuscrit. Ainsi, KISS1 et Kiss1 feront référence respectivement au gène humain et non humain du kisspeptide. Le terme GPR54 était le nom officiel du récepteur, jusqu'en 2006 où il n'a plus été considéré comme orphelin. La nomenclature proposée est KISS1R et Kiss1R pour faire référence respectivement au gène du récepteur humain et non humain du kisspeptide. Cependant, dans un souci de clarté, nous garderons le terme GPR54 pour désigner le récepteur dans ce manuscrit, ce terme étant le plus utilisé dans la littérature à ce jour. Les produits des gènes KISS1 et Kiss1 seront nommés kisspeptides ou KP (la terminologie exacte étant kisspeptides), avec une extension numérique pour indiquer le nombre d'acides aminés de la séquence. Enfin, une lettre en minuscule sera apposée en amont pour différencier les différentes espèces.



AR Popa SM, et al. 2008.
Annu. Rev. Physiol. 70:213–38

Figure 1.11 : Chez l'homme, le gène *Kiss1* code pour un polypeptide de 145 acides aminés qui est clivé par protéolyse en un peptide de 54 acides aminés, appelé KP-54 ou métastine. D'autres fragments plus petits ont été initialement isolés du placenta, et proviennent probablement de la dégradation du KP-54 étant donné qu'aucun site de clivage n'a été clairement identifié. D'après (Popa *et al.*, 2008).

B. Biochimie

1. Les différentes formes du kisspeptide

Chez l'humain, différentes formes de kisspeptide ont été initialement isolées du placenta (Kotani *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). Le produit initial du gène KISS1 est un peptide de 145 acides aminés qui est clivé en un peptide de 54 acides aminés, appelé métastin ou kisspeptin-54 ou KP-54. Des expériences de culture de trophoblaste de placenta montrent que des formes plus courtes (KP-14, KP-13, KP-10) sont libérées (Bilban *et al.*, 2004), et proviennent probablement de la dégradation du KP-54 étant donné qu'aucun site de clivage classique (entre des doublets d'acides aminés basiques) n'a été clairement identifié. Cependant, il n'est pas exclu qu'un clivage par les prohormones convertases se produise après un seul acide aminé basique (Seidah et Chrétien, 1999).

Une étude *in vitro* menée par Kotani et collaborateurs a montré, par un test de saturation utilisant du KP-10 radiomarqué, que les différentes formes de kisspeptide se liaient au récepteur avec la même affinité, et avec la même potentialité (Kotani *et al.*, 2001). En revanche il a été montré récemment, *in vivo*, que la potentialité des formes courtes est plus faible que celle de la forme longue. L'amplitude de stimulation de la LH est légèrement supérieure, et la durée de sécrétion plus longue, suite à une administration de KP-52 comparée à une administration de KP-10 chez le rat (Pheng *et al.*, 2009; Thompson et Murphy, 2010). Les kisspeptides ont en commun les 10 derniers acides aminés et possèdent le motif RY-amide, ou RF-amide chez les primates, en partie C-Terminale (**figure 1.11**). Cette séquence de 10 acides aminés (KP-10) semble constituer la séquence minimale possédant l'activité biologique nécessaire à la liaison et à l'activation du récepteur GPR54 (Kotani *et al.*, 2001).

Cependant, l'alanine-scanning du KP-10, qui consiste à substituer chaque acide aminé par une alanine afin de déterminer la contribution de chacun, montre que les 5 derniers acides aminés, ainsi que le groupement amide, sont importants pour la liaison au récepteur (Lee *et al.*, 2009), et plus particulièrement la Phe⁶ et la Tyr¹⁰ (Gutierrez-Pascual *et al.*, 2009). Ces données suggèrent que des peptides plus courts que le KP-10 pourraient être actifs *in vivo*, mais cela reste à démontrer. Une équipe japonaise a généré des agonistes du GPR54 à partir de ces 5 derniers acides aminés, en y ajoutant un groupement aromatique en partie N-terminale. La demi-vie de ces agonistes dans le sérum murin varie de 6 à 38 heures alors qu'elle n'est que de quelques minutes pour le KP-10 (Tomita *et al.*, 2007; Tomita *et al.*, 2008).

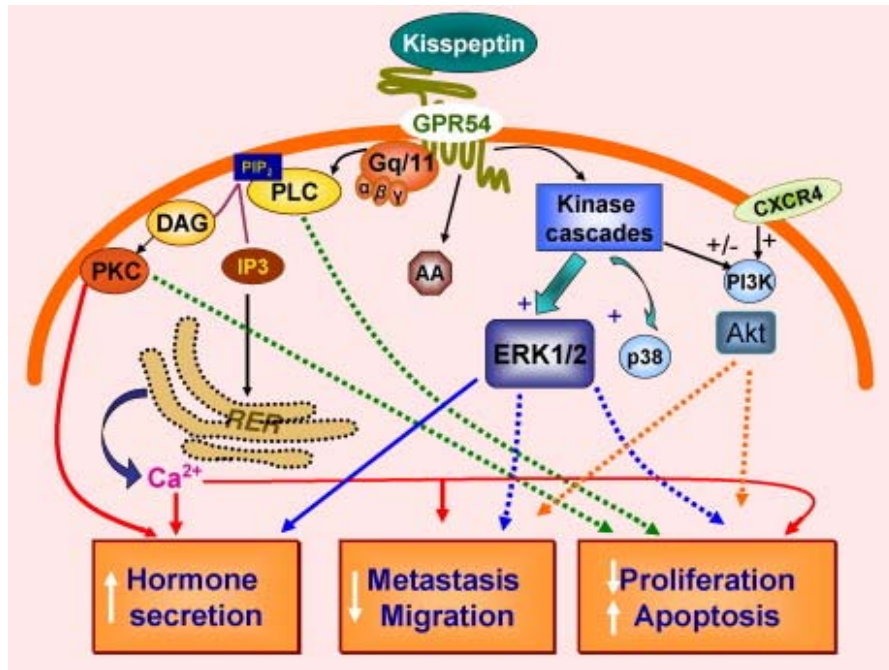


Figure 1.12 : Illustration des différentes voies de signalisation pouvant être activées suite à la liaison du KP au récepteur GPR54 (Castano *et al.*, 2009).

2. Les voies de signalisation du GPR54

Le GPR54 présente une homologie à 44-45% avec le récepteur de la galanine, mais ne lie ni la galanine (Lee *et al.*, 1999), ni les peptides apparentés à la galanine (Ohtaki *et al.*, 2001).

L'activation du récepteur GPR54 par le kisspeptide a été mise en évidence par une augmentation de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire, en présence d'extrait de placenta, dans des cellules CHO (chinese hamster ovary) exprimant le GPR54 (Kotani *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001).

La liaison du kisspeptide au récepteur GPR54 entraîne une activation de la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire de la protéine Gαq (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001). Il en résulte la génération de seconds messagers intracellulaires, par clivage du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG). Le DAG active la protéine kinase C (PKC), et l'IP3 mobilise le calcium intracellulaire (Stafford *et al.*, 2002). De plus, le GPR54 stimule la libération de l'acide arachidonique, et active la voie de signalisation des MAP kinases ERK1/2 et p38 (Kotani *et al.*, 2001).

Le kisspeptide peut donc activer une grande variété de signaux, via le récepteur GPR54 (**figure 1.12**), et stimule notamment la sécrétion de GnRH par l'intermédiaire du DAG et/ou du Ca^{2+} (Castano *et al.*, 2009).

C. Distribution du kisspeptide et de son récepteur

Le système kisspeptide/GPR54 apparaît relativement conservé au cours de l'évolution car ce système a été décrit chez la plupart des mammifères, et chez les poissons (Biran *et al.*, 2008; Kanda *et al.*, 2008; van Aerle *et al.*, 2008), mais pas chez les oiseaux (Um *et al.*, 2010). La distribution de ce système ne se cantonne pas à un organe en particulier mais à une multitude d'organes ayant un rapport direct ou non avec la fonction de reproduction, et c'est probablement ce qui rend complexe l'étude de ce système sur un organe en particulier. Etant donné qu'au début de ma thèse aucune donnée ne faisait état de la présence du KP ou de son récepteur le GPR54 dans l'espèce équine, les données qui vont suivre concernent principalement les humains, les rongeurs de laboratoire, les ovins et les primates.

Le kisspeptide

Dans l'espèce humaine, l'ARNm du gène KISS1 est présent de façon importante dans différentes régions du cerveau, dans l'hypophyse, mais également dans différents organes tels que le placenta, le pancréas, les testicules, le foie, l'intestin grêle (Lee *et al.*, 1996; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001) ou l'ovaire (Gaytan *et al.*, 2009).

La distribution des neurones à KP dans le cerveau des mammifères a été mise en évidence par deux techniques : l'hybridation *in situ*, permettant de visualiser l'ARNm du gène Kiss1, et l'immunohistochimie, permettant de visualiser le peptide.

La majorité des neurones immunoréactifs pour le KP est localisée au niveau du noyau arqué (ARC), et dans le noyau infundibulaire chez l'humain (équivalent au noyau arqué chez l'animal) (Rometo *et al.*, 2007). Chez le rat (Desroziers *et al.*, 2010), la brebis (Franceschini *et al.*, 2006) ou encore le primate (Ramaswamy *et al.*, 2008), les neurones immunoréactifs pour le KP semblent être présents plutôt dans la partie caudale de l'ARC.

Il existe également une seconde population de neurones à KP, dans une région plus antérieure : la région préoptique, où les neurones à KP sont présents dans le noyau périventriculaire antéroventral (AVPV) et dans le noyau périventriculaire préoptique (PeN) chez les rongeurs (Gottsch *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005), et dans l'aire pré-optique (APO) de façon assez dispersée chez l'ovin (Franceschini *et al.*, 2006) et le primate (Goodman *et al.*, 2007).

Le GPR54 :

Dans l'espèce humaine, l'ARNm du gène GRP54 est présent de façon importante dans différentes régions du cerveau, mais également dans le placenta, l'hypophyse, le pancréas, et la moelle épinière (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). L'immunohistochimie révèle l'existence du GPR54 plus précisément au niveau du cortex cérébral, du thalamus, du pont, du bulbe rachidien et du cervelet chez l'humain (Muir *et al.*, 2001). Chez les rongeurs, l'ARNm du gène GPR54 a été détecté dans différentes zones du cerveau (pont, mésencéphale, thalamus, hypothalamus, hippocampe, amygdale, cortex, cortex frontal et striatum), ainsi que dans des tissus périphériques tels que le foie et l'intestin (Lee *et al.*, 1999) ou encore l'ovaire (Castellano *et al.*, 2006). L'ARNm du gène GPR54 a également été détecté au niveau de l'hypothalamus (Shahab *et al.*, 2005) et de l'ovaire (Gaytan *et al.*,

2009) chez le primate. Enfin, l'ARNm du gène GPR54 est exprimé au niveau des neurones à GnRH chez le rat (Han *et al.*, 2005; Messenger *et al.*, 2005).

D. Rôles physiologiques du kisspeptide

Comme nous venons de le voir, le kisspeptide et son récepteur ont été localisés dans plusieurs organes, et semblent capables d'activer plusieurs voies de signalisations intracellulaires qui sont impliquées dans différentes fonctions physiologiques.

Rôle du kisspeptide dans l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique :

En 2003, le rôle majeur du kisspeptide dans la **mise en place de la puberté** a été mis en évidence simultanément par deux équipes, qui ont montré que des mutations naturelles chez l'homme, ou induites chez la souris, étaient responsables de certaines formes d'hypogonadisme hypogonadotrope (de Roux *et al.*, 2003; Seminara *et al.*, 2003). Ce phénotype a également été observé chez la souris invalidée pour le gène GPR54 (GPR54^{-/-}) (Funes *et al.*, 2003; Messenger *et al.*, 2005), et un peu plus tard chez la souris invalidée pour le gène Kiss1 (Kiss1^{-/-}) (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007). Ce phénotype est infertile et confirme que le système KP/GPR54 constitue un signal critique permettant d'atteindre des niveaux élevés en GnRH, nécessaires pour une maturation sexuelle normale et pour l'ovulation. Cependant, les souris Kiss1^{-/-} et GPR54^{-/-} conservent un certain degré de sécrétion des neurones à GnRH (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007; Lapatto *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2009).

Il existe un **dimorphisme sexuel des populations de neurones à kisspeptide** chez le rat. Chez l'adulte, le nombre de neurones à KP dans l'AVPV est plus important chez la femelle que chez le mâle (Kauffman *et al.*, 2007). Les neurones à KP sont sensibles à l'action des stéroïdes sexuels pendant une période de temps critique, qui chez le rat, se situe entre la fin de gestation et la période néonatale (Morris *et al.*, 2004). Si des femelles sont exposées à de fortes doses de testostérone pendant cette période, une « masculinisation » des neurones à KP se produit au niveau de l'AVPV (Kauffman *et al.*, 2007). De même, la castration néonatale chez le rat mâle provoque une chute de la testostérone et une « féminisation » des neurones de l'AVPV qui deviennent ainsi capable de générer un pic de GnRH/LH (Homma *et al.*, 2009).

Le kisspeptide intervient dans **la régulation de l'axe gonadotrope chez l'adulte**, point que nous aborderons plus en détail dans les parties suivantes.

Rôle du kisspeptide dans d'autres fonctions physiologiques:

Les différentes actions évoquées ci-dessous font partie d'une liste non exhaustive.

Le kisspeptide a été initialement mis en évidence grâce à ses effets **anti-métastatiques** (Lee et Welch, 1997).

L'expression du kisspeptide et de son récepteur a été identifiée chez l'humain au niveau du **système cardiovasculaire**, et plus précisément dans les artères coronaires et la veine ombilicale où le kisspeptide exerce un effet **vasoconstricteur**, et dans l'aorte (Mead *et al.*, 2007).

Le kisspeptide interviendrait également pendant la gestation, en **limitant l'invasion trophoblastique**. En effet, les toutes premières données sur l'expression du kisspeptide avaient montré des taux importants de kisspeptide dans le placenta des femmes enceintes (Lee *et al.*, 1996; Muir *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). De façon plus spécifique, l'expression du kisspeptide et de son récepteur dans les cellules trophoblastiques est plus élevée lors du premier trimestre que lors du troisième trimestre de grossesse (Bilban *et al.*, 2004). Cette diminution d'expression au cours de la grossesse est corrélée avec la diminution de l'invasion trophoblastique.

Les taux circulants de kisspeptide, qui sont pratiquement indétectables chez le mâle et la femelle non gestante, sont chez la femme 1000 fois plus élevés lors du premier trimestre de grossesse et 10000 fois plus élevés lors du troisième trimestre (Horikoshi *et al.*, 2003). De récentes études suggèrent que des taux faibles de KP en début de grossesse sont associés à des termes précoces et à des poids de naissance plus faibles, ce qui pourrait suggérer une mauvaise placentation (Kavvasoglu *et al.*, 2011). De plus, certains avortements précoces seraient liés à un défaut de KP (Park *et al.*, 2012).

De façon intéressante, parmi toutes les formes de KP, le KP-10 est celui qui a le plus d'effets inhibiteurs sur l'invasion trophoblastique (Hiden *et al.*, 2007). De plus, seul le KP-10 est capable de stimuler la libération de Ca^{2+} dans les cellules trophoblastiques en début de grossesse (Bilban *et al.*, 2004).

E. Sites d'action du kisspeptide

Nous venons de voir que le KP pouvait intervenir au niveau de plusieurs fonctions physiologiques, dont la principale serait la régulation de l'axe hypothalamo-hypophysogonadique. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons aux mécanismes et sites d'action du KP, pour induire la sécrétion de la GnRH et des gonadotropines.

➤ Effets directs et indirects sur les neurones à GnRH :

Il est maintenant clairement établi que le kisspeptide est un régulateur essentiel de la sécrétion des gonadotropines, comme le montre le nombre de publications mettant en évidence des effets stimulants du KP sur la sécrétion de la LH, et dans une moindre mesure de la FSH chez de nombreux mammifères, comme le rat (Navarro *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2005a), la souris (Gottsch *et al.*, 2004), la brebis (Caraty *et al.*, 2007), la vache (Kadokawa *et al.*, 2008), le singe (Plant *et al.*, 2006) ou encore la femme (Dhillon *et al.*, 2007).

Le KP agit de façon dose dépendante, et semble être un stimulateur très puissant de la LH puisque une dose de 10 pmol de KP-54 administrée par voie intra-cérébro-ventriculaire (i.c.v.) est efficace chez le rat (Navarro *et al.*, 2005b). En revanche, des doses 100 fois plus importantes sont nécessaires pour obtenir une stimulation de la FSH (Navarro *et al.*, 2005a).

Plusieurs expériences montrent que, *in vivo*, le KP exerce son action en amont de la GnRH :

- L'administration d'un antagoniste de la GnRH bloque les effets stimulants du KP (Gottsch *et al.*, 2004).
- Chez la souris Kiss1^{-/-} présentant un hypogonadisme hypogonadotrope, l'administration de KP induit une augmentation des gonadotropines, alors que les souris GPR54^{-/-} ne présentent pas d'augmentation des gonadotropines suite à l'administration de KP (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007; Lapatto *et al.*, 2007).
- Chez la brebis, l'administration i.c.v. de kisspeptide stimule la libération de GnRH dans le liquide céphalo-rachidien (Messenger *et al.*, 2005).

Plusieurs expériences *in vitro* confirment que le KP exerce son action directement au niveau des neurones à GnRH :

- La majorité des neurones à GnRH exprime le GPR54 chez les rongeurs (Irwig *et al.*, 2004; Messenger *et al.*, 2005). Il en est de même chez la brebis où le taux atteint 90 % (Irwig *et al.*, 2004; Messenger *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2009a).
- Des fibres immunoréactives au KP sont en étroite apposition avec des neurones à GnRH chez la ratte et la jument (Kinoshita *et al.*, 2005; Decourt *et al.*, 2008).
- Le KP dépolarise les neurones à GnRH *in vitro* (Liu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

En plus de son action directe sur la sécrétion de la GnRH, il semblerait que le KP agisse de façon indirecte, par l'intermédiaire d'interneurones tels que les neurones GABAergiques (Zhang *et al.*, 2009).

➤ Effet en dehors de la barrière hématoencéphalique :

Le KP exogène pourrait agir au niveau des organes circumventriculaires. Ces organes ne possèdent pas de barrière hémato encéphalique, mais sont pourvus d'une vascularisation riche leur permettant un échange entre le sang et le liquide céphalo-rachidien.

Chez le singe, les neurones à KP projettent vers l'éminence médiane et les fibres à KP sont en étroite apposition avec les fibres à GnRH (Ramaswamy *et al.*, 2008). L'équipe de Keen et collaborateurs a montré, par une technique de perfusion push-pull au niveau de l'éminence médiane, qu'environ 75 % des pulses de KP étaient corrélés à un pulse de GnRH (Keen *et al.*, 2008). Par ailleurs, une administration continue d'un antagoniste du KP au niveau de l'éminence médiane abolit la pulsativité de la GnRH (Roseweir *et al.*, 2009).

Le KP peut stimuler la libération de la GnRH à partir d'explants d'hypothalamus médio-basal de rat contenant les terminaisons des neurones à GnRH au niveau de l'éminence médiane, mais pas les corps cellulaires (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2008). De même, chez la souris (Patterson *et al.*, 2006) et la brebis (Smith *et al.*, 2011), le KP est capable de stimuler la sécrétion de GnRH directement au niveau des terminaisons présentes dans l'éminence médiane. De plus, l'examen de données anatomiques récentes, obtenues par microscopie confocale et électronique, indique que des contacts axo-axoniques existent entre les fibres à GnRH et à kisspeptide au niveau de la zone interne de l'éminence médiane (Uenoyama *et al.*, 2011).

Par ailleurs, il a été montré que de nombreuses ramifications dendritiques des neurones à GnRH étaient présentes au-delà de la barrière hémato-encéphalique, dans l'OVLT (Organe Vasculaire de la Lamme Terminale). L'administration de glutamate ou de KP à proximité de ces dendrites entraîne une augmentation de l'activité électrique des neurones à GnRH. Ces données suggèrent que les dendrites des neurones à GnRH pourraient servir à déterminer la concentration de ces molécules (glutamate et KP) dans la circulation sanguine (Herde *et al.*, 2011).

➤ Effets au niveau de l'hypophyse :

Le rôle des KP au niveau hypophysaire est très controversé. Chez le rat, les gènes Kiss1 et GPR54 sont exprimés au niveau de l'adénohypophyse (Gutierrez-Pascual *et al.*, 2007). La plupart des cellules gonadotropes immunoréactives pour la sous-unité β de la LH le sont également pour le KP, et il en est de même pour le GPR54 mais dans une proportion moins importante (Richard *et al.*, 2008). De plus, chez la brebis, le KP est capable d'induire une augmentation de l'ordre de 80 % de la sécrétion de LH dans des cultures primaires d'hypophyse prélevées exclusivement au moment de la phase folliculaire (Smith *et al.*, 2008). Cependant, le KP n'est que très peu sécrété dans le sang porte hypophysaire, et des études *in vivo* sur des brebis dont l'hypothalamus a été déconnecté chirurgicalement de l'hypophyse montrent l'absence de stimulation de la LH suite à l'administration de KP par voie i.v. (Smith *et al.*, 2008).

Chez le singe, des cellules immunoréactives pour le KP ont été localisées dans le lobe intermédiaire et co-localisent avec α -MSH (Melanocyte Stimulating Hormone) mais pas avec les cellules gonadotropes ou somatotropes de l'adénohypophyse. Chez 50% des animaux on trouve aussi à la périphérie de l'adénohypophyse une colocalisation du KP dans des cellules immunoréactives pour l'ACTH (adrénocorticotrophine) (Ramaswamy *et al.*, 2009). Néanmoins des expériences de culture de cellules hypophysaires de singe montrent une absence d'élévation de l'ACTH après administration de KP (Luque *et al.*, 2011).

Il est donc probable que le KP puisse avoir un rôle au niveau de l'hypophyse chez certaines espèces (stimulations prolongées et/ou actions paracrines mais qui reste à déterminer). Néanmoins dans l'état actuel de nos connaissances son rôle dans le contrôle de l'axe gonadotrope à ce niveau ne semble pas prédominant.

➤ Effet au niveau des gonades :

Des travaux de l'équipe de Tena-Sempere chez le rat femelle adulte montrent que l'expression de l'ARNm des gènes Kiss1 et GPR54 est présente au niveau ovarien tout au long du cycle (Castellano *et al.*, 2006). L'expression de l'ARNm du GPR54 semble être constante, en revanche celle du Kiss1 augmente avant l'ovulation. De plus, une immunoréactivité pour le KP est observée au niveau de l'ovaire, avec un signal important dans les cellules de la thèque des follicules en croissance, dans le corps jaune, et dans la glande interstitielle. Une immunoréactivité est également observée pour le GPR54 dans les mêmes zones, mais avec une intensité moindre (Castellano *et al.*, 2006). Cependant, l'action du KP au niveau ovarien ne semble pas indispensable comme en témoignent les expériences menées chez la femme (Pallais *et al.*, 2006) ou la souris (Seminara *et al.*, 2003) présentant une inactivation du GPR54 chez lesquelles l'ovulation peut être induite par un traitement utilisant la GnRH. Enfin, le KP participerait à la régulation de certains aspects du processus ovulatoire, puisqu'un inhibiteur de COX-2 supprime l'expression du gène Kiss1 au niveau ovarien chez la ratte (Gaytan *et al.*, 2009).

F. Les neurones à kisspeptide, centre intégrateur de différents signaux ?

1. Interactions GnRH-stéroïdes : le lien manquant ?

Un certain nombre d'observations montrent que les neurones à GnRH ne sont pas la cible directe des stéroïdes. Les neurones à GnRH n'expriment pas le récepteur de la P4 ce qui suggère que la P4 agirait par le biais d'interneurones. De même, les neurones à GnRH expriment le récepteur bêta à l'E2 (ER β) mais pas le récepteur alpha à l'E2 (ER α), ce qui implique qu'une autre population de neurones, présentant des afférences avec les neurones à GnRH, exprimeraient le ER α . Par ailleurs, il a été montré que le ER α intervenait dans le rétrocontrôle positif de l'E2 puisque les souris ER α ^{-/-} ne présentent pas d'activation des neurones à GnRH, ni de pic pré-ovulatoire de LH en réponse à l'E2, contrairement aux souris ER β ^{-/-} qui présentent un profil normal (Krege *et al.*, 1998; Wintermantel *et al.*, 2006).

Un certain nombre de travaux indiquent que les cellules à KP sont des cibles potentielles de régulation par les hormones stéroïdes dans le contrôle de la fonction gonadotrope. En effet l'équipe de Caraty et collaborateurs a montré, par une étude d'immunohistochimie menée sur des hypothalamus de brebis, que l'ensemble des neurones immunoréactifs pour le KP exprimaient le ER α au niveau de l'ARC, et que 50% l'exprimaient au niveau de l'APO (Franceschini *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'équipe de Steiner et collaborateurs a montré, par hybridation *in situ*, que l'ovariectomie, chez la souris, entraînait une augmentation de l'expression de l'ARNm de Kiss1 au niveau de l'ARC accompagnée d'une diminution de l'ARNm de Kiss1 au niveau de l'AVPV. D'autre part, un traitement œstrogénique chez des souris ovariectomisées entraîne une diminution de l'expression l'ARNm de Kiss1 au niveau de l'ARC, et une augmentation au niveau de l'AVPV (Smith *et al.*, 2005). Les neurones à KP de ces deux structures sont donc régulés de façon inverse par l'E2 chez la souris.

Les souris invalidées pour le GPR54 ou le Kiss1, ovariectomisées et traitées avec de l'E2 et de la P4, ne présentent pas de pic de LH contrairement aux souris non invalidées (Dungan *et al.*, 2007; Clarkson *et al.*, 2008). Ces données soulignent l'importance du KP et de son récepteur GPR54 dans l'intégration du rétrocontrôle des stéroïdes sur la génération du pic pré-ovulatoire de LH.

Chez la ratte, l'infusion d'un anticorps anti-rKP dans l'APO empêche l'apparition du pic pré-ovulatoire de LH (Kinoshita *et al.*, 2005), ce qui confirme que le rétrocontrôle positif de l'E2 s'exerce au niveau des neurones à KP de l'APO (AVPV chez la souris).

Le blocage des ER α par un antagoniste, chez la ratte cyclique, empêche également l'apparition du pic pré-ovulatoire de LH et l'ovulation, et réduit la sécrétion de LH en réponse au KP exogène alors que la réponse au GnRH exogène est préservée. En revanche, le blocage des ER β par un antagoniste ne provoque aucun changement en termes de pic de LH et d'ovulation, mais la sécrétion de LH en réponse au KP exogène est amplifiée (Roa *et al.*, 2008a). Ces données confirment l'importance du ER α dans la génération du pic pré-ovulatoire de LH, et suggèrent que le ER β aurait un rôle inhibiteur dans la réponse LH suite à une administration de KP.

Les variations d'expression du KP sont en relation étroite avec les changements d'état physiologique.

Chez la ratte, l'expression de l'ARNm du gène Kiss1 varie dans les différentes populations de neurones à KP le soir du pro-œstrus. En effet, celle-ci augmente dans l'AVPV, alors qu'elle est quasiment indétectable dans l'ARC (Smith *et al.*, 2006b). L'expression de c-Fos

(marqueur de l'activation transcriptionnelle) dans les neurones à KP varie également au cours du cycle avec une forte expression dans l'AVPV au moment du pic de LH, et une quasi-absence de celle-ci pendant le dioestrus (Smith *et al.*, 2006b). Il a donc été admis que, chez les rongeurs au moment du pro-œstrus (phase pré-ovulatoire), les neurones à KP de l'AVPV sont régulés positivement alors que ceux de l'ARC sont régulés négativement.

Les neurones à KP chez la brebis sont également répartis en deux populations. Le niveau d'expression du KP dans les neurones de l'ARC augmente après ovariectomie (Pompolo *et al.*, 2006), comme cela est le cas dans d'autres espèces, suggérant ainsi un rétrocontrôle négatif de l'E2 sur cette population neuronale. Cependant, une augmentation de l'expression de l'ARNm du gène Kiss1 est observée juste avant le pic pré-ovulatoire, dans la région caudale de l'ARC (Estrada *et al.*, 2006), et suggère un rétrocontrôle positif de l'E2 au niveau des neurones à KP de l'ARC. Ces résultats sont en accord avec le fait que de fortes doses d'E2 induisent une augmentation de l'activité neuronale au niveau de l'ARC (Clarke *et al.*, 2001). Il est donc suggéré que deux populations neuronales contenant du KP seraient présentes au niveau de l'ARC chez la brebis : elles intégreraient le rétrocontrôle négatif et positif de l'E2. Toutefois, l'expression du KP augmente en fin de phase folliculaire dans les neurones de l'ARC mais également dans ceux de l'APO (Smith *et al.*, 2009a). De même, une activation de la protéine Fos est observée dans les neurones à KP de l'APO, au moment du déclenchement du pic pré-ovulatoire de GnRH (Hoffman *et al.*, 2011). Comme nous l'avons évoqué précédemment, seulement 50 % des neurones à KP de l'APO possèdent le ER α . De plus, chez la brebis ovariectomisée, des micro-implants d'E2 induisent un pic pré-ovulatoire de GnRH lorsqu'ils sont implantés au niveau de l'hypothalamus médio-basal, et n'ont pas d'effet lorsqu'ils sont implantés au niveau de l'APO (Caraty *et al.*, 1998). L'ensemble de ces résultats a conduit à formuler l'hypothèse qu'en fin de phase folliculaire, les neurones à KP dans l'APO pourraient donc être activés indirectement par le rétrocontrôle positif de l'E2 s'exerçant sur les cellules à KP de l'hypothalamus médio-basal (Caraty *et al.*, 2010). Des travaux de traçage des voies nerveuses permettront d'identifier toutes les connections entre ces différentes populations de cellules à KP et éventuellement valider cette hypothèse.

Les neurones à KP apparaissent donc comme le lien manquant et longtemps recherché permettant l'expression de l'ensemble des rétrocontrôles des stéroïdes sur le neurone à GnRH. Cependant, le KP n'est pas le seul neuropeptide présent dans ces neurones. En effet, les neurones immunoréactifs pour le KP au niveau de l'ARC expriment d'autres peptides comme la dynorphine (DYN) et la neurokinine B (NKB) (Goodman *et al.*, 2007). Cette

population neuronale est appelée KNDy avec K (kisspeptin) N (neurokinin B) et Dy (dynorphin).

La NKB, peptide de la famille des tachykinines, est connue pour jouer un rôle important dans l'intégration du rétrocontrôle négatif de l'E2 sur la sécrétion de la GnRH (Rance et Bruce, 1994). La DYN est un peptide endogène agoniste des récepteurs morphiniques, ou opioïdes, qui intervient dans le rétrocontrôle négatif de la P4 sur la sécrétion de la GnRH (Goodman *et al.*, 2004).

Les neurones KNDy participeraient ainsi à la régulation de la sécrétion de la GnRH, par l'intermédiaire de la NKB et de la DYN qui modèleraient la sécrétion du KP sous l'influence des stéroïdes sexuels (Navarro *et al.*, 2009). Cependant, cette population de neurones KNDy n'a pour l'instant pas été recherchée dans l'espèce équine.

2. Interactions photopériode-KP

Des hamsters Syriens (espèce de jours longs) exposés à des jours courts présentent une diminution des taux plasmatiques de LH et de FSH ainsi qu'une suppression de la spermatogenèse et de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, entraînant une quiescence de l'axe reproducteur. Chez le hamster Syrien, l'expression de l'ARNm du Kiss1 diminue au niveau de l'ARC lors du passage en jours courts. Ce changement d'expression semble être dépendant de la mélatonine puisque l'ablation de la glande pinéale n'induit pas de diminution de l'expression de l'ARNm de Kiss1 lors d'un passage en jours courts (Revel *et al.*, 2006). Une administration continue intracérébrale de KP-10 pendant 4 semaines, chez des hamsters Syriens placés en jours courts, restaure le poids testiculaire et la sécrétion de testostérone à des taux comparables à ceux mesurés sur des animaux en jours longs (Revel *et al.*, 2007). Par ailleurs, des administrations biquotidiennes de KP-54 par voie intra péritonéale ont le même effet (Ansel *et al.*, 2011).

Chez la brebis (espèce de jours courts), l'expression de l'ARNm du Kiss1 au niveau de l'ARC est plus importante durant les jours courts que les jours longs (Smith *et al.*, 2007). Par ailleurs, le nombre de neurones immunoréactifs pour le KP au niveau de l'APO augmente tardivement, 112 jours après un passage en jours courts, c'est-à-dire après l'augmentation de la LH (Chalivoix *et al.*, 2010). Ces données suggèrent que la synthèse du KP augmente lors du passage en jours courts chez la brebis, et que cette augmentation intervient tardivement dans la cascade d'évènements conduisant à la reprise de la cyclicité.

En résumé, l'expression de l'ARNm de *Kiss1* au niveau de l'ARC semble donc être régulée différemment par la photopériode selon les espèces, ce qui traduirait une interprétation différente du message mélatoninergique entre les espèces de jours courts et celles de jours longs.

Cependant, l'équipe de Li a récemment montré que les neurones à KP n'exprimaient pas le récepteur de la mélatonine (*MTRN1A*) (Li *et al.*, 2011), ce qui suggère que les neurones à KP ne seraient pas des cibles directes de cette hormone.

3. Interactions métabolisme-KP

La leptine est synthétisée par les adipocytes et informe le système nerveux central de la réserve énergétique et de l'état nutritionnel des individus. Le récepteur de la leptine (*Ob-Rb*) n'est pas exprimé par les neurones à GnRH, et plusieurs données suggèrent que l'état d'engraissement influencerait l'activité des neurones à KP. En effet, 40 % des neurones à KP de l'ARC exprimeraient l'ARNm de *Ob-Rb* (Smith *et al.*, 2006a). Cependant, il a été récemment montré que ce pourcentage ne serait que de 6% (Louis *et al.*, 2011). L'expression de l'ARNm du gène *Kiss1* au niveau de l'ARC est réduite chez les souris déficientes pour la leptine (*ob/ob*), comparée aux souris non déficientes, et un traitement à la leptine restaure en partie l'expression de l'ARNm du gène *Kiss1* chez les souris *ob/ob* (Smith *et al.*, 2006a).

Une corrélation existe entre le statut énergétique et le niveau d'expression du gène *Kiss1*. Un stress énergétique entraîne une diminution de l'expression du gène *Kiss1* chez le rat pré-pubère (Castellano *et al.*, 2005). Par ailleurs, le profil de réponse des gonadotropines suite à une administration de KP chez les animaux sous alimentés est différent de celui observé chez les animaux nourris *ad libitum*. Chez la ratte adulte sous alimentée, la durée de sécrétion de la LH suite à l'administration intracérébrale de KP est augmentée alors que la durée de sécrétion de la FSH est réduite (Roa *et al.*, 2008b), ce qui suggère qu'un stress métabolique modifie la sécrétion de GnRH en réponse à une administration de KP. D'autre part, une administration intracérébrale de leptine chez la ratte adulte sous alimentée entraîne un profil de sécrétion similaire. Les mécanismes de modulation de l'axe gonadotrope par la leptine pourraient donc faire intervenir une activation du système à KP.

L'analyse de données plus récentes suggère cependant que la leptine ne constituerait pas un signal critique pour la restauration de la sécrétion de la LH par le KP en cas de balance énergétique négative. En effet, chez la ratte adulte ayant une balance énergétique négative,

une administration de leptine correspondant à un niveau basal ne restaure pas l'expression de l'ARNm du gène Kiss1, et n'augmente pas les niveaux plasmatiques de LH, contrairement aux doses pharmacologiques qui maintiennent la LH à des valeurs contrôles (True *et al.*, 2011). De plus, aucune expérience *in vitro* ou *in vivo* n'a montré un lien direct entre la leptine et l'expression de l'ARNm du gène Kiss1, suggérant que des intermédiaires ou d'autres facteurs neuroendocriniens interviendraient dans la régulation du gène Kiss1, comme par exemple le neuropeptide Y (NPY), ou la ghréline.

Le NPY est un neuropeptide hypothalamique connu pour son action orexigénique et régulatrice sur la fonction de reproduction chez la brebis (Clarke *et al.*, 2005). Plusieurs analyses *in vitro* et *in vivo* indiquent un effet stimulant du NPY sur la sécrétion de la GnRH. Par exemple, une exposition des cellules GT1-7 (lignées cellulaires de neurones immortalisés sécrétant la GnRH) au NPY augmente la sécrétion de la GnRH (Besecke *et al.*, 1994), et une perfusion de NPY dans le 3^{ème} ventricule de la brebis en période pré-ovulatoire entraîne une augmentation des taux de la GnRH dans l'éminence médiane (Advis *et al.*, 2003). De plus, les souris NPY^{-/-} présentent un pic pré-ovulatoire de LH qui est atténué par rapport à des souris contrôles (Xu *et al.*, 2000). Cependant, le NPY peut également exercer une action négative sur la sécrétion de la GnRH, et en particulier en cas d'absence des stéroïdes puisqu'une perfusion de NPY dans le 3^{ème} ventricule chez la ratte ovariectomisée inhibe la pulsativité de la LH (McDonald *et al.*, 1985), et qu'une perfusion intrahypothalamique de NPY à des lapines ovariectomisées diminue la fréquence et l'amplitude des pulses de la GnRH (Khorram *et al.*, 1987).

Une administration continue de leptine par voie i.c.v. induit une diminution de la synthèse du NPY chez le rat (Wang *et al.*, 1997) et une augmentation de l'expression du gène Kiss1 chez la souris (Luque *et al.*, 2007). Or, des souris NPY^{-/-} présentent une diminution de l'expression du gène Kiss1 (Luque *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que le NPY pourrait intervenir dans la régulation positive et négative de l'expression du gène Kiss1.

La ghréline a également une action stimulante sur la prise alimentaire, et inhibe l'expression de l'ARNm du gène Kiss1 chez le rat (Forbes *et al.*, 2009).

G. Les effets de l'administration du kisspeptide

Les études portant sur les effets de l'administration de KP sont nombreuses et diversifiées comme en témoignent les modèles utilisés (mâles, femelles, animaux pré-pubères, animaux pubères) et les protocoles d'administration (injections centrales, périphériques, utilisation du

KP-54, KP-10). Une administration de KP est capable de stimuler la sécrétion de LH de façon transitoire chez pratiquement toutes les espèces étudiées : l'homme (Dhillon *et al.*, 2005), la souris (Gottsch *et al.*, 2004), le rat (Navarro *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2004), le singe (Plant *et al.*, 2006), la brebis (Messenger *et al.*, 2005), la vache (Kadokawa *et al.*, 2008), le cochon (Lents *et al.*, 2008), la chèvre (Hashizume *et al.*, 2010) et la jument (Magee *et al.*, 2009).

La seule exception concerne une étude menée chez le poisson, chez qui le KP semblerait avoir un effet inhibiteur sur la sécrétion de la LH uniquement (diminution de l'expression de la sous-unité β de la LH mais pas de la FSH) (Pasquier *et al.*, 2011).

1. Efficacité des différentes formes

Il a été montré *in vitro*, que les différentes formes de KP se liaient au récepteur avec la même affinité, et avec la même potentialité (Kotani *et al.*, 2001; Muir *et al.*, 2001).

Chez l'homme, la demi-vie de la forme longue (KP-54) a été estimée à moins de 30 minutes (Dhillon *et al.*, 2005), ce qui suggère que les formes courtes ont une demi-vie encore plus faible. De plus, chez le rat mâle adulte, une injection unique par voie sous-cutanée de KP-54 entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de LH plus importante que celle de KP-10 ou de KP-14 (Thompson *et al.*, 2006). L'amplitude de stimulation de la LH est légèrement supérieure et la durée de sécrétion est plus longue suite à une administration i.c.v. ou i.v. de KP-52 comparée au KP-10 chez le rat (Pheng *et al.*, 2009). Toutefois cette différence d'amplitude de stimulation est faible, or la différence de coût entre la synthèse du KP-54 ou KP-52 (forme longue) et le KP-10 (forme courte) est importante, ce qui a conduit la majorité des auteurs à utiliser préférentiellement le KP-10.

2. Efficacité des différents modes d'administration

Injection unique :

Chez la brebis ovariectomisée, la stimulation de la sécrétion de LH suite à une injection unique de 10 μ g de KP-10 est transitoire. Un retour des concentrations de l'hormone au niveau basal est observé 2 heures après l'injection. Il existe une relation entre la dose

injectée et la réponse obtenue (stimulation de la sécrétion de LH) mais dans une plage réduite (de 10 à 40 µg). En effet, l'aire sous la courbe des concentrations plasmatiques de LH ne diffère plus entre une injection unique de 40 µg et de 160 µg de KP-10 (Caraty *et al.*, 2007). Afin d'obtenir une stimulation plus prolongée des gonadotropines, certaines équipes se sont tournées vers des injections répétées ou encore vers une administration continue sous forme de perfusion de KP.

Injections répétées :

Chez le rat mâle adulte, quatre injections i.v. répétées de 10 µg de KP-10 toutes les 75 minutes induisent des pulses de LH associés à chaque injection. De plus, chaque pulse est identique en terme d'amplitude, de durée, et de quantité de LH sécrétée (Tovar *et al.*, 2006). Après chaque injection, la LH est immédiatement stimulée, mais le niveau en LH atteint n'est pas maintenu et approche le niveau basal au bout des 75 minutes.

Chez le singe mâle pré-pubère ayant reçu au préalable une injection de GnRH, des perfusions i.v. de 2 µg de KP-10 pendant une minute, répétées toutes les heures pendant 48 heures, induisent des pics de LH associés à chaque perfusion. Le même profil est observé pour la FSH, mais avec des amplitudes de réponse plus faibles (Plant *et al.*, 2006).

Chez l'agnelle prépubère, une administration de 20 µg de KP par voie i.v. toutes les heures pendant 24 heures induit des pulses de LH associés à chaque administration, et par conséquent augmente la fréquence et l'amplitude des pulses de LH, ainsi que la concentration plasmatique de la LH et de l'E2. Après 17 heures de traitement, un pic de LH de type pré-ovulatoire est observé, associé à une élévation de la concentration plasmatique en P4, 5 jours après le traitement chez 4/6 agnelles (Redmond *et al.*, 2011).

Perfusions :

Chez le singe mâle pré-pubère ayant reçu au préalable une injection de GnRH, une perfusion i.v. continue de KP-10 à raison de 100 µg/h pendant 98 heures induit une stimulation de la sécrétion de LH qui atteint des concentrations maximales après 1 à 2 heures de perfusion, puis les concentrations plasmatiques en LH diminuent pour retourner au niveau

basal après 12 heures de perfusion. Ce niveau basal est maintenu pendant le reste de la perfusion de KP-10 (Seminara *et al.*, 2006).

Chez le rat mâle adulte, une perfusion sous-cutanée de KP-54 à raison de 340 µg/jour pendant 13 jours entraîne une augmentation des concentrations plasmatiques de la LH et de la testostérone durant le premier jour de perfusion, puis les niveaux diminuent dès le deuxième jour, à des taux semblables à ceux observés chez les rats recevant uniquement du sérum physiologique. Durant le reste de la perfusion, et malgré la présence du KP-54, les niveaux en LH et en testostérone restent identiques entre les deux groupes. A la fin des 13 jours de perfusion, le poids testiculaire ainsi que les niveaux d'inhibine diffèrent entre les groupes, avec un poids testiculaire et un niveau d'inhibine plus faible chez les rats perfusés avec le KP-54 (Thompson *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces données suggère une désensibilisation du GPR54 suite à une exposition prolongée au KP, provoquant ainsi un effet inhibiteur sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Il est à noter que les doses utilisées dans ces expériences de perfusion sont relativement élevées (34 µg.kg⁻¹.h⁻¹ pour le singe, et 11,34 µg.kg⁻¹.h⁻¹ pour le rat). D'autre part, il a été rapporté chez le rat mâle adulte une dégénérescence testiculaire au bout de 12 heures de perfusion sous-cutanée de KP-54 (50 nmol par jour) alors que les gonadotropines sont toujours à des niveaux élevés, ce qui suggère que cette dégénérescence interviendrait indépendamment d'une désensibilisation des récepteurs GPR54. Un prétraitement avec un antagoniste de la GnRH empêche cette dégénérescence et suggère que de fortes doses de KP entraînent une hyperstimulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (Thompson *et al.*, 2009).

Chez la ratte adulte, une perfusion intracerebroventriculaire de KP-10 à la dose de 10 µg/jour pendant 7 jours induit une stimulation transitoire de la LH pendant 48 heures, et une augmentation de la FSH de façon progressive et continue pendant les 7 jours de perfusion. La désensibilisation du GPR54 ne serait donc pas l'unique explication de la stimulation transitoire de la LH observée dans plusieurs études (Roa *et al.*, 2008b).

En résumé, une stimulation transitoire des gonadotropines, de l'ordre de quelques dizaines de minutes, est observée suite à des injections (uniques ou répétées) de KP. En

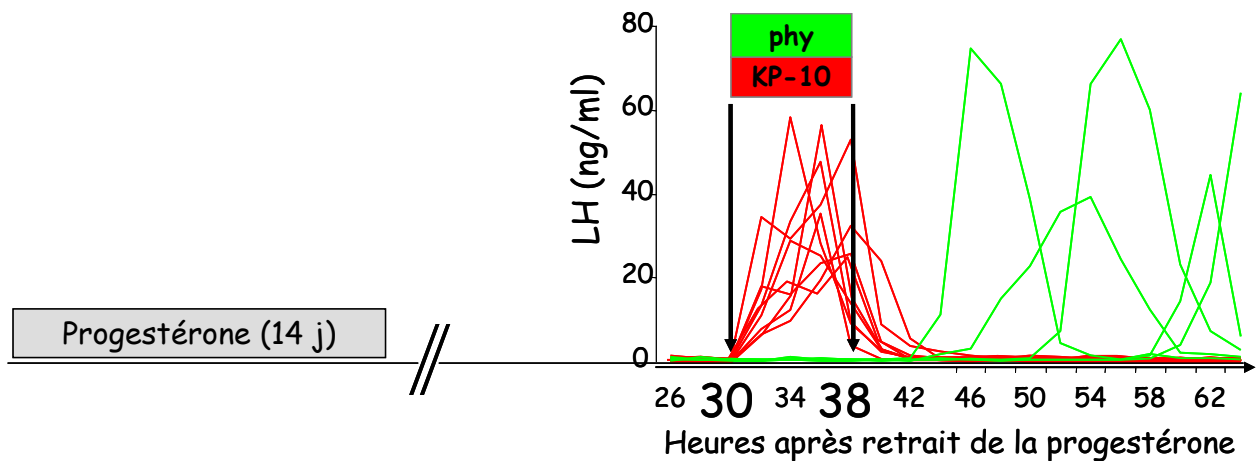


Figure 1.13 : Effet d'une perfusion de sérum physiologique (vert) ou de KP-10 à la dose de 700 $\mu\text{g/h}$ (rouge) pendant 8 heures, 30 heures après le retrait de la P4, sur le démarrage du pic préovulatoire de LH chez la brebis cyclique. D'après (Caraty *et al.*, 2007).

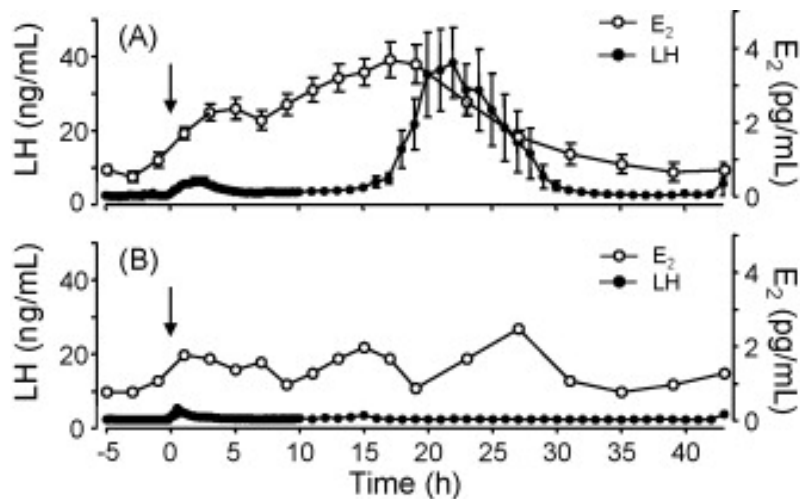


Figure 1.14 : Effet d'une perfusion de KP-10 à la dose de 20 $\mu\text{g/h}$ pendant 43 heures sur la sécrétion de LH et d'E₂ pendant la période d'anoestrus, chez 9 brebis (moyenne \pm SEM) ayant ovulé pendant la perfusion (A) et chez une brebis n'ayant pas ovulé pendant la perfusion (B). Le début de la perfusion est représenté par la flèche verticale (Sebert *et al.*, 2010).

revanche, une perfusion de KP est capable d'induire une stimulation plus prolongée de la LH, mais qui ne semble pas pouvoir être maintenue au-delà d'une journée.

3. Quelles sont les applications du kisspeptide dans la maîtrise du cycle chez la femelle ?

Chez le rat femelle pré-pubère prétraité avec la PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin), une injection unique de KP-54 par voie sous cutanée est capable d'induire une stimulation de la sécrétion de LH, suivie d'une ovulation (Matsui *et al.*, 2004). Cependant, la PMSG induit une croissance folliculaire et peut induire à elle seule une ovulation, comme cela a été montré chez d'autres animaux pré-pubères tels que la cochette (Dial *et al.*, 1984), ou l'agnelle (Davis et Johnstone, 1985). Il est à préciser que la PMSG, aussi appelée eCG (equine Chorionic Gonadotropin), a une action LH et FSH chez toutes les espèces de mammifère étudiées, excepté chez la jument.

En revanche, chez la brebis adulte cyclique présynchronisée avec un implant contenant de la P4, une perfusion de 700 µg de KP-10 par heure pendant 8 heures, administrée 30 heures après le retrait de la P4, induit un démarrage du pic pré-ovulatoire de LH parfaitement synchronisé, 2 heures après le début de la perfusion. Chez les brebis recevant une perfusion de sérum physiologique, le démarrage du pic pré-ovulatoire intervient plus tard, et de façon beaucoup moins synchrone (Caraty *et al.*, 2007) (**Figure 1.13**).

De même, chez la brebis adulte en inactivité, une perfusion de 20 µg de KP-10 par heure pendant 48 heures induit une stimulation transitoire de la LH et de la FSH (pendant 4 à 5 heures). Passé ce délai, les niveaux de FSH rejoignent les niveaux observés avant perfusion alors que ceux de LH restent significativement plus élevés jusqu'à ce qu'un pic pré-ovulatoire de LH soit observé. Cette stimulation initiale des gonadotropines est donc capable d'induire une croissance folliculaire suivie d'un pic pré-ovulatoire de LH (environ 22 heures après le début de la perfusion) et d'une ovulation chez 80% des brebis qui reçoivent le KP (Caraty *et al.*, 2007). L'œstradiol semble jouer un rôle prépondérant puisque seules les brebis ayant atteint un certain seuil de concentrations plasmatiques d'E2 présentent un pic pré-ovulatoire de LH et une ovulation pendant la perfusion de KP-10 (**figure 1.14**).

Les premiers travaux étudiant les effets du KP sur la sécrétion des gonadotropines et la maîtrise du cycle chez la jument cyclique ont été entrepris en 2005 (Briant, communication personnelle).

Des juments, présentant un **follicule compris entre 26 et 30 mm** de diamètre, avaient reçu des injections i.v. uniques répétées de 60 µg ou de 300 µg de hKP-10 toutes les heures pendant 6 heures. Aucun effet n'avait été observé sur les concentrations plasmatiques de LH ou sur l'ovulation.

En revanche, des juments présentant un **follicule de 33 mm** de diamètre recevant une injection unique par voie i.v. de 10 mg de hKP-10 avaient ovulé dans les 48 heures après l'injection, pour 75 % des ponettes traitées contre 25 % des ponettes témoins. Cependant, là encore, aucune montée significative des concentrations plasmatiques de LH n'avait été observée chez les animaux traités (Briant *et al.*, 2006).

Cette expérience a été reconduite l'année suivante, mais seulement 37,5 % et 25 % des ponettes ayant reçu une injection i.v. unique de 10 mg de hKP-10 ou mKP-10 respectivement ont ovulé dans les 48 heures après l'injection, résultat qui ne diffère pas significativement de celui des témoins (Briant, communication personnelle).

Par ailleurs, en augmentant les doses de KP, il a été montré qu'une injection i.v. unique de 20 mg de hKP-10 n'induisait pas l'ovulation dans les 48 heures (30 %), ni même 4 injections i.v. de 5 mg de hKP-10 toutes les 2 heures (30 %). En revanche, une injection i.v. unique de 4 mg de busérelina (analogue de la GnRH, Suprefact®) induit l'ovulation dans les 48 heures chez 90 % ponettes traitées (Duchamp *et al.*, 2007).

Ces résultats montrent d'une part qu'une injection unique de KP-10 en fin de phase folliculaire n'est pas capable d'induire une stimulation de la LH chez la jument, et d'autre part que des injections uniques ou répétées de KP-10 ne permettent pas d'induire l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire dans cette espèce.

Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons rappelé précédemment, le cycle de la jument présente certaines particularités qui rendent difficile la prédiction de l'ovulation, et les traitements actuels de maîtrise du cycle ne donnent pas entière satisfaction.

Dans ce contexte, les travaux menés chez la brebis avec la forme courte du KP ovin (oKP-10), dont la séquence est commune chez la plupart des mammifères, suggèrent des perspectives intéressantes pour l'utilisation du kisspeptide (Caraty *et al.*, 2007; Sebert *et al.*, 2010). Par ailleurs, la forme courte se lie aux récepteurs avec la même affinité que la forme longue. Les avantages de l'utilisation du KP-10 sont multiples : 1) il est facilement synthétisable puisque les séquences utilisées ne comportent que 10 acides aminés, et donc peu coûteux, 2) son utilisation sous forme synthétique supprime les risques sanitaires associés aux hormones extraites, 3) la demi-vie courte du KP-10 est un élément favorable pour une potentielle demande d'autorisation de mise sur le marché.

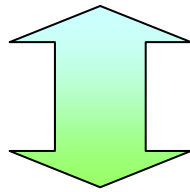
Le kisspeptide est présent au niveau de l'hypothalamus chez la plupart des mammifères et il est fortement impliqué dans la régulation de la fonction de reproduction. Si le système KP-GPR54 semble bien conservé au cours de l'évolution, aucune donnée dans la littérature ne faisait part de la présence du KP dans l'espèce équine au début de ma thèse.

Les premiers essais d'administration du KP-10 humain ou murin réalisés chez la jument en 2005 et 2006 (Briant *et al.*, 2006) n'avaient pas été concluants. De plus, au début de ma thèse nous ne disposions pas de la séquence du KP-10 équin.

- Le premier objectif de la thèse a donc été d'identifier la présence de kisspeptide au niveau de l'hypothalamus de la jument, et d'évaluer les interactions possibles avec la GnRH. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication dans « Journal of Chemical Neuroanatomy » en 2008. L'article est présenté dans la thèse tel que publié, le « matériels et méthodes » n'est donc pas repris (Chapitre I).
- Le deuxième objectif a été d'évaluer les possibilités de mise au point de traitements utilisant le kisspeptide pour la maîtrise du cycle chez la jument cyclique ou en inactivité ovulatoire saisonnière. Nous avons pour cela choisi d'utiliser le KP-10 équin (eKP-10) dont la séquence venait d'être déterminée.
 - Au cours des expériences préliminaires, nous avons tout d'abord vérifié la capacité du eKP-10 à stimuler les gonadotropines chez la brebis et la jument lors d'injections uniques par voie i.v.. Nous avons ensuite mis au point un système de perfusion permettant une administration continue par

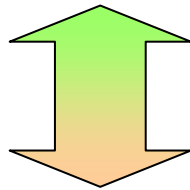
Les éleveurs de chevaux

Objectif = disposer de nouveaux traitements pour la maîtrise de la reproduction de leurs juments.



Partenaire industriel URCEO

Objectif = s'investir dans la recherche scientifique, et proposer aux firmes pharmaceutiques de nouveaux traitements pour répondre à la demande des éleveurs.



Organisme d'accueil INRA

Objectif = **Comprendre et appréhender les mécanisme d'action du KP chez la jument** pour enrichir les connaissances sur le sujet, et pour répondre à la demande des industriels et des éleveurs.

voie i.v. pendant plusieurs jours. Nous avons enfin vérifié la stabilité du eKP-10 dans notre système d'administration (Chapitre II).

- Au cours des expériences proprement dites, nous avons essentiellement travaillé pendant la période de cyclicité. Dans un premier temps, nous avons déterminé les conditions d'administration (période du cycle, dose) permettant une stimulation optimale des gonadotropines chez la jument. Nous avons ensuite entrepris des essais de synchronisation de cycles et d'induction de l'ovulation sur un follicule pré-ovulatoire (Chapitre III).
- Enfin, nous avons également réalisé quelques essais pendant l'inactivité ovulatoire saisonnière afin d'évaluer l'intérêt potentiel de l'utilisation de l'eKP-10 pour l'induction de cycles (Chapitre IV).

Cette thèse CIFRE (Convention Industrielles de Formation par la Recherche) a été financée par la société URCEO (Union Régionale des Coopératives d'Élevage de l'Ouest) et s'est donc inscrite dans une optique innovante afin de proposer de nouveaux outils à la filière équine. Appliquée à l'espèce équine, modèle expérimental peu utilisé, elle devrait également contribuer à apporter des connaissances fondamentales originales sur le kisspeptide.

Matériels et méthodes communs aux expériences effectuées chez la jument

1. Animaux

Toutes les expériences ont été conduites dans l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière à l'INRA de Nouzilly (latitude 47° Nord), et ont utilisé des juments de race poney Welsh adultes (que nous appellerons « ponettes »), âgées de 4 à 19 ans.

En dehors des expériences, les ponettes ont été maintenues au pré, entre le 15 avril et le 15 novembre. Le reste de l'année, elles ont été logées soit dans des boxes paillées (3 à 4 ponettes par boxe de 25 m² environ) avec un accès libre à un paddock dans la journée, soit en stabulation libre paillée (7 m² par ponette) avec un accès permanent à un paddock. Les ponettes en boxes recevaient du foin (5 kg/ponette/jour), un aliment concentré (1,8 kg/ponette/jour), et des compléments minéraux en libre service. Les ponettes en stabulation recevaient la même alimentation hormis l'aliment concentré. Le poids des ponettes a été contrôlé tous les 2 mois. Leur note d'état corporel a toujours été supérieure ou égale à 3,5 sur une échelle allant de 0 à 5 (0 correspondant à un état maigre et 5 à un état obèse).

Au cours des expériences, les ponettes ont été logées dans des stalles individuelles de 6 m², paillées et équipées d'abreuvoirs automatiques en libre accès. Un filet à foin était mis à disposition dans chaque stalle et rempli plusieurs fois dans la journée. Les ponettes ont été placées dans ces stalles au minimum la veille des expériences.

2. Statut physiologique des ponettes

En période de cyclicité, l'état ovarien des ponettes a été suivi par échographie transrectale, à l'aide d'un échographe muni d'une sonde linéaire de 5 MHz (Aloka, Tokyo, Japon). Au début de chaque expérience, les ponettes ont reçu cinq à sept jours après ovulation constatée, une injection i.m. unique de prostaglandine F2 α de synthèse (cloprosténol 250 μ g, Estrumate®, 1 ml, Schering Plough, France), afin d'induire la lutéolyse. Ensuite, sur la base d'un suivi échographique, les ponettes ont été attribuées dans les différents lots en fonction de la taille du plus gros follicule en croissance.

En période d'inactivité saisonnière, l'inactivité des ponettes a été vérifiée par un dosage hebdomadaire de progestérone plasmatique. Etant donné que la phase lutéale dure environ 14 jours, et la phase folliculaire environ 7 jours, une ponette est considérée comme étant en

inactivité ovarienne à partir de 4 semaines successives « sans » progestérone plasmatique (niveaux de progestérone < 1 ng/ml). Pour les ponettes en inactivité, une échographie transrectale a permis de confirmer l'absence de gros follicules, signifiant qu'elles n'étaient pas en période de transition vers la saison de cyclicité.

3. Protocole de perfusion

Ce protocole a été mis en œuvre au cours de toutes les expériences ayant nécessité une administration continue de kisspeptide par voie intraveineuse.

a. Préparation des ponettes et pose du cathéter

Chaque ponette a été pesée puis légèrement tranquilisée par administration intraveineuse de romifidine (0,25 ml/100 kg, Sédivet®, Boehringer Ingelheim, France). Une des deux veines jugulaires a été tonduée puis nettoyée et désinfectée selon le protocole suivant : lavage à l'aide d'une brosse éponge imbibée de savon iodé (Polyvidone iodée, 7,5 g pour 100 ml, Vétédine® savon, Vétquinol, France) puis rincée à l'alcool à 70%. Ce protocole a été répété 3 fois. Enfin, la zone a été séchée à l'aide d'un papier absorbant. La pose du cathéter nécessitant l'intervention de 3 personnes pour l'effectuer dans des conditions sécurisantes, une personne a positionné la tête de la ponette de façon à incurver l'encolure et permettre ainsi à une seconde personne d'introduire dans la veine le trocard (intraflon, REF 122.27, diamètre 2,7 mm, Vygon, France) fourni avec le kit nutricath « S » (REF 2181.20, Vygon, France). Une troisième personne, équipée de gants stériles, a introduit le cathéter en silicone du kit nutricath « S » (ø int. 1,2 mm, ø ext. 2,0 mm, long. 60 cm) dans le trocard, sur une longueur d'environ 30 centimètres, puis a retiré le trocard. Au niveau de la sortie du cathéter de la veine, un morceau d'adhésif a été collé afin de constituer des ailettes qui ont elles mêmes été fixées à la peau avec du fil non résorbable (REF 0882488, Flexidene® DS30, B.Braun Médical, Boulogne Billancourt, France). Quelques millilitres d'une solution physiologique (solution isotonique de chlorure de sodium à 0,9%, B. Braun Médical, Boulogne Billancourt, France) héparinée à 0,4 % (héparine sodique, 25000 U.I. / 5 ml, Héparine Choay®, Sanofi-Aventis, France) ont été injectés dans le cathéter afin d'éviter une éventuelle coagulation. La longueur du cathéter étant de 60 cm, un raccord avec un autre cathéter en silastic (ø int. 1,4 mm, ø ext. 1,9 mm, Saint-Gobain performance Plastics Corporation, Taunton, MA, USA), a été



Photographie 1 : Ponette équipée du système de perfusion.

nécessaire pour permettre une connexion avec le système de perfusion, positionné sur le dos de la ponette.

b. Système de perfusion

Chaque ponette a été équipée d'un surfaix sur lequel a été fixé le système de perfusion (**photographie 1**). Le support était constitué d'un cylindre transparent en polychlorure de vinyle (PVC) (longueur : 30 cm, diamètre : 9 cm, Caplatub, Tours, France) attaché sur le surfaix à l'aide de lanières de cuir. A l'intérieur de ce cylindre avait été fixée une pompe péristaltique (RP-Q1, Takasago, 0,4 ml/min \pm 15%, Sercom, France), reliée à un interrupteur permettant la mise en marche/arrêt de la pompe. Ce dernier était associé à un voyant lumineux, témoin de la bonne alimentation de la pompe et permettant ainsi d'intervenir rapidement.

La pompe était reliée d'un côté à une poche de sérum physiologique (NaCl 0,9%, 250 ml, Coophavet, France), permettant de véhiculer différentes solutions, et de l'autre côté à la veine jugulaire par l'intermédiaire du cathéter en silastic. Le débit des pompes étant en moyenne de 0,34 à 0,46 ml/min, une poche de 250 ml se vidait donc environ en 9 à 12 heures.

Lors des expériences nécessitant une perfusion de 72 heures ou plus, nous avons choisi de mettre de nouvelles poches toutes les 8 heures. A chaque changement de poches, les pompes étaient attribuées de façon aléatoire entre les ponettes afin d'homogénéiser globalement les débits de perfusion qui pouvaient varier en fonction des pompes, et/ou au fil du temps pour une même pompe. A chaque changement de poche, le volume restant dans les poches était mesuré afin d'évaluer la dose exacte reçue par chaque ponette (volume initial – volume final/poids de la ponette).

c. Solution perfusée

Le kisspeptide-10 équin (eKP-10, PM = 1361 g/mol) a été synthétisé chimiquement selon la stratégie Fmoc, puis hautement purifié (pureté >95%) par HPLC en phase inverse, par le laboratoire GeneCust (laboratoire de Biotechnologie du Luxembourg S.A., Dudelange, Belgique).

Les lots suivants ont été successivement utilisés : PO # 080051, 200 mg ; PO # 080087, 2 g, PO # 080104, 10 g ; PO # 100067, 10 g, PO # 100305, 10 g. Ils ont été dissouts dans de l'eau pour préparation injectable (eau PPI, Cooper, Melun, France), et aliquotés dans des microtubes stériles de 1,5 ml (Eppendorfs, France) à une concentration de 50 mg/ml, puis congelés à -20°C.

Avant chaque expérience, cette solution a été reprise dans de l'eau PPI pour préparer des doses de 3 ml prêtes à être injectées dans les poches de sérum physiologique. La concentration de eKP-10 dans ces doses a été déterminée afin d'obtenir, après dilution dans le sérum physiologique, la dose de kisspeptide devant être administrée aux ponettes (mg/heure) pour chaque expérience. Les doses de 3 ml ont été conservées dans des tubes stériles de 5 ml (BD Vacutainer Z, REF 368434) puis stockées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Chaque dose a alors été décongelée dans de l'eau tiède avant d'être injectée dans la poche de sérum physiologique. Lors des changements de poches, nous avons congelé la solution restante pour un dosage éventuel ultérieur du eKP-10 afin de pouvoir vérifier *a posteriori* les doses administrées.

4. Prélèvements sanguins

Des prélèvements sanguins ont été effectués afin de mesurer les concentrations plasmatiques de LH, FSH, œstrogènes totaux ou 17 β -œstradiol, et progestérone. Ils ont été réalisés soit à l'aide du système Vacutainer® (Becton Dickinson, France) comportant un tube hépariné de 5 ml (ref 367869), un corps de prélèvement et une aiguille, soit pour les prélèvements sériés rapprochés à l'aide d'une seringue permettant d'aspirer le sang par l'intermédiaire d'un cathéter posé sur la veine jugulaire (cathéter i.v. court, intraflon 2, ref 122.27, Vygon, Ecoen, France). Les prélèvements sanguins ont été centrifugés à 3200 tours/min (2000 g) pendant 10 min à température ambiante. Les plasmas ont ensuite été récupérés dans des tubes cristal de 3 ml, qui ont été bouchés et stockés à -20°C jusqu'au dosage.

5. Dosages radio-immunologiques des hormones gonadotropes et stéroïdiennes

a. Généralités

Le principe du dosage radio-immunologique (RIA) repose sur la compétition entre un antigène marqué par un isotope (Ag^*) et le même antigène non marqué (Ag) vis-à-vis de leur anticorps (Ac) spécifique. A la précision spécifique rigoureuse de la réaction $Ag-Ac$ vient s'ajouter la haute sensibilité de détection par la radioactivité.

L' Ag^* étant apporté en quantité constante et connue, la radioactivité liée à l'anticorps dépendra de la quantité d' Ag présent dans le milieu à doser. Une gamme d'étalonnage obtenue à partir de quantités croissantes et connues d' Ag permettra de déterminer la concentration en Ag dans le milieu à analyser, en fonction de la radioactivité mesurée. La concentration d'un échantillon en Ag sera donc inversement proportionnelle à la quantité d' Ag^* .

i. Le marquage des gonadotropines :

Le principe consiste à fixer l'iode radioactif sur l'hormone par substitution à un atome d'hydrogène en position ortho par rapport au radical hydroxyle des résidus tyrosiles de la molécule protéique (comme l'ont démontré Harington et Neuberger pour l'insuline en 1936). L'iode 125 (^{125}I), qui se présente sous forme réduite (NaI) vient réagir avec le groupement phénol d'une tyrosine ou avec la chaîne latérale d'un résidu histidine. Ces groupements sont préalablement oxydés à l'aide d'un agent oxydant doux : l'iodogène. La fixation de ^{125}I se fait en position ortho- du groupement phénolique. On obtient ainsi une solution d'hormone monomarkuée, polymarkuée et d'iode libre.

ii. La purification de l'hormone marquée

Après l'étape du marquage, la purification est nécessaire afin de séparer l'iode libre qui n'a pas réagi, de l'hormone marquée. Le principe de séparation repose sur la différence de poids moléculaire entre l'iode libre (125 Da), et l'hormone (33 500 Da pour la LH, et 33 200 Da pour la FSH). Pour ce faire, une colonne SéphadexTM G25 (G25280, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) est utilisée. Cette colonne est composée d'un gel composé de billes poreuses hydratées par une solution de tampon Véronal (0,025M) contenant 3% de BSA qui sert également de solution d'élution. L'indice 25 correspond à la granulométrie des billes de SéphadexTM.

Immédiatement après le marquage, la solution contenant l'hormone marquée, l'hormone libre et l'iode libre est déposée au sommet d'une colonne SéphadexTM G25, puis éluee par le

tampon qui a servi pour l'équilibration de la colonne. Du fait de sa taille, l'hormone marquée ne peut pas passer entre les billes et est donc entraînée vers l'extérieur par le flux du tampon d'éluion. En revanche, l'iode libre est suffisamment petit pour passer à l'intérieur des billes. L'hormone marquée sort donc en premier de la colonne.

Un collecteur de fractions permet de récupérer dans des tubes de 5 ml les gouttes sortant de la colonne. Chaque fraction contient 20 gouttes. Ainsi les tous premiers tubes contiennent le tampon d'éluion, puis apparaît le premier pic radioactif correspondant à l'hormone marquée, puis le second pic radioactif correspond à l'iode libre.

La lecture de la radioactivité, exprimée en coups par minute (cpm), se fait grâce à l'utilisation d'un compteur gamma (Wallac Wizard 1470).

b. Dosage de la LH

Pour déterminer les concentrations plasmatiques de LH, nous avons utilisé la méthode publiée par Guillaume *et al.*, (2002), que nous avons adapté au cours de ma thèse afin d'augmenter l'étendue de la gamme sans perdre en sensibilité.

Les principales modifications sont les suivantes :

Tous les échantillons ont été dosés en duplicat dans 50 µl de plasma (100 µl de plasma dans l'ancien dosage). Les gammes ont été préparées avec des surcharges de LH (eLH NHPP AFP 5130A, A. F. Parlow) dans du plasma de ponette immunodéprimée pour la GnRH (plasma de ponette hypophysectomisée dans l'ancien dosage). L'anticorps a été utilisé au 1:440 000 final (Anti-LH AFP-240580, A.F. Parlow) (anticorps anti eCG dans l'ancien dosage).

La LH (eLH NHPP AFP 5130A, A. F. Parlow) a été marquée à l'iode 125 selon la procédure précédemment décrite.

Les coefficients de variation intra-dosage et inter-dosage ont été calculés à partir de plasma de références placés tous les 100 tubes. Les valeurs des coefficients de variation intra-dosage et inter-dosage sont respectivement de 5% et 14% respectivement pour une valeur de LH dans le plasma de 3,5 ng/ml.

La procédure du nouveau dosage est décrite en **annexe 1**.

Les paramètres de l'ancien dosage sont les suivants :

Rappelons que T= totaux (représente la quantité totale d'Ag* présent dans chaque tube), LNS = liaison non spécifique (Ag* sans Ac), B0 = liaison maximale (Ag* + Ac).

Pourcentage de liaison maximale spécifique (B0/T-LNS/T) = 25%.

Limite de détection (B0+ 2 x écart type) = 0,125 ng/ml.

ED-20 (B/B0 = 20%) = 2,651 ng/ml.

Les paramètres du nouveau dosage sont les suivants :

Pourcentage de liaison maximale spécifique (B0/T-LNS/T) = 34%.

Limite de détection (B0+ 2 x écart type) = 0,125 ng/ml.

ED-20 (B/B0 = 20%) = 4,961 ng/ml.

Une comparaison de résultats obtenus avec ces 2 dosages est présentée **figure 2.1** :

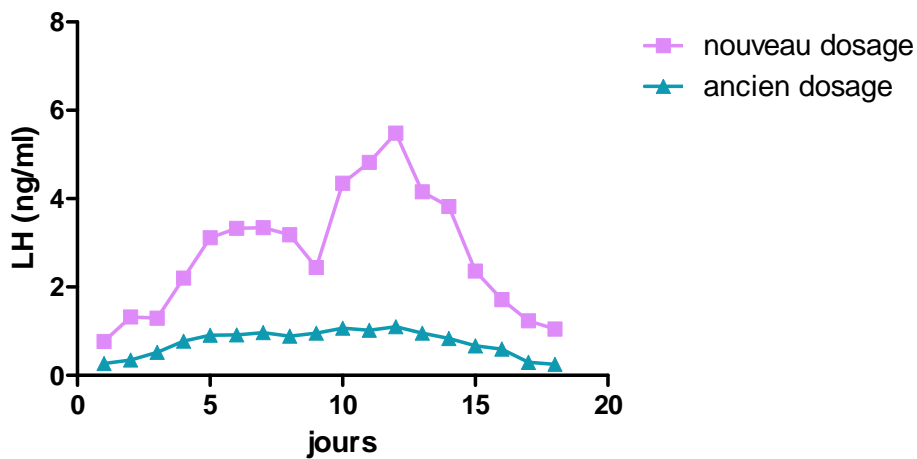


Figure 2.1 : Profils plasmatique de LH au cours d'un cycle, pour une même ponette, obtenus simultanément en utilisant les conditions de l'ancien dosage (en vert) et du nouveau dosage (en violet).

Tous les plasmas qui avaient été dosés dans l'ancien dosage (jusque fin 2009) ont été re-dosés.

c. Dosage de la FSH

D'après la méthode publiée par (Guillaume *et al.*, 2002), tous les échantillons ont été dosés en duplicat dans 100 μ l de plasma. Les gammes ont été préparées avec des surcharges de FSH (eFSH 1368, Y. Combarous) dans du plasma de ponette hypophysectomisée. L'anticorps a été utilisé au 1:160 000 final (Anti-FSH 803, Y. Combarous). La FSH (eFSH 1368, Y. Combarous) a été marquée à l'iode 125 avec de l'iodogène selon la procédure précédemment

décrite, et non avec la chloramine T comme décrit dans la méthode de Guillaume et collaborateurs. Les coefficients de variation intra-dosage et inter-dosage ont été calculés à partir de plasma de référence placés tous les 100 tubes.

La limite de détection est de 0,78 ng/ml. Les valeurs des coefficients de variation intra-dosage et inter-dosage sont respectivement de 12% et 8% pour une valeur de FSH dans le plasma de 3 ng/ml.

La procédure de ce dosage est détaillée en **annexe 2**.

d. Dosage des œstrogènes totaux

Le dosage plasmatique des œstrogènes totaux a été réalisé par une méthode de dosage RIA spécifique par compétition et en direct (c'est-à-dire sans extraction préalable), précédemment décrite (Briant *et al.*, 2003). Brièvement, pour chaque échantillon, 100 µl de plasma ont été hydrolysés pendant 24 heures à 37 °C en y ajoutant 100 µl de tampon d'hydrolyse (acide acétique 0,075 M, acétate de sodium 0,05 M, extrait d'*Helix pomatia* 10 ml/l (lot 213472/D221-01, BioSeptra, Cergy, France). L'anticorps anti-estrone (lapin n°1000, INRA, Nouzilly, France) a été dilué au 1 : 12 500 initial. L'estrone tritiée (TRK 321, lot 142, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Angleterre) a été utilisée à une concentration de travail de 7,5 nCi par tube de dosage. La limite de détection est de 0,05 ng/ml. Les coefficients de variation intra-dosage et inter-dosage ont été calculés à partir de plasmas de référence placés tous les 100 tubes. Ils sont respectivement de 17% et 5% pour une valeur d'estrone dans le plasma de 0,5 ng/ml.

e. Dosage du 17β-œstradiol

Le dosage plasmatique du 17β-œstradiol a été effectué par une méthode de dosage RIA spécifique, utilisant un traceur marqué à l'iode 125 fourni dans un kit de dosage (KIP0629, DIAsource immunoassay S.A., Nivelles, Belgique), validée à l'INRA de Nouzilly (Lardic L. *et al.*, 2010).

Ce dosage nécessite une extraction des plasmas et limite donc à environ 200 le nombre d'échantillons pouvant être traités en une seule fois. De plus, les échantillons doivent être concentrés pour que les valeurs soient comprises dans la gamme.

Pour chaque échantillon, 1 ml de plasma a été extrait avec 3 ml d'un mélange d'éthyle acétate et de cyclohexane (volume/volume), pendant 2 heures à température ambiante. Les

échantillons ont ensuite été congelés dans de l'azote liquide afin de séparer la phase aqueuse de la phase organique. La phase aqueuse (qui contient les stéroïdes) a été transférée dans des tubes en verre, puis évaporée. Les échantillons ont été repris dans 200 µl de tampon PBS, puis transférés dans des tubes coatés avec l'anticorps (tubes fournis dans le kit de dosage). La procédure détaillée est décrite en **annexe 3**.

Le rendement d'extraction a varié de 49 à 53 %.

L'activité hétérosécificique du dosage est de 1,8% pour l'estrone, 1,2% pour l'estriol, et inférieure à 1% pour les autres stéroïdes.

La limite de détection est de 3,12 pg/ml. Le coefficient intra-dosage pour une valeur d'E2 dans le tampon phosphate de 15 pg/ml est de 6%.

f. Dosage de la progestérone

Les dosages de la P4 ont été réalisés par le laboratoire de dosages hormonaux à l'INRA de Nouzilly selon une méthode validée (Canépa S. *et al.*, 2008).

Les concentrations plasmatiques de P4 ont été déterminées par une méthode de dosage EIA spécifique par déplacement et sans extraction au préalable. La limite de détection est de 0,4 ng/ml, et le coefficient de variation intra-dosage est de 9,3 % pour un plasma ayant une concentration de P4 de 1,2 ng/ml.

Cette procédure est détaillée en **annexe 4**.

6. Traitement des données

Les données quantitatives relatives aux poids, âges, tailles des follicules, et aux durées dans le cycle ont été exprimées en moyennes \pm SD (standard deviation = erreur type de l'échantillon) afin d'apprécier la variabilité.

Les concentrations hormonales ont été exprimées en moyennes \pm SEM (standard error of the mean = écart type de la moyenne) afin de permettre une meilleure lisibilité.

Les moyennes ont été représentées sous forme d'histogrammes lorsque des périodes ont été analysées, et sous forme de courbes lorsque l'évolution des profils a été analysée (début du pic, amplitude de sécrétion...).

L'aire sous la courbe, ou AUC (Area Under the Curve), a été calculée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5, en utilisant la méthode des trapèzes. Les AUCs ont été représentées sous forme d'histogrammes, avec pour unité ng/ml/h.

7. Analyses statistiques

Du fait du faible nombre d'échantillons par lot ($n < 10$), les comparaisons statistiques ont utilisé des tests non paramétriques exacts qui ont été effectués avec le logiciel StatXact5 (Cytel Software Corporation, Cambridge, USA). Les tests non paramétriques exacts sont plus puissants que les tests paramétriques traditionnels. Une comparaison globale entre les lots a tout d'abord été effectuée, et lorsque la différence était significative ($P \leq 0,05$), les lots ont été comparés soit 2 à 2, soit par rapport au témoin négatif. Les lots ont été considérés comme différents pour une probabilité unilatérale $\leq 0,05$, en appliquant la correction de Bonferroni (division de la probabilité par le nombre de combinaisons possibles).

Chapitre I : Mise en évidence du kisspeptide chez la jument

1. Introduction

Pour la mise en évidence du KP dans l'hypothalamus de jument, nous avons choisi une approche d'immuno-histochimie puisque cette technique est relativement simple à mettre en œuvre, et a déjà été utilisée dans d'autres espèces comme la brebis (Franceschini et al., 2006). Chez la plupart des espèces de mammifères, les différentes formes de KP identifiées (KP-54, KP-14, KP-13, KP-10) (Kotani et al., 2001; Bilban et al., 2004), ont une partie C-terminale commune (les 10 derniers acides aminés), et contiennent le motif RY-amide (Arg-Tyr-NH₂) ou RF-amide (Arg-Phe-NH₂) respectivement chez les espèces non primates et primates. Cependant, d'autres peptides membres de la famille des RF-amides tels que les RFRPs (RF-amide Related Peptides) sont présents au niveau de l'hypothalamus. Or, les anticorps disponibles au début de notre étude étaient tous dirigés contre cette partie C-Terminale du KP, et permettaient donc de mettre en évidence toutes les formes de KP, sans distinction, mais aussi potentiellement certains RFRPs.

Il est maintenant clairement établi que certains anticorps possèdent une réaction croisée avec ces peptides RFRP (notamment l'anticorps de chez Phoenix Pharmaceuticals). En revanche, l'anticorps 564 (Alain Caraty), produit dans notre laboratoire, dirigé contre la partie C-terminale du mKP-10, a montré une spécificité satisfaisante à des concentrations optimales, étant donné qu'il ne lie pas d'autres peptides hypothalamiques tels que les peptides de la famille des RFamides (Franceschini et al., 2006) et que les souris KO pour le Kiss1 ne présentent pas de cellules immunoréactives pour le KP avec cet anticorps (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007; Lapatto *et al.*, 2007).

Nous avons donc réalisé dans un premier temps un test de préabsorption avec le eKP-10 afin de s'assurer de l'affinité et de la spécificité de la réaction de l'anticorps 564 pour le eKP-10 au niveau de l'hypothalamus de jument. Nous avons ensuite entrepris la mise en évidence de cellules et de fibres immunoréactives pour le KP dans l'hypothalamus de jument, au moment de l'ovulation. Nous avons recherché la distribution de ces structures immunoréactives depuis l'aire pré-optique jusqu'aux corps mammillaires. Enfin, à l'aide d'un double marquage KP/GnRH, nous avons recherché les points d'interaction entre ces deux systèmes.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans **Journal of Chemical Neuroanatomy** :

Decourt, C., Y. Tillet, A. Caraty, I. Franceschini & C. Briant (2008) Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system. *J Chem Neuroanat*, 36, 131-7.

Au cours de l'écriture de cet article, nos résultats de mise en évidence du KP ont été confortés par l'identification de la séquence équine du KP-10 (GenBank numéro d'accès : XM_001489036), par alignement de séquences suite au séquençage systématique du génome équin (Gilles Bruneau, communication personnelle). Le KP-10 équin (eKP-10 : Y-**R**-W-N-S-F-G-L-R-Y) ne diffère du KP-10 ovin et du KP-10 murin (Y-N-W-N-S-F-G-L-R-Y) que par le 2^{ème} acide aminé.

Human (NP_002247)	Y N W N S F G L R F
Chimpanzee (XP_514123)	Y N W N S F G L R F
Macaque (XP_001098284)	Y N W N S F G L R F
Pig (ACB99811)	Y N W N S F G L R Y
Cattle (XP_872566)	Y N W N S F G L R Y
Horse (XP_001489086)	Y R W N S F G L R Y
Sheep (AAY56323)	Y N W N S F G L R Y
Mouse (NP_839991)	Y N W N S F G L R Y
Rat (NP_859043)	Y N W N S F G L R Y
Opossum (NP_001137604)	Y N W N S F G L R Y
Frog (DAA06348)	Y N W N S F G L R Y
Medaka (AB272755)	Y N L N S F G L R Y
Zebrafish (AB245404)	Y N L N S F G L R Y
Sea Bass (ACM07422)	Y N L N S F G L R Y
Goldfish (ACI96030)	Y N L N S F G L R Y

D'après (Oakley *et al.*, 2009).

2. Résumé de l'article

Pour déterminer si le KP pouvait être impliqué dans la fonction de reproduction chez la jument, nous avons étudié la distribution des neurones à KP et leurs interactions anatomiques avec les neurones à GnRH au niveau de l'hypothalamus de jument au moment de l'ovulation. Des neurones immunoréactifs pour le KP ont été localisés au niveau de l'ARC, formant une population très dense, avec une majorité de neurones entre le milieu de l'ARC et le récessus pré-mammillaire. Des fibres variqueuses immunoréactives ont été localisées, depuis l'aire pré-

optique jusqu'aux corps mammillaires, avec une densité plus importante au niveau de l'aire périventriculaire antérieure et de l'éminence médiane. De rares appositions entre des fibres à KP et des neurones à GnRH ont été observées au niveau de l'ARC. Des appositions entre des fibres à KP et des fibres à GnRH ont également été observées avec une incidence plutôt faible au niveau de l'aire antérieure périventriculaire basale, et une incidence élevée au niveau de l'éminence médiane.

Les bases neuroanatomiques de ce travail permettent de suggérer que, comme chez les autres espèces de mammifère, le KP exerce probablement un rôle majeur dans le contrôle de la libération de la GnRH.



Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system

C. Decourt^{a,b,c,d,e}, Y. Tillet^{a,b,c,d,e}, A. Caraty^{a,b,c,d,e}, I. Franceschini^{a,b,c,d,e}, C. Briant^{a,b,c,d,e,*}

^aINRA, UMR85, Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

^bCNRS, UMR6175, F-37380 Nouzilly, France

^cUniversité François Rabelais, F-37041 Tours, France

^dHaras Nationaux, F-37380 Nouzilly, France

^eIFR 135, Imagerie Fonctionnelle, F-37044 Tours, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 December 2007

Received in revised form 30 July 2008

Accepted 30 July 2008

Available online 7 August 2008

Keywords:

Kisspeptin

Hypothalamus

Horses

ABSTRACT

To determine if kisspeptin could be implicated in the control of reproduction in equine species, we studied the distribution of kisspeptin neurons and their anatomical interactions with GnRH neurons in the hypothalamus of pony mares. Brains were collected in three pony mares between 2 and 4 h after ovulation. One major population of kisspeptin immunoreactive cell bodies was found in the arcuate nucleus (ARC), where they extended from the middle of the nucleus to the premammillary recess. Kisspeptin immunoreactive varicose fibers extended from the preoptic area to the mammillary nuclei, with important densities especially in the anterior periventricular area and the median eminence (ME). Rare close appositions of kisspeptin fibres on GnRH cell bodies were observed in the ARC. Close appositions between kisspeptin and GnRH fibres were also confirmed at a low incidence in the anterior basal periventricular area and at a high incidence in the ME. This work provides neuroanatomical bases for further investigations into the role of kisspeptin in equine reproduction.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

KiSS-1 was originally identified as a metastasis suppressor gene encoding an array of structurally related peptides, namely kisspeptins which act through the G protein-coupled receptor GPR54. These peptides include metastatin, also known as kisspeptin-54, and shorter peptide fragments of the common KiSS-1 precursor, such as kisspeptin-14, kisspeptin-13 and kisspeptin-10 (kp10). All kisspeptins share the 10 amino acid C-terminal region and have the same potency in terms of receptor activation (Kotani et al., 2001).

Recently, the role of the KiSS-1/GPR54 system in the reproductive function has emerged, through neuroendocrine control of GnRH and gonadotropin secretion. Several studies have reported the marked ability of kisspeptin to elicit LH secretion in rodents (Matsui et al., 2004; Gottsch et al., 2004), sheep (Caraty et al., 2007) and primates (Shahab et al., 2005). As a result of this effect on gonadotropins, kisspeptin can induce ovulation in the rat

(Matsui et al., 2004) and the cyclic ewe (Caraty et al., 2007), and is also able to synchronize cycles with ovulations in anoestrus ewes (Caraty et al., 2007).

Kisspeptins have been identified in the brains of rodents (Smith et al., 2005), ewes (Pompolo et al., 2006; Franceschini et al., 2006), monkeys and women (Romero et al., 2007). Their distribution varies between species and according to physiological state. In female mice, two main populations of kisspeptin-expressing neurons have been identified by *in situ* hybridization (Smith et al., 2005): in the arcuate nucleus (ARC) and in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV), a well-defined sexually dimorphic nucleus located in the preoptic area (POA) in this species. It seems that these two populations play an important role in relaying the negative and positive (preovulatory GnRH/LH surge) feedback effects of estrogens on GnRH neurons, respectively (Smith et al., 2005). In female rats, most of the KiSS-1 mRNA-expressing cells contain estrogen receptor (ER) alpha immunoreactivity in the AVPV and ARC (Adachi et al., 2007). Kisspeptin immunoreactive fibres have also been found in the preoptic area in close apposition to GnRH neuronal cell bodies or fibres (Clarkson and Herbison, 2006; Kinoshita et al., 2005).

In the ewe, kp10 immunoreactive cells have been found predominantly in the ARC and POA (Pompolo et al., 2006; Franceschini et al., 2006). Numerous immunoreactive fibres were

* Corresponding author at: INRA, UMR85, Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France. Tel.: +33 2 47 42 78 07; fax: +33 2 47 42 77 43.

E-mail address: cbriant@pop.tours.inra.fr (C. Briant).

observed in the median eminence (ME), with the highest density in the external zone (Franceschini et al., 2006). Fibres were also seen running parallel to the walls of the third ventricle (Franceschini et al., 2006). Kp10 neurons co-express ER alpha (Franceschini et al., 2006) and progesterone receptors (Smith et al., 2007), particularly in the ARC. In the ARC, Kiss1-mRNA is negatively regulated by chronic elevated levels of E2 in ovariectomized ewes (Smith et al., 2007) and up-regulated by transient elevated levels of E2, in the caudal portions of the ARC during the late follicular phase (Estrada et al., 2006).

In humans and monkeys, neurons expressing Kiss1-mRNA are localized predominantly in the ARC and are negatively regulated by steroids (Rometo et al., 2007; Shibata et al., 2007).

In equine species, efficient treatments to synchronize ovulation would be very useful, as it is not currently possible to predict the day of ovulation in advance. In view of kisspeptin's potency to induce cycles with synchronized LH surges and ovulations in cyclic or anoestrus ewes, it appears interesting to investigate this molecule in mares. Therefore, the aim of the present experiment was to study the anatomical distribution of kisspeptin immunoreactive neurons, in the hypothalamus of pony mares, and their potential interactions with GnRH neuronal system. Brains were sampled in pony mares at a specific time of their ovarian cycle, when kisspeptin is known to play an important role in LH secretion. Thus, brains were collected at the moment when the LH secretion dramatically increases, on the day they ovulated, and specifically between 2 and 4 h after ovulation.

2. Materials and methods

2.1. Animals

All animal procedures were performed in accordance with the French law on experimental procedures (authorizations 37-118 and C37-175-2 of the French Ministry of Agriculture).

Three cyclic Welsh pony mares from the INRA herd of Nouzilly were used (body weight \pm SEM: 315 \pm 19 kg; age \pm SEM: 11 \pm 1.2 years). Cycles were synchronized with an injection of prostaglandin F2 α (cloprostenol, 250 mg, EstrumateTM, IM, Shering Plough, Levallois-Perret, France) between 5 and 8 days after their previous ovulation. To monitor follicular growth and detect ovulations, ovaries were scanned by ultrasonography, using a 5 MHz linear-array transducer (Aloka, Tokyo, Japan). Ovulations were induced with an injection of hCG (ChorulonTM, Intervet SA, Angers, France, 1500 UI) when the dominant follicle reached 33 mm. From 35 h after this injection, mares were scanned every hour to detect ovulation. Between 2 and 4 h after ovulation, mares were slaughtered in an official slaughterhouse.

2.2. Immunohistochemistry

Immediately after slaughtering, the heads were removed. For one mare, the head was perfused through the carotid arteries with sodium nitrite (3 L) and then with 4% paraformaldehyde (Merck France) in 0.1 M phosphate buffer (6 L, pH 7.4). For the other two mares, after the brain had been removed, the block of basal forebrain was dissected out and directly immersed overnight for fixation in 4% paraformaldehyde solution with 0.2% picric acid (Sigma–Aldrich, France). This block included all the hypothalamic nuclei and the ME. Following cryoprotection in 20% sucrose, 40 μ m thick frozen coronal sections, from the rostral preoptic area to the mamillary nuclei, were cut with a microtome and collected in phosphate buffer saline (PBS) 0.1 M containing 0.3% Triton[®]X-100 (Merck, France) and 0.01% sodium azide (VWR, Prolabo, Fontenay sous Bois, France).

To determine the distribution of kisspeptin neurons, every 10th free-floating section from the perfused head, and every 20th free-floating section from the two other heads were processed for immunolabelling. Sections were incubated with normal mare serum (1:15) for 30 min at room temperature, followed by 24 h of incubation in PBS 0.1 M, containing 0.3% Triton[®]X-100 and 0.01% sodium azide, with 1% H₂O₂.

Sections were then incubated for 72 h at 4 °C in the anti-kp10 serum (Franceschini et al., 2006) diluted (1:10,000) in a solution of PBS 0.1 M, containing 0.3% Triton[®]X-100, 0.01% sodium azide, and 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA). The anti-kp10 serum was raised in rabbit against the mouse/ewe kp10 sequence (Franceschini et al., 2006). The mouse/ewe kp10 (YNWNSFGLRY-NH₂) (GenBank accession no. DQ059506) is identical to the equine kp10, except for one amino acid: YRWNSFGLRY-NH₂. The equine sequence was obtained by comparing the ovine and equine genomes (GenBank accession no. AAWR02000000). Moreover, this antibody recognizes the C-terminal part of the sequence which is entirely retained in the

horse (Caraty, unpublished data). The high specificity of the anti-kp10 serum was previously established, with RIA binding not inhibited by other hypothalamic peptides including the PrRP a peptide of the RFamide family (Franceschini et al., 2006) and immunostaining not inhibited after preadsorption of the antibody with other RFamides peptides such as GnIH, NFF, Chemerin, QRFP and PrRP (Goodman et al., 2007). Moreover, anti-kp10 serum did not bind to any cells in the recently developed Kiss-1 KO mice (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007; Lapatto et al., 2007).

Sections were then rinsed twice for 2 h with PBS 0.1 M, containing 0.3% Triton[®]X-100 and 0.01% sodium azide, and rinsed once for 2 h with PBS 0.1 M, containing 0.3% Triton[®]X-100 without azide. Antibody labelling was revealed by incubating overnight at 4 °C in a Peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (711-035-152, Jackson ImmunoResearch Europe) (1:10,000) and then rinsed three times for 2 h with PBS 0.1 M, containing 0.3% Triton[®]X-100. The peroxidase was visualized with a mixture of 0.02% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma–Aldrich, France), 0.5% nickel ammonium sulfate (Fluka, Sigma–Aldrich, France) and 0.03% hydrogen peroxide in Tris–HCl buffer 0.05 M pH 7.6 for 5–15 min. Images were taken on an Olympus BX51 microscope using the Spot insight image capture system CCD camera.

To check the specificity of the staining, hypothalamic sections were also processed with the anti-kp10 serum pre-adsorbed overnight at 4 °C with increasing concentrations (2 ng–20 ng–200 ng–2 μ g/mL) of mouse kp10 (NeoMPS, Strasbourg, France). The staining was considered specific when the immunopositive reaction gradually decreased with increasing concentrations of mouse kp10 and was totally abolished with 20 ng/mL of peptide.

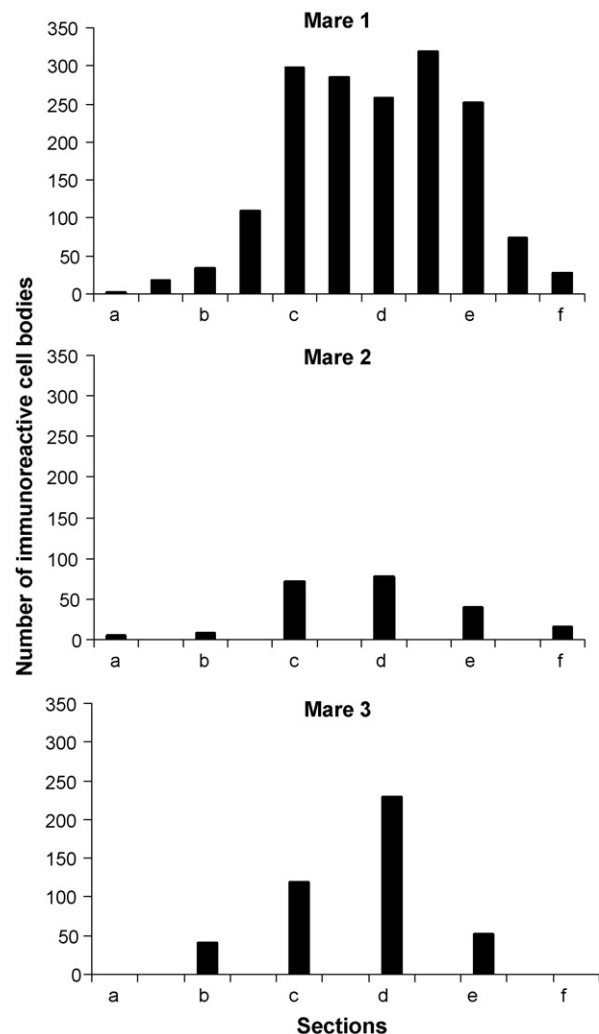


Fig. 1. Distribution of kisspeptin immunoreactive cell bodies in 40 μ m sections of the hypothalamus in three mares, at the level of the ARC. The head of the mare 1 was perfused but not the heads of the mares 2 and 3. Sections from (a) to (f) are presented from the rostral to the caudal part of ARC where cells were observed. The interval between two sections is 400 μ m.

To determine the potential morphological interactions between kisspeptin and GnRH structures in the three mares, every 10th free-floating adjacent section was processed for double immunolabelling. Sections were incubated with normal goat serum (1:15) for 30 min at room temperature, followed by a 48 h incubation at 4 °C in a mixture of the anti-kp10 serum (Franceschini et al., 2006) (1:10,000), a monoclonal anti-GnRH antibody raised in mouse (Eurogentec, Angers, France) (1:5000) and 0.1% BSA. Sections were then rinsed with PBS 0.1 M, containing 0.3% Triton[®]X-100 and 0.01% sodium azide, six times during 30 min. Sections were incubated overnight at 4 °C, in a mixture of Alexafluor[®] 546-conjugated goat anti-rabbit IgG (A11035, Molecular Probes, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) (1:4000) and biotin-SP-conjugated goat anti-mouse IgG (115-065-164, Jackson ImmunoResearch Europe) (1:500). Sections were then rinsed with PBS 0.1 M, containing 0.3% Triton[®]X-100 and 0.01% sodium azide, six times during 30 min. Sections were incubated with Neutralized Avidin-FluoProbes[®] 488 (FP-BC6391, Interchim, France) (1:500), during 2 h, and then rinsed with PBS 0.1 M containing 0.3% Triton[®]X-100 and 0.01% sodium azide, six times during 30 min. Finally, the sections were mounted on gelatine-coated slides and coverslipped with a fluoromount-G mounting medium (Southern Biotech, Clinisciences, France). Immunostaining was observed using an epifluorescent microscope (Olympus BX51) with the Spot insight image capture system CCD camera, and confocal images were captured on a confocal laser scanning microscope system (Olympus Fluoview 500) and analysed using the Fluoview[™] software.

To determine anatomical structures in the hypothalamus of the mares, adjacent sections were stained with cresyl violet.

3. Results

The distribution of kisspeptin immunoreactivity was clearly cytoplasmic, detectable in both cell bodies and fibres. The

distribution of kisspeptin immunoreactive cell bodies is presented in Figs. 1 and 2. Although the number of immunoreactive cells appeared greater for the mare whose head was perfused, their pattern of distribution was similar between the three mares. Kisspeptin immunoreactive cell bodies were located predominantly in the ARC and a few scattered cells were seen in the dorsomedial nucleus. In the ARC, kisspeptin immunoreactive cell bodies were distributed at a high density. They extended from the middle of the ARC to the corpus mamillare and were more condensed in the caudal areas of the ARC up to the preamillary recessus, with more than 300 neurons in these caudal sections. They were approximately 25 µm in diameter and they showed a round somal morphology. The majority of cell bodies were bipolar, but some were unipolar or multipolar.

Kisspeptin immunoreactive varicose fibres extended from the POA to the corpus mamillare (Fig. 3). In the anterior POA, their density was low (Fig. 3A) and increased progressively to reach a high density in the anterior periventricular area, where they ran parallel to the walls of the third ventricle (Fig. 3B). This density then progressively decreased to become low at the level of the corpus mamillare. A high density of kisspeptin immunoreactive fibres was also observed in the ME, essentially in a wide median internal zone (Fig. 3C).

Dual immunofluorescence for kisspeptin and GnRH neurons in the hypothalamus of the three mares demonstrated that the two

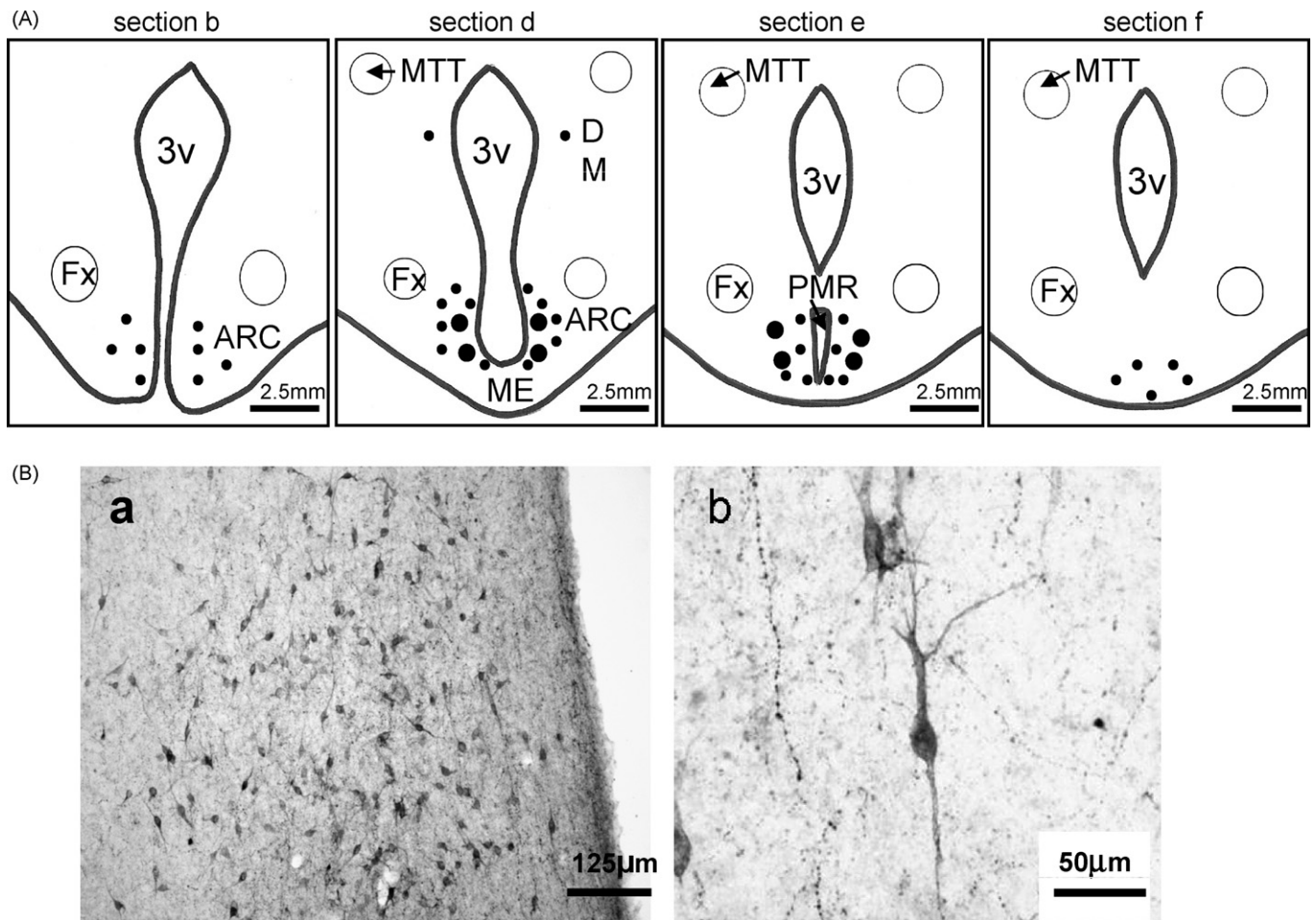


Fig. 2. (A) Diagrammatic presentation of localization and density of kisspeptin immunoreactive cell bodies in sections (b), (d), (e), and (f) (from Fig. 1) of the ARC of the mare 1. Small dot, <math>< 5</math> neurons; big dot, 50 neurons. (B) Photomicrographs of kisspeptin immunoreactive cell bodies taken on the section (d) above of the ARC of the mare 1, at two different magnifications showing (Ba) the density of neurons in the ARC and (Bb) a bipolar neuron in the ARC. ARC, arcuate nucleus; DM, dorsomedial nucleus; Fx, fornix; ME, median eminence; MTT, mammillothalamic tract; PMR, preamillary recessus; 3V, third ventricle.

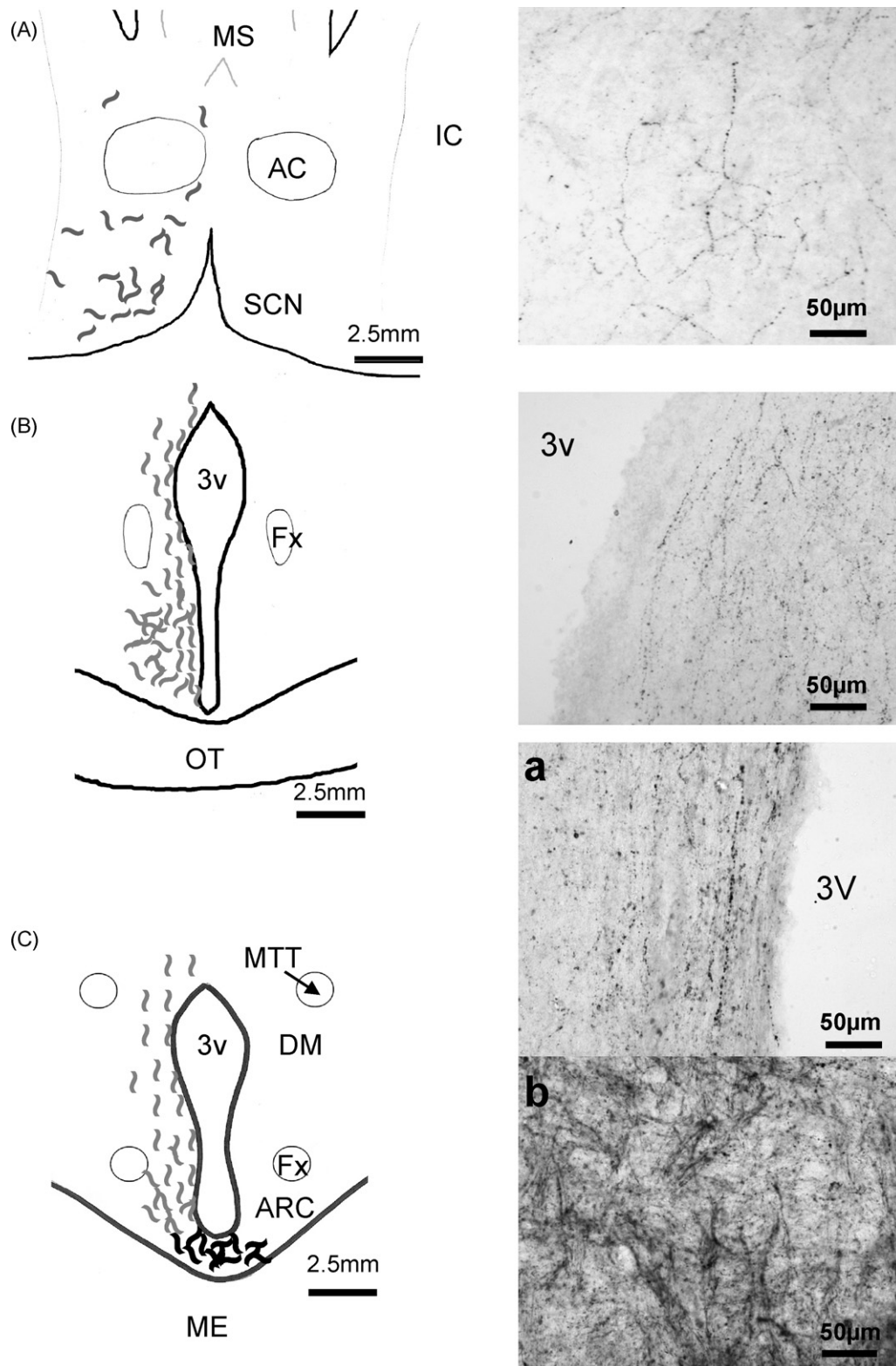


Fig. 3. Localization and density of kisspeptin immunoreactive fibres in the hypothalamus of the mare 1, with diagrammatic representation of the distribution on the left and corresponding microphotographs on the right. (A) In the POA at the level of the SCN, fibres with low density are not organized with any obvious orientation. (B) In the anterior periventricular area, fibres with higher density run parallel to the wall of the 3V. (C) In the ARC (Ca) numerous fibres run parallel to the wall of the 3V, and in the ME (Cb) numerous fibres with no obvious orientation can be observed. Thin grey line, <5 fibres; large black line, 5–10 fibres. AC, anterior commissure; ARC, arcuate nucleus; DM, dorsomedial nucleus; Fx, fornix; IC, internal capsule; ME, median eminence; MS, medial septum; MTT, mammillothalamic tract; OT, optic tract; SCN, supra-chiasmatic nucleus; 3V, third ventricle.

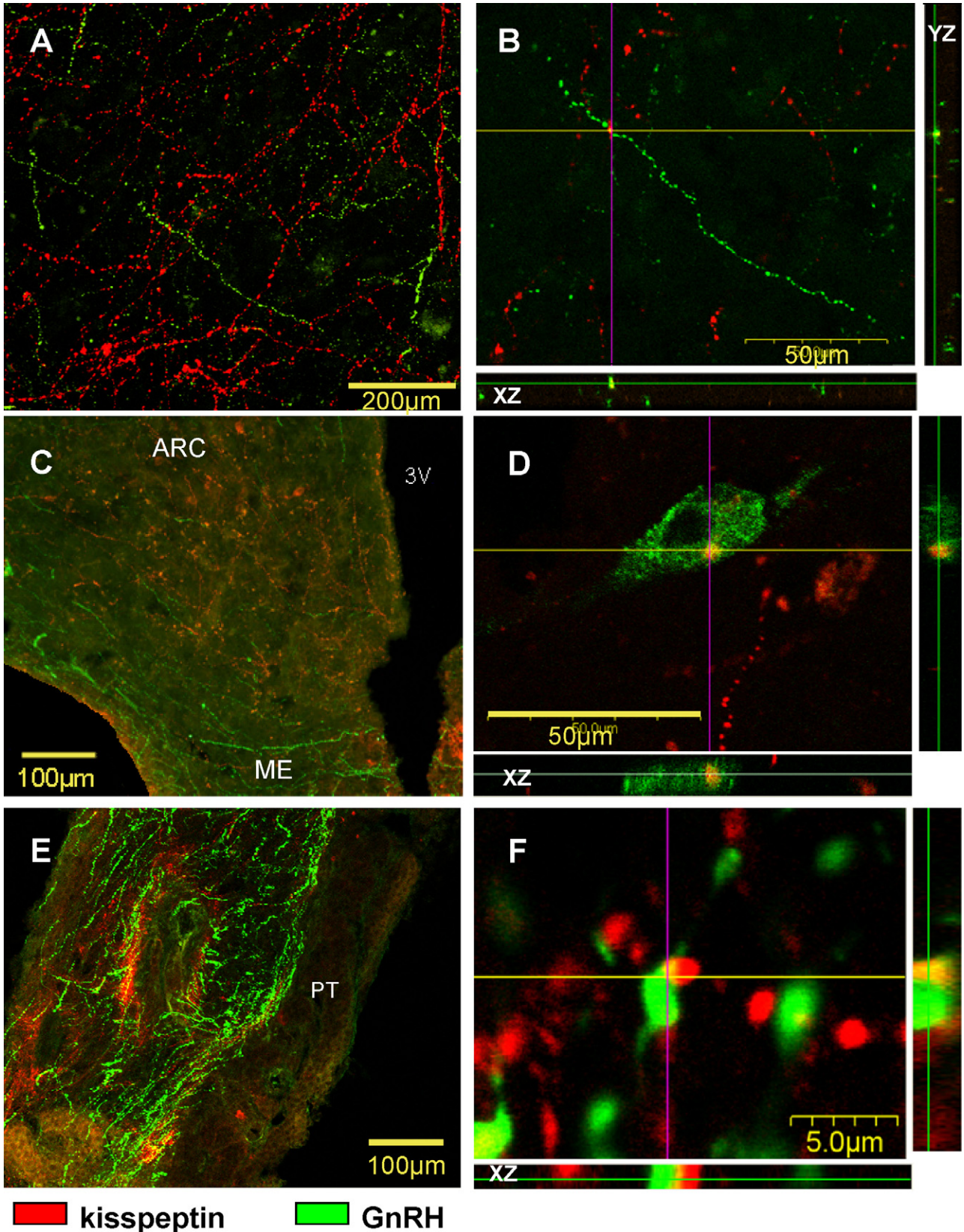


Fig. 4. Double immunolabelling for kisspeptin and GnRH neurons in the hypothalamus of mares. Single confocal 200 nm-thick optical sections demonstrate: At the level of the anterior basal periventricular area in mare 1, (A) numerous kisspeptin (red) and GnRH (green) fibres with (B) one close apposition between the two types of fibres visualized in different planes. At the level of the ARC in mare 3, (C) a rather high density of kisspeptin immunoreactive cell bodies and fibres with some GnRH fibres and rare GnRH immunoreactive cell bodies. The density of GnRH fibres increases when getting near the ME, (D) one close apposition between a GnRH cell body and a kisspeptin fibre. At the level of the ME in mare 2, (E) a very high density of GnRH fibres, a significant number of which are in close contact with the walls of the vessels and a smaller density of kisspeptin fibres, (F) one close apposition between GnRH and kisspeptin fibres. ARC, arcuate nucleus; ME, median eminence; PT, Pars tuberalis; 3V, third ventricle.

peptides were not colocalized. However, close appositions between kisspeptin fibres and GnRH cell bodies or fibres were observed in the periventricular area, the ARC and the ME (Fig. 4). These appositions were then analysed using confocal microscopy (Fig. 4). Rare “inputs” of kisspeptin fibres on GnRH cell bodies (less than 3 per animal) were observed in the ARC. Close appositions were found between kisspeptin and GnRH fibres in the anterior basal periventricular area and the ME. They were at low incidence in the anterior basal periventricular area (between 5 and 10 per animal) and more numerous in the ME (around 10 per 200 nm-thick optical section).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first to describe the distribution of kisspeptin neurons and their morphological interactions with GnRH neurons in the equine hypothalamus. In pony mares, at the time of the ovulatory LH surge, the majority of kisspeptin immunoreactive cell bodies are distributed in the ARC. This finding is consistent with results obtained in all studied species: rodents (Smith et al., 2005), sheep (Pompolo et al., 2006; Franceschini et al., 2006) and primates (Rometo et al., 2007; Shibata et al., 2007). Moreover, the size and distribution of these cells, from the rostral to the caudal side of the ARC, are very similar to those observed in sheep (Franceschini et al., 2006).

In contrast to rodents and ewes, no kisspeptin immunoreactive cell bodies were found in the POA, in the present study. The expression of KiSS-1 mRNA in the POA appears highly variable according to the species and the stage of cycle. In rodents the feedback of estradiol is positive in the AVPV (mice: Smith et al., 2005), and in cyclic animals, the AVPV KiSS-1 expression is highest in the proestrus afternoon (rat: Adachi et al., 2007; mice: Smith et al., 2006). In these species the kisspeptin neurons of the AVPV are involved in the estradiol induced preovulatory GnRH/LH surge. In contrast in ewes the number of KiSS-1 mRNA-expressing cells in the POA is significant, but not affected by ovariectomy or steroids (Smith et al., 2007). Another situation is represented in primates, where only rare KiSS-1 expressing neurons are observed in the POA, whatever is the endocrine status of the subjects (menopausal or intact women: Rometo et al., 2007; adult male monkeys: Shibata et al., 2007).

With respect to kisspeptin distribution, the results of the present experiment may indicate that horses would then be similar to human and monkeys with kisspeptin cell bodies predominantly localized in the ARC. However, one cannot exclude a potential regulation of the peptide by steroids, as in the present experiment only one specific stage of the cycle was studied. It is possible that kisspeptin was present in neuronal cells of the POA, but at quantities too low to be detected, and we did not inject colchicine before sacrifice, as it was done in ewes (Franceschini et al., 2006). To confirm the absence of kisspeptin cell bodies in the POA of the horse, future experiments should be refined to compare the distribution of these cells, for example during the follicular and luteal phases, or during oestrus and anoestrus in mares, or in males and females.

Interestingly, the present anatomical distribution of kisspeptin cells, predominantly in the ARC, corresponds to an area where GnRH neurons are known to be numerous (Melrose et al., 1994). For these latter authors the whole mediobasal hypothalamus area is of primary importance, for secretion of gonadotropins in equine species, compared to GnRH neurons in other areas. This provides a morphological basis for a potential relationship between these two kinds of neurons and for the potential involvement of kisspeptin in equine reproduction.

To propose an initial response to this hypothesis, we attempted to identify morphological interactions between GnRH and kisspeptin structures in the hypothalamus of the three mares by dual immunofluorescence. Close appositions between kisspeptin fibres and GnRH cells or fibres could be evidenced at different levels. However, to conclude that synaptic contacts exist, a study using electronic microscopy would be necessary. Close appositions between kisspeptin fibres and GnRH cells could only be observed in the ARC and at a very low incidence. By way of comparison, in rats, these close appositions have also been found, but in the POA (Clarkson and Herbison, 2006; Kinoshita et al., 2005), and the peptide released in the POA is involved in the preovulatory LH surge (Kinoshita et al., 2005). Thus in mares, at the time of the preovulatory surge, the ARC would be possibly an area involved in the GnRH surge. However, only rare appositions between kisspeptin fibres and GnRH cell bodies could be seen in the present study. This may reflect the rather low number of GnRH cells detected in the three mares, and this could be attributed to the fact that at this stage of the cycle, GnRH secretion is increased (Irvine and Alexander, 1994), inducing a greater draining of neuron cell bodies and as a consequence a increased secretion at the level of fibres. On the other hand, numerous GnRH immunoreactive fibres were observed at the level of the external ME, where they seem to pour into the visible vessels. Interestingly in this area numerous close appositions between GnRH and kisspeptin fibres could also be seen. In ovariectomized ewes, at the time of an induced LH surge, we also have observed these kinds of appositions in the ME (Franceschini, unpublished results). From the recent literature the hypotheses emerges that kisspeptin neurons could regulate GnRH release at GnRH neuronal terminals (Maeda et al., 2007). Thus, it has been demonstrated that kp10 can stimulate GnRH release from explants of MBH, which contain GnRH nerve terminals in the ME region, in the absence of GnRH neuronal cell bodies (d'Anglemont de Tassigny et al., 2008). Our present results seem to suggest that in mares at the time of the LH surge, the ME could be of primary importance for the regulation of GnRH secretion by kisspeptin.

In conclusion, this study shows that in mares, just after ovulation, one major kisspeptin population is observed in the ARC, with close appositions between kisspeptin fibres and GnRH cells or fibres, in the ARC and the ME. The greater number of these appositions affects fibres at the level of the ME. This work provides neuroanatomical bases for further investigations into the role of kisspeptin in equine reproduction.

Acknowledgements

We greatly thank Gaël Ramé and Jean-Philippe Dubois for their help to collect brains, Maryline Cateau Stéphanie Martinet and Samia Ben-Saïd for their technical assistance, Gilles Bruneau for his help to use genome data bases, Guy Duchamp and his team from the UPEA PRC for taking care of the mares and the French National Studs for their financial support.

References

- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., 2007. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J. Reprod. Dev.* 53 (2), 367–378.
- d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Dixon, J.P.C., Day, K., Leitch, H.G., Hendrick, A.G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M.B.L., Aparicio, S.A.J.R., Colledge, W.H., 2007. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (25), 10714–10719.
- d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., 2008. Kisspeptin can stimulate GnRH release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149 (8), 3926–3932.
- Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Said, S., Morrissey, A., Cogne, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory

- surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148 (11), 5258–5267.
- Clarkson, J., Herbison, A.E., 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147 (12), 5817–5825.
- Estrada, K.M., Clay, C.M., Pompolo, S., Smith, J.T., Clarke, I.J., 2006. Elevated Kiss-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. *J. Neuroendocrinol.* 18 (10), 806–809.
- Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci. Lett.* 401 (3), 225–230.
- Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., de Oliveira, C.V., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148 (12), 5752–5760.
- Gottsche, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145, 4073–4077.
- Irvine, C.H.G., Alexander, S.L., 1994. The dynamics of gonadotropin releasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. *J. Endocrinol.* 140, 283–295.
- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Maeda, K., 2005. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146, 4431–4436.
- Kotani, M., Dethoux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., Parmentier, M., 2001. The metastasis suppressor gene Kiss-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.* 276, 34631–34636.
- Lapatto, R., Pallais, J.C., Zhang, D., Chan, Y.M., Mahan, A., Cerrato, F., Le, W.W., Hoffman, G.E., Seminara, S.B., 2007. *Kiss1*^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than *Gpr54*^{-/-} mice. *Endocrinology* 148, 4927–4936.
- Maeda, K.I., Adachi, S., Inoue, K., Ohkura, H., Tsukamura, H., 2007. Metastin/Kisspeptin and control of estrous cycle in rats. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8, 21–29.
- Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H., Ohtaki, T., 2004. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 383–388.
- Melrose, P.A., Pickel, C., Chermie, H.S., 1994. Distribution and morphology of immunoreactive gonadotropin-releasing-hormone (GnRH) neurons in the basal forebrain of ponies. *J. Comp. Neurol.* 339 (2), 269–287.
- Pompolo, S., Pereira, A., Estrada, K.M., Clarke, I.J., 2006. Co-localisation of Kisspeptin and gonadotropin releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology* 147, 804–810.
- Rometo, A.M., Krajewski, S.J., Voytko, M.L., 2007. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J. Clin. Endocr. Metab.* 92 (7), 2744–2750.
- Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (6), 2129–2134.
- Shibata, M., Friedman, R.L., Ramaswamy, S., Plant, T.M., 2007. Evidence that down regulation of hypothalamic Kiss-1 expression is involved in the negative feedback action of testosterone to regulate luteinising hormone secretion in the adult male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *J. Neuroendocrinol.* 19 (6), 432–438.
- Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2005. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146, 3686–3692.
- Smith, J.T., Popa, S.M., Clifton, D.K., Hoffman, G., Steiner, R.A., 2006. Kiss-1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J. Neurosci.* 26 (25), 6687–6694.
- Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A., 2007. Kiss-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 148 (3), 1150–1157.

3. Discussion de l'article dans le contexte bibliographique actuel

Nous avons mis en évidence la présence de fibres et de cellules immunoréactives pour le KP. La grande majorité des neurones immunoréactifs pour le KP dans l'hypothalamus de jument, au moment de l'ovulation, est localisée au niveau du noyau arqué. Ce résultat est cohérent avec ceux de la littérature, puisque l'on retrouve des neurones à KP au niveau de l'ARC chez toutes les espèces de mammifère étudiées (Mikkelsen et Simonneaux, 2009). Comme chez la brebis (Franceschini *et al.*, 2006) et le singe (Ramaswamy *et al.*, 2008), la densité de ces neurones est plus importante dans la région caudale de l'ARC.

En revanche, nous n'avons pas observé de neurones immunoréactifs pour le KP dans l'APO au moment de l'ovulation contrairement à Magee et collaborateurs chez la jument en diœstrus (Magee *et al.*, 2009). Cette différence peut être attribuée essentiellement à deux facteurs, l'anticorps utilisé et le stade du cycle auquel les hypothalamis ont été prélevés. En effet, l'anticorps utilisé par Magee et collaborateurs (anti hKP-54 de chez Phoenix (G-048-56)) pourrait avoir mis en évidence d'autres peptides de type RFRP, puisque celui-ci ne présente pas une bonne spécificité pour les KPs (Lehman *et al.*, 2010). Concernant le stade du cycle, les hypothalamis n'ont pas été prélevés au même moment (juste après ovulation dans notre étude, et pendant la phase de diestrus dans l'étude de Magee et collaborateurs). Or chez la brebis, l'expression de l'ARNm du Kiss1 et de la protéine KP augmentent en fin de phase folliculaire dans les neurones de l'ARC et également dans ceux de l'APO (Smith *et al.*, 2009a). Ce stade correspond à un stade antérieur par rapport à notre expérience et il est donc possible que dans notre étude, l'absence de signal au niveau de l'APO soit la conséquence d'une libération rapide du KP qui ne serait pas stocké dans les neurones, au moment de l'ovulation.

Nous avons mis en évidence de rares appositions entre les fibres à KP et les neurones à GnRH, ce qui est en accord avec des études menées chez le rat (Kinoshita *et al.*, 2005). Les appositions plus fréquentes entre les fibres à KP et les fibres à GnRH au niveau de l'éminence médiane, que nous avons également observées, et qui ont également été montrées chez le singe (Ramaswamy *et al.*, 2008), suggèrent fortement une action de fibre à fibre. Chez le singe, l'analyse des résultats issus de la technique de perfusion push-pull au niveau de l'éminence médiane montre qu'environ 75 % des pulses de KP sont corrélés à un pulse de

GnRH (Keen *et al.*, 2008). Une autre étude chez le macaque révèle qu'une administration continue d'un antagoniste du KP au niveau de l'éminence médiane abolit la pulsativité de la GnRH (Roseweir *et al.*, 2009).

De plus, des données récentes semblent confirmer le fait que le KP pourrait agir directement au niveau de l'éminence médiane, sur les terminaisons des neurones à GnRH (Uenoyama *et al.*, 2011).

L'ensemble de ces données suggèrent donc que l'action du KP sur la libération de la GnRH se ferait principalement par des interactions non synaptiques, axo-axonales, au niveau de l'éminence médiane.

Dans ce premier chapitre, nous avons montré, par une approche immunohistochimique, la présence du kisspeptide dans l'hypothalamus de la jument au moment de l'ovulation, ce qui suggère son implication dans la fonction de reproduction également dans cette espèce. Au regard des résultats obtenus avec ce peptide pour la maîtrise du cycle chez la brebis, la mise en œuvre d'une recherche comparable chez la jument apparaissait justifiée.

Chapitre II : Expériences préliminaires

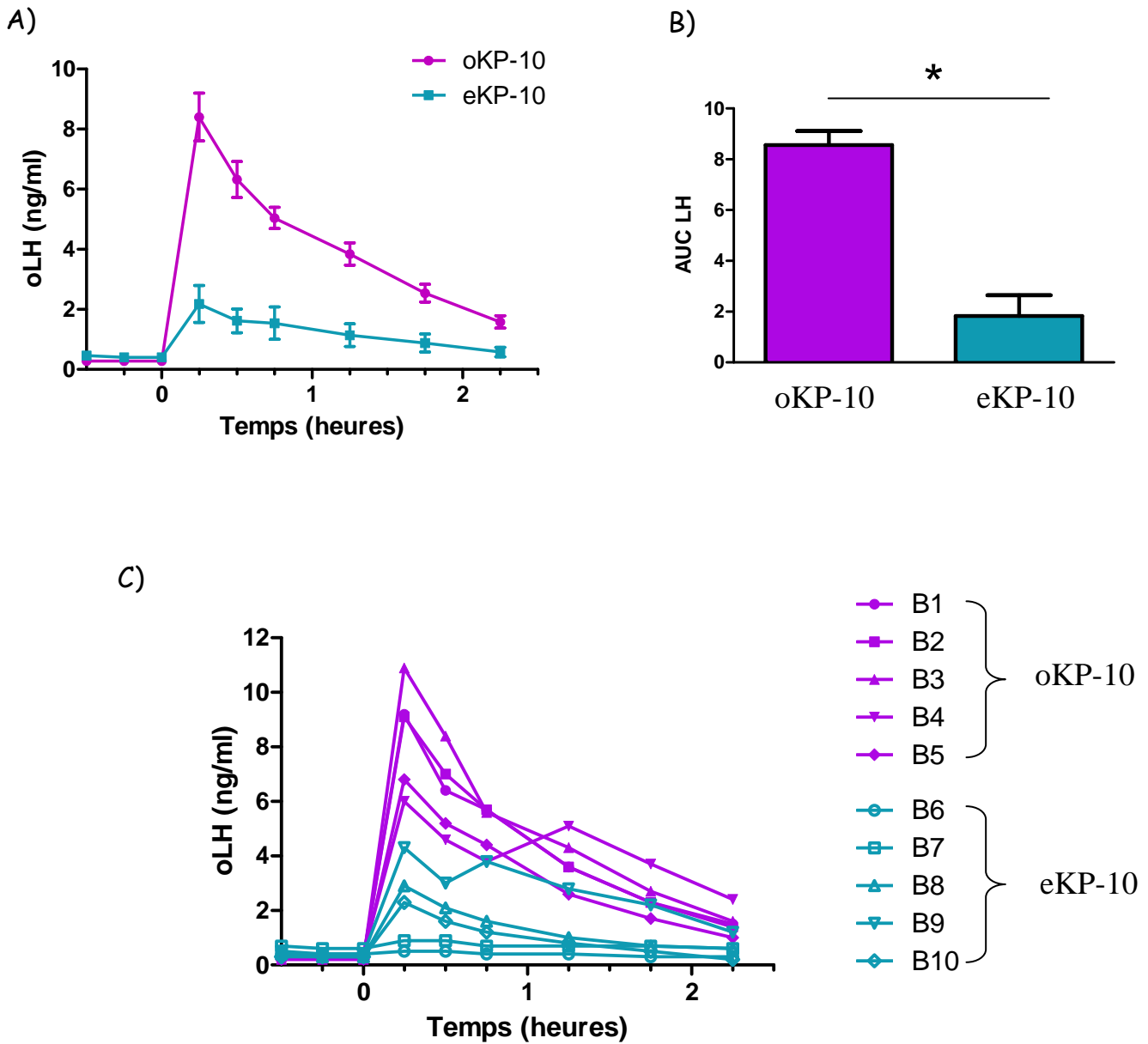


Figure 2.1 : Concentrations plasmatiques de LH chez des brebis recevant une injection i.v. unique de 20 µg : de oKP-10 (n=5) ou de eKP-10 (n=5). (A) Profils plasmatiques moyens (± SEM); (B) AUCs moyennes (± SEM); (C) Profils individuels. * $P \leq 0,05$.

A. *Expérience 1 : injection i.v. unique de mKP-10 ou de eKP-10 chez des brebis*

Objectifs :

Le eKP-10 n'ayant jamais été testé *in vivo*, nous avons tout d'abord souhaité vérifier son activité sur la stimulation de la LH dans une espèce où une forme de KP-10 proche était efficace, la brebis. Nous avons donc comparé, dans cette espèce, les effets du eKP-10 et du oKP-10 (dont les séquences ne diffèrent que par le deuxième acide aminé en partie N-terminale) après injection unique par voie i.v..

1. Protocole expérimental

Dix brebis Ile de France ovariectomisées ont été réparties dans un des deux lots suivants :

→ oKP-10 (YNWNSFGLRY-NH₂) (n = 5)

→ eKP-10 (YRWNSFGLRY-NH₂) (n = 5)

Les brebis ont reçu une injection de 20 µg de oKP-10 ou de eKP-10 par voie i.v.

Des prélèvements sanguins sériés ont été effectués toutes les 15 min, depuis 30 min avant jusqu'à 45 min après l'injection, puis toutes les 30 min jusqu'à 2h15 après l'injection, pour le dosage de la LH.

Les valeurs des aires sous la courbe (AUCs) ont été comparées par un test exact non paramétrique de permutation pour échantillons indépendants.

2. Résultats/discussion

L'examen des moyennes des concentrations plasmatiques de LH obtenues après l'injection montre que les deux formes de KP-10 (ovin ou équin) stimulent la sécrétion de LH chez la brebis (**figure 2.1.A**). Comme précédemment observé avec le oKP-10 (Caraty *et al.*, 2007), cette stimulation est transitoire. Les concentrations plasmatiques maximales de la LH sont maximales après l'injection, dès le premier prélèvement à 15 min, et se rapprochent du niveau basal à la fin de la série de prélèvements, soit 2h15 après l'injection. Toutefois, la stimulation de la sécrétion de LH est supérieure avec le oKP-10 car l'aire sous la courbe (AUC) des

réponses des brebis du lot oKP-10 est significativement supérieure à celle des brebis du lot eKP-10 (**figure 2.1.B**).

L'analyse des profils individuels montre que toutes les brebis recevant le eKP-10 (brebis 6 à 10) sont celles ayant les plus faibles réponses en terme de sécrétion de LH, voire même très faibles pour les brebis 6 et 7 (**figure 2.1.C**). Néanmoins, les brebis n'ont pas été interverties dans les traitements et l'interaction brebis/traitement n'a donc pas été testée.

Cette expérience a permis de vérifier l'activité biologique du eKP-10 chez la brebis ; elle est toutefois inférieure à celle du oKP-10. L'analyse de l'alanine-scanning du hKP-10, qui consiste à substituer chaque acide aminé par une alanine afin de déterminer la contribution de chacun, montre que les 5 derniers acides aminés positionnés en partie C-terminale du peptide, ainsi que le groupement amide, sont importants pour la liaison au récepteur (Lee *et al.*, 2009). Le eKP-10 ne diffère du oKP-10 que par le 2^{ème} acide aminé en partie N-terminale du peptide. Il n'est donc pas exclu que la partie C-terminale du KP-10 soit indispensable pour la liaison et l'activation du récepteur, et que la partie N-terminale intervienne plutôt dans l'affinité pour le récepteur. Par ailleurs, il n'est pas exclu que l'affinité des récepteurs pour leurs peptides respectifs diffère selon les espèces.

B. Expérience 2 : injections i.v. uniques successives de eKP-10 chez des ponettes en anœstrus saisonnier.

Objectifs :

Nous avons ensuite évalué l'efficacité du eKP-10 à stimuler les gonadotropines FSH et LH lors d'injections i.v. uniques chez la ponette en inactivité ovarienne, pendant la saison d'anœstrus saisonnier. En effet, pendant cette période, les taux hormonaux sont naturellement bas, permettant ainsi de mieux visualiser un effet stimulant sur la libération de gonadotropines.

Pour cette première administration de eKP-10 chez la ponette, les doses ont été choisies de la façon suivante :

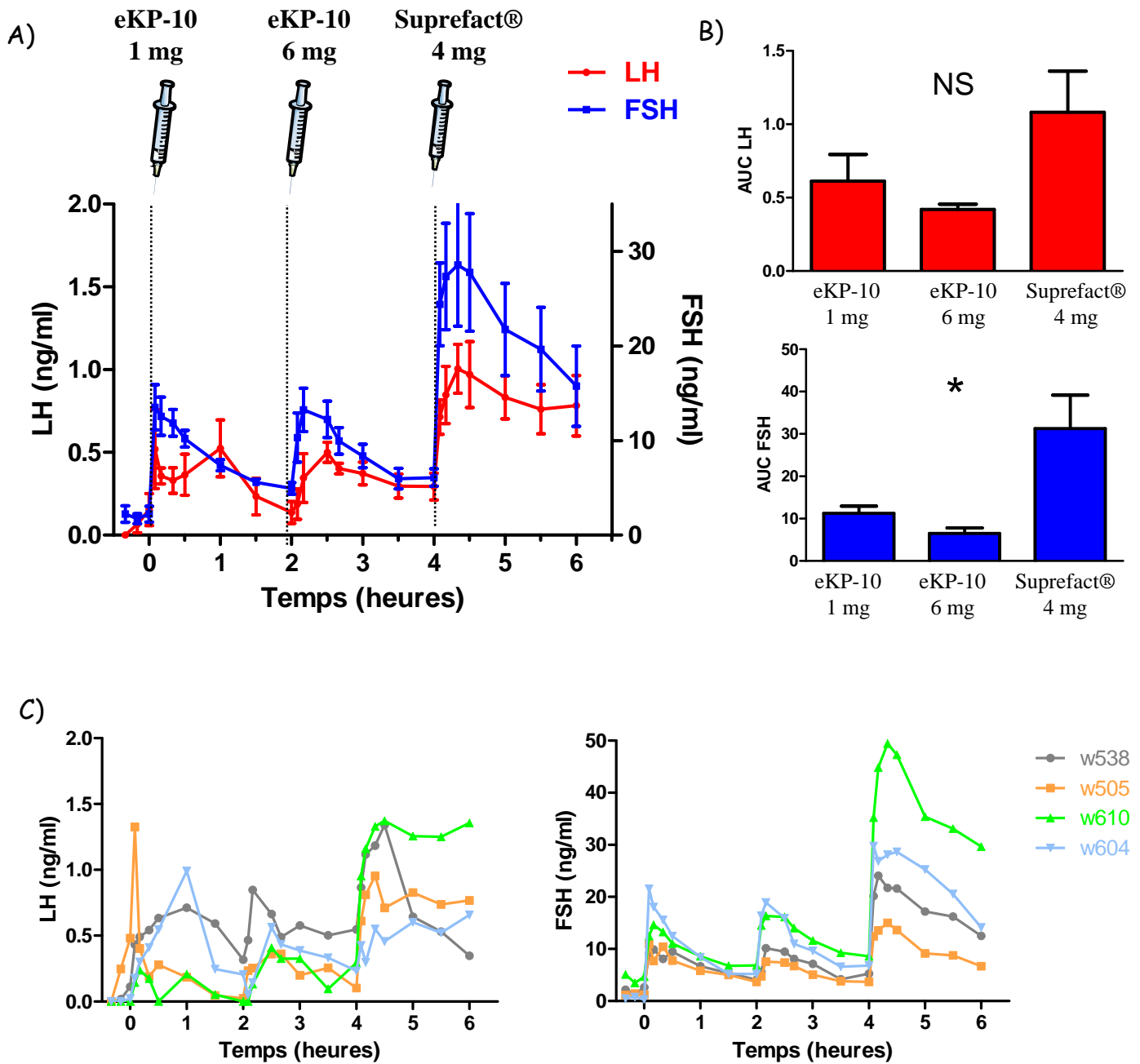


Figure 2.2 : Concentrations plasmatiques de LH et de FSH chez des ponettes (n=4) recevant des injections i.v. uniques successives de 1 mg de eKP-10, puis 6 mg de eKP-10 et enfin 4 mg de buséréline. (A) Moyennes (\pm SEM); (B) AUCs moyennes (+ SEM) pour la LH (rouge) et la FSH (bleu) suite à chaque injection; (C) Profils individuels. NS = non significatif. * $P \leq 0,05$.

Des expériences antérieures réalisées dans le laboratoire chez la ponette avaient montré que des injections i.v. répétées de 60 ou de 300 µg de oKP-10 par ponette (poids moyen 300 kg) n'avaient pas d'effet sur la LH (Briant, non publié). Nous avons donc choisi de tester deux doses supérieures de eKP-10, soit 1 mg et 6 mg par ponette (poids moyen 326 ± 48 kg). A titre de comparaison, nous avons également injecté une forte dose de 4 mg de buséréline (analogue de la GnRH) qui est capable d'induire l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire chez la ponette cyclique (Briant, communication personnelle).

1. Protocole expérimental

Quatre ponettes (poids \pm SD: 326 ± 48 kg) en inactivité ovarienne ont reçu **successivement**, toutes les 2 heures, une injection i.v. unique de :

- **1 mg de eKP-10**, dans 4 ml d'eau PPI
- **6 mg de eKP-10**, dans 4 ml d'eau PPI
- **4 mg de buséréline** (Suprefact®, 1 mg/ml, Sanofi-aventis), soit 4 ml

Les prélèvements sanguins ont été effectués à l'aide d'un cathéter -20, -10 et 0 min avant la première injection, puis +5, +10, +20, +30, +60, +90, +120 min après chaque injection, pour dosage des gonadotropines LH et FSH.

Pour chaque hormone, les valeurs d'AUCs ont été calculées en prenant comme niveau basal la concentration plasmatique de l'hormone avant chaque injection. Les valeurs d'AUCs obtenues après chaque injection ont été comparées entre elles globalement avec un test exact non paramétrique de Friedman pour échantillons appariés. Quand la comparaison globale était significative, les lots ont ensuite été comparés deux à deux par un test exact de permutation pour mesures appariées.

2. Résultats/discussion

Les résultats sont présentés sur la **figure 2.2**.

L'examen des profils plasmatiques moyens montre que chaque injection induit une augmentation des concentrations plasmatiques de la LH et de la FSH (**figure 2.2.A**):

- Une injection i.v. unique de 1 mg de eKP-10 multiplie par 5 les concentrations plasmatiques de LH, et par 6,5 celles de FSH.
- Une injection i.v. unique de 6 mg de eKP-10 multiplie par 4 les concentrations plasmatiques de LH, et par 3 celles de FSH.
- Une injection i.v. unique de 4 mg de buséréline triple les concentrations plasmatiques de LH, et multiplie par 4 celles de FSH.

Pour les valeurs de LH, la comparaison globale des AUCs ne montre pas de différence significative entre les injections ($P = 0,43$) (**figure 2.2.B**). L'examen des profils individuels montre une importante variabilité des réponses avec le eKP-10, les taux hormonaux ayant rejoint les taux de base 2 heures après injection chez la plupart des ponettes. Au contraire, avec la buséréline, certaines ponettes montrent une amplitude de réponse, plus élevée et plus prolongée qu'avec le eKP-10 ; en effet 2 heures après injection de buséréline, les taux de LH sont encore nettement au dessus de leur niveau avant injection chez 3 ponettes sur 4 (**figure 2.2.C**).

Pour les valeurs de FSH, la comparaison globale des AUCs met en évidence un effet significatif, mais les comparaisons 2 à 2 ne montrent pas de différences entre les lots. L'examen des profils individuels montre une bonne homogénéité entre les réponses des différentes ponettes suite à chaque injection. D'une façon plus prononcée que pour la LH, les 2 doses de eKP-10 induisent une stimulation transitoire de la FSH, correspondant visuellement à la moitié de la stimulation induite par la buséréline.

La stimulation induite par la dose de 6 mg de eKP-10 ne semble pas meilleure que celle induite par la dose de 1 mg de eKP-10. Cependant, l'injection de 6 mg de eKP-10 ayant toujours été réalisée après celle de 1 mg, il est possible que les capacités de libération de la LH aient été diminuées après la première injection.

Cette expérience montre pour la première fois les effets stimulants d'injections i.v. uniques de eKP-10 sur les gonadotropines hypophysaires chez la jument, en comparaison avec une stimulation induite par une forte dose d'un analogue de la GnRH. Depuis cette étude, l'équipe de Magee et collaborateurs a montré qu'une injection i.v. unique de 0,5 mg ou de 1 mg de rKP-10 à des juments en diœstrus induisait une augmentation transitoire de la LH, avec une concentration maximale obtenue dans les 20 à 30 min après injection, et un retour au niveau

basal au bout de 4 heures post injection. D'autre part, l'AUC des concentrations plasmatiques de LH ne diffère pas de celle obtenue avec une injection i.v. unique de 25 µg de GnRH (Magee *et al.*, 2009).

Si l'on compare nos résultats avec ceux obtenus chez la brebis, la dose de KP-10 efficace en injection i.v. chez la jument est 100 fois supérieure, puisque 10 µg suffisent pour induire une augmentation significative de la LH chez la brebis (Caraty *et al.*, 2007). Si l'on rapporte la dose efficace au poids moyen des animaux (60 kg pour une brebis et 300 kg pour une ponette), la dose efficace chez la jument reste 20 fois supérieure.

La stimulation des gonadotropines obtenue par cette voie d'administration est de courte durée, comparée avec la buséréline. L'administration par voie i.v., même si répétée, est donc incompatible avec l'obtention d'un niveau élevé et soutenu des gonadotropines. Cette conclusion a déjà été faite chez la brebis et correspond probablement à une demi-vie courte du KP-10, de l'ordre de quelques minutes. Seul un apport continu et régulier, par perfusion i.v. permet une stimulation prolongée des gonadotropines (Caraty *et al.*, 2007).

C. Expérience 3 : perfusion de eKP-10 (0,5 mg/h pendant 6 heures) chez des ponettes en anœstrus saisonnier.

Objectifs :

Afin de tester le mode d'administration par perfusion i.v. chez la ponette, nous avons mis au point un système de perfusion, utilisant une pompe péristaltique, qui soit suffisamment robuste pour pouvoir fonctionner pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines, en étant fixé sur le dos des animaux.

L'expérience précédente a montré que la dose efficace par injection i.v. unique chez la jument (1 mg) était bien supérieure à celle efficace chez la brebis (10 µg). Nous avons alors choisi la dose de 0,5 mg par heure de eKP-10, en considérant qu'une injection de 1 mg induisait un effet stimulant sur la sécrétion des gonadotropines pendant environ 2 heures.

1. Protocole expérimental

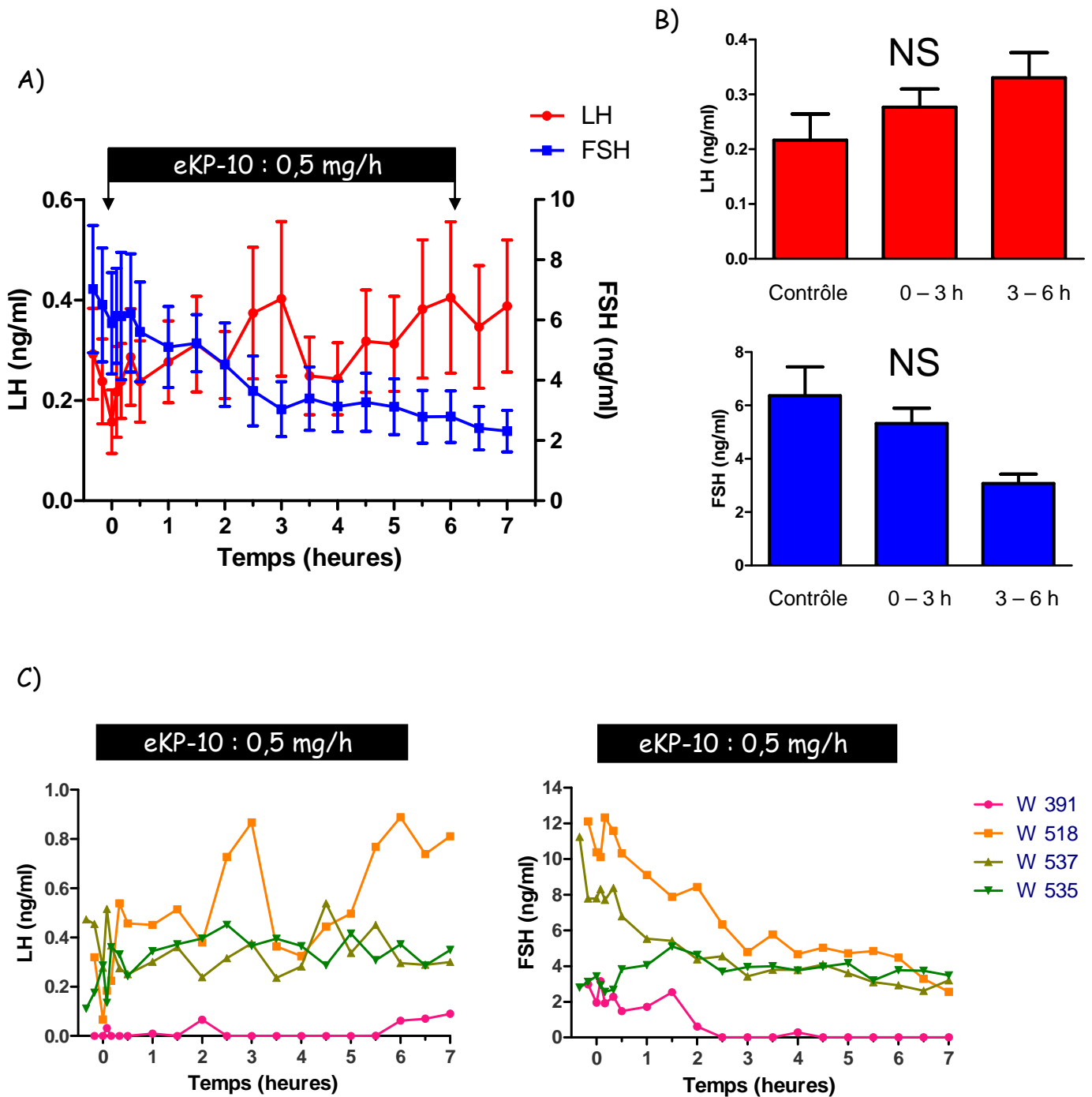


Figure 2.3 : Concentrations plasmatiques de LH et de FSH chez des ponettes (n=4) recevant une perfusion i.v. de eKP-10 depuis T0 et pendant 6 heures à raison de 0,5 mg/h. Les rectangles représentent les durées de perfusion. (A) Moyennes (\pm SEM); (B) Moyennes (+ SEM) par périodes de 3 h; (C) Profils individuels.

Cette expérience a eu lieu assez tardivement dans la saison d'inactivité (fin mars) puisqu'elle dépendait des résultats de l'expérience précédente.

Un lot de ponettes a reçu par voie orale un progestagène : Altrenogest (11 mg, Régumate®, 5 ml, Intervet), une fois par jour pendant une semaine avant de début de l'expérience. Le jour de l'expérience, 4 ponettes sélectionnées comme étant en inactivité ovarienne, sur la base des taux plasmatiques de la P4 et de la croissance folliculaire, ont reçu une perfusion i.v. de eKP-10 à raison de 0,5 mg/h par ponette (poids moyen 320 ± 50 kg) pendant 6 heures.

Trois prélèvements sanguins ont été effectués à 30 min d'intervalle avant le début de la perfusion, puis +5, +10, +15, +20, +30 min après le début de la perfusion, enfin toutes les 30 min après le début de la perfusion, pendant 6 heures, pour le dosage des gonadotropines LH et FSH.

Pour chaque ponette, les valeurs plasmatiques de LH et de FSH ont été moyennées par périodes. La première période (contrôle) représente le niveau basal avant perfusion. La seconde période (0 - 3 h) représente les valeurs obtenues pendant les 3 premières heures de perfusion de eKP-10, puis la troisième période (3 - 6 h) représente les valeurs obtenues pendant les 3 heures suivantes de perfusion.

Une comparaison globale des moyennes plasmatiques entre les différentes périodes a été effectuée par un test exact non paramétrique de Friedman pour échantillons appariés.

2. Résultats/discussion

Les résultats sont présentés sur la **figure 2.3**.

L'examen des profils moyens et des moyennes par période de 3 heures semblent montrer une légère augmentation de la LH et une légère diminution de la FSH pendant les 6 heures de perfusion (**figure 2.3.A**).

Cependant, l'analyse statistique, ayant comparé les périodes entre elles, n'indique aucun effet global ni sur la sécrétion de LH ($P = 0,28$), ni sur celle de FSH ($P = 0,43$) (**figure 2.3.B**).

L'examen des profils individuels montre des effets très variables (**figure 2.3.C**) :

En ce qui concerne la LH, une ponette (W391) présente des niveaux sous le seuil de détection du dosage tout au long de l'expérience, et deux ponettes ne présentent pas de variations pendant la perfusion. Pour une seule ponette (W518), la perfusion a entraîné plusieurs pics de sécrétion de LH.

En ce qui concerne la FSH, 3 ponettes montrent une diminution des concentrations plasmatiques au cours de la perfusion. Seule une ponette (W535) présente un taux stable.

La première ovulation a eu lieu 14, 25, 49 et 53 jours après la perfusion chez les ponettes W391, W537, W535 et W518 respectivement. Malgré ces stades hétérogènes de l'œstrus, la dose de 0,5 mg/h semble être insuffisante pour permettre une stimulation de la LH chez la ponette. Comme pour les injections, la dose à administrer par perfusion i.v. chez la ponette serait donc également bien supérieure à celle efficace chez la brebis (20 µg/h). Le fait d'avoir à perfuser des solutions de l'ordre du mg/h indique également que l'administration de eKP-10 par une autre voie (s.c.) pourrait être difficile à mettre en oeuvre du fait des difficultés potentielles de solubilisation de la molécule à haute concentration, et de son coût.

Cette expérience avait également pour objectif de tester notre système de perfusion sur les ponettes. Nous en avons conclu que ce dispositif était relativement bien adapté pour résister aux comportements des ponettes en liberté dans les stalles (grattage, roulage, secouage, mordillements par les congénères...), même s'il nécessite une surveillance constante.

D. Expérience 4 : Stabilité du eKP-10 dans le système de perfusion.

Objectifs :

Avant d'initier des expériences plus longues, nous avons souhaité vérifier s'il n'y avait pas de perte ou de dégradation du eKP-10 dans le système de perfusion, les poches restant en place sur les ponettes et à température ambiante pendant environ 8 heures. Ces essais ont été réalisés dans le laboratoire.

Tableau 2.1 : Stabilité du eKP-10 dans le système de perfusion au cours des différentes manipulations.

Etapas	Dosage du KP
Dans la poche de sérum physiologique une fois le eKP-10 mis en solution	0,32 ng/ml
Dans la solution de eKP-10 à l'extrémité du tube en sylastic. Un tube récolté par heure de perfusion, pendant 6 heures. Moyenne \pm SEM des 6 heures.	0,33 \pm 0,04 ng/ml
Après 24 heures de présence du eKP-10 dans la poche de sérum physiologique à température ambiante	0,32 ng/ml
Après congélation/décongélation du reste de solution de eKP-10 dans la poche	0,33 ng/ml

1. Protocole expérimental

Le système de perfusion a été installé sur une paillasse du laboratoire. Après avoir mis le eKP-10 en solution dans la poche de serum physiologique et mis la pompe en fonctionnement, la solution de eKP-10 a été récupérée à l'extrémité du tube en silastic (normalement posé dans la veine jugulaire des ponettes) dans un tube conique de 50 ml. Les tubes ont été changés toutes les heures, pendant 6 heures. Par rapport aux conditions des expériences effectuées sur les ponettes, seule la température ambiante différait.

Des prélèvements de la solution perfusée ont été effectués pour dosage du eKP-10 :

- dans la poche de sérum physiologique juste après la mise en solution d'un aliquot de eKP-10 (aliquot de 5 mg/ml).
- dans les tubes placés à l'extrémité du tube en silastic, au cours des 6 heures de fonctionnement.
- après 24 heures de présence du eKP-10 dans la poche de sérum physiologique à température ambiante.
- après congélation/décongélation du reste de solution de eKP-10 dans la poche

Le dosage du eKP-10 est présenté en **annexe 5**. La gamme d'étalonnage de ce dosage s'étend de 4 à 1000 pg/ml. Toutes les solutions testées ont été diluées dans du tampon Véronal 0,025 M (Diethylmalonylurée sodée, diethylmalonylurée, Merck) BSA 3g/l (Sigma-Aldrich) Triton 0,01‰ (Merck), afin d'obtenir une concentration finale de 0,5 ng/ml (= concentration finale attendue dans la poche de sérum physiologique après dilution).

2. Résultats/discussion

Les résultats du dosage du eKP-10 dans les prélèvements de solution effectués aux différentes étapes de la perfusion sont présentés dans le **tableau 2.1**.

L'analyse de l'ensemble des valeurs montre qu'à toutes les étapes, les valeurs sont comprises entre 0,32 et 0,33 ng/ml. Nous constatons donc une première « perte » de eKP-10 au moment de la mise en solution dans la poche de sérum physiologique (concentration initiale = 0,5

ng/ml). Ceci pourrait correspondre à une adsorption du peptide sur les parois de la poche de perfusion. Ensuite, le dosage ne montre pas de différences de concentration à toutes les autres étapes. Ceci indique que le eKP-10 reste stable à température ambiante et après congélation/décongélation. Les doses réelles administrées sont toutefois légèrement inférieures aux doses théoriques.

En conclusion, ces expériences préliminaires nous ont permis de mettre en évidence l'efficacité du eKP-10 sur la stimulation des gonadotropines chez la jument. Elles ont également abouti à la mise au point d'un système de perfusion fiable et robuste permettant d'administrer le eKP-10 de façon continue.

Pour l'organisation des expériences suivantes, nous avons été dépendants de l'alternance entre les saisons sexuelles et les périodes d'anœstrus des ponettes. Dans un souci de clarté, nous avons regroupé l'ensemble des expériences effectuées chez la ponette cyclique (chapitre III) puis celle réalisée chez la ponette en anœstrus saisonnier (chapitre IV).

Chapitre III : Le kisspeptide chez la jument cyclique

Partie 1 : Optimisation du choix du stade du cycle et de la dose lors de perfusions de courte durée (3 à 6 heures).

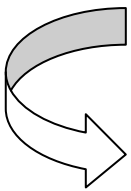
Question :

A quel stade du cycle l'administration de KP est-elle la plus efficace pour stimuler l'axe gonadotrope?

Début de phase folliculaire

Milieu de phase folliculaire

Fin de phase folliculaire



Expérience 1 : Perfusion de eKP-10 (2,5 mg/h pendant 6 heures) à différents stades de la phase folliculaire

1. Introduction - Objectifs

Aucune donnée de la bibliographie ne mentionne l'induction de l'ovulation avec une injection unique de kisspeptide, mis à part chez des rattes pré-pubères mais celles-ci avaient été prétraitée avec de la PMSG (Matsui *et al.*, 2004). De plus, les données récentes obtenues chez la jument montrent qu'une injection i.v. unique de 1 mg de mKP-10 (Magee *et al.*, 2009), de 10 mg et même de 20 mg (Briant, communication personnelle) ne permet pas l'induction de l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire de taille 35-40 mm. Il est vraisemblable que la stimulation de libération des gonadotropines soit trop courte. Afin d'obtenir une libération plus prolongée de ces hormones, il semble nécessaire d'administrer le KP-10 sur un temps plus long. Cela a été montré chez la brebis par perfusion continue (Caraty *et al.*, 2007) et par injections répétées chez l'agnelle pré-pubère (Redmond *et al.*, 2011).

Afin d'obtenir une stimulation plus prolongée des gonadotropines, il semble nécessaire d'administrer le KP-10 de façon continue, comme cela a été montré chez la brebis (Caraty *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'approche par perfusion continue apparaît beaucoup plus simple à mettre en œuvre et moins stressante que des injections répétées.

Nous avons vu précédemment que la dose de 0,5 mg/h n'était pas suffisante pendant l'œstrus pour induire une stimulation homogène et soutenue des gonadotropines. Nous avons donc choisi la dose de eKP-10 à administrer sous forme de perfusion pendant la période de cyclicité de la façon suivante : chez la brebis, une injection i.v. unique de 10 µg stimule la LH de façon transitoire, et une perfusion de 20 µg/h stimule la LH de façon plus prolongée. Chez la jument, nous avons montré qu'une injection i.v. unique de 1 mg stimulait la LH, nous avons donc appliqué le même ratio que chez la brebis, ce qui revient à une dose de 2,5 mg/h. Chez la ratte l'augmentation relative de la LH est la plus forte au moment de l'œstrus (quelques heures après ovulation) et la plus faible en proœstrus (équivalent au moment du pic de LH) car à ce stade les taux de LH sont déjà très élevés (Roa *et al.*, 2006). Chez la femme au contraire, l'augmentation est plus importante au stade pré-ovulatoire (quelques heures avant ovulation) que pendant la phase folliculaire et la phase lutéale, mais les auteurs ne précisent pas si le pic pré-ovulatoire a déjà commencé (Dhillon *et al.*, 2007). Chez la brebis, l'injection d'une faible dose de KP (20 µg), induit une augmentation plus importante de la LH en période pré-ovulatoire qu'en phase lutéale (Smith *et al.*, 2009b).

Tableau 3.1.1 : Partie 1 - Expérience 1 : Attribution des ponettes dans chacun des 3 lots (poids des ponettes et taille du plus gros follicule présent lors de l'expérience).

lot	ponette	poids (kg)	moyenne poids (kg) ± SD	taille follicule (mm)	moyenne taille follicule (mm) ± SD
Début de phase folliculaire	W 587	360	364 ± 48	17	16 ± 3
	W 556	342		14	
	W 578	411		13	
	W 606	316		20	
Milieu de phase folliculaire	W 457	287	354 ± 50	22	24 ± 2
	W 459	405		25	
	W 561	371		25	
	W 570	271		22	
Fin de phase folliculaire	W 384	314	361 ± 41	35	32 ± 2
	W 537	402		31	
	W 542	258		30	
	W 574	320		33	

Il semble donc que les réponses au KP soient variables en fonction du moment du cycle et de l'espèce.

L'objectif de cette expérience a donc été de tester une première dose de eKP-10 par perfusion i.v. à différents stades du cycle. Les 3 stades choisis correspondent à des moments clés de la phase folliculaire, en fonction des applications ultérieures potentielles :

- Début de la phase folliculaire : correspond au lendemain de l'injection de prostaglandines.
- Milieu de la phase folliculaire : correspond approximativement au moment où s'exerce le phénomène de dominance. Une stimulation des gonadotropines par le eKP-10 serait intéressante pour l'obtention d'ovulations multiples.
- Fin de la phase folliculaire : correspond à l'apparition du follicule pré-ovulatoire. C'est à ce stade que sont appliqués les traitements actuels d'induction de l'ovulation.

2. Matériel et méthodes

a) Animaux et lots

Après injection de prostaglandine $\text{PGF2}\alpha$ de synthèse, les ponettes (âge \pm SD : $8,25 \pm 3,8$ ans) ont été réparties dans un des 3 lots suivants en fonction du diamètre du plus gros follicule le jour de l'expérience.

- Lot début de phase folliculaire (n = 4) : taille des follicules inférieure à 20 mm
- Lot milieu de phase folliculaire (n = 4) : plus gros follicule compris entre 22 et 25 mm
- Lot fin de phase folliculaire (n = 4) : plus gros follicule compris entre 30 et 35 mm (= follicule de taille pré-ovulatoire)

Les caractéristiques des ponettes affectées à chaque lot (poids et état ovarien) sont présentées dans le **tableau 3.1.1**.

b) Protocole expérimental :

Le jour de l'expérience, les ponettes ont reçu une perfusion de eKP-10 à la dose de 2,5 mg/h pendant 6 heures, soit un total de 15 mg de eKP-10.

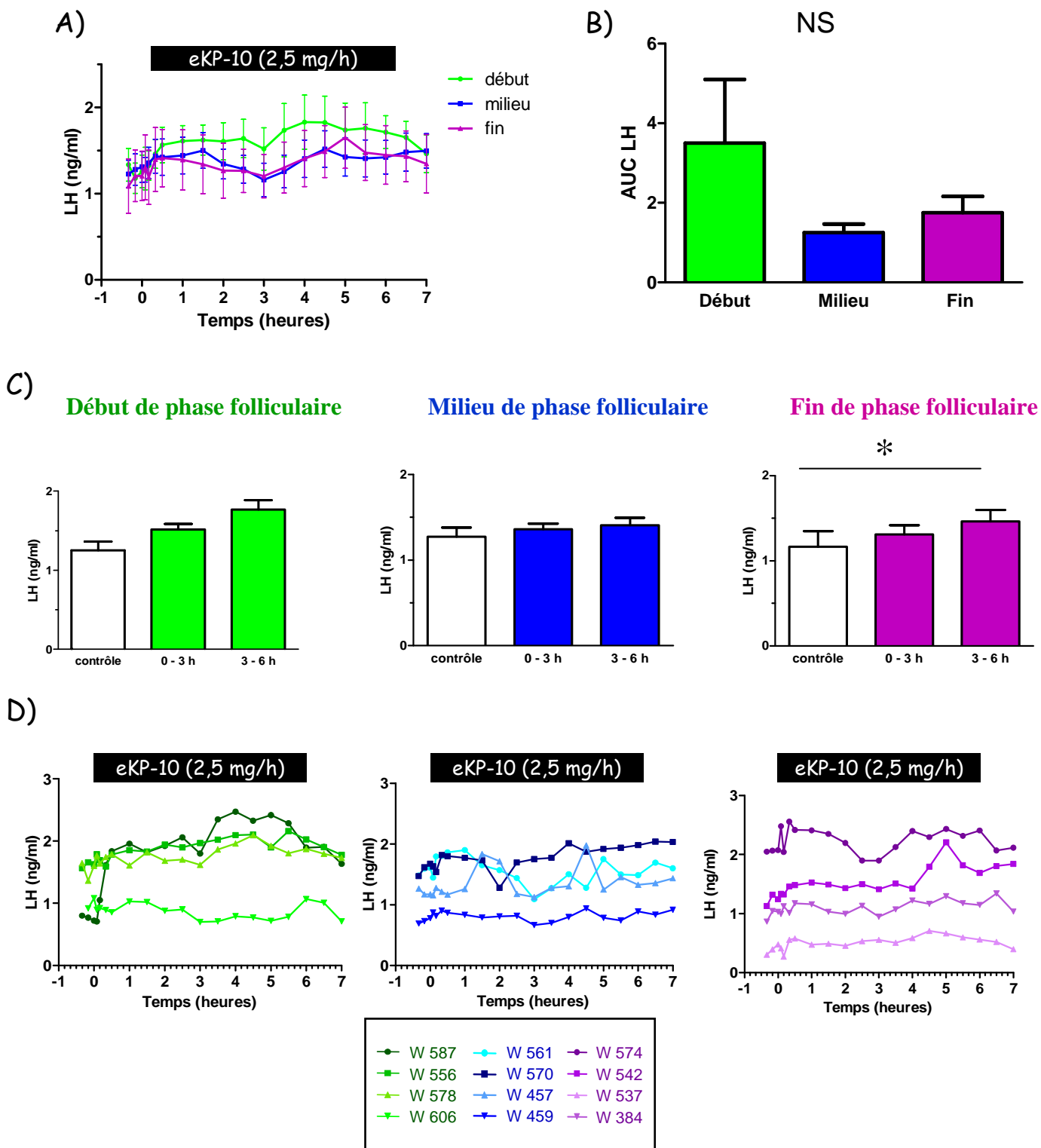


Figure 3.1.1 : Partie 1 - Expérience 1 : Concentrations plasmatiques de LH pendant la perfusion i.v. de 2,5 mg/h de eKP-10 pendant 6 heures, à 3 stades différents de la phase folliculaire (début, milieu et fin, n = 4 par lot). Les rectangles délimités par les 2 flèches verticales représentent la durée de la perfusion. (A) Profils moyens (\pm SEM) ; (B) AUCs moyennes (\pm SEM); (C) Moyennes (\pm SEM) par périodes de 3 heures; (D) Profils individuels. Les rectangles représentent les durées de perfusion. NS : non significatif. * $P \leq 0,05$.

Trois prélèvements sanguins ont été effectués à 30 min d'intervalle avant le début de la perfusion de eKP-10, puis +5, +10, +15, +20, +30 min, et enfin toutes les 30 min pendant 6 heures après le début de la perfusion, afin de doser la LH plasmatique.

c) Analyse statistique

Les AUCs des 3 lots ont été comparées globalement entre elles par un test exact non paramétrique de Kruskal et Wallis pour échantillons indépendants.

Pour chaque ponette, les valeurs de LH ont été moyennées par période. La première période (contrôle) représente le niveau basal avant perfusion. La seconde période (0 - 3 h) représente les valeurs de LH obtenues pendant les 3 premières heures de perfusion de eKP-10, puis la troisième période (3 - 6 h) représente les valeurs de LH obtenues pendant les 3 heures suivantes de perfusion.

A l'intérieur de chaque lot, les moyennes des 3 périodes ont tout d'abord été comparées globalement entre elles par un test exact non paramétrique de Friedman pour échantillons appariés. Lorsque la comparaison globale était significative, l'augmentation de LH entre la période 1 et la période 3 a été testée par un test exact non paramétrique de Page pour échantillons appariés.

3. Résultats

Les résultats sont présentés sur la **figure 3.1.1**.

Les AUCs des 3 lots ne sont pas différentes entre elles, bien que visuellement celle du lot début de phase folliculaire semble plus élevée (**figure 3.1.1.B**).

Les comparaisons à l'intérieur de chaque lot indiquent un effet global dans le lot fin de phase folliculaire avec une augmentation progressive des concentrations plasmatiques de LH entre les 3 périodes (**figure 3.1.1.A et C**).

L'analyse des profils individuels révèle des réponses à la perfusion de eKP-10 très variables. Dans le lot fin de phase folliculaire les 4 ponettes présentent une très légère augmentation de la LH, alors que dans le lot début de phase folliculaire, une seule ponette (W587) présente une

forte augmentation de la LH, phénomène qui n'est pas observé chez les autres ponettes de ce lot (**figure 3.1.1.D**).

4. Discussion

Pour cette expérience, les effets de la perfusion de eKP-10 sur la sécrétion de la LH ne sont significatifs qu'en fin de phase folliculaire. Toutefois, à ce stade, les augmentations des concentrations plasmatiques de LH chez les ponettes sont faibles. D'autre part, en fin de phase folliculaire, la LH augmente naturellement et il n'est pas exclu que la faible augmentation de LH observée à ce stade ne soit pas due à la perfusion de eKP-10 mais à l'augmentation naturelle de la LH.

Dans le lot début de phase folliculaire, une ponette (W587) présente une importante stimulation de LH dès le début de la perfusion, deux ponettes présentent une légère augmentation (W556 et W578) et une reste stable (W606). Or, cette dernière ponette présente le plus gros follicule (20 mm) du lot. Cette grande variabilité de réponse ne permet pas d'observer d'effet de la perfusion de eKP-10 sur les niveaux de LH.

D'un point de vue qualitatif, ces résultats chez la ponette diffèrent de ceux publiés dans les autres espèces, la femme (Dhillon *et al.*, 2007), la ratte (Roa *et al.*, 2006) et la brebis (Smith *et al.*, 2009b). Pour ces dernières, la stimulation de la LH aux différents stades étudiés est plus nette et plus contrastée entre les différents stades.

Pour la suite des expérimentations, ces résultats nous ont donc paru difficilement utilisables. Les niveaux de LH apparaissent semblables entre les 3 stades étudiés avant perfusion, alors qu'ils auraient dû être plus élevés en fin de phase folliculaire. Comme l'attribution des ponettes dans les lots avait été effectuée en fonction de la taille du plus gros follicule le jour de l'expérience, il est possible que ce follicule soit en régression et non en croissance. Pour la suite des expériences, nous avons donc décidé de suivre par échographie l'évolution des follicules depuis l'ovulation précédente afin de s'assurer que le plus gros follicule présent lors de la perfusion était bien en croissance, et de définir les 3 stades de façon plus contrastée.

Nous avons également augmenté la dose administrée afin de tenter d'obtenir un effet plus important. Enfin, nous avons rajouté avant le début de la perfusion de eKP-10 une période témoin avec administration de sérum physiologique. L'idéal aurait été de perfuser 4 ponettes par stade avec du sérum physiologique pour obtenir des profils de sécrétion témoins.

Toutefois, compte tenu de la lourdeur des expériences qui nécessitent une surveillance permanente des animaux, nous avons décidé que chaque ponette serait son propre témoin.

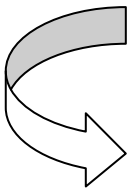
Question :

A quel stade du cycle l'administration de KP est-elle la plus efficace pour stimuler l'axe gonadotrope?

Début de phase folliculaire

Milieu de phase folliculaire

Fin de phase folliculaire



Expérience 2 : Perfusion de eKP-10 (6 mg/h pendant 6 heures) à différents stades de la phase folliculaire

Tableau 3.1.2 : Partie 1 - Expérience 2 : Attribution des ponettes dans chacun des 3 lots (poids des ponettes et taille du plus gros follicule présent lors de l'expérience).

lot	ponette	poids (kg)	moyenne poids (kg) ± SD	taille follicule (mm)	moyenne taille follicule (mm) ± SD
Début de phase folliculaire	W 497	300	283 ± 40	14	13 ± 2
	W 529	305		12	
	W 553	312		14	
	W 626	214		10	
Milieu de phase folliculaire	W 524	327	297 ± 33	26	24 ± 1
	W 535	313		24	
	W 594	306		23	
	W 618	242		22	
Fin de phase folliculaire	W 518	287	338 ± 48	33	34 ± 2
	W 522	322		32	
	W 523	326		35	
	W 549	417		36	

1. Introduction - Objectifs

L'expérience précédente a été reproduite en lui apportant les modifications suivantes :

La taille des follicules a été suivie par échographie depuis l'ovulation du cycle précédent afin d'administrer la perfusion en présence de follicules en croissance. Les 3 stades de traitement ont été différenciés de façon plus précise. Les ponettes ont reçu au préalable une perfusion de sérum physiologique pendant 3 heures, afin de disposer d'un niveau basal de LH plus représentatif, et la dose de eKP-10 a été augmentée à 6 mg/h.

2. Matériel et méthodes

a) Animaux et lots

Après administration de prostaglandine PGF2 α de synthèse, les ponettes (âge \pm SD : 7,5 \pm 2,2 ans) ont été réparties dans un des 3 lots suivants en fonction du diamètre du plus gros follicule en croissance le jour de l'expérience.

- Lot début de phase folliculaire (n = 4) : taille des follicules comprise entre 10 et 15 mm le jour suivant l'injection de PGF2 α
- Lot milieu de phase folliculaire (n = 4) : taille du plus gros follicule compris entre 22 et 26 mm le 2^{ème} jour après l'injection de PGF2 α
- Lot fin de phase folliculaire (n = 4) : taille du plus gros follicule compris entre 32 et 36 mm (= follicule de taille pré-ovulatoire) 5 jours après l'injection de PGF2 α

Les caractéristiques des ponettes affectées à chaque lot (poids et état ovarien) sont présentées dans le **tableau 3.1.2.**

b) Protocole expérimental

Le jour de l'expérience, les ponettes ont reçu tout d'abord une perfusion de sérum physiologique pendant 3 heures, puis une perfusion de eKP-10 à la dose de 6 mg/h pendant 6 heures, soit un total de 36 mg de eKP-10.

Pour le dosage des gonadotropines et des œstrogènes totaux, les prélèvements sanguins sériés ont été effectués à l'aide d'un cathéter placé dans la veine jugulaire toutes les 15 min pendant la perfusion de sérum physiologique, puis +5, +10, +20, +30 min après le début de la perfusion de eKP-10, et enfin toutes les 30 min jusqu'à l'arrêt de la perfusion de eKP-10. Enfin, un prélèvement sanguin quotidien a été effectué avec un Vacutainer® dès le lendemain de l'expérience et jusqu'à 5 jours après ovulation afin de doser également la progestérone plasmatique pour vérifier que les ovulations après traitement étaient suivies d'une sécrétion normale de progestérone.

Un suivi échographique quotidien a été réalisé depuis le lendemain de l'expérience, jusqu'à l'ovulation constatée.

c) Analyse statistique

Le jour de perfusion, pour chaque hormone, les AUCs ont été comparées globalement entre les lots par un test exact non paramétrique de Kruskal et Wallis pour échantillons indépendants. Lorsque la comparaison globale était significative, les lots ont été comparés 2 à 2 par un test de permutation pour données indépendantes, en appliquant la correction de Bonferroni.

A l'intérieur de chaque lot et pour chaque hormone, les valeurs des 4 ponettes ont été moyennées par périodes de 3 heures. La première période (-3 - 0 h) représente le niveau basal obtenu lors des 3 heures de perfusion de sérum physiologique. La seconde période (0 - 3 h) représente les valeurs obtenues pendant les 3 premières heures de perfusion de eKP-10, puis la troisième période (3 - 6 h) représente les valeurs obtenues pendant les 3 heures suivantes de perfusion. L'analyse statistique a consisté à comparer globalement les moyennes des 3 périodes entre elles par un test exact non paramétrique de Friedman pour échantillons appariés. Lorsque la comparaison globale était significative, l'augmentation entre la période 1 et la période 3 a été testée par un test exact non paramétrique de Page pour échantillons appariés.

La distribution des ovulations a été comparée entre les 3 lots par un test exact non paramétrique de Kruskal et Wallis pour échantillons indépendants.

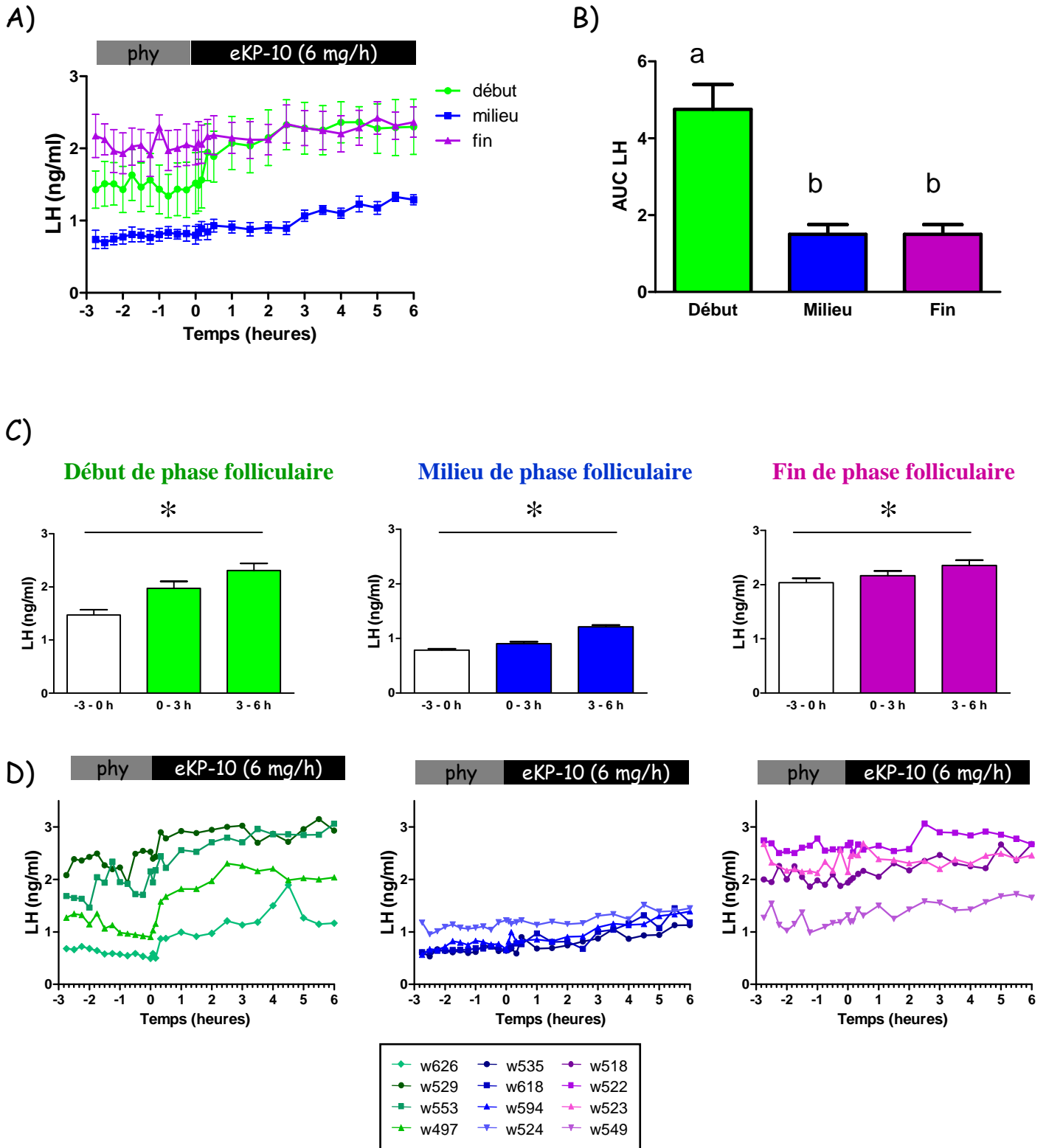


Figure 3.1.2 : Partie 1 - Expérience 2 : Concentrations plasmatiques de LH pendant la perfusion i.v. de 6 mg/h de eKP-10 pendant 6 heures, à 3 stades différents de la phase folliculaire (début, milieu et fin, n = 4 par lot). (A) Profils moyens (\pm SEM); (B) AUCs moyennes (+ SEM); (C) Moyennes (+ SEM) par périodes de 3 heures; (D) Profils individuels. Les rectangles représentent les durées de perfusion. Les lots différant entre eux sont identifiés par des lettres différentes. * $P \leq 0,05$.

3. Résultats

Effets pendant la perfusion :

✓ Sur la LH

Les résultats sont présentés sur la **figure 3.1.2**.

Les AUCs diffèrent globalement entre les 3 lots, et les comparaisons 2 à 2 révèlent que l'AUC du lot début de phase folliculaire est supérieure comparée aux deux autres lots (**figure 3.1.2.B**).

A l'intérieur de chacun des lots, une différence globale est constatée, ainsi qu'une augmentation progressive des concentrations plasmatiques de LH entre la période 1 et la période 3 (**figures 3.1.2.A et C**).

L'examen des profils individuels montre un niveau basal de LH très hétérogène dans les lots début et fin de phase folliculaire, contrairement au lot milieu de phase folliculaire. Après le début de la perfusion, une évolution homogène des profils est observée à l'intérieur de chacun des lots (**figure 3.1.2.D**).

✓ Sur la FSH

Les résultats sont présentés sur la **figure 3.1.3**.

Les AUCs diffèrent globalement entre les 3 lots, et les comparaisons 2 à 2 révèlent que l'AUC du lot début de phase folliculaire est supérieure comparée aux deux autres lots (**figure 3.1.3.B**).

A l'intérieur des lots début et milieu de phase folliculaire, une différence globale des concentrations plasmatiques de FSH est mise en évidence entre les 3 périodes. Cependant, l'augmentation progressive de FSH n'est visible que dans le lot milieu de phase folliculaire (**figures 3.1.3.A et C**).

L'examen des profils individuels montre que le niveau basal de FSH est très hétérogène dans le lot début de phase folliculaire, alors qu'une plus grande homogénéité est observée dans les lots milieu et fin de phase folliculaire où les concentrations sont très basses (**figure 3.1.3.D**).

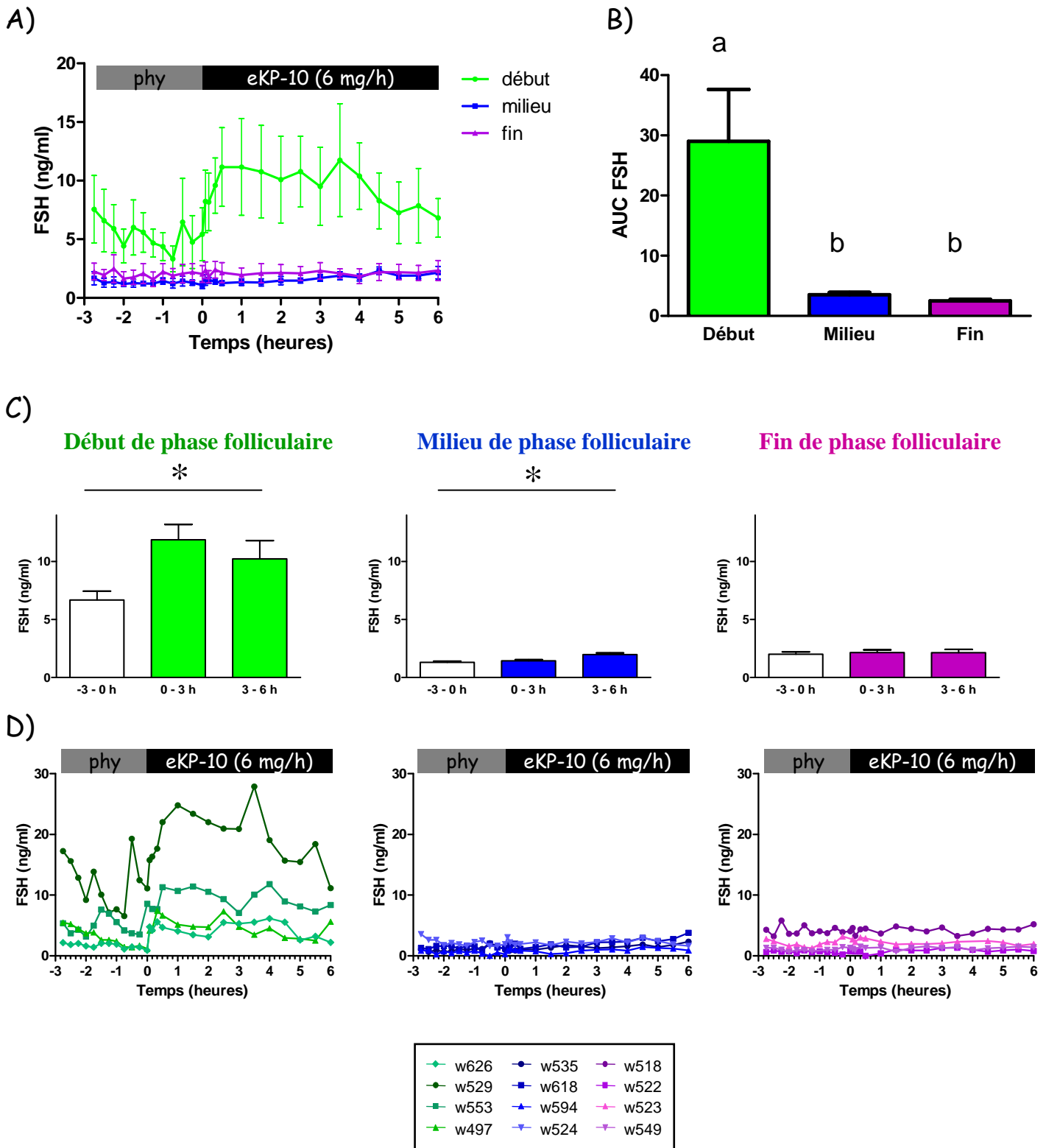


Figure 3.1.3 : Partie 1 - Expérience 2 : Concentrations plasmatiques de FSH pendant la perfusion i.v. de 6 mg/h de eKP-10 pendant 6 heures, à 3 stades différents de la phase folliculaire (début, milieu et fin, n = 4 par lot). (A) Profils moyens (\pm SEM); (B) AUCs moyennes (\pm SEM); (C) Moyennes (\pm SEM) par périodes de 3 heures; (D) Profils individuels. Les rectangles représentent les durées de perfusion. * $P \leq 0,05$. Les lots différant entre eux sont identifiés par des lettres différentes.

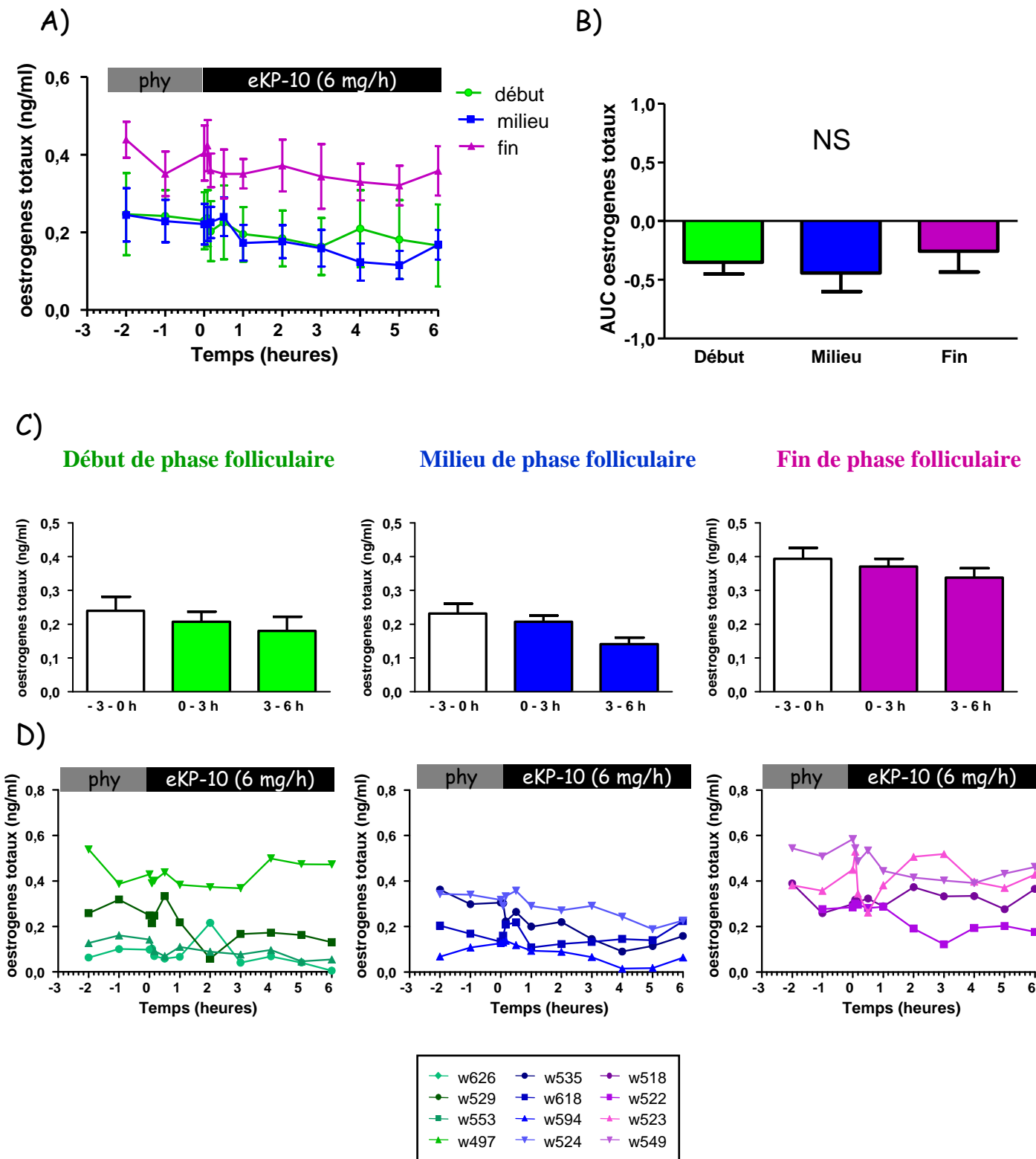


Figure 3.1.4 : Partie 1 - Expérience 2 : Concentrations plasmatiques des oestrogènes totaux pendant la perfusion i.v. de 6 mg/h de eKP-10 pendant 6 heures, à 3 stades différents de la phase folliculaire (début, milieu et fin, n = 4 par lot). (A) Profils moyens (± SEM); (B) AUCs moyennes (± SEM); (C) Moyennes (± SEM) par périodes de 3 heures; (D) Profils individuels. Les rectangles représentent les durées de perfusion. NS : non significatif.

✓ **Sur les œstrogènes totaux**

Les résultats sont présentés sur la **figure 3.1.4**.

Les AUCs ne diffèrent pas entre les 3 lots (**figure 3.1.4.B**).

A l'intérieur de chacun des lots, il n'y a pas de différence globale significative entre les 3 périodes (**figures 3.1.4.A et C**).

L'examen des profils individuels montre que les niveaux plasmatiques sont assez hétérogènes, avec dans l'ensemble des valeurs du niveau de base plus élevées dans le lot fin de phase folliculaire. Par ailleurs, la perfusion n'entraîne pas d'effet stimulant sur les œstrogènes totaux aux 3 stades étudiés (**figure 3.1.4.D**).

Effets après l'arrêt de la perfusion :

L'analyse de ces résultats est uniquement descriptive. Nous n'avons pas réalisé d'analyse statistique. En effet, les durées des cycles après traitement étaient différentes entre les lots et donc difficilement comparables.

Les profils moyens et individuels de l'évolution des concentrations plasmatiques de LH, FSH, œstrogènes totaux et progestérone dans chacun des 3 lots (début, milieu et fin de phase folliculaire, n = 4 par lot) pendant toute la phase folliculaire ayant succédé au traitement sont présentés sur les **figures 3.1.5. et 3.1.6.** respectivement.

✓ **Sur la LH**

Pour les ponettes ayant été perfusées en début de phase folliculaire, les taux plasmatiques de LH obtenus au bout des 6 heures de perfusion restent maintenus pendant tout le cycle, même après l'arrêt de la perfusion, sauf pour une ponette (W626). Il est à noter que cette ponette n'a pas ovulé, et qu'elle est entrée en anœstrus saisonnier (cette expérience a eu lieu en septembre).

Pour les ponettes ayant été perfusées en milieu de phase folliculaire, les concentrations plasmatiques continuent d'augmenter pendant un ou deux jours suivant l'arrêt de la perfusion, puis diminuent ensuite pour ré-augmenter lors du démarrage du pic péri-ovulatoire.

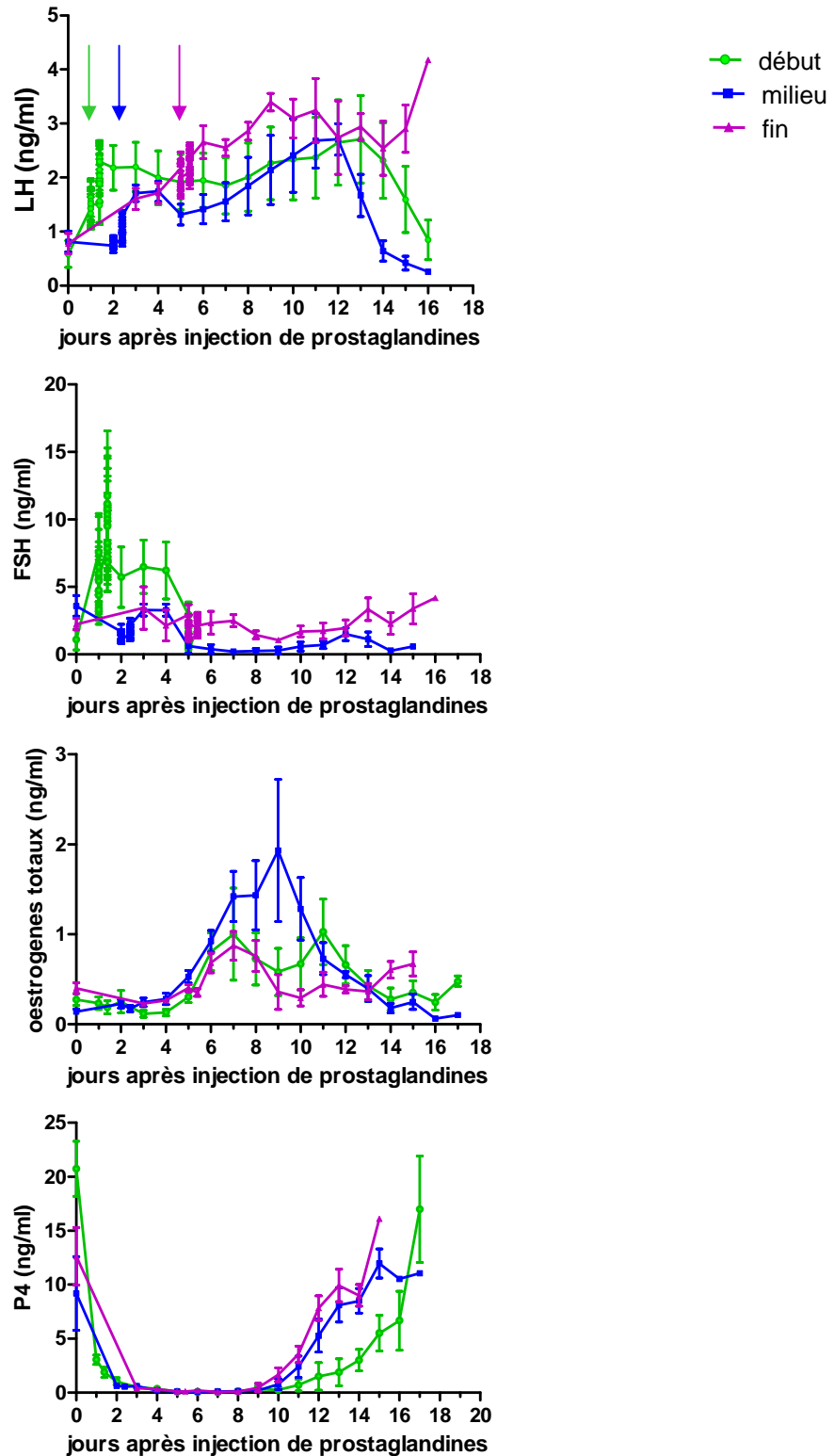


Figure 3.1.5 : Partie 1 - Expérience 2 : Concentrations plasmatiques de LH, FSH, oestrogènes totaux et progestérone au cours du cycle (moyennes (\pm SEM)), avant, pendant et après la perfusion i.v. de 6 mg/h de eKP-10 pendant 6 heures à différents stades de la phase folliculaire (début, milieu et fin, n = 4 par lot). Le jour de la perfusion est représentée par une fine flèche verticale. Pour LH et FSH, dans chaque lot, le premier et le second groupement de points alignés verticalement correspondent respectivement à l'ensemble des données obtenues pendant les 3 heures de perfusion de sérum physiologique, puis les 6 heures de perfusion de eKP-10 à la dose de 6 mg/h.

Début de phase folliculaire

Milieu de phase folliculaire

Fin de phase folliculaire

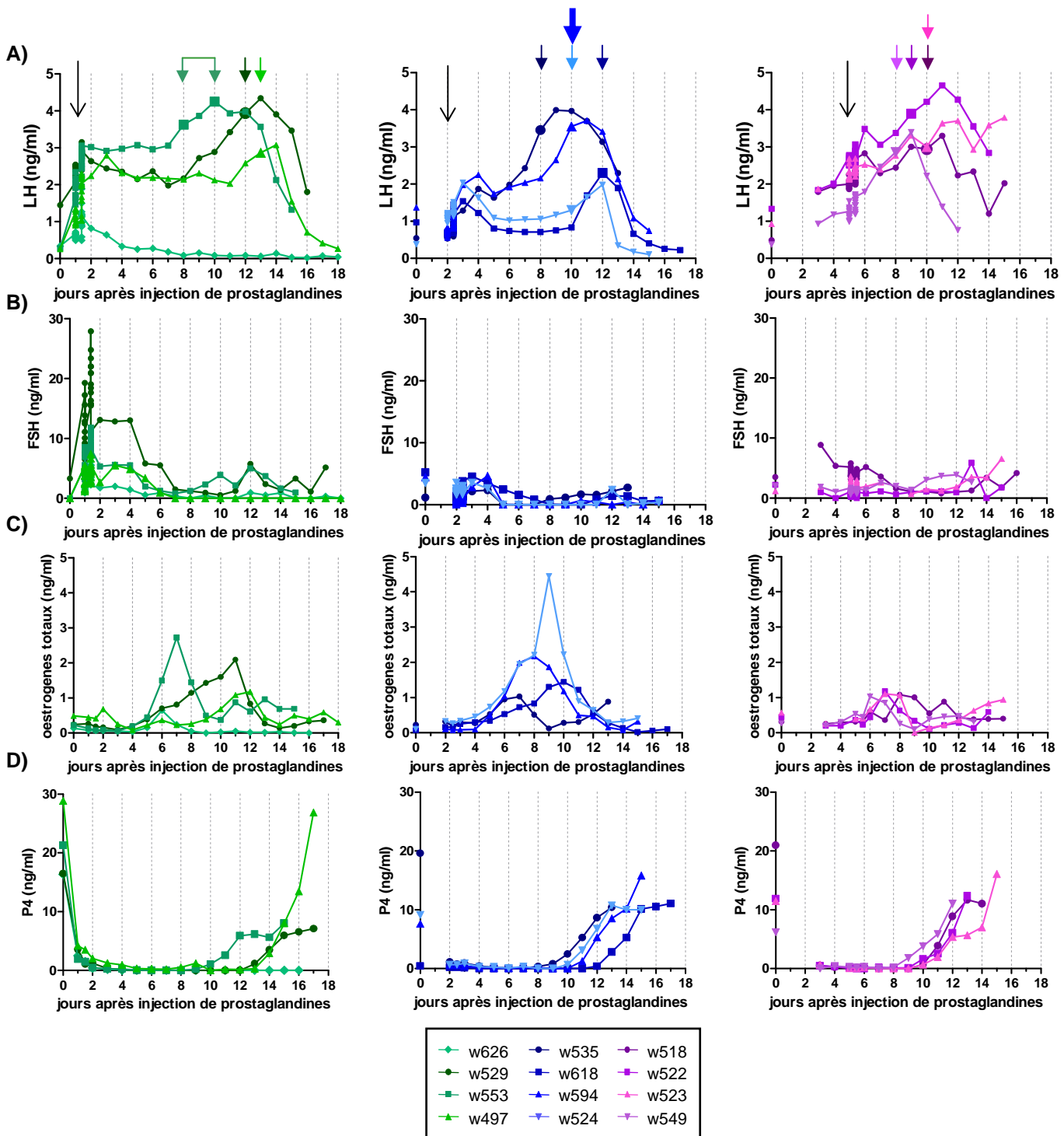


Figure 3.1.6 : Partie 1 - Expérience 2 : Concentrations plasmatiques de LH (A), FSH (B), oestrogènes totaux (C) et progestérone (D) au cours du cycle (profils individuels), avant, pendant et après la perfusion i.v. de 6 mg/h de eKP-10 pendant 6 heures à différents stades de la phase folliculaire (début, milieu et fin, n = 4 par lot). Le jour de la perfusion est représentée par une fine flèche verticale. Pour LH et FSH, dans chaque lot, le premier et le second groupement de points alignés verticalement correspondent respectivement à l'ensemble des données obtenues pendant les 3 heures de perfusion de sérum physiologique, puis les 6 heures de perfusion de eKP-10 à la dose de 6 mg/h. Les points grossis ainsi que les flèches de couleurs correspondent à la date d'ovulation (W626 n'a pas ovulé, et W594 a eu une double ovulation le même jour = grosse flèche).

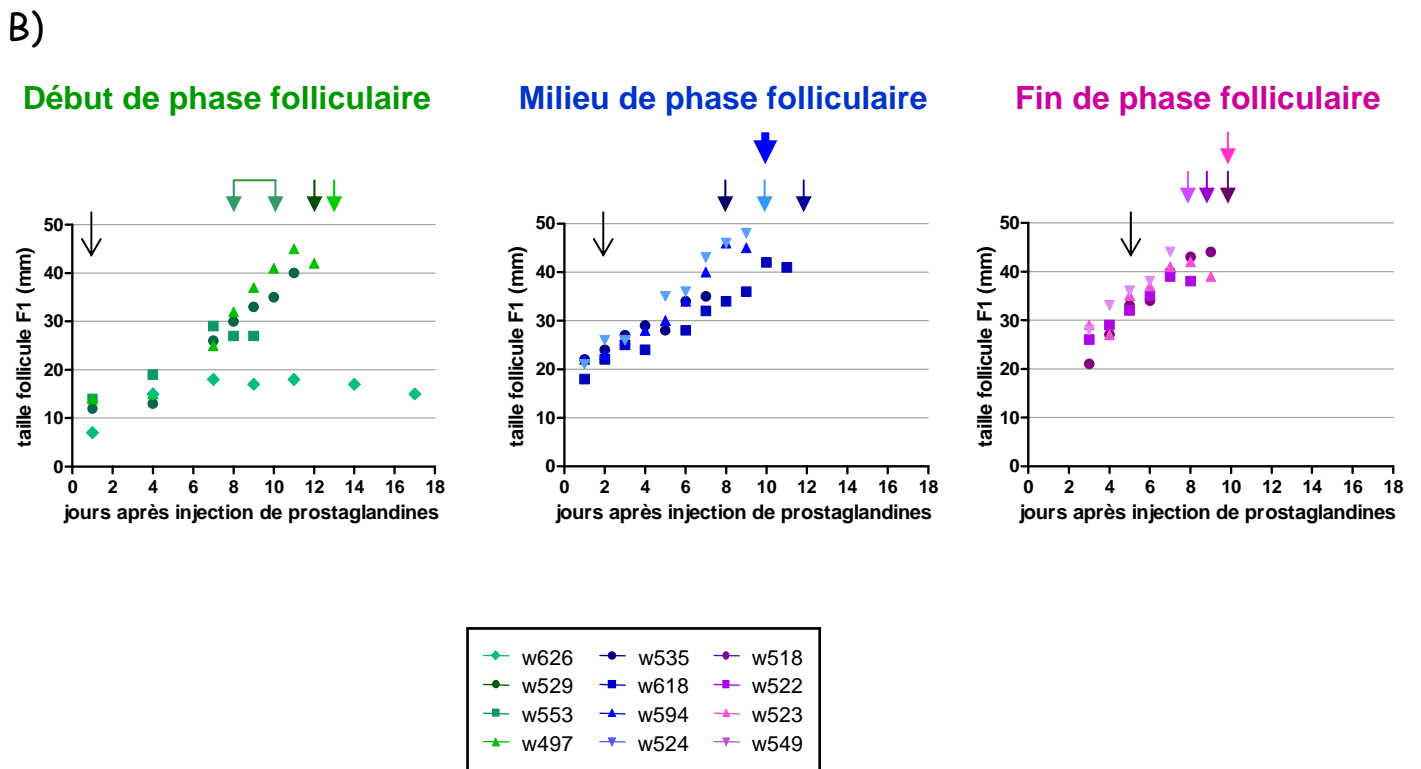
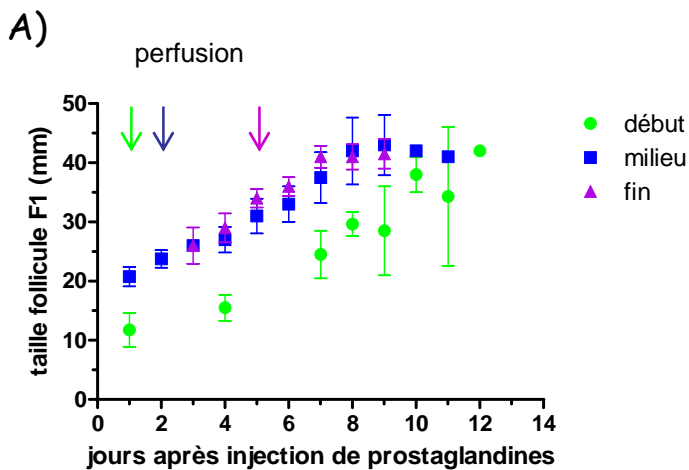


Figure 3.1.7 : Partie 1 - Expérience 2 : Evolution de la **taille du plus gros follicule (F1)** dans chacun des 3 lots. (A) Profils moyens \pm SD; (B) Profils individuels. Le jour de la perfusion est représenté par une fine flèche verticale. Les ovulations sont représentées par des flèches de couleurs (W626 n'a pas ovulé, et W594 a eu une double ovulation le même jour = grosse flèche).

Pour les ponettes ayant été perfusées en fin de phase folliculaire, il ne semble pas y avoir d'effet sur la LH après l'arrêt de la perfusion.

✓ **Sur la FSH**

En début et milieu de phase folliculaire, les niveaux de FSH obtenus pendant la perfusion semblent être maintenus après l'arrêt de la perfusion, avec des effets visibles pendant 3 jours et 2 jours respectivement après l'arrêt de la perfusion. L'augmentation semble plus importante en début de phase folliculaire. Aucun effet n'est visible en fin de phase folliculaire.

✓ **Sur les œstrogènes totaux**

Des pics d'œstrogènes pré-ovulatoires sont visibles dans les lots début et milieu de phase folliculaire et paraissent atténués dans le lot fin de phase folliculaire.

✓ **Sur la progestérone**

Les niveaux plasmatiques de la P4 augmentent après ovulation chez toutes les ponettes traitées (sauf pour la W626 dans le lot début de phase folliculaire qui n'a pas ovulé et qui est entrée en anœstrus saisonnier). Les niveaux atteints 5 jours après l'ovulation sont de 14 (\pm 6), 12 (\pm 1), 13 (\pm 1) ng/ml dans les lots début, milieu et fin de phase folliculaire respectivement.

✓ **Sur la croissance folliculaire et l'ovulation**

Les résultats sont représentés sur la **figure 3.1.7**.

La perfusion ne semble pas avoir eu d'effet sur la croissance folliculaire.

Les ponettes ont ovulé en moyenne (\pm SD) 11 (\pm 2,16), 10 (\pm 1,41), et 9,25 (\pm 0,83) jours après l'injection de prostaglandines dans les lots début, milieu et fin de phase folliculaire respectivement, d'un follicule mesurant en moyenne (\pm SD) 35 (\pm 7), 41 (\pm 5) et 41 (\pm 3) mm de diamètre la veille de l'ovulation respectivement. Par rapport au début du traitement, la durée jusqu'à ovulation a été de 10 (\pm 2,16), 8 (\pm 1,41), et 4,25 (\pm 0,83) jours dans les lots début, milieu et fin de phase folliculaire respectivement. La distribution des ovulations ne diffère pas entre les lots. Sur les 12 ponettes, 2 ont présenté une double ovulation. La ponette W553 du lot début de phase folliculaire a tout d'abord ovulé d'un follicule de 29 mm 8 jours

après injection de prostaglandine, puis d'un follicule de 27 mm présent sur le même ovaire 10 jours après injection de prostaglandine. Dans le lot milieu de phase folliculaire, la ponette W594 a ovulé d'un follicule de 45 mm et d'un autre de 38 mm présent sur le même ovaire, 10 jours après injection de prostaglandine. Enfin, la ponette W626 du lot début de phase folliculaire n'a pas ovulé.

4. Discussion

La perfusion de eKP-10 à la dose de 6 mg/h induit une stimulation plus importante des gonadotropines lorsqu'elle est effectuée au stade début de phase folliculaire. Pour LH, la stimulation est maintenue plusieurs jours après l'arrêt de la perfusion, jusqu'au démarrage du pic péri-ovulatoire.

Effets pendant la perfusion :

L'analyse des résultats de cette étude montre qu'une perfusion de eKP-10 à la dose de 6 mg/h pendant 6 heures permet une augmentation significative des concentrations plasmatiques de LH aux différents stades de la phase folliculaire étudiés. **Les effets de la perfusion de eKP-10 sont plus importants en début de phase folliculaire sur la sécrétion de LH, puisqu'ils permettent une augmentation d'environ 1,5 fois le niveau de base.** Cette dose apparaît donc plus efficace à ce stade que la dose précédemment utilisée (2,5 mg/h). Toutefois il est à noter que lors de cette expérience, l'état des follicules a été mieux caractérisé (follicules en croissances et inférieurs à 15 mm). En revanche, en fin de phase folliculaire, les effets de la perfusion de eKP-10 sur la sécrétion de la LH apparaissent semblables entre les doses 2,5 et 6 mg/h. Enfin, aucun effet n'est visible sur la sécrétion des œstrogènes totaux pendant les 6 heures de perfusion à aucun des stades. Si l'on rapproche ces résultats des études comparables réalisées dans d'autres espèces, ils sont cohérents avec les travaux effectués chez la ratte adulte (Roa *et al.*, 2006). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'une injection i.c.v. de KP-10 induisait une augmentation de 4 fois le niveau de base au stade dioestrus 2 (équivalent au début de la phase folliculaire chez la jument) et 2 fois le niveau de base au stade proestrus (équivalent au stade pré-ovulatoire). L'augmentation moindre au stade proestrus est attribuée aux niveaux déjà élevés de la LH pendant le pic pré-ovulatoire. Dans notre expérience, l'augmentation apparaît toutefois moins importante que chez le rat. Il est possible que cela soit dû au mode d'administration du KP (i.v. *versus* i.c.v., injection *versus* perfusion). Nos

résultats différents par contre de ceux obtenus chez la femme, chez laquelle, l'augmentation est plus importante au stade pré-ovulatoire (quelques heures avant ovulation) que pendant la phase folliculaire et la phase lutéale ; cependant, les auteurs ne précisent pas si le pic pré-ovulatoire a déjà commencé (Dhillon *et al.*, 2007). Chez la brebis, l'effet du KP est plus important au stade pré-ovulatoire qu'en phase lutéale (Smith *et al.*, 2009b). Les stades comparés dans ces études sont donc différents de ceux comparés dans notre expérience, et il est à noter que ces études ont été réalisées avec des injections uniques et non par perfusion. Chez la brebis, la réponse différentielle à l'administration du KP en fonction des stades du cycle pourrait être attribuée à des niveaux d'expression différents de l'ARNm du gène Kiss1 au cours du cycle sous l'influence des rétrocontrôles œstrogéniques ; ces niveaux augmentent en fin de phase folliculaire dans les neurones intervenant dans l'induction du pic pré-ovulatoire de la LH (Smith *et al.*, 2006b; Smith *et al.*, 2009a; Smith *et al.*, 2010). Ces données ne sont pas disponibles dans l'espèce équine.

Les réponses différentielles que nous observons en fonction des différents stades du cycle peuvent s'expliquer ainsi :

En début de phase folliculaire (le lendemain de l'injection de prostaglandines), le rétrocontrôle de l'E2 et de l'inhibine est très faible. De plus, l'injection de prostaglandines provoque une augmentation de la pulsativité de la LH dans les 36 heures qui suivent la lutéolyse, probablement du fait de la levée du rétrocontrôle négatif de la P4 (Silvia *et al.*, 1995). Les conditions semblent donc favorables pour permettre une stimulation importante de la LH et de la FSH en réponse à une perfusion de eKP-10 en début de phase folliculaire.

En milieu de phase folliculaire, les taux de LH et de FSH sont naturellement bas du fait du rétrocontrôle négatif de l'œstradiol et de l'inhibine sur l'hypothalamus et l'hypophyse (Burns et Douglas, 1981), ce qui pourrait limiter l'action stimulante du eKP-10 sur la sécrétion de LH et FSH.

En fin de phase folliculaire, les concentrations plasmatiques de LH sont déjà à un niveau élevé comme en témoignent les profils moyens et individuels. Il n'est donc pas exclu que la capacité de synthèse et/ou de libération de la GnRH et/ou de LH soit limitante, probablement à cause de la pulsativité maximale de la GnRH. De plus, la demi-vie plus importante de la LH équine par rapport à celle d'autres espèces, fait que les taux élevés circulants de LH peuvent masquer des augmentations modestes de sa libération. Les capacités de libération de la LH à ce stade peuvent également être appréciées grâce aux résultats de Foster et collaborateurs qui ont administré de la GnRH native par injection unique i.v. à

différents stades du cycle. L'augmentation la plus importante est observée en fin de phase folliculaire (Foster *et al.*, 1979). A ce stade la libération de la LH peut donc être encore stimulée. La faible augmentation que nous observons dans notre expérience serait donc plutôt attribuable à une limitation de la libération de la GnRH en réponse au eKP-10. Dans l'expérience de Foster, il est également possible que la forte dose unique de GnRH ait contribué à vider le stock hypophysaire contrairement à la stimulation plus « physiologique » de la GnRH endogène induite par la perfusion de eKP-10.

Les niveaux plasmatiques d'œstrogènes ne varient pas au cours de la perfusion, or chez la brebis, l'œstradiol augmente de façon immédiate et progressive pendant la perfusion (Sebert *et al.*, 2010). Bien qu'il ait été montré chez la jument que le profil des œstrogènes totaux variait de façon parallèle à celui de l'œstradiol pendant la phase folliculaire (Palmer et Terqui, 1977), il n'est pas exclu qu'une augmentation de libération de l'œstradiol n'ait pas entraîné d'augmentation décelable dans le dosage des œstrogènes totaux du fait de concentrations 100 fois moindres.

Effets après l'arrêt de la perfusion :

Si l'on s'intéresse aux taux plasmatiques de LH pendant le cycle, après la perfusion de eKP-10 en début de phase folliculaire, on constate qu'ils sont maintenus jusqu'au démarrage du pic pré-ovulatoire. Cet effet est également visible, mais pendant 2 jours uniquement après la perfusion, lorsque celle-ci a lieu en milieu de phase folliculaire. **Ce résultat est très encourageant dans l'éventualité de l'administration du eKP-10 pendant toute la phase folliculaire pour maîtriser la durée du cycle.** Aucun effet semblable n'est rapporté dans la bibliographie.

Dans ce lot début de phase folliculaire, les niveaux de LH atteignent des valeurs au moins équivalentes à la moitié de celles mesurées pendant le pic péri-ovulatoire, et restent maintenues jusqu'au début du pic. Toutefois, la croissance folliculaire n'apparaît pas accélérée et les ovulations n'interviennent pas plus précocement dans ce lot. Concernant les niveaux de LH nécessaires pour induire l'ovulation, il a cependant été précédemment démontré que des concentrations équivalentes au quart de la valeur du pic endogène de LH suffisent à induire l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire chez la moitié des ponettes traitées avec un antagoniste de la GnRH (Briant *et al.*, 2003). Il semblerait donc que la maturité du follicule soit un facteur limitant dans la réponse ovulatoire à une augmentation de LH endogène provoquée par une administration de eKP-10 exogène. *A contrario*, un apport

exogène de fortes doses de LH peut induire l'ovulation de follicules de 29 mm (Duchamp, non publié), voir même de 22 mm (Briant, 2004).

Concernant la vitesse de croissance folliculaire, elle est peut être également limitée par la capacité de croissance maximale du follicule de 3 mm par jour (Ginther *et al.*, 2008a). **En conséquence, le traitement avec le eKP-10 ne permettra peut être pas de raccourcir le cycle de façon importante mais plutôt de synchroniser les ovulations.**

Contrairement aux concentrations de LH, les concentrations de FSH rejoignent le niveau basal dans les lots début et milieu de phase folliculaire au moment de la dominance. Le traitement de eKP-10 ne semble pas capable de « s'opposer » aux rétrocontrôles négatifs de l'œstradiol et de l'inhibine, actifs à ce stade. **Il apparaît donc illusoire d'envisager l'utilisation du eKP-10 dans un traitement de superovulation.**

Dans cette expérience, 2 ponettes sur 12 ont présenté une double ovulation. Dans ce troupeau, l'incidence des doubles ovulations est d'environ 6 % (Briant, 2004), et l'historique des ovulations pour ces 2 ponettes montre qu'elles ont déjà présenté des doubles ovulations au cours des 3 dernières années. Ceci suggère que la perfusion de eKP-10 ne serait pas responsable des doubles ovulations observées chez ces 2 ponettes.

Enfin, la dose de KP-10 efficace chez la ponette (6 mg/h) apparaît bien supérieure à celle utilisée chez la brebis (20 µg/h) (Caraty *et al.*, 2007), même si elle est rapportée au poids des animaux. Toutefois, la dose efficace de GnRH chez la ponette (20 µg/h) (Becker et Johnson, 1992) est elle aussi bien supérieure à celle utilisée chez la brebis (0,125 µg/h) (McNatty *et al.*, 1988). Dans ces conditions, la limite entre la dose stimulante de eKP-10 et la dose désensibilisante risque d'être faible, même si les profils de LH obtenus dans la présente expérience ne le suggèrent pas. En effet, il a été montré chez le macaque qu'une dose de 34 µg.kg⁻¹.h⁻¹ de KP-10 administrée en perfusion par voie i.v. entraînait une désensibilisation des récepteurs GPR54 (Seminara *et al.*, 2006). Chez la ponette, la dose utilisée dans cette expérience est de l'ordre de 16,4 µg.kg⁻¹.h⁻¹, soit moitié moins importante. Cependant, la pharmacologie d'un récepteur est propre à chaque espèce. La dose optimale doit donc permettre une stimulation maximale sans désensibilisation.

Cette expérience a donc permis de confirmer les résultats obtenus au cours de l'expérience précédente. La meilleure stimulation des gonadotropines est obtenue lorsque la perfusion de eKP-10 est administrée en début de phase folliculaire. C'est donc ce stade que nous avons

choisi pour la poursuite de notre étude, notre objectif étant d'obtenir une synchronisation des ovulations, grâce à une administration continue de eKP-10 pendant toute la phase folliculaire. Cependant, considérant les fortes doses testées chez la ponette au regard de celles efficaces chez la brebis, nous avons souhaité au préalable confirmer la dose optimale efficace chez la ponette au stade début de phase folliculaire dans un protocole standardisé.

Nous gardons également en mémoire la stimulation de la LH par le eKP-10 en fin de phase folliculaire, même si elle reste modeste. Ce stade présente en effet un intérêt dans l'objectif de mise au point d'un traitement d'induction de l'ovulation.

A quel stade du cycle l'administration de KP est-elle la plus efficace pour stimuler l'axe gonadotrope?

Début de phase folliculaire

Milieu de phase folliculaire

Fin de phase folliculaire

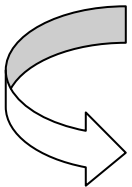
Quelle est la dose optimale efficace ?

0,5 mg/h

1 mg/h

3 mg/h

6 mg/h



Expérience 3 : *Perfusion de différentes doses de eKp-10 en début de phase folliculaire*

Tableau 3.1.3 : Partie 1 - Expérience 3 : Attribution des ponettes dans chacun des 4 lots (poids des ponettes et taille du plus gros follicule présent lors de l'expérience).

lot	ponette	poids (kg)	moyenne poids (kg) \pm SD	taille follicule (mm)	moyenne taille follicules (mm) \pm SD
0,5 mg/h	W515	286	322 \pm 79	17	14 \pm 3
	W624	211		10	
	W538	389		11	
	W525	403		17	
1 mg/h	W551	245	320 \pm 49	15	14 \pm 2
	W499	377		13	
	W373	315		17	
	W524	344		11	
3 mg/h	W506	325	306 \pm 27	15	16 \pm 1
	W621	266		17	
	W620	297		15	
	W591	336		16	
6 mg/h	W615	315	350 \pm 57	11	14 \pm 2
	W537	445		14	
	W535	340		13	
	W486	299		16	

1. Introduction - Objectifs

Suite à l'expérience précédente, nous avons cherché à définir la dose minimale efficace à administrer en début de phase folliculaire, pour induire une bonne stimulation des gonadotropines dans nos conditions standardisées. Nous entendons par dose optimale, une dose capable de stimuler la LH et la FSH de la façon la plus homogène possible entre les ponettes. Nous avons donc choisi 4 doses comprises entre la dose inefficace en période d'œstrus (0,5 mg/h) et la dose efficace en période de cyclicité (6 mg/h).

Ce travail ayant comme objectif la maîtrise du cycle avec le kisspeptide, il était intéressant de réduire la quantité de peptide à administrer en vue d'une application potentielle.

2. Matériel et méthodes

a) Animaux et lots

Après administration de prostaglandine PGF₂ α de synthèse, les ponettes (âge \pm SD : 9,5 \pm 3 ans) qui présentaient des follicules en croissance dont le diamètre était compris entre 10 et 17 mm ont été sélectionnées et attribuées aléatoirement dans un des 4 lots suivants :

- Lot 0,5 mg/h : n = 4
- Lot 1 mg/h : n = 4
- Lot 3 mg/h : n = 4
- Lot 6 mg/h : n = 4

Les caractéristiques des ponettes affectées à chaque lot (poids et état ovarien) sont présentées dans le **tableau 3.1.3**.

b) Protocole expérimental

Le jour de l'expérience, les ponettes ont reçu tout d'abord une perfusion de sérum physiologique pendant 1 heure afin de connaître le niveau basal de LH, puis une perfusion d'une des 4 doses de eKP-10 pendant 3 heures.

Les prélèvements sanguins sériés ont été effectués toutes les 10 minutes avec un cathéter pendant les 4 heures de perfusion, afin de doser la LH et la FSH plasmatique.

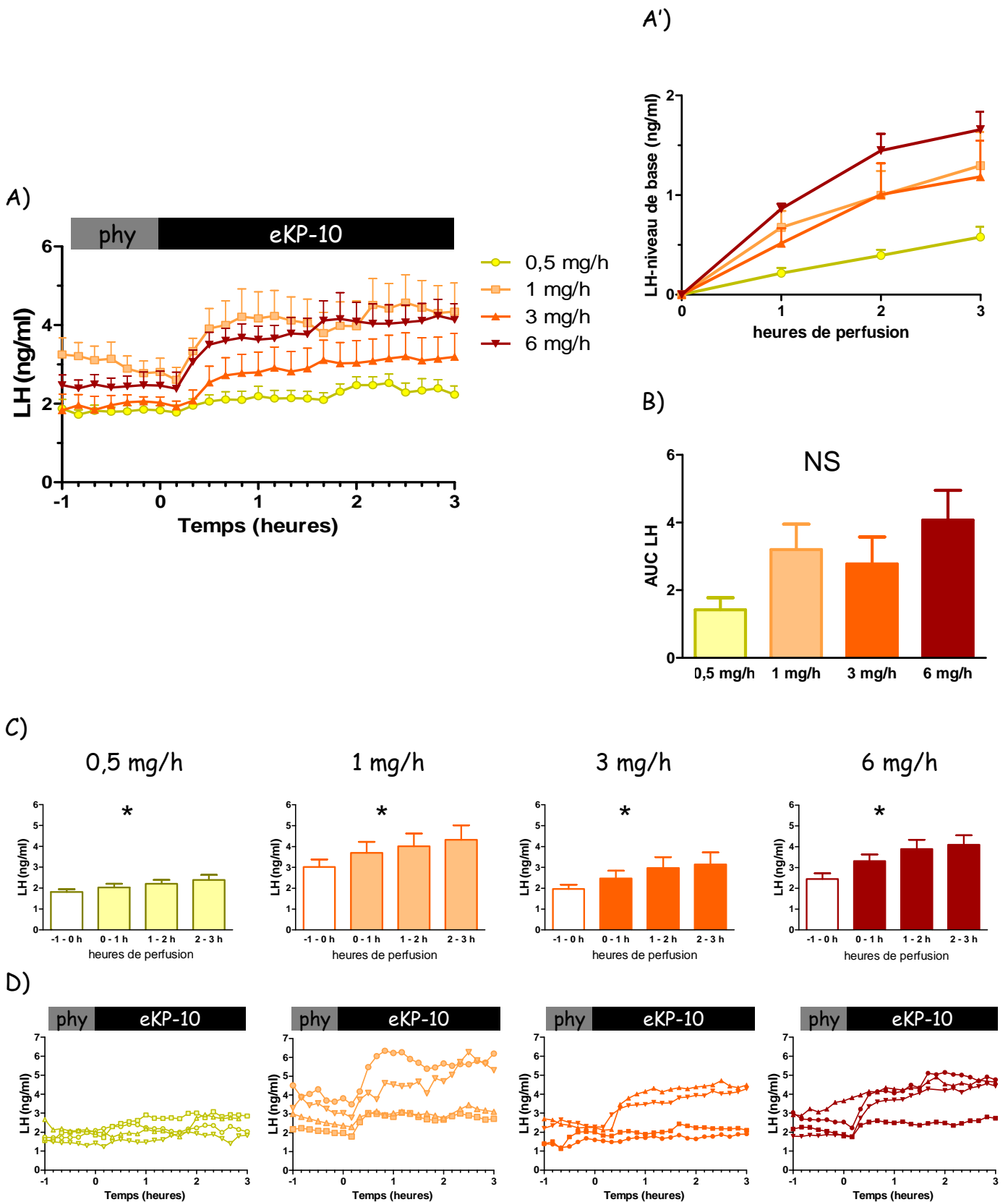


Figure 3.1.8 : Partie 1 - Expérience 3 : Concentrations plasmatiques de LH pendant 1 heure de perfusion de sérum physiologique puis 3 heures de eKP-10 à différentes doses (0,5, 1, 3 ou 6 mg/h, n = 4 par dose), en début de phase folliculaire. (A) Moyennes (+ SEM); (A') Moyennes (+ SEM) dont le niveau basal a été soustrait; (B) AUCs moyennes (+ SEM); (C) Moyennes (+ SEM) par période de 1 heure; (D) profils individuels. Les rectangles représentent les durées de perfusion. NS : non significatif. * $P \leq 0,05$.

c) Analyse statistique

Afin de comparer les effets entre les doses, pour chaque hormone, les AUCs de LH et de FSH ont été comparées globalement entre les lots par un test exact non paramétrique de Kruskal et Wallis pour échantillons indépendants.

Afin d'apprécier l'augmentation des taux hormonaux à l'intérieur des lots, les valeurs de LH et de FSH ont été moyennées pour chaque ponette par périodes de 1 heure. La première période (-1 - 0 h) représente le niveau basal obtenu lors de l'heure de perfusion de sérum physiologique. La seconde période (0 - 1 h) représente les valeurs obtenues pendant la première heure de perfusion de eKP-10, la troisième période (1 - 2 h) représente les valeurs obtenues pendant la deuxième heure de perfusion, et enfin la quatrième période (2 - 3 h) représente les valeurs obtenues pendant la troisième heure de perfusion. A l'intérieur de chaque lot, les moyennes des taux de LH et de FSH calculées ci-dessus ont ensuite été comparées entre les périodes tout d'abord globalement par un test exact non paramétrique de Friedman pour échantillons appariés. Lorsque la comparaison globale était significative, l'augmentation de la LH ou de la FSH entre la période (-1 - 0 h) et la période (2 - 3 h) a été testée par un test exact non paramétrique de Page pour échantillons appariés.

3. Résultats

Les concentrations plasmatiques de LH sont présentées sur la **figure 3.1.8.**

L'analyse de l'évolution des concentrations moyennes dans les 4 lots au cours de la perfusion montre que les niveaux de base avant traitement sont assez variables (**figure 3.1.8.A**). Nous avons donc retranché ce niveau de base et représenté la moyenne par heure de perfusion, le temps 0 correspondant à l'heure de perfusion de sérum physiologique (**figure 3.1.8.A'**).

Les AUCs des 4 lots ne diffèrent pas significativement entre elles (**figure 3.1.8.B**).

A l'intérieur des lots, une différence globale est mise en évidence pour chacune des 4 doses testées entre les 4 périodes et l'augmentation de la LH est significative entre la période 1 et la période 4 (**figure 3.1.8.A et C**).

L'examen des profils individuels (**figure 3.1.8.D**) montre une grande variabilité du niveau basal, mais également de la réponse à la perfusion de eKP-10 à l'intérieur de chaque lot. Les

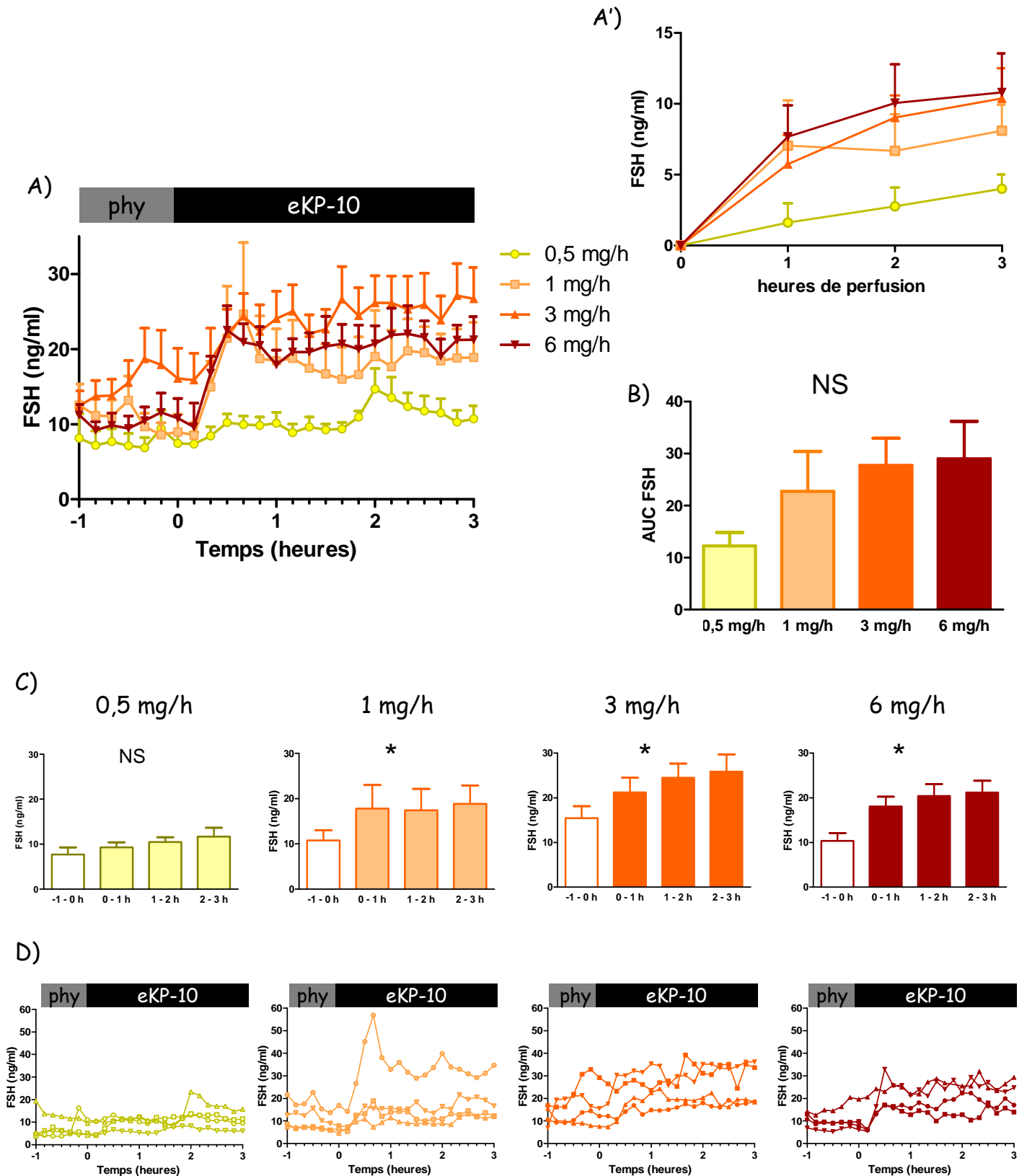


Figure 3.1.9 : Partie 1 - Expérience 3 : Concentrations plasmatiques de FSH pendant 1 heure de perfusion de sérum physiologique puis 3 heures de eKP-10 à différentes doses (0,5, 1, 3 ou 6 mg/h, n = 4 par dose), en début de phase folliculaire. (A) Moyennes (+ SEM); (A') Moyennes (+ SEM) dont le niveau basal a été soustrait; (B) AUCs moyennes (+ SEM); (C) Moyennes (+ SEM) par période de 1 heure; (D) profils individuels. Les rectangles représentent les durées de perfusion. NS : non significatif. * $P \leq 0,05$.

profils semblent moins hétérogènes avec la dose 6 mg/h. Les prélèvements sériés permettent d'apprécier à 10 min près le temps nécessaire au eKP-10 pour induire une stimulation de la LH. Pour les doses 1, 3 et 6 mg/h, la LH est nettement stimulée dans les 20 minutes suivant le début de la perfusion. En considérant le temps moyen nécessaire pour que la solution de KP atteigne la veine jugulaire (testé au laboratoire et estimé à environ 7 minutes), les effets sur la LH sont donc visibles dans les 10 minutes après l'arrivée de la solution de eKP-10 dans le sang, selon la dose utilisée.

Les concentrations plasmatiques de FSH sont présentées sur la **figure 3.1.9**.

L'analyse de l'évolution des concentrations moyennes dans les 4 lots au cours de la perfusion montre que les niveaux de base avant traitement sont assez variables (**figure 3.1.9.A**). Comme pour la LH, nous avons donc retranché ce niveau de base et représenté la moyenne par heure de perfusion (**figure 3.1.9.A'**).

Les AUCs des 4 lots ne diffèrent pas significativement entre elles (**figure 3.1.9.B**).

A l'intérieur des lots, une différence globale est mise en évidence pour les doses 1, 3 et 6 mg/h et l'augmentation de FSH est significative entre la période 1 et la période 4 pour les doses 3 et 6 mg/h (**figure 3.1.9.A, A' et C**).

L'examen des profils individuels montre une bonne homogénéité des réponses pour les doses 3 et 6 mg/h. Les effets sur l'augmentation de la FSH plasmatique sont visibles dans les 20 min après le début de la perfusion, soit dans les 10 min après l'arrivée de la solution de eKP-10 dans le sang (**figure 3.1.9.D**).

4. Discussion

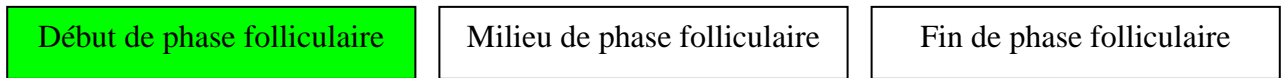
La dose de 0,5 mg/h se démarque des 3 autres doses par son efficacité moindre sur la sécrétion de LH et par son absence d'effet sur celle de FSH. **Les doses de 3 et 6 mg/h stimulent les deux hormones LH et FSH, de façon relativement homogène entre les ponettes.** Enfin, la dose de 1 mg/h est intermédiaire avec une stimulation des 2 hormones mais une plus grande hétérogénéité des réponses entre ponettes.

Le KP agit donc de façon dose dépendante chez la jument, à la fois sur la LH et la FSH, comme cela est le cas chez d'autres espèces avec toutefois quelques différences. Il a été montré chez le rat que le KP-54 était un stimulateur très puissant de la sécrétion de LH

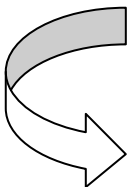
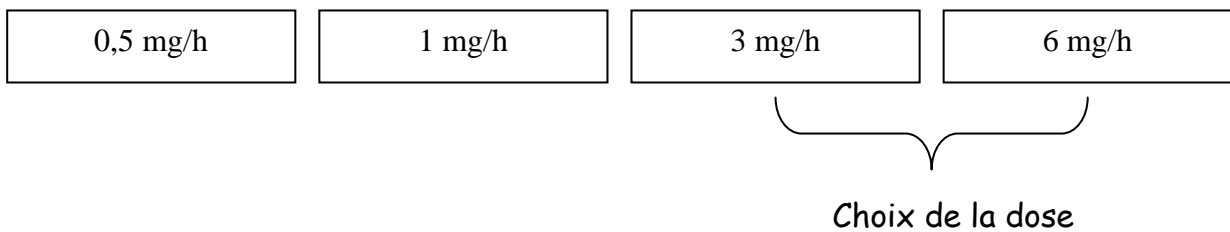
comparée à celle de FSH lors d'une administration i.c.v., puisque des doses 100 fois plus importantes de KP sont nécessaires pour obtenir une stimulation de la FSH (Navarro *et al.*, 2005a). Cependant, le mode d'administration et le peptide utilisé diffèrent (KP-54 en i.c.v. chez le rat versus KP-10 en i.v. chez la ponette). Des études menées chez la brebis recevant une injection de KP-10 par voie i.v. à différentes doses montrent qu'une dose de 10 µg (6,2 nmol) entraîne une augmentation significative des valeurs de l'aire sous la courbe pour les concentrations plasmatiques de LH comparée à une dose de 2,5 µg (1,6 nmol). Au contraire, une dose de 40 µg (25 nmol) est nécessaire pour qu'une différence significative des valeurs de l'aire sous la courbe pour les concentrations plasmatiques en FSH soit observée en comparaison avec la dose de 2,5 µg (1,6 nmol) (Caraty *et al.*, 2007). La différence de dose nécessaire pour induire une stimulation significative de la LH et de la FSH est donc bien moins importante que celle reportée chez le rat lors d'administration i.c.v. de KP-54. Chez la jument, nos résultats vont également dans ce sens et suggèrent que le eKP-10 est un sécrétagogue de la LH mais également de la FSH, à des doses relativement semblables. **Dans la mesure où il paraissait difficile de faire un choix entre les doses 3 et 6 mg/h, nous avons choisi de conserver ces deux doses pour l'expérience suivante.** La suite logique aurait été de faire un premier essai de perfusion de KP pendant toute la phase folliculaire. Cependant du fait de la lourdeur du protocole demandant une surveillance des animaux 24 h/24, nous avons opté dans un premier temps pour une administration de moyenne durée, soit 72 h, correspondant à un tiers de la phase folliculaire. Nous espérons ainsi que les résultats qui seraient obtenus en matière de profils hormonaux et de croissance folliculaire nous permettraient de choisir entre les doses de 3 et 6 mg/h pour une administration pendant toute la phase folliculaire.

Partie 2 : Approche des effets sur le cycle par une perfusion de moyenne durée (72 heures)

A quel stade du cycle l'administration de KP est-elle la plus efficace pour stimuler l'axe gonadotrope?



Quelle est la dose optimale efficace ?



Perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h ou 6 mg/h pendant 72 heures, en début de phase folliculaire

Tableau 3.2.1 : Partie 2 : Attribution des ponette dans chacun des 3 lots (poids des ponettes et taille du plus gros follicule présent lors de l'expérience).

lot	ponette	poids (kg)	moyenne poids (kg) \pm SD	taille follicule traité (mm)	moyenne taille follicule (mm) \pm SD
Témoïn	W 588	310	348 \pm 39	15	16 \pm 1
	W 578	352		16	
	W 373	330		16	
	W 548	400		15	
3 mg/h	W 600	330	290 \pm 32	15	16 \pm 2
	W 594	300		14	
	W 384	275		17	
	W 619	255		17	
6 mg/h	W 618	284	306 \pm 51	17	17 \pm 2
	W 592	320		16	
	W 597	250		19	
	W 616	370		15	

1. Introduction-Objectifs

Nous proposons d'évaluer dans cette expérience les effets d'une perfusion de eKP-10 aux deux doses qui induisent les effets les plus nets sur les gonadotropines en début de phase folliculaire, à savoir la dose 3 mg/h et la dose 6 mg/h avec pour objectif le choix d'une des 2 doses pour un essai ultérieur de synchronisation de l'ovulation chez la jument cyclique.

Une durée de perfusion de 72 heures nous a paru compatible à la fois avec l'obtention d'information intéressantes sur les profils hormonaux et la croissance folliculaire et avec une organisation optimale des expériences. Dans cette expérience, nous avons par ailleurs rajouté un « vrai » lot témoin perfusé pendant les 3 jours avec du sérum physiologique. Enfin, pour tenter de mieux apprécier l'efficacité du traitement, nous avons choisi, malgré la lourdeur du dosage, de doser le 17β -œstradiol (E2) et non plus les œstrogènes totaux pour les raisons évoquées précédemment.

2. Matériel et méthodes

a) Animaux et lots

Le lendemain de l'injection de prostaglandine $PGF2\alpha$ de synthèse, les ponettes (âge \pm SD : $7,5 \pm 3,7$ ans) qui présentaient des follicules en croissance dont le diamètre était inférieur à 20 mm ont été sélectionnées pour l'expérience. Les ponettes ont été attribuées aléatoirement dans un des 3 lots suivant :

- Lot témoin : n = 4
- Lot 3 mg/h : n = 4
- Lot 6 mg/h : n = 4

Les caractéristiques des ponettes affectées à chaque lot (poids et état ovarien) sont présentées dans le **tableau 3.2.1**.

b) Protocole expérimental

Les ponettes ont toutes reçu une perfusion de sérum physiologique pendant 3 heures, puis une perfusion de sérum physiologique (lot témoin), ou de eKP-10 à la dose 3 mg/h (lot 3 mg/h) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (lot 6 mg/h), pendant 72 heures.

Des prélèvements sanguins ont été effectués à raison de :

- 1 prélèvement par heure pendant les 3 premières heures de perfusion de sérum physiologique,
- 1 prélèvement toutes les 2 heures pendant les 10 premières heures de perfusion de sérum physiologique ou de eKP-10,
- 4 prélèvements par jour, (toutes les 5 heures de 7h à 22h), entre la 10^{ème} et la 72^{ème} heure de perfusion,
- 3 prélèvements par jour jusqu'à l'ovulation et enfin,
- 1 prélèvement par jour au cours des 5 jours suivant l'ovulation.

Les dosages hormonaux de LH, FSH, œstradiol et progestérone ont été réalisés.

c) Analyse statistique

Dans cette expérience les différents paramètres analysés sont :

- l'AUC des concentrations plasmatiques de LH, FSH et E2 au cours des 10 premières heures de perfusion,
- l'AUC des concentrations plasmatiques de LH, FSH et E2 au cours des 72 heures de perfusion,
- l'AUC du pic péri-ovulatoire de LH,
- le moment du démarrage du pic péri-ovulatoire de LH (défini comme étant le moment où les concentrations de l'hormone sont supérieures à deux fois le niveau de base, et se maintiennent pendant deux prélèvements successifs),
- l'AUC du pic pré-ovulatoire d'E2,
- le moment du démarrage du pic pré-ovulatoire d'E2 (défini comme étant le moment où les concentrations de l'hormone sont supérieures à deux fois le niveau de base, et se maintiennent pendant deux prélèvements successifs),
- la distribution des ovulations, soit le nombre de jours entre l'injection de prostaglandine et l'ovulation.

Tableau 3.2.2 : Partie 2 : Dose réellement reçue par les ponette, en fonction du volume administré pendant toute la durée de la perfusion, et du poids de chaque ponette.

Lot	Ponette	Poids (kg)	Dose (mg/h)	Dose (µg/kg/h)
3 mg/h	W 600	330	2,6	7,8
	W 594	300	2,5	8,5
	W 384	275	2,8	10,0
	W 619	255	2,2	8,5
6 mg/h	W 618	284	4,9	17,2
	W 592	320	4,4	13,6
	W 597	250	5	20,0
	W 616	370	5,5	14,7

Tous ces paramètres ont été comparés entre les lots par un test exact non paramétrique de Kruskal et Wallis pour données indépendantes. Quand la comparaison globale était significative, les lots ont ensuite été comparés deux à deux par un test exact de permutation pour mesures indépendantes, en appliquant la correction de Bonferroni.

Pour LH et FSH, les amplitudes maximales de stimulation atteinte pendant les 72 heures de perfusion dans les lots 3 mg/h et 6 mg/h ont été comparées par un test exact de permutation pour mesures indépendantes.

3. Résultats

→ Dose réellement reçue

Les doses de eKP-10 reçues par chaque ponette sont présentées dans le **tableau 3.2.2**.

Les ponettes des lots 3 mg/h et 6 mg/h ont reçu en moyenne (\pm SEM) une dose de 2,53 (\pm 0,11) mg/h et de 4,95 (\pm 0,20) mg/h respectivement, soit 8,7 (\pm 0,40) $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ et 16,38 (\pm 1,23) $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ respectivement.

→ Effets pendant les 72 heures de perfusion sur les paramètres endocriniens

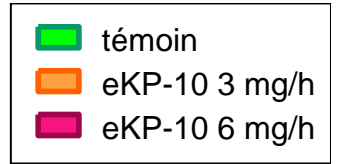
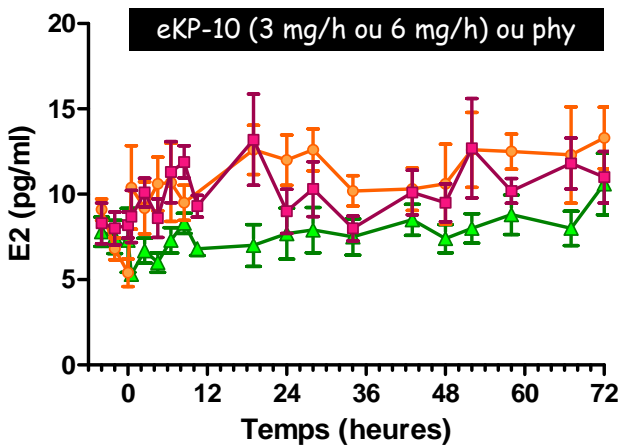
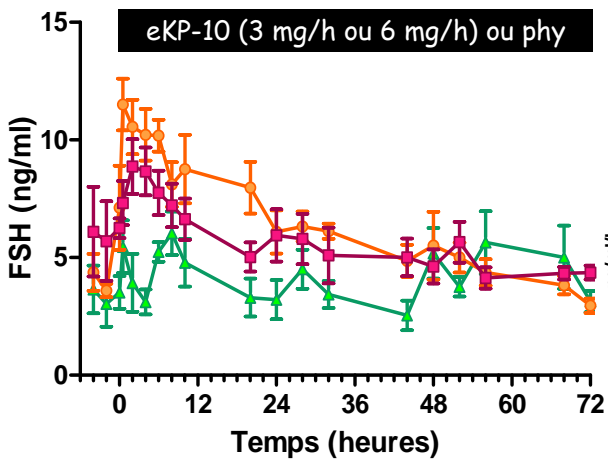
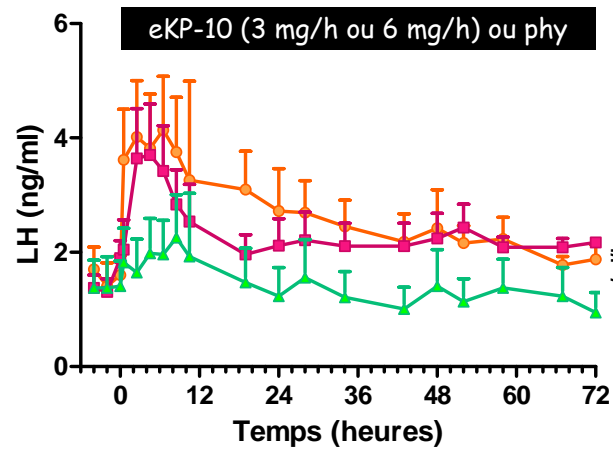
L'évolution des concentrations plasmatiques de LH, FSH et E2 pendant les 72 heures de perfusion (témoin, 3 mg/h ou 6 mg/h, $n = 4$ par lot) en début de phase folliculaire est représentée sur la **figure 3.2.1** pour les profils moyens (\pm SEM), et sur la **figure 3.2.2** pour les profils individuels.

La LH

L'analyse des profils moyens montre que la perfusion de eKP-10 induit une stimulation transitoire de la LH qui n'est pas maintenue pendant les 72 heures de perfusion. L'amplitude maximale atteinte est en moyenne (\pm SEM) de 4,14 (\pm 0,94) ng/ml dans le lot 3 mg/h, et 3,70 (\pm 0,89) ng/ml dans le lot 6 mg/h et ne diffère pas entre ces 2 lots (**figure 3.2.1.A**).

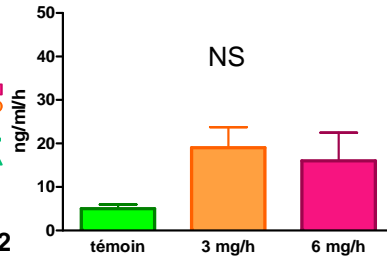
L'AUC des concentrations plasmatiques de LH pendant les 10 premières heures de perfusion ne diffère pas entre les lots ($P = 0,18$) (**figure 3.2.1.B**). En revanche, l'AUC des concentrations obtenues durant les 72 heures de perfusion diffère globalement entre les lots.

A)



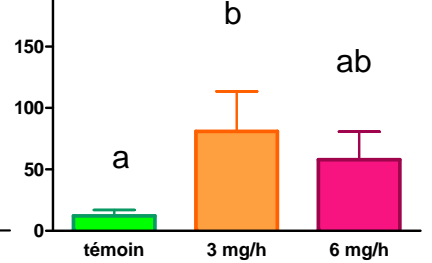
B)

AUC LH 10 h

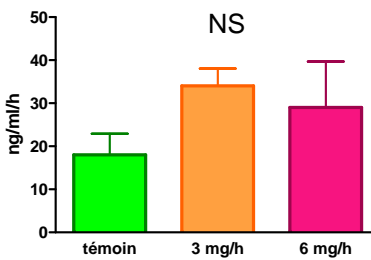


C)

AUC LH 72 h



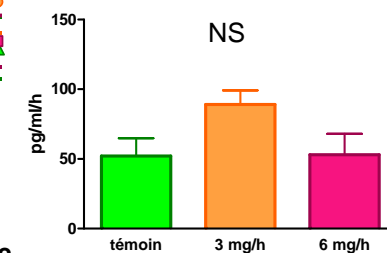
AUC FSH 10 h



AUC FSH 72 h



AUC E2 10 h



AUC E2 72 h

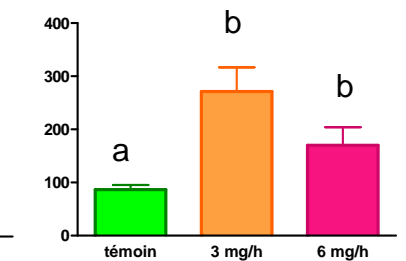


Figure 3.2.1 : Partie 2 : Concentrations plasmatiques de LH, FSH et E2 pendant la perfusion de sérum physiologique (témoins, en vert) ou pendant la perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h (eKP-10 3 mg/h, en orange) ou 6 mg/h (eKP-10 6 mg/h, en rouge) pendant 72 heures. (A) Moyenne (\pm SEM). Les rectangles représentent les durées de perfusion. (B) AUC moyennes (\pm SEM) pendant 10 h; (C) AUC moyennes (\pm SEM) pendant 72 h. NS : non significatif. Les lots différant entre eux sont identifiés par des lettres différentes.

Témoins

eKP-10
3 mg/h

eKP-10
6 mg/h

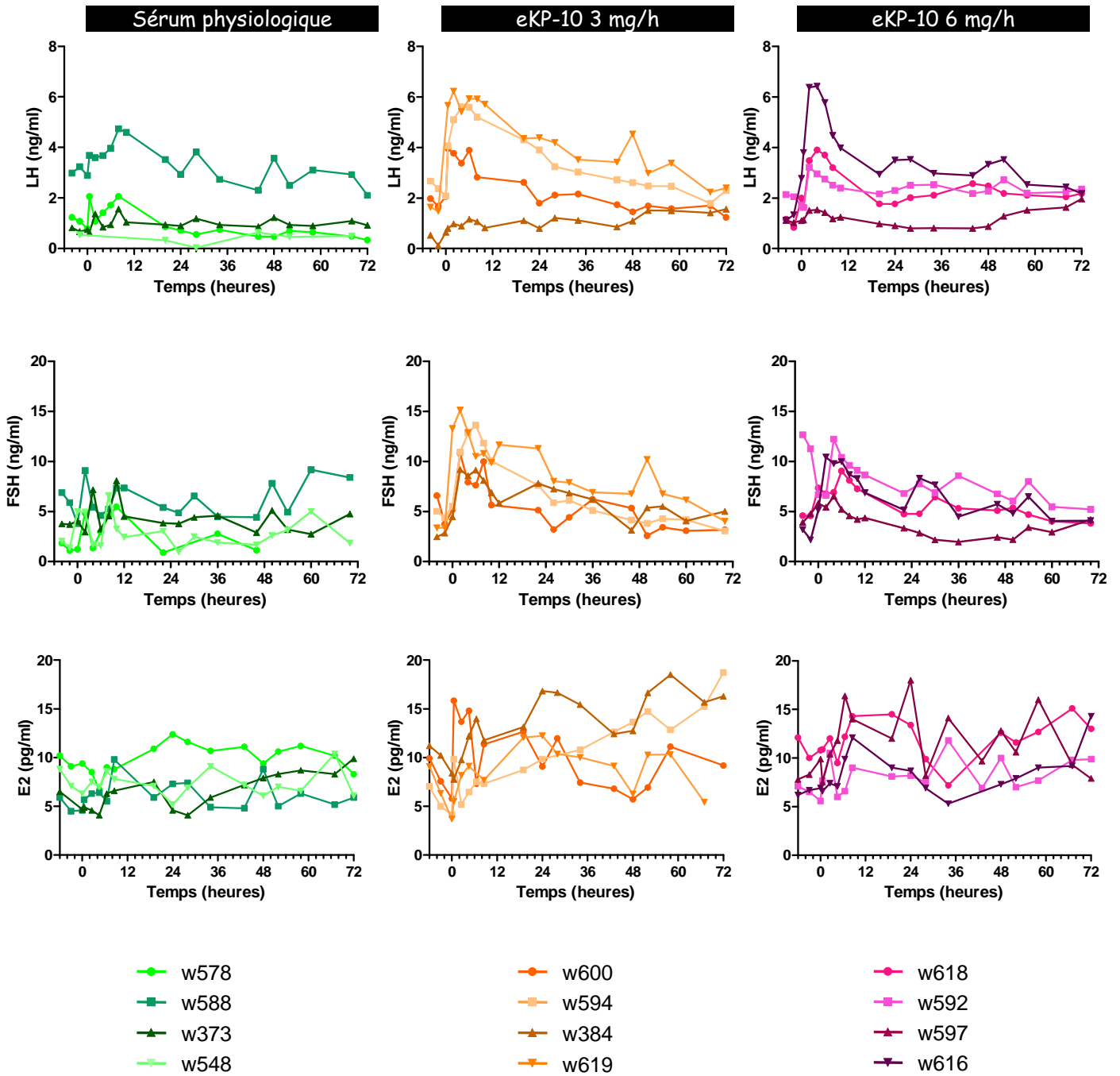


Figure 3.2.2 : Partie 2 : Profils individuels des concentrations plasmatiques de LH, FSH et E2 pendant la perfusion de sérum physiologique (témoins, en vert) ou pendant la perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h (eKP-10 3 mg/h, en orange) ou 6 mg/h (eKP-10 6 mg/h, en rouge) pendant 72 heures. Les rectangles représentent les durées de perfusion.

Elle est supérieure dans le lot 3 mg/h comparée au lot témoin, et tend à être supérieure dans le lot 6 mg/h comparée au lot témoin (**figure 3.2.1.C**).

L'examen des profils individuels montre un niveau basal hétérogène dans chacun des 3 lots, et une variabilité de réponse au traitement dans les lots 3 et 6 mg/h avec une ponette sur 4 ne présentant qu'une faible stimulation pendant les 72 heures de perfusion de eKP-10 (**figure 3.2.2**).

La FSH

L'analyse des profils moyens montre que la perfusion de eKP-10 induit une stimulation transitoire de la FSH qui n'est pas maintenue pendant les 72 heures de perfusion. L'amplitude maximale atteinte est en moyenne (\pm SEM) de 11,51 (\pm 1,10) ng/ml dans le lot 3 mg/h, et 8,87 (\pm 1,16) ng/ml dans le lot 6 mg/h, et ne diffère pas entre ces 2 lots (**figure 3.2.1.A**).

L'AUC des concentrations plasmatiques de FSH pendant les 10 premières heures de perfusion ne diffère pas entre les lots ($P = 0,13$) (**figure 3.2.1.B**). En revanche, l'AUC des concentrations obtenues durant les 72 heures de perfusion diffère globalement entre les lots. Elle est supérieure dans le lot 3 mg/h comparée au lot témoin, et tend à être supérieure dans le lot 6 mg/h comparée au lot témoin (**figure 3.2.1.C**).

L'examen des profils individuels montre un niveau basal assez hétérogène dans chacun des 3 lots, et une variabilité de réponse au traitement dans les lots 3 et 6 mg/h. Cependant, cette variabilité semble moins prononcée que pour la LH, car toutes les ponettes traitées présentent une augmentation notable de FSH (**figure 3.2.2**).

L'œstradiol

L'analyse des profils moyens montre que la perfusion de eKP-10 induit une stimulation de l'E2 pendant toute la durée de la perfusion (**figure 3.2.1.A**).

L'AUC des concentrations plasmatiques de l'E2 pendant les 10 premières heures de perfusion ne diffère pas entre les lots ($P = 0,20$) (**figure 3.2.1.B**). En revanche, l'AUC des concentrations obtenues durant les 72 heures de perfusion diffère globalement entre les lots. Elle est supérieure dans les deux lots traités par rapport au lot témoin (**figure 3.2.1.C**).

L'examen des profils individuels montre une variabilité des réponses dans les deux lots traités (**figure 3.2.2**).

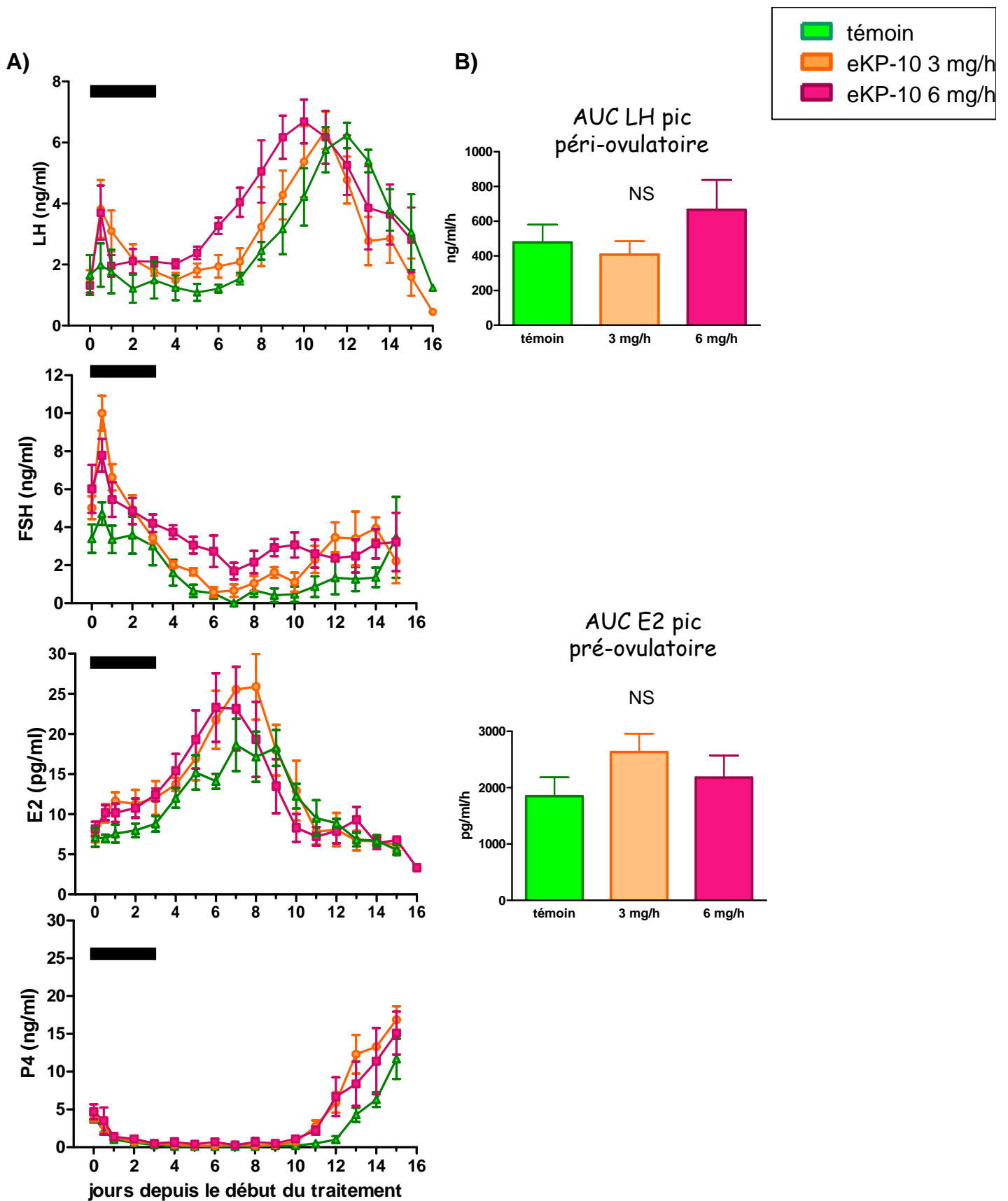


Figure 3.2.3: Partie 2 : Concentrations plasmatiques de **LH**, **FSH**, **E2** et **P4** pendant et après la perfusion de 72 heures de sérum physiologique (lot témoins, en vert, n = 4) ou eKP-10 à la dose de 3 mg/h (lot 3 mg/h, en orange, n = 4) ou eKP-10 à la dose de 6 mg/h (lot 6 mg/h, en rouge, n = 4). (A) Profils moyens (\pm SEM). Les rectangles représentent les durées de perfusion; (B) AUCs moyennes (+ SEM). NS: non significatif.

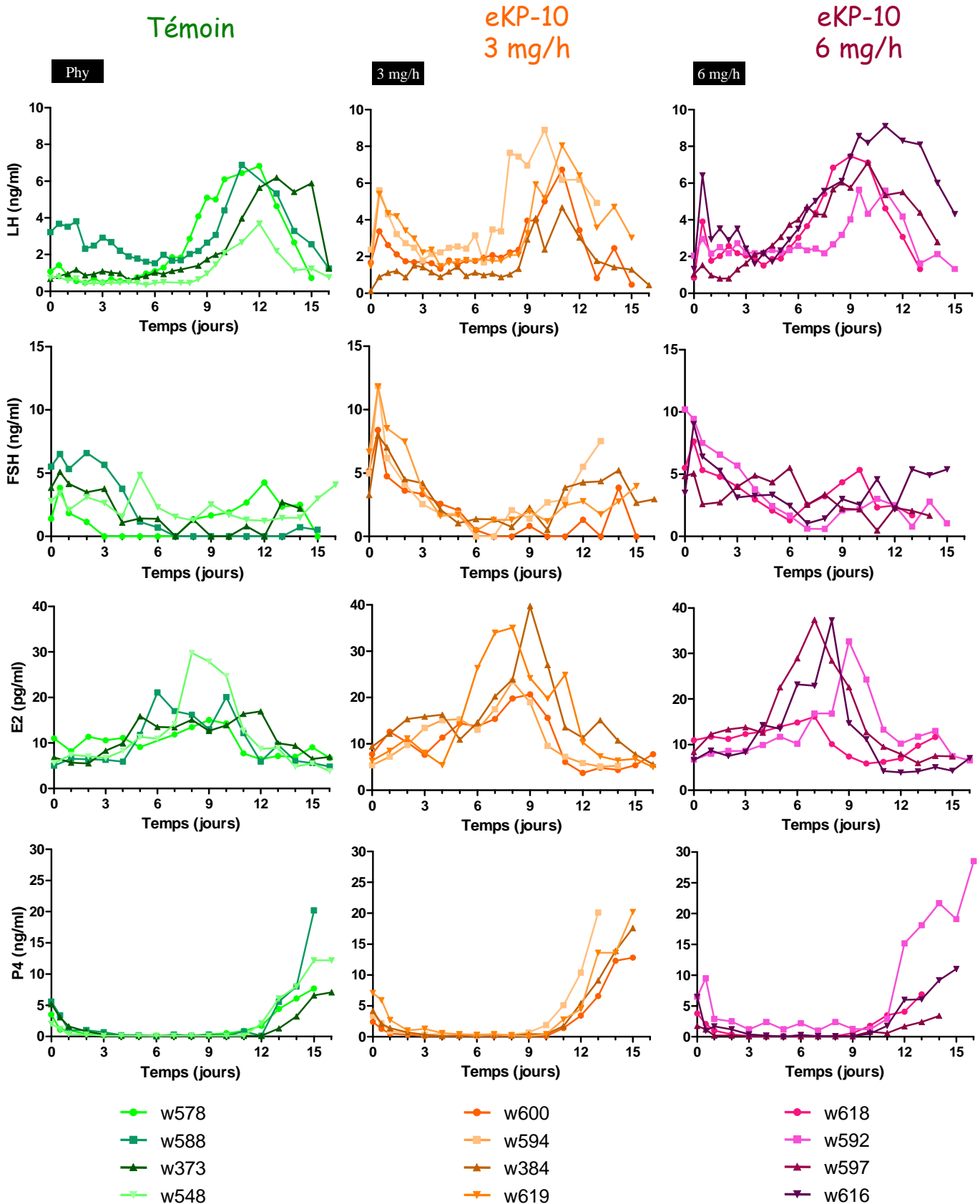


Figure 3.2.4: Partie 2 : Profils individuelles des concentrations plasmatiques de LH, FSH, E2 et P4 pendant et après la perfusion de 72 heures de sérum physiologique (lot témoins, en vert, n = 4) ou eKP-10 à la dose de 3 mg/h (lot 3 mg/h, en orange, n = 4) ou eKP-10 à la dose de 6 mg/h (lot 6 mg/h, en rouge, n = 4). Les rectangles représentent les durées de perfusion.

→ Effets après les 72 heures de perfusion sur les paramètres endocriniens

L'évolution des concentrations plasmatiques de LH, FSH, E2 et P4 pendant et après l'arrêt de la perfusion est présentée sur la **figure 3.2.3** pour les profils moyens (\pm SEM), et sur la **figure 3.2.4** pour les profils individuels.

Il est à noter qu'une ponette (W548) du lot témoin a présenté un cycle anormalement long (29 jours entre l'injection de PG et l'ovulation). Cette ponette avait été traitée pour une fourbure (congestion inflammatoire d'une partie du sabot) quelque temps avant le début de l'expérience. Nous avons donc « recalé » les profils endocriniens de cette ponette avec la croissance du follicule qui a ovulé, puisque plusieurs vagues folliculaires successives ont été observées chez cette ponette.

La LH

L'AUC du pic péri-ovulatoire de LH ne diffère pas entre les 3 lots (**figure 3.2.3.B**). Le démarrage du pic apparaît en moyenne (\pm SD) 6,09 (\pm 1,08), 5,29 (\pm 0,50), et 3,04 (\pm 1,78) jours après l'arrêt des 72 heures de perfusion, dans les lots témoin, 3 mg/h et 6 mg/h respectivement. Cette durée tend à être différente entre les 3 lots ($P = 0,07$), et les comparaisons 2 à 2 montrent que le pic de LH tend à être avancé dans le lot 6 mg/h comparé au lot témoin ($P = 0,04$).

La FSH

Les taux plasmatiques en FSH continuent à chuter après l'arrêt de la perfusion dans les 3 lots, pour atteindre un niveau minimal au milieu de la phase folliculaire et remonter ensuite progressivement jusqu'à l'ovulation.

L'œstradiol

L'AUC du pic pré-ovulatoire d'E2 ne diffère pas entre les 3 lots (**figure 3.2.3.B**). Le démarrage du pic d'E2 apparaît en moyenne (\pm SD) 2,67 (\pm 1,15), 2,50 (\pm 1,91), et 2,33 (\pm 1,53) jours après l'arrêt des 72 heures de perfusion, dans les les lots témoin, 3 mg/h et 6 mg/h respectivement.

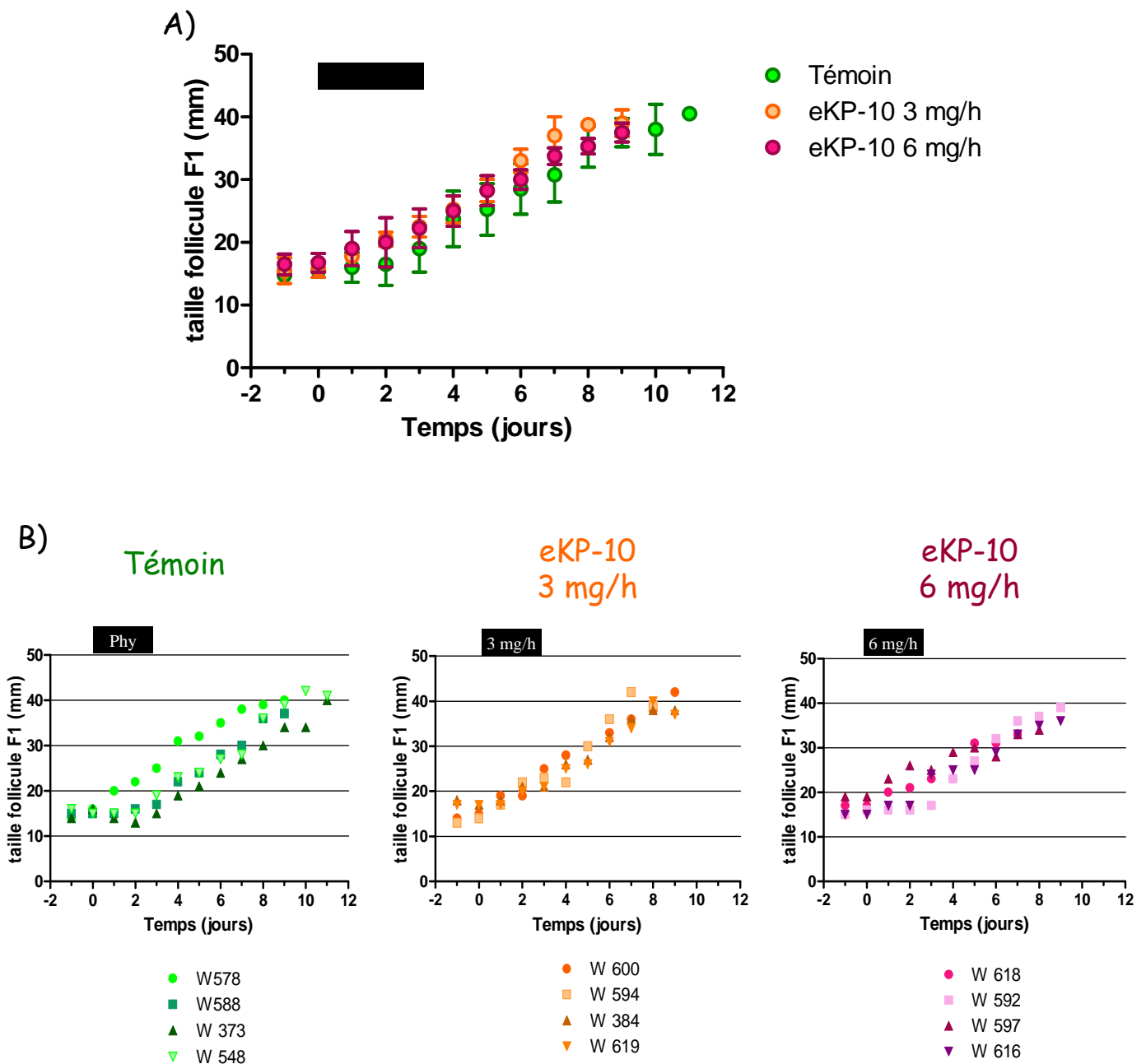


Figure 3.2.5: Partie 2 : Evolution de la **taille du plus gros follicule** pendant et après les 72 heures perfusion en début de phase folliculaire dans chacun des 3 lots (sérum physiologique, eKp-10 3 mg/h ou 6 mg/h, n = 4 par lot). (A) Moyennes (\pm SD); (B) Croissances individuelles. Les rectangles représentent les durées de perfusion.

La progestérone

Les concentrations plasmatiques de P4 augmentent chez toutes les ponettes après ovulation. L'analyse statistique ne révèle aucune différence ni dans le début de la montée de la P4, ni dans les valeurs maximales atteintes 5 jours après ovulation, entre les 3 lots. Or visuellement l'augmentation de la P4 semble apparaître de façon plus précoce chez les ponettes des 2 lots traités que chez les ponettes du lot témoin. Lorsque l'on regroupe les 2 lots traités, il y a une forte tendance à ce que la P4 augmente plus tôt chez les ponettes traitées que chez les ponettes témoins ($P = 0,06$) soit en moyenne (\pm SD) 10,62 (\pm 0,92) et 12,25 (\pm 0,96) jours après le début du traitement chez les ponettes traitées et les ponettes témoins respectivement.

→ Effet des 72 heures de perfusion sur la croissance folliculaire et sur l'ovulation.

La croissance folliculaire

Le suivi de la croissance folliculaire pendant et après la perfusion est présenté sur la **figure 3.2.5**. Il n'y a pas d'effet sur la croissance folliculaire.

L'ovulation

La distribution des ovulations suite à la perfusion est présentée dans le **tableau 3.2.3** et sur la **figure 3.2.6**. Les ponettes du lot témoin ont ovulé en moyenne (\pm SD) 11,75 (\pm 0,96) jours après l'injection de PG, les ponettes du lot 3 mg/h et du lot 6 mg/h ont ovulé en moyenne (\pm SD) 10,75 (\pm 0,50) et 10,25 (\pm 0,96) jours après l'injection de PG respectivement. Cette durée ne diffère pas entre les 3 lots. Par contre si on regroupe les ponettes traitées, ces dernières ovulent plus tôt que les ponettes témoins ($P = 0,04$).

La taille moyenne (\pm SD) des follicules avant ovulation est de 40 (\pm 2), 39 (\pm 2) et 36 (\pm 3) mm dans les lots témoin, 3 mg/h et 6 mg/h respectivement. Cette taille tend à être globalement différente entre les lots ($P = 0,08$) avec une tendance à ce que la taille à l'ovulation des follicules du lot 6 mg/h soit inférieure à celle des follicules du lot témoin ($P = 0,02$).

Tableau 3.2.3: Partie 2 : Distribution des **ovulations** en nombre de jours après injection de prostaglandines (PG), suite à une perfusion de 72 heures en début de phase folliculaire (le lendemain de l'injection de PG) de sérum physiologique (lot témoin), ou de eKP-10 à la dose de 3 mg/h (lot 3 mg/h) ou de e KP-10 à la dose de 6 mg/h (lot 6 mg/h)

Lot	Ponette	Ovulation (nombre de jours après PG)	Moyenne	SD
Témoin	W 373	13	11,75	0,96
	W 588	11		
	W 578	11		
	W 548	12 (en réalité 29)		
3 mg/h	W 384	11	10,75	0,50
	W 594	10		
	W 600	11		
	W 619	11		
6 mg/h	W 592	11	10,25	0,96
	W 597	10		
	W 616	11		
	W 618	9		

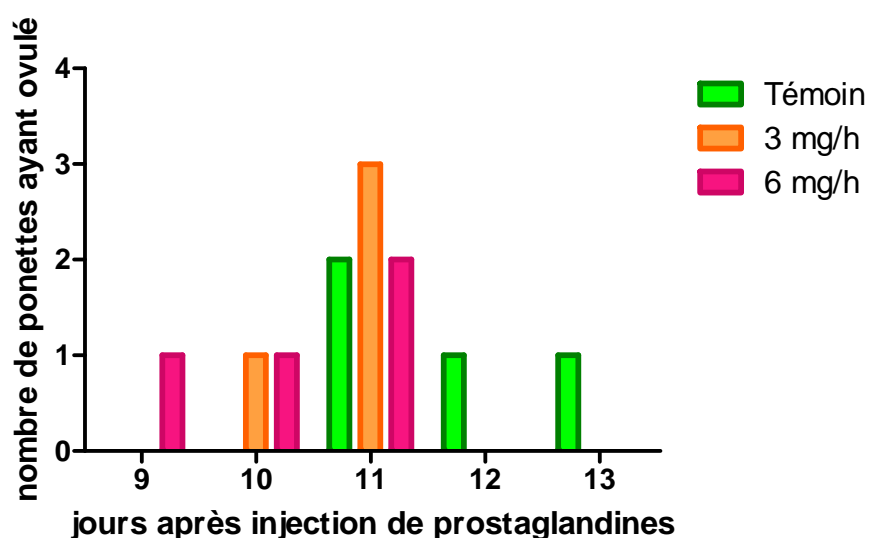


Figure 3.2.6: Partie 2: Représentation graphique du tableau ci-dessus permettant une meilleure visualisation de la distribution des ovulations

4. Discussion

La perfusion de eKP-10 pendant 72 heures au stade début de phase folliculaire induit :

- **une stimulation transitoire des gonadotropines pendant environ 24 h, associée à une stimulation de l'œstradiol,**
- **des effets stimulants sur le démarrage du pic-périovulatoire de LH et la survenue des ovulations.**

Doses réellement administrées :

Les doses réellement reçues sont légèrement inférieures aux doses théoriques. Néanmoins, les ponettes du lot 6 mg/h ont toutes reçu une dose correspondant approximativement au double de la dose reçue par les ponettes du lot 3 mg/h.

Effets sur les paramètres endocriniens au cours des 72 heures de perfusion :

L'analyse de l'ensemble des résultats de cette expérience indique qu'une perfusion de 72 heures de eKP-10, à des doses de 3 mg/h ou 6 mg/h, permet une stimulation des gonadotropines LH et FSH. Les concentrations plasmatiques maximales de gonadotropines ne diffèrent pas entre les 2 lots traités. En revanche, l'AUC pendant les 72 heures de perfusion est supérieure dans le lot 3 mg/h, ce qui témoigne donc d'une stimulation plus prolongée des gonadotropines dans ce lot. Cependant, la stimulation des gonadotropines n'est visible qu'au cours des 24 premières heures de perfusion. Au-delà, les niveaux plasmatiques des gonadotropines diminuent jusqu'à un niveau proche du niveau basal, alors que la perfusion de eKP-10 est maintenue. Cette stimulation transitoire est également observée chez la brebis en anœstrus, chez laquelle une perfusion de KP-10 entraîne une augmentation transitoire de la LH pendant les 5 premières heures de perfusion, puis le pic pré-ovulatoire intervient environ 15 heures plus tard (Sebert *et al.*, 2010). Si l'on prend en compte la demi-vie de la LH qui est de 5 h environ chez la jument et de 20 min chez la brebis, la durée de stimulation de la LH est donc comparable entre ces deux espèces.

Cette expérience est également la première à montrer un effet stimulant du kisspeptide sur la sécrétion de l'E2 chez la jument, probablement liée à l'augmentation de la LH, et suggère ainsi que le dosage de l'E2 est plus pertinent que celui des œstrogènes totaux dans nos conditions expérimentales. En effet, le dosage des œstrogènes totaux cumule les différentes formes conjuguées et non conjuguées, et dans le plasma ce sont les métabolites de l'oestrone

qui prédominent. Seul l'E2 régule l'action de la GnRH sur l'hypophyse et module ainsi la sécrétion des gonadotropines (Noden *et al.*, 1975). Les données de la littérature font état d'une variation parallèle des concentrations plasmatiques d'œstrogènes totaux et d'E2, mais à des concentrations 100 fois plus élevées pour les œstrogènes totaux (Palmer et Terqui, 1977). Il n'est cependant pas exclu que notre traitement induise une augmentation de l'E2 sans pour autant induire une augmentation des autres métabolites (estriol et estrone sous forme libre ou sulfatée). Ceci implique une éventuelle augmentation de la conversion de l'estrone en œstradiol par l'intermédiaire d'une activité accrue de la 17 β hydroxystéroïde oxydoréductase, ou d'une augmentation de la testostérone. Ce dosage offre donc la possibilité de visualiser les variations de l'E2 suite à notre traitement, variations qui auraient été très probablement masquées par dilution dans la masse des œstrogènes totaux.

Pour tenter d'expliquer la stimulation transitoire des gonadotropines, nous pouvons proposer plusieurs hypothèses en fonction du niveau où pourrait se situer le(s) facteur(s) limitant(s) :

1. Niveau hypothalamique : désensibilisation des récepteurs GPR54 au eKP-10, notamment au niveau des terminaisons des neurones à GnRH.

Cette hypothèse s'appuie sur les résultats publiés chez le macaque. Dans cette espèce, la dose de KP-10 administrée par perfusion est de l'ordre de 34 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Celle-ci entraîne une première action stimulante sur la LH pendant les 1 à 2 premières heures de perfusion, suivie d'une diminution des concentrations qui atteignent le niveau basal au bout de 12 heures de perfusion. Ensuite, les niveaux restent bas jusqu'à la fin des 98 heures de perfusion (Seminara *et al.*, 2006). Les auteurs ont interprété ces résultats comme étant liés à une désensibilisation du GRP54 au kisspeptide chez le macaque. Les doses utilisées chez la ponette dans notre expérience sont de l'ordre de 8,7 à 16,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (pour les doses 3 et 6 mg/h respectivement), soit 2 fois moins élevées que chez le macaque. Néanmoins, il est difficile de faire des comparaisons entre les doses administrées chez deux espèces différentes d'autant que les statuts physiologiques des animaux sont différents (mâle castré prépubère chez le macaque *versus* femelle cyclique chez la ponette). Quoiqu'il en soit, la possibilité d'une désensibilisation des récepteurs GPR54 en présence de fortes doses de eKP-10 reste envisageable chez la ponette.

2. Niveau hypothalamique : limitation des capacités de sécrétion de la GnRH.

Cette hypothèse propose que l'hypothalamus ne serait pas capable de répondre à la stimulation exercée par le KP au delà de 24 heures, par libération à partir des granules de

sécrétion et/ou synthèse *de novo*. Etant donné les difficultés à doser la GnRH chez la jument, très peu d'auteurs ont étudié le contenu hypothalamique ou les variations de libération de la GnRH au cours du cycle. Dans cette espèce, la pulsativité semble basse au cours de la phase lutéale avec un pulse toutes les 2 heures environ, puis la fréquence augmenterait jusqu'à un pulse toutes les 30 minutes le jour de l'ovulation (Irvine et Alexander, 1994; Silvia *et al.*, 1995). Il est donc possible que la capacité de synthèse de la GnRH soit faible en début de phase folliculaire, et que, suite à une forte stimulation de la GnRH par le KP-10, la synthèse *de novo* soit insuffisante pour assurer la production de peptide en quantité suffisante pour une libération plus prolongée.

3. Niveau hypothalamique et/ou hypophysaire : rétrocontrôle de l'E2.

Cette hypothèse s'appuie sur des résultats obtenus chez la brebis. Dans cette espèce, l'augmentation de l'E2 qui suit celle de la LH pendant la perfusion de KP-10 induit un rétrocontrôle négatif au niveau hypothalamique et/ou hypophysaire, entraînant ainsi une diminution des concentrations plasmatiques de LH. Cependant, cette stimulation transitoire de la LH, pendant environ 5 heures chez la brebis, est suffisante pour induire un cycle en contre-saison (Caraty *et al.*, 2007; Sebert *et al.*, 2010). Dans notre expérience, dans la mesure où l'œstradiol augmente significativement chez les animaux traités, cette hypothèse mérite également d'être envisagée.

4. Niveau hypophysaire : limitation des capacités de sécrétion de l'hypophyse.

Cette hypothèse propose que les doses administrées entraîneraient un épuisement du stock hypophysaire de LH, au cours des 72 heures de perfusion de eKP-10. La concentration en LH hypophysaire pendant la période de cyclicité est d'environ 15 µg/mg d'adénohypophyse (Silvia *et al.*, 1986). L'adénohypophyse pesant approximativement 500 mg, on peut donc estimer la quantité de LH stockée dans l'hypophyse à environ 7 mg. Le volume sanguin d'une ponette équivaut approximativement à 8 % du poids corporel, soit environ 24 litres de sang. Les 7 mg de LH dilués dans la circulation sanguine correspondent donc à une concentration approximative de 300 ng/ml. Il semble donc possible de pouvoir « vider » le stock hypophysaire à la suite d'une libération prolongée de LH si l'on prend en compte le métabolisme d'élimination. De plus, cette valeur du contenu hypophysaire en LH a été obtenue sur des tissus collectés pendant la saison de reproduction en général. Aucune étude ne mentionne la quantité de LH dans une hypophyse au cours des différents stades de la phase folliculaire chez la jument. En revanche, il est bien établi que les effets d'une administration

de GnRH sur la sécrétion de la LH varient au cours du cycle (Foster *et al.*, 1979; Alexander et Irvine, 1986) et ces effets peuvent refléter une synthèse ou un stock hypophysaire différents. Cette hypothèse d'une insuffisance de synthèse *de novo* de la LH est donc également possible pour expliquer la libération transitoire de LH.

En combinant les hypothèses 2 et 4, la différence de profil de sécrétion des gonadotropines entre les doses 3 et 6 mg/h pourrait s'expliquer par un épuisement plus ou moins rapide des stocks hypothalamiques en GnRH et/ou hypophysaires en gonadotropines.

Enfin, nous pouvons noter des réponses individuelles aux traitements extrêmement variables d'une ponette à une autre. La **figure 3.2.4** illustre cette hétérogénéité. Que ce soit dans le lot 3 mg/h ou 6 mg/h, une ponette sur 4 ne présente qu'une faible augmentation de la LH pendant les 72 heures de perfusion (W384 dans le lot 3 mg/h et W597 dans le lot 6 mg/h). En revanche, ces 2 ponettes (W384 et W597) présentent une augmentation progressive de l'E2 pendant toute la durée de la perfusion. L'augmentation de l'E2 n'apparaît donc pas proportionnelle à l'augmentation de la LH. Il peut s'agir soit d'une différence de sensibilité à la LH, soit d'une possible action du KP directement au niveau ovarien qui a été proposée dans certaines espèces. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le système KP/GPR54 est présent au niveau ovarien. Des travaux de l'équipe de Tena-Sempere montrent que l'expression de l'ARNm des gènes Kiss1 et GPR54 est présente tout au long du cycle chez la ratte adulte. L'ARNm du GPR54 semble être constant, en revanche l'ARNm du Kiss1 augmente avant l'ovulation. De plus, une immunoréactivité pour le KP est observée au niveau de l'ovaire chez la ratte, avec un signal important dans les cellules de la thèque des follicules en croissance, dans le corps jaune, et dans la glande interstitielle. Une immunoréactivité est également observée pour le GPR54 dans les mêmes zones, mais avec une intensité moindre (Castellano *et al.*, 2006).

Il n'est donc pas exclu qu'une action mineure du KP se produise au niveau ovarien. Toutefois, le fait que le KP puisse entraîner une augmentation de la sécrétion de l'E2 par une action directe au niveau de l'ovaire n'a pas à ce jour été démontrée.

Effets sur le cycle :

Les effets les plus marquants sont :

1. une tendance à l'avancement du début du pic péri-ovulatoire de LH de près de 3 jours et à la réduction de la taille des follicules à l'ovulation, dans le lot 6 mg/h.

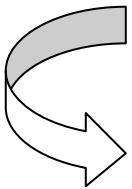
2. la survenue des ovulations en moyenne 1 jour plus tôt dans les 2 lots traités qui correspond à une tendance à l'augmentation des concentrations plasmatiques de la P4 en moyenne 1,5 jours plus tôt. De plus, l'augmentation de la P4 après l'ovulation dans chacun des 3 lots témoigne de la fonctionnalité du corps jaune.

Ces effets apparaissent relativement modestes mais sont toutefois comparables à ceux obtenus chez la brebis cyclique recevant une perfusion de oKP-10, chez laquelle les pics préovulatoires de LH sont avancés en moyenne de 24 heures.

Cette expérience a montré que la perfusion de eKP-10 pendant 3 jours en début de phase folliculaire permettait de stimuler les gonadotropines, mais pendant seulement 24 heures. La dose de 3 mg/h induit toutefois une stimulation plus prolongée que la dose de 6 mg/h. Cette stimulation des gonadotropines est associée à une stimulation de l'œstradiol. En revanche, la dose de 6 mg/h est celle qui tend à avancer le pic péri-ovulatoire de LH. Enfin, les ponettes traitées ovulent 1 jour plus tôt que les ponettes témoins, ce qui correspond à une montée de la progestérone également 1 jour plus tôt. Ces derniers résultats sont particulièrement encourageants. Ils permettent en effet d'espérer que l'augmentation de la durée de la perfusion, en soutenant la sécrétion d'E2, pourra accentuer l'avancée et la synchronisation du pic de LH. Pour l'expérience suivante, qui a consisté à administrer le eKP-10 pendant toute la phase folliculaire, nous avons choisi la dose de 6mg/h.

Partie 3 : Essais de maîtrise du cycle

Expérience 1 : Essais de synchronisation des ovulations



*Perfusion de eKp-10 à la dose de 6 mg/h pendant toute la phase
folliculaire*

Tableau 3.3.1 : Partie 3 - Expérience 1 : Attribution des ponette dans chacun des 2 lots (poids des ponettes et taille du plus gros follicule présent lors de l'expérience).

lot	ponette	poids (kg)	moyenne poids (kg) \pm SD	taille follicule traité (mm)	moyennes taille follicule (mm) \pm SD
Témoin	W 544	414	361 \pm 43	19	19 \pm 1
	W 548	365		17	
	W 594	310		19	
	W 616	353		20	
eKP-10 6 mg/h	W 595	318	323 \pm 29	19	19 \pm 1
	W 586	365		20	
	W 588	307		18	
	W 617	300		18	

1. Introduction

Suite à l'expérience précédente, nous avons testé la perfusion de eKP-10 à la dose de 6 mg/h pendant une durée plus longue soit pendant toute la phase folliculaire, avec l'objectif d'obtenir une synchronisation des ovulations comme cela est le cas chez la brebis. Chez la brebis en inactivité, il est nécessaire d'administrer le KP-10 jusqu'au démarrage du pic pré-ovulatoire de LH afin d'induire un cycle complet (croissance folliculaire suivie d'un pic de LH et de l'ovulation) (Sebert *et al.*, 2010). Chez la jument, le démarrage du pic péri-ovulatoire de LH est extrêmement variable entre les individus et il n'est pas possible de le prévoir. C'est pourquoi nous avons décidé de perfuser le eKP-10 depuis le début de la phase folliculaire jusqu'à l'ovulation.

2. Matériel et méthodes

a) Animaux et lots

Le lendemain de l'injection de prostaglandine PGF₂ α de synthèse, les ponettes (âge \pm SD : 7,1 \pm 2,2 ans) qui présentaient des follicules en croissance dont le diamètre était inférieur à 20 mm ont été sélectionnées pour l'expérience. Les ponettes ont été attribuées aléatoirement dans un des 2 lots suivant :

- Lot témoin : n = 4 (W544, W548, W594, W616)
- Lot eKP-10 6 mg/h : n = 4 (W595, W586, W588, W617)

Les caractéristiques des ponettes affectées à chaque lot (poids et état ovarien) sont présentées dans le **tableau 3.3.1**.

b) Protocole expérimental

Les ponettes ont reçu une perfusion de sérum physiologique pendant 3 heures, puis une perfusion de sérum physiologique (lot témoin) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (lot eKP-10 6 mg/h), depuis le début de la phase folliculaire (le lendemain de l'injection de PG) jusqu'à ovulation.

Quatre prélèvements sanguins ont été réalisés avant la perfusion, puis +2, +4, +6, +8, +10 heures après le début de la perfusion, puis 3 prélèvements par jour (matin, midi et soir)

Tableau 3.3.2 : Partie 3 - Expérience 1 : Dose réellement reçue par les ponette, en fonction du volume administré pendant toute la durée de la perfusion, et du poids de chaque ponette.

Lot	Ponette	Poids (Kg)	Dose (mg/h)	Dose (µg/kg/h)
eKP-10 6 mg/h	W595	318	4,85	15,3
	W586	365	6,03	16,5
	W588	307	5,44	17,7
	W617	300	4,87	16,2

jusqu'à ovulation, et enfin un prélèvement par jour les 5 jours suivant l'ovulation, afin de doser les gonadotropines LH et FSH, ainsi que l'E2 et la P4.

Les ponettes ont été échographiées tous les jours jusqu'à ovulation afin de suivre la croissance folliculaire et de repérer l'ovulation au jour près.

c) Analyse statistique

Dans cette expérience les différents paramètres analysés sont :

- le nombre de jours entre le début de la perfusion et l'ovulation,
- la croissance moyenne du follicule dominant,
- la taille du follicule la veille de l'ovulation,
- l'AUC des concentrations plasmatiques de LH, FSH au cours des 10 premières heures de perfusion,
- l'AUC des concentrations plasmatiques de LH, FSH et E2 au cours des 72 premières heures de perfusion,
- l'AUC du pic péri-ovulatoire de LH,
- le début du pic péri-ovulatoire de LH,
- l'AUC du pic péri-ovulatoire d'E2,
- le début du pic pré-ovulatoire d'E2,
- le début de l'augmentation de la P4 après ovulation

Tous ces paramètres ont été comparés entre les lots 6 mg/h et témoins par un test exact non paramétrique de permutation pour données indépendantes.

3. Résultats

→ Dose réellement reçue

Les doses reçues par chaque ponette sont présentées dans le **tableau 3.3.2**.

Au cours de cette expérience, les doses reçues sont légèrement inférieures à la dose théorique pour 3 ponettes sur les 4. Néanmoins, pour chaque ponette, ces doses sont voisines

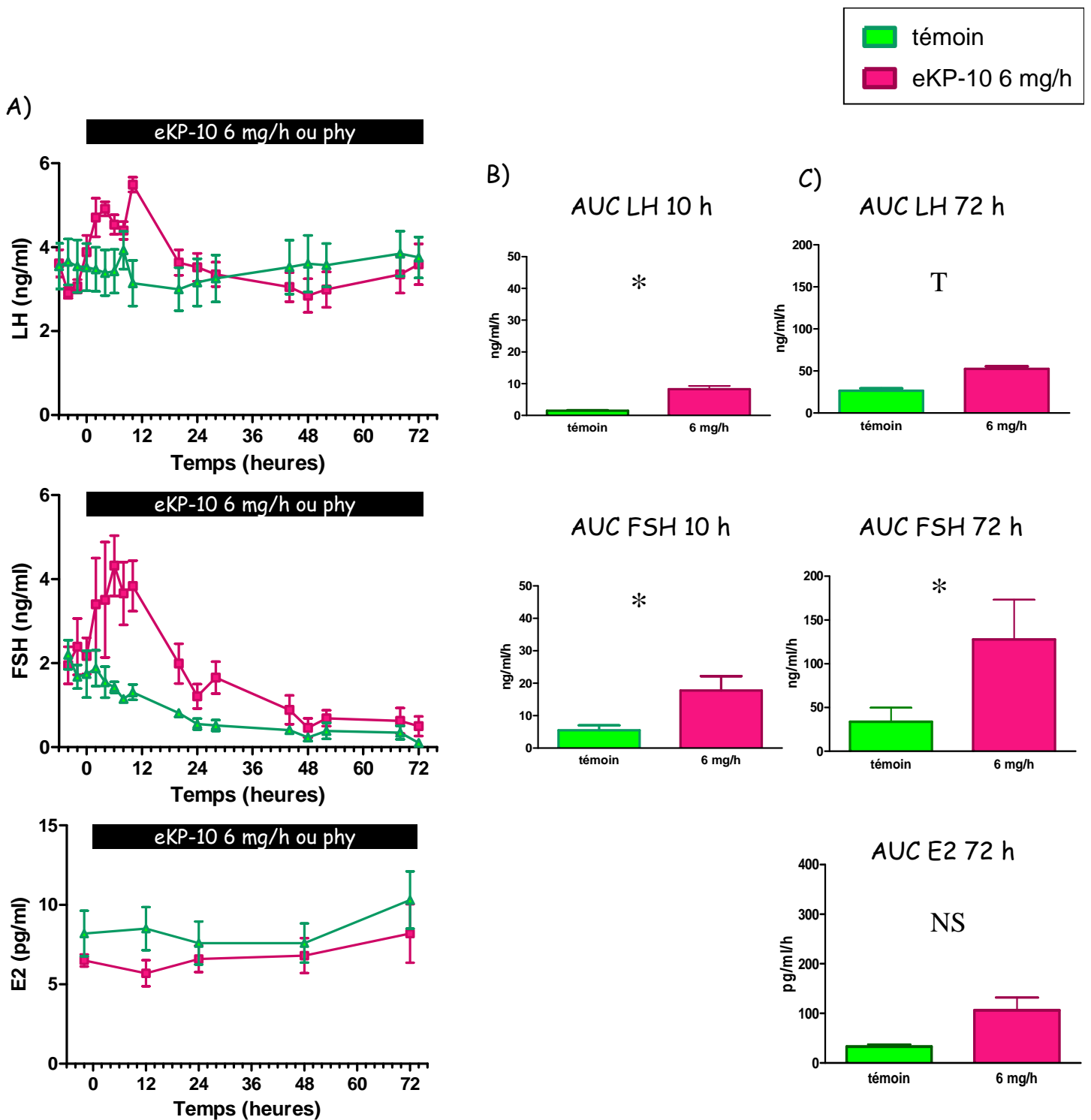


Figure 3.3.1 : Partie 3 - Expérience 1 : Concentrations plasmatiques de LH, FSH et E2 pendant les 72 premières heures de perfusion de sérum physiologique (témoins, en vert, n=4) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (eKP-10 6 mg/h, en rouge, n=4). (A) Moyenne ± SEM. Les rectangles représentent les durées de perfusion; (B) AUC moyennes (+ SEM) sur 10 h; (C) AUC moyennes (+ SEM) sur 72 h. NS : non significatif; T = tendance; * $P \leq 0,05$.

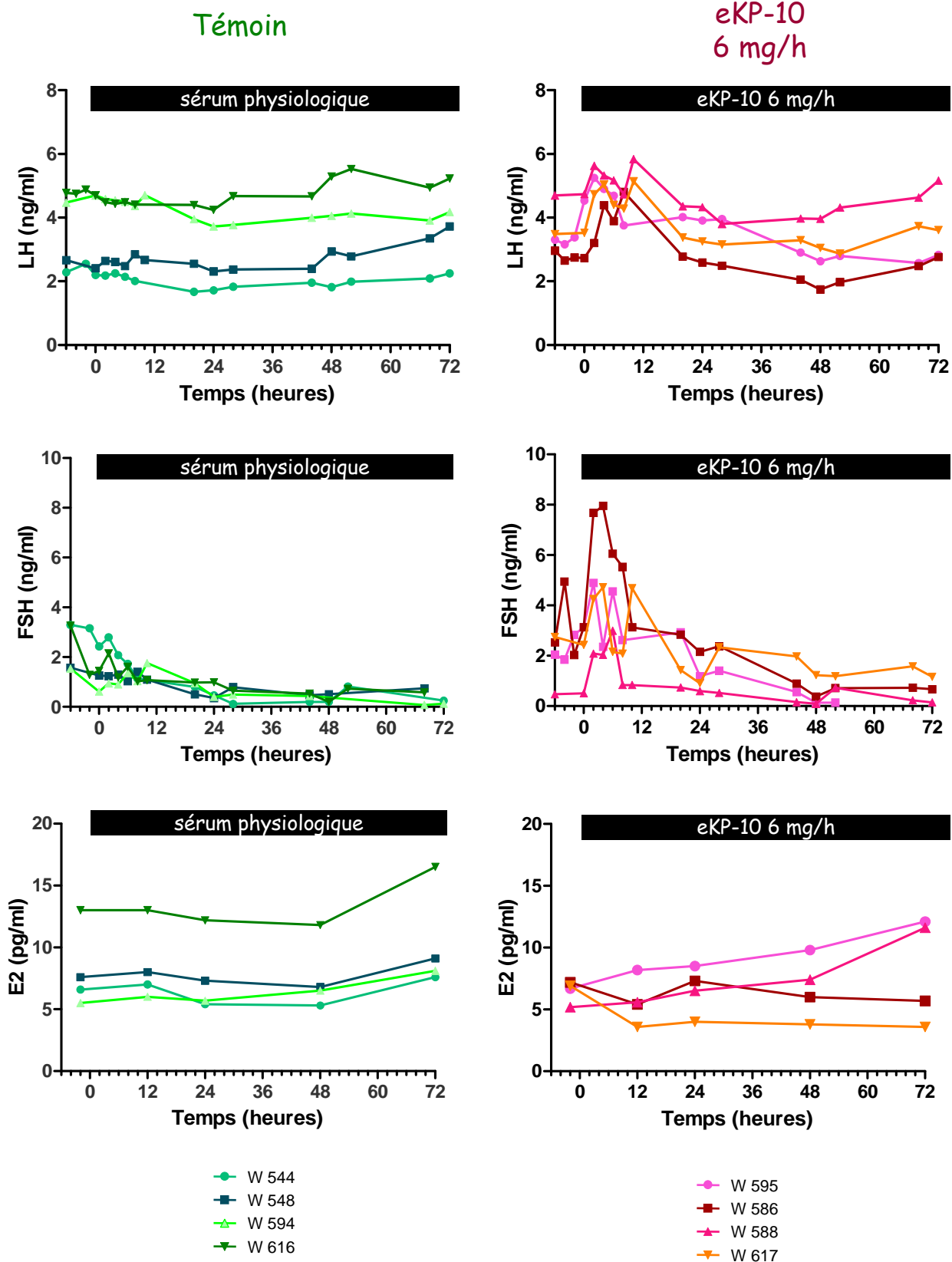


Figure 3.3.2 : Partie 3 - Expérience 1 : Profils plasmatiques individuels des concentrations plasmatiques de LH, FSH et E2 pendant les 72 premières heures de perfusion de sérum physiologique (témoins, en vert, n=4) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (eKP-10 6 mg/h, en rouge, n=4). Les rectangles représentent les durées de perfusion.

lorsqu'elles sont rapportées au poids de chaque ponette. En moyenne (\pm SEM) les ponettes ont reçu une perfusion de $5,3 (\pm 0,24)$ mg/h de eKP-10, soit $16,4 (\pm 0,4)$ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

→ Effet sur les paramètres endocriniens pendant les 72 premières heures de perfusion

Les effets de la perfusion de eKP-10 à la dose de 6 mg/h sur les concentrations plasmatiques de LH, de FSH et d'E2 pendant les 72 premières heures de perfusion, sont présentés sur les **figures 3.3.1.** et **3.3.2.**

Sur la LH

Les profils moyens montrent que la perfusion de eKP-10 induit une stimulation transitoire de la LH (**figure 3.3.1.A**).

L'AUC des concentrations plasmatiques de LH pendant les 10 premières heures de perfusion est supérieure dans le lot 6 mg/h comparée à celle du lot témoin (**figure 3.3.1.B**), alors que l'AUC des concentrations obtenues durant les 72 heures de perfusion tend à être supérieure dans le lot 6 mg/h comparée à celle du lot témoin ($P = 0,07$) (**figure 3.3.1.C**).

L'examen des profils individuels montre que la LH est stimulée transitoirement chez les 4 ponettes du lot 6 mg/h, avec un retour au niveau basal dans les 24 heures environ après le début de la perfusion (**figure 3.3.2**).

Sur la FSH

Les profils moyens montrent que la perfusion de eKP-10 induit une stimulation transitoire de la FSH (**figure 3.3.1.A**).

L'AUC des concentrations plasmatiques de FSH pendant les 10 premières heures de perfusion est supérieure dans le lot 6 mg/h comparée à celle du lot témoin (**figure 3.3.1.B**), de même que l'AUC obtenue durant les 72 heures de perfusion (**figure 3.3.1.C**).

L'examen des profils individuels montre que la FSH est stimulée transitoirement chez les 4 ponettes du lot 6 mg/h avec un retour au niveau basal dans les 12 heures environ après le début de la perfusion (**figure 3.3.2**).

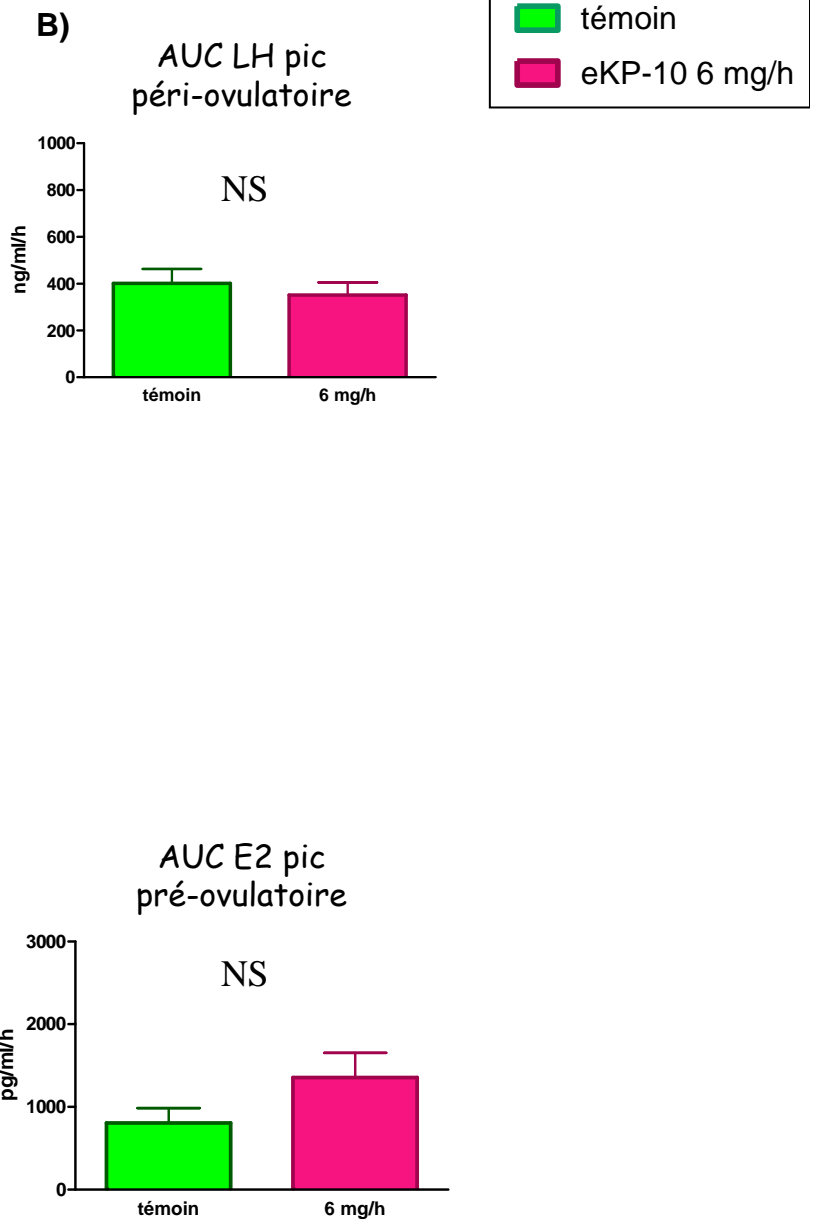
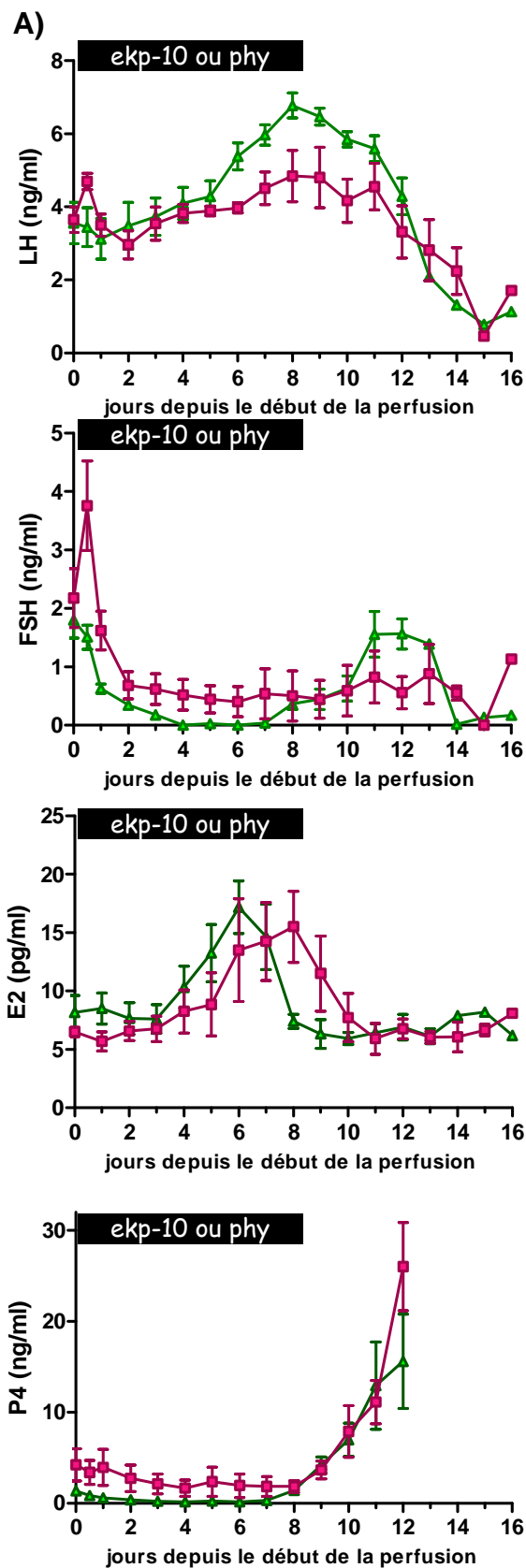


Figure 3.3.3: Partie 3 - Expérience 1 : Concentrations plasmatiques de LH, FSH, E2 et P4 pendant la perfusion de sérum physiologique (lot témoins, en vert, n = 4) ou eKP-10 à la dose de 6 mg/h (lot 6 mg/h, en rouge, n = 4) depuis le début de la phase folliculaire (J0) jusqu'à l'ovulation. (A) Profils moyens (\pm SEM). Les rectangles représentent les durées de perfusion. (B) AUC moyennes (+ SEM). NS : non significatif.

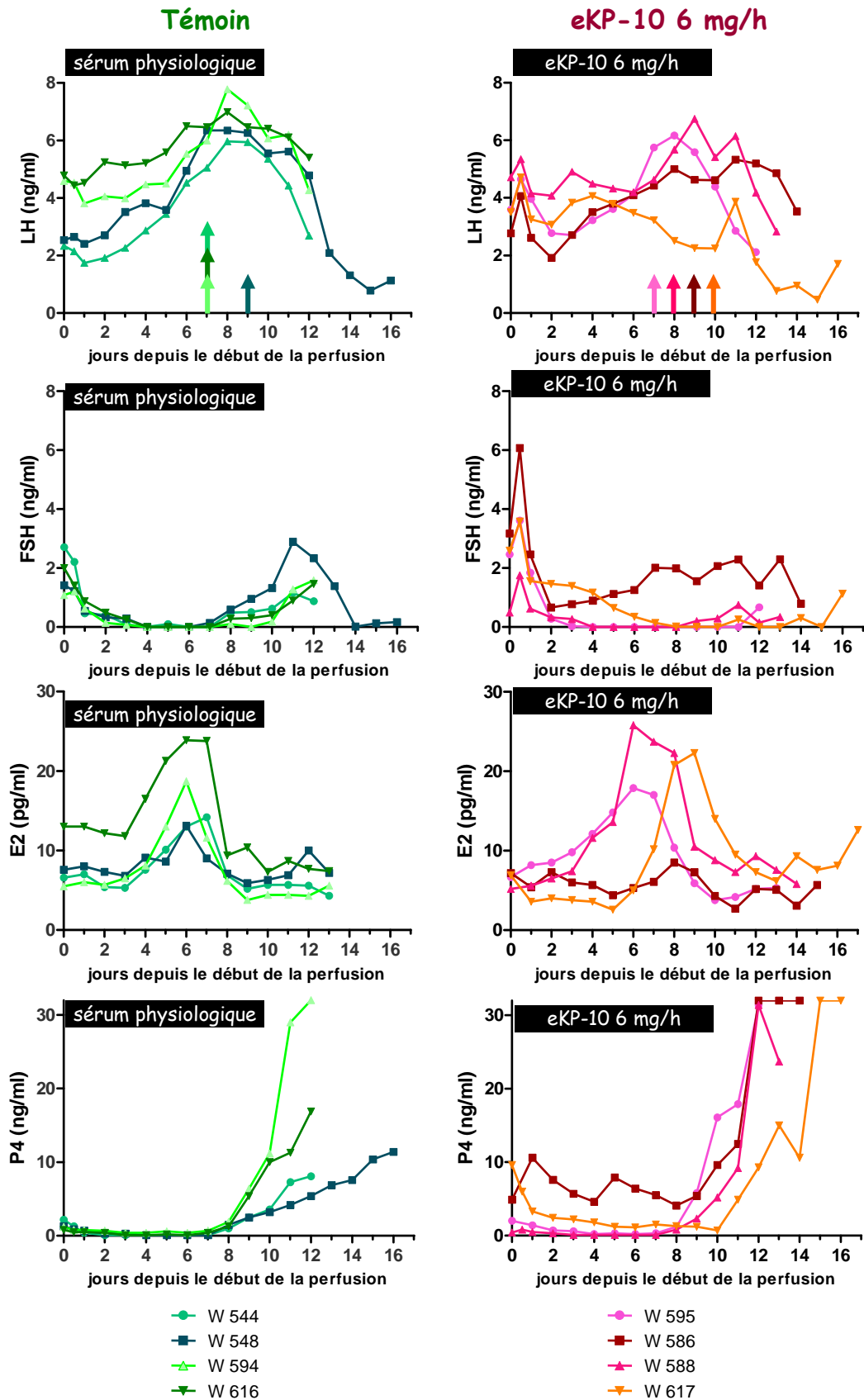


Figure 3.3.4 : Partie 3 - Expérience 1 : Profils plasmatiques individuels en LH, FSH, E2 et P4 des ponettes recevant une perfusion de sérum physiologique (lot témoin, en vert, n=4) ou une perfusion de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (lot 6 mg/h, en rouge, n=4) depuis le début de la phase folliculaire (J0) jusqu'à ovulation. Les rectangles indiquent les durées de perfusion. Les flèches différentes couleur indiquent l'ovulation pour chaque ponette.

Sur l'E2

Les profils moyens ne permettent pas de montrer un effet stimulant de la perfusion de eKP-10 sur la sécrétion de l'E2 (**figure 3.3.1.A**).

L'AUC de l'E2 sur 10 heures n'a pas été calculée étant donné que nous ne disposons que d'une seule valeur pendant cette période. L'AUC des concentrations plasmatiques d'E2 pendant les 72 premières heures de perfusion ne diffère pas entre les 2 lots (**figure 3.3.1.C**).

L'examen des profils individuels montre 2 types de réponses. Pour la moitié des ponettes du lot 6 mg/h, la perfusion entraîne une augmentation de l'E2 et pour l'autre moitié aucun effet (**figure 3.3.2**).

→ Effet sur les paramètres endocriniens pendant la suite de la perfusion

Les résultats sont présentés sur les **figures 3.3.3** et **3.3.4**

Le démarrage du pic péri-ovulatoire de la LH n'apparaît pas plus tôt chez les ponettes du lot 6 mg/h par rapport à celles du lot témoin, soit en moyenne (\pm SD) 7 ± 1 et 6 ± 2 jours après le début de la perfusion (**figure 3.3.3.A**).

Les AUCs du pic péri-ovulatoire de LH ne diffèrent pas entre les 2 lots ($P=0,30$) (**figure 3.3.3.B**).

L'examen des profils individuels montre (**figure 3.3.4**) :

- pour la ponette dont le follicule a lutéinisé (W617) une diminution des concentrations plasmatiques de LH pendant toute la durée de la perfusion dans le lot eKP-10 6 mg/h
- pour la ponette W588, le maintien de niveaux élevés de LH pendant toute la perfusion.

Les niveaux plasmatiques de FSH diminuent pour atteindre des valeurs minimales pendant pratiquement tout le cycle, jusqu'aux abords de l'ovulation où les concentrations semblent augmenter dans le lot témoin uniquement (**figure 3.3.3.A**).

L'examen des profils individuels montre que les niveaux plasmatiques de FSH diminuent plus progressivement chez la ponette W617 du lot eKP-10 6 mg/h, et sont élevés pendant toute la durée de l'expérience chez la ponette W586 du même lot (**figure 3.3.4**).

Le démarrage du pic d'E2 intervient en moyenne (\pm SD) $4,25 (\pm 0,44)$ et $5 (\pm 2)$ jours après le début de la perfusion dans les lots 6 mg/h et témoin respectivement, et ne diffère pas entre les 2 lots (**figure 3.3.3.A**).

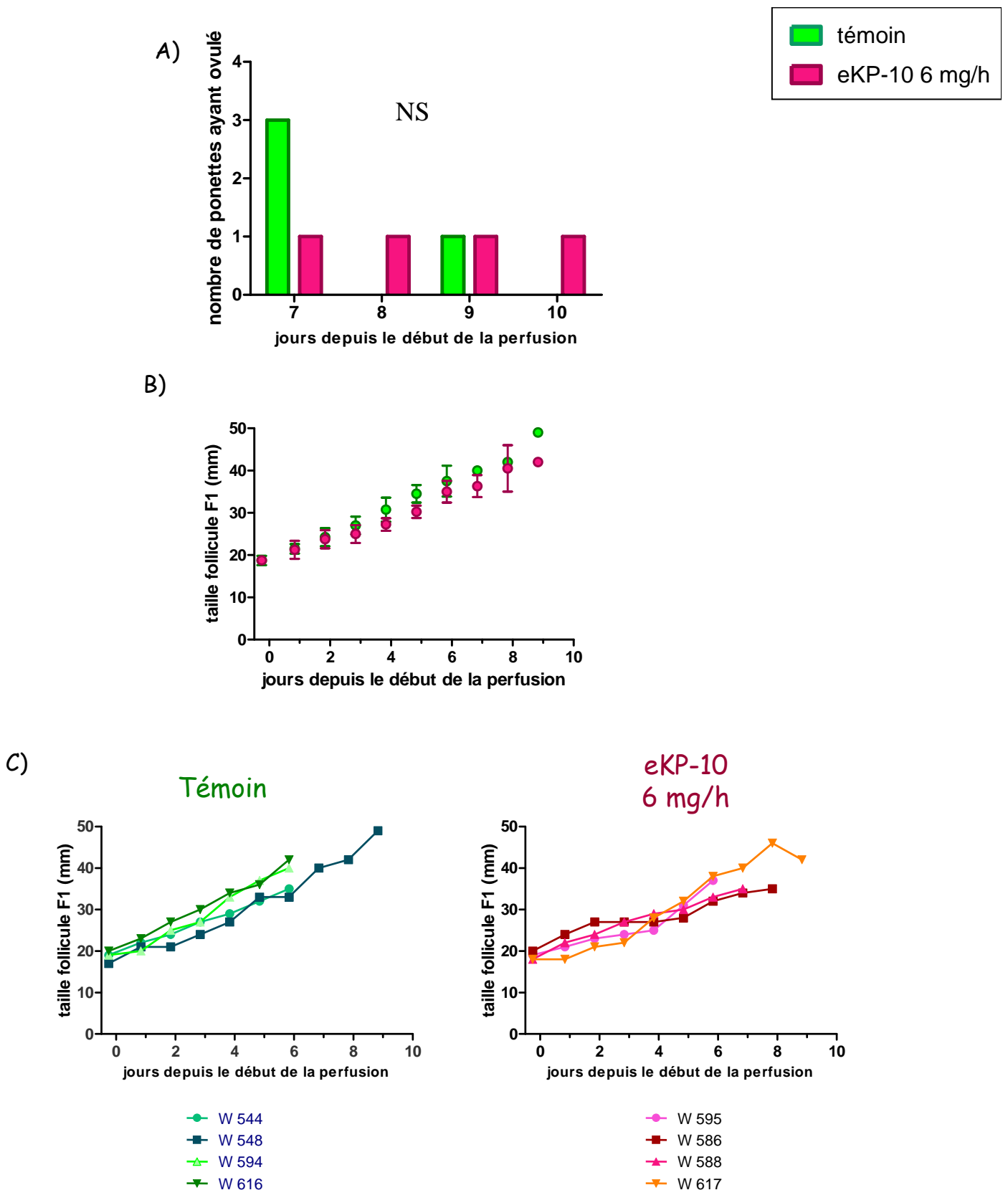


Figure 3.3.5 : Partie 3 - Expérience 1 : (A) Distribution des ovulations après le début de la perfusion (1 jour après l'injection de prostaglandines). Evolution de la taille du plus gros follicule depuis le début de la perfusion (début de phase folliculaire) jusqu'à ovulation, chez les ponettes perfusées avec du sérum physiologique (témoin, en vert, n=4) ou avec le eKP-10 à la dose de 6 mg/h (eKP-10 6 mg/h, en rouge, n=4) (B) Moyennes (± SD); (C) Profils individuels. NS : non significatif.

L'AUC du pic pré-ovulatoire de l'E2 ne diffère pas significativement entre les lots (**figure 3.3.3.B**).

L'examen des profils individuels montre que, dans le lot eKP-10 6 mg/h, 2 ponettes présentent une augmentation des niveaux plasmatiques d'E2 dès le jour de la perfusion (W595 et W588), 1 ponette (W617) présente une augmentation 6 jours après, et 1 ponette (W586) a des niveaux d'E2 bas pendant toute la durée de l'expérience. Dans le lot témoin, l'évolution des concentrations plasmatiques d'E2 est homogène, avec une augmentation environ 4 jours après le début de la perfusion de sérum physiologique (**figure 3.3.4**).

Les niveaux plasmatiques de la P4 au cours du cycle ne diffèrent pas significativement entre les 2 lots (**figure 3.3.3.A**).

L'examen des profils individuels montre que, dans le lot eKP-10 6 mg/h, 2 ponettes conservent un taux plasmatique de P4 élevé pendant la phase folliculaire (P4 supérieure à 1 ng/ml pour W617 et supérieure à 4 ng/ml pour W586). Pour les 2 autres ponettes de ce lot, et pour les 4 ponettes du lot témoin, les taux de P4 restent inférieurs à 1 ng/ml jusqu'à l'ovulation. Enfin, chez toutes les ponettes, les concentrations plasmatiques de P4 augmentent après ovulation, et le début de cette augmentation ne diffère pas entre les 2 lots (**figure 3.3.4**).

→ Effet sur l'ovulation et sur la croissance folliculaire

Les résultats sont présentés sur la **figure 3.3.5**.

L'analyse statistique ne révèle pas de différence significative entre les lots en ce qui concerne la distribution des ovulations (**figure 3.3.5.A**). Les ovulations ne sont ni avancées, ni synchronisées dans le lot 6 mg/h par rapport au lot témoin. Les ponettes ont ovulé en moyenne (\pm SD) 7,5 (\pm 0,5) et 8,3 (\pm 0,5) jours après le début de la perfusion dans les lots témoin et 6 mg/h respectivement.

La croissance folliculaire est plus lente dans le lot 6 mg/h ($2,2 \pm 0,3$ mm par jour) comparée au lot témoin ($2,9 \pm 0,4$ mm par jour), mais la taille du follicule la veille de l'ovulation n'est pas différente entre les 2 lots (42 ± 5 et 37 ± 3 mm dans les lots témoin et 6 mg/h respectivement) ($P = 0,18$) (**figure 3.3.5.B et C**). En fin de la phase folliculaire, une ponette du lot témoin (W548) et une ponette du lot 6 mg/h (W617) ont présenté un follicule lutéinisé.

Ces ponettes ont été considérées comme ayant ovulé lorsque des points blancs étaient visibles à l'intérieur du follicule, ce qui correspond au début de sécrétion de progestérone. Ceci a été vérifié par dosage de la P4.

4. Discussion

Comme dans l'expérience précédente, la perfusion de eKP-10 pendant toute la phase folliculaire induit une stimulation transitoire des gonadotropines. Cependant, aucun effet stimulant sur le cycle n'est visible.

Doses réellement administrées :

Les doses de eKP-10 reçues par les ponettes sont légèrement inférieures aux doses théoriques, mais comparables à celles de l'expérience précédente (4,95 mg/h *versus* 5,3 mg/h). Lorsque les doses sont rapportées au poids de chaque ponette, celles-ci sont similaires.

Effets sur les paramètres endocriniens au cours des 72 premières heures :

Comme dans l'expérience précédente (6mg/h pendant 72 heures), la stimulation des gonadotropines est transitoire, avec toutefois quelques différences.

Pour la LH, contrairement à l'expérience précédente, l'AUC sur 10 h est supérieure dans le lot 6 mg/h comparée au lot témoin. En revanche, l'AUC sur 72 h tend seulement à être supérieure dans le lot 6 mg/h comparée au lot témoin, comme dans l'expérience précédente.

Pour la FSH, contrairement à l'expérience précédente, l'AUC sur 10 h et sur 72 h est supérieure dans le lot 6 mg/h comparée au lot témoin. Ainsi, la stimulation des gonadotropines au cours de 72 premières heures a été au moins équivalente à celle de l'expérience précédente.

Cependant contrairement à l'expérience précédente, la stimulation de l'œstradiol n'est pas significative dans lot 6 mg/h.

L'étude des profils individuels apporte quelques éléments de réponse. Dans le lot traité, les 2 ponettes (W586 et W617) qui conservent des niveaux de progestérone élevés pendant toute la phase folliculaire n'ont probablement pas répondu à l'injection de PGF2 α . Cette absence de lutéolyse suite à une injection unique de PGF2 α a déjà été rapportée dans la littérature (Glazar *et al.*, 2004). Pour la ponette W586, un pic péri-ovulatoire de LH et une ovulation sont

observés. Pour la ponette W617, les concentrations plasmatiques de LH chutent fortement, il n'y a pas de pic péri-ovulatoire et le follicule pré-ovulatoire lutéinise. Du fait des taux élevés de progestérone, ces 2 ponettes ne montrent pas de stimulation de l'oestradiol, ce qui contribue au fait que dans le lot traité, la stimulation de l'oestradiol n'est pas significative. Dans la mesure où une ponette du lot témoin (W548) a également présenté un follicule lutéinisé, ce phénomène ne peut pas être attribué au eKP-10. L'apparition de ce type de follicules est observée dans 5 à 8 % des cycles (McCue, 2002). Néanmoins pour ces 2 ponettes traitées, les profils endocriniens ne sont pas exploitables pour la discussion. Pour les 2 autres ponettes du lot traité (W595 et W588), l'E2 augmente depuis le début de la perfusion comme dans l'expérience précédente, et pour une (W588), la LH reste haute depuis la fin de la perfusion jusqu'au pic péri-ovulatoire de LH. Toutefois, l'ovulation n'est pas avancée pour ces deux animaux par rapport aux animaux témoins.

La perfusion de eKP-10 à la dose de 6 mg/h pendant toute la phase folliculaire ne semble pas capable d'avancer le début du pic de LH chez cette espèce.

Cette expérience apporte néanmoins des informations permettant de mieux cerner les hypothèses faites lors de l'expérience précédente concernant la stimulation transitoire de la LH :

- L'hypothèse de désensibilisation des récepteurs au eKP-10 nous paraît désormais peu plausible puisque, malgré la perfusion continue de eKP-10, les niveaux plasmatiques de LH ré-augmentent chez 3 ponettes sur 4 lors du pic péri-ovulatoire. Chez les souris GPR54^{-/-}, qui sont infertiles, une administration de KP ou d'un agoniste n'induit pas de stimulation des gonadotropines (Lapatto *et al.*, 2007). Cependant, il reste à définir si cette ré-augmentation est due ou non au KP.
- Le rôle du rétrocontrôle négatif de l'E2 pendant les 72 premières heures n'apparaît pas majeur car dans cette expérience, 2 ponettes traitées ne présentent pas d'augmentation d'E2 en début de perfusion et la stimulation de la LH est également transitoire.
- Les 2 autres hypothèses relatives au stock hypothalamique en GnRH et au contenu hypophysaire en LH, qui seraient insuffisants pour maintenir une sécrétion de LH prolongée, apparaissent ainsi les plus vraisemblables.

Effets sur les paramètres endocriniens, la croissance folliculaire et les ovulations pendant la suite de la perfusion :

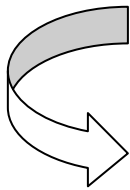
Malgré une stimulation initiale des gonadotropines comparable à celle observée au cours de l'expérience précédente, les effets sur l'avancée du pic de LH, des ovulations et de la sécrétion de progestérone ne sont pas reproduits. Au contraire, la croissance folliculaire apparaît ralentie chez les ponettes recevant le eKP-10. Ceci suggère que la prolongation de la perfusion de eKP-10 au delà de 72 heures activerait un facteur modérateur qui régulerait le démarrage du pic de LH. Chez la brebis en anœstrus, il est possible que cette régulation n'ait pas été activée du fait de la courte durée de la phase folliculaire, car le pic de LH initié dès 22 heures après le début de la perfusion peut induire les ovulations (Caraty *et al.*, 2007). Chez la brebis, ce pic de LH est produit par le rétrocontrôle positif de l'œstradiol. Or chez la jument des travaux récents suggèrent que le rétrocontrôle de l'œstadiol est négatif pendant tout le cycle (Ginther *et al.*, 2007). Les auteurs proposent que ce rétrocontrôle serait à l'origine de la longueur de la phase folliculaire chez la jument, nécessaire pour permettre à un follicule de croître progressivement à la vitesse de 3 mm par jour, pour atteindre la maturité au moment de l'ovulation, à l'issue d'une phase folliculaire de plus de 10 jours. La chute brutale de l'œstradiol dès le lendemain du pic serait ainsi le signal responsable de la décharge de LH qui va provoquer l'ovulation. L'hypothèse de l'effet modérateur de l'œstradiol dans notre expérience apparaît valable si ce rétrocontrôle s'exerce essentiellement au niveau hypophysaire. Il aurait donc été intéressant de mesurer dans nos conditions expérimentales la sécrétion de GnRH pour savoir si elle restait maintenue pendant toute la durée de la perfusion.

A l'issue de cette expérience, nous devons constater qu'un traitement long de eKP-10 ne permet pas de modifier de façon significative la dynamique d'un cycle chez la jument.

Dans la mesure où le traitement de moyenne durée (3 jours) permet une stimulation répétable de la LH, sans mettre en jeu à priori de facteur modérateur, nous avons choisi de l'appliquer au stade pré-ovulatoire dans un essai d'induction d'ovulation.

La décharge de LH provoquée par le eKP-10 peut-elle induire l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire ?

Expérience 2 : Essai d'induction de l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire



Perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h pendant 72 heures au stade pré-ovulatoire

1. Introduction-Objectifs

Nous abordons dans cette expérience la deuxième application potentielle du eKP-10 chez la jument cyclique. En effet, ce qui est répétable dans toutes les expériences de perfusion de 72 heures ou plus, c'est qu'une perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h ou de 6 mg/h en début de phase folliculaire stimule la LH à des taux plasmatiques proches des taux péri-ovulatoires, pendant une dizaine d'heures environ. Avec les perfusions de eKP-10 de courte durée, nous avons vu qu'une perfusion pendant 6 heures stimulait plus efficacement la LH en début de phase folliculaire, mais une stimulation de moindre amplitude était également observée en fin de phase folliculaire. Parmi les hypothèses émises pour expliquer cette stimulation transitoire, nous avons proposé que le contenu hypothalamique en GnRH et/ou que le contenu hypophysaire en LH puissent être limitants pour une stimulation plus prolongée de la sécrétion de LH. Or, la fin de la phase folliculaire est le stade où l'hypophyse présente la plus forte réponse à une injection de la GnRH par voie i.v. (Foster *et al.*, 1979). De plus, chez des juments traitées avec un antagoniste de la GnRH au stade pré-ovulatoire, une augmentation de la LH plasmatique à des niveaux équivalents au quart du pic endogène est suffisante pour induire l'ovulation du follicule pré-ovulatoire (Briant *et al.*, 2003). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une augmentation de la LH pendant une dizaine d'heures à des niveaux proches de ceux d'un pic péri-ovulatoire pourrait induire l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire.

Dans le troupeau expérimental de l'INRA de Nouzilly, et sur un total de 115 cycles, l'intervalle de temps entre l'injection de prostaglandines et l'apparition d'un follicule pré-ovulatoire est en moyenne (\pm SD) de 7 (\pm 2,14) jours (Duchamp, communication personnelle). De plus, il est bien établi que l'intervalle de temps entre l'injection de prostaglandines et l'ovulation se situe aux alentours de 10 jours (7 à 12 jours selon Loy et collaborateurs (Loy *et al.*, 1979)). Nous avons donc estimé le délai moyen entre l'apparition d'un follicule pré-ovulatoire et l'ovulation à approximativement 3 jours pour des animaux non traités.

Les traitements d'induction d'ovulation utilisant la LH permettent de raccourcir ce délai à 36 heures en moyenne, et ceux utilisant la GnRH à 40 heures. Nous avons donc choisi de perfuser le eKP-10 pendant 3 jours, estimant que cette durée serait suffisante pour exercer un effet stimulant sur la LH et l'ovulation. L'objectif était également de pouvoir comparer les

Tableau 3.3.3 : Partie 3 - Expérience 2 : Détails physiologiques des ponette de chaque lot (poids des ponettes et taille du plus gros follicule présent lors de l'expérience).

lot	ponette	poids (Kg)	Moyenne poids \pm SD	taille follicule traité (mm)	Moyennes taille follicule \pm SD
Témoin	W506	317	337 \pm 63	32	33 \pm 1
	W536	390		32	
	W570	293		32	
	W594	309		35	
	W596	399		32	
	W601	315		34	
	W604	430		33	
	W622	241		32	
eKP-10 3 mg/h	W384	294	384 \pm 54	33	34 \pm 1
	W464	415		36	
	W544	440		36	
	W549	405		34	
	W578	428		33	
	W585	335		35	
	W620	338		34	
	W627	418		34	

effets obtenus avec ceux de l'expérience de perfusion de eKP-10 pendant 3 jours en début de phase folliculaire.

Nous avons choisi la dose de 3 mg/h car cette dose permet une stimulation plus prolongée de la LH lors des premières heures de perfusion en début de phase folliculaire.

2. Matériel et méthodes

Etant donné les difficultés liées à la surveillance des ponettes au cours des protocoles de perfusion, nous avons traité 8 ponettes avec le eKP-10, et suivi la croissance folliculaire et l'ovulation de 8 autres ponettes afin d'avoir des témoins contemporains de l'expérience. Ces ponettes témoins n'ont pas reçu de perfusion de sérum physiologique, l'ovulation n'a pas été induite par un autre traitement pharmacologique, et elles n'ont pas été prélevées pour les dosages hormonaux (conditions naturelles).

a) Animaux et lots

Après injection de prostaglandine de synthèse $\text{PGF}_{2\alpha}$, la croissance folliculaire a été suivie par échographie, jusqu'à la détection d'un follicule de taille pré-ovulatoire de 32 à 36 mm, et d'un utérus œdémateux. Les ponettes (âge \pm SD : $9,4 \pm 3,8$ ans) ont ensuite été distribuées dans un des 2 lots suivants :

- Lot témoin : $n = 8$
- Lot eKP-10 3 mg/h : $n = 8$

Il est pratiquement impossible, compte tenu de la taille du troupeau disponible, d'obtenir 16 ponettes ayant le même jour un follicule de taille 32 à 36 mm, et présentant les 2 veines jugulaires en « bon état » c'est-à-dire permettant la pose d'un cathéter d'un côté et la réalisation de prélèvement avec un vacutainer® de l'autre. L'affectation dans les 2 lots n'a donc pas été aléatoire. Les ponettes ont été placées en priorité dans le lot 3 mg/h au fur et à mesure qu'une ponette répondait à nos critères et jusqu'à ce que le nombre voulu soit atteint, puis le lot témoin a été complété. Les 16 ponettes ont été sélectionnées en 3 jours.

Les caractéristiques des ponettes affectées à chaque lot (poids et état ovarien) sont présentées dans le **tableau 3.3.3**.

Tableau 3.3.4 : Partie 3 - Expérience 2 : Dose réellement reçue par les ponette, en fonction du volume administré pendant toute la durée de la perfusion, et du poids de chaque ponette.

Lot	Ponette	Poids (Kg)	Dose (mg/h)	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$)
eKP-10 3 mg/h	W384	294	3,12	10,61
	W464	415	2,82	6,79
	W544	440	2,93	6,65
	W549	405	2,64	6,52
	W578	428	2,88	6,72
	W585	335	2,70	7,99
	W620	338	2,61	7,80
	W627	418	2,84	6,79

b) Protocole expérimental

Les 8 ponettes du lot 3 mg/h ont reçu une perfusion de sérum physiologique pendant 3 heures, puis une perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h pendant 72 heures.

Quatre prélèvements sanguins ont été effectués avant le début de la perfusion, puis un prélèvement toutes les 2 heures pendant les 10 premières heures de perfusion, 4 fois par jour pendant le reste des 72 heures de perfusion, puis 1 fois par jour les 5 jours suivant l'ovulation. La LH et l'E2 plasmatique ont été dosés.

Les 8 ponettes du lot eKP-10 3 mg/h ainsi que les 8 ponettes du lot témoin ont été échographiées bi-quotidiennement, à 12 heures d'intervalle, afin de suivre précisément la croissance folliculaire et les ovulations.

Pour les ponettes du lot 3 mg/h, le système de perfusion a été débranché dès que l'ovulation a été constatée. Les ponettes n'ayant pas ovulé pendant la perfusion ont été débranchées après 72 heures de perfusion.

c) Analyse statistique

La croissance moyenne du follicule dominant, la taille des follicules à l'ovulation et la distribution des ovulations ont été comparées entre les lots eKP-10 3 mg/h et témoins par un test exact non paramétrique de permutation pour données indépendantes.

3. Résultats

→ Doses réellement reçues

Les doses reçues par chaque ponette sont représentées dans le **tableau 3.3.4**.

En moyenne (\pm SEM) les ponettes ont reçu une perfusion de 2,82 (\pm 0,06) mg/h de eKP-10, soit une concentration moyenne (\pm SEM) de 7,48 (\pm 0,46) $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$.

→ Effet sur la croissance folliculaire et sur l'ovulation :

L'évolution de la croissance folliculaire est présentée sur la **figure 3.3.6**.

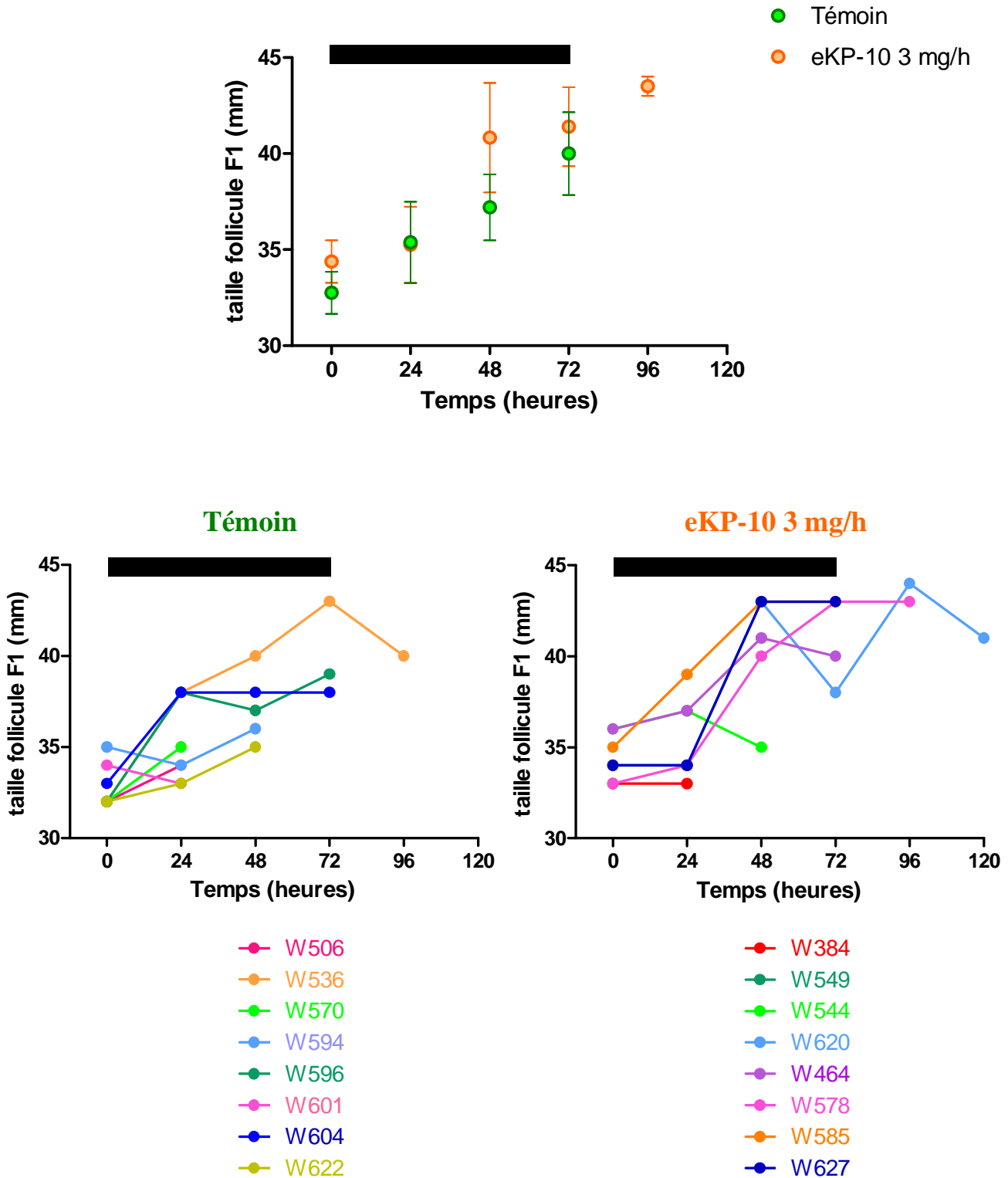


Figure 3.3.6 : Partie 3 - Expérience 2 : Evolution de la croissance du follicule pré-ovulatoire, depuis sa détection (T0) jusqu'à l'ovulation, chez les ponettes du lot témoin (n=8) et celles du lot eKP-10 3 mg/h n=8, recevant une perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h pendant 72 heures), les ovulations sont présentées par tranches de 24 heures, (A) Moyenne \pm SD, (B) Profils individuels. Les rectangles représentent les durées de perfusion.

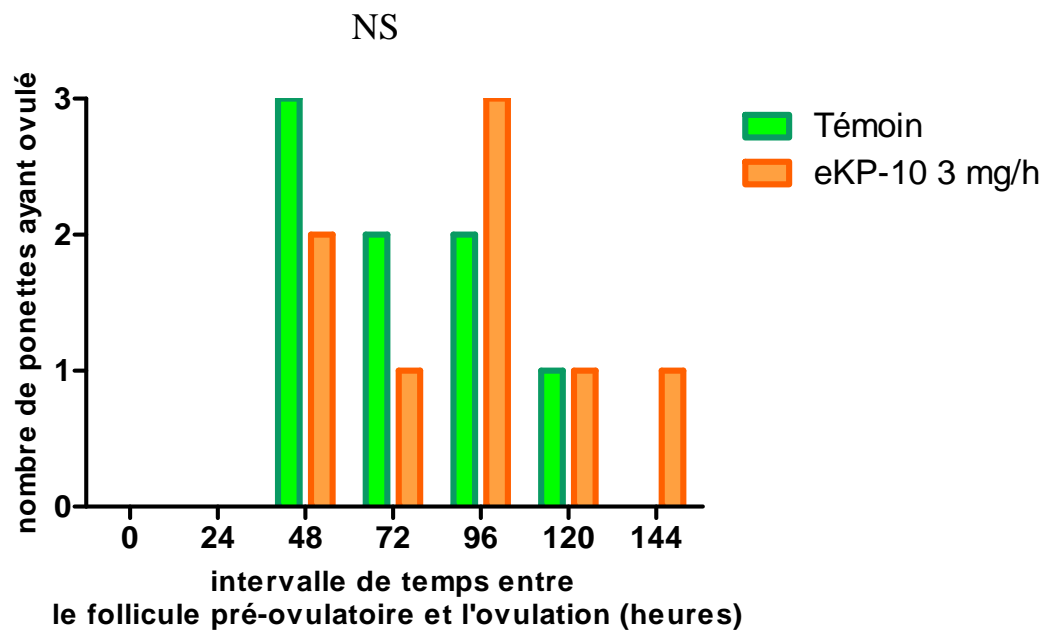


Figure 3.3.7 : Partie 3 - Expérience 2 : Distribution des ovulations dans le lot témoin (en vert, n=8) et le lot eKP-10 3 mg/h (en orange, n=8). Les ovulations ont été regroupées par tranches de 24 heures. NS : non significatif.

La croissance folliculaire semble plus linéaire chez les ponettes du lot témoin comparée à celles du lot eKP-10 3 mg/h. La croissance moyenne du follicule pré-ovulatoire entre le début du traitement et l'ovulation ne diffère pas entre les 2 lots ($P = 0,46$). Cependant, la croissance moyenne (\pm SD) de ce follicule est ralentie entre le premier et le deuxième jour de traitement dans le lot traité $0,87 (\pm 1,3)$ mm par rapport au lot témoin $2,87 (\pm 2,5)$ mm ($P = 0,04$).

Il y a une tendance à ce que les ponettes du lot eKP-10 3 mg/h ovulent en moyenne (\pm SD) d'un follicule plus gros ($43,5 \pm 0,5$ mm) comparé à celles du lot témoin ($40 \pm 2,1$ mm) ($P = 0,08$).

La distribution des ovulations est présentée sur la **figure 3.3.7**.

Les ponettes ont été échographiées bi-quotidiennement, pour permettre une estimation plus précise de l'ovulation dans les 72 heures après détection du follicule pré-ovulatoire. Or la majorité des ponettes du lot 3 mg/h a ovulé après les 72 heures de perfusion. Pour simplifier l'analyse des résultats, nous n'avons tenu compte que de l'échographie du matin.

Les ponettes du lot témoin et du lot 3 mg/h ont ovulé en moyenne (\pm SD) $3,13 (\pm 1,13)$ jours et $3,75 (\pm 1,39)$ jours respectivement, après la détection du follicule pré-ovulatoire. Le délai entre la détection du follicule pré-ovulatoire et l'ovulation ne diffère pas significativement entre les deux lots ($P = 0,22$). Dans le lot témoin, 5 ponettes sur 8 ont ovulé dans les 72 heures après la détection du follicule pré-ovulatoire, contre 3 ponettes sur 8 dans le lot 3 mg/h, ce qui n'est pas différent.

→ Effets sur les paramètres endocriniens pour les ponettes ayant reçu la perfusion de eKP-10 (3 mg/h) :

Pour l'étude des profils plasmatiques de la LH et de l'œstradiol, nous ne présentons pas de profils moyens car ils ne seraient pas représentatifs du lot compte tenu du fait que 3 types de réponses différentes sont observées. Chaque type de réponse correspond à l'association d'un profil type de LH, d'un profil type d'œstradiol et d'un délai défini entre le début de la perfusion et l'ovulation (ovulation pendant ou après la perfusion). Nous présentons donc les profils individuels pour chaque type de réponse sur les **figures 3.3.8., 3.3.9. et 3.3.10.**

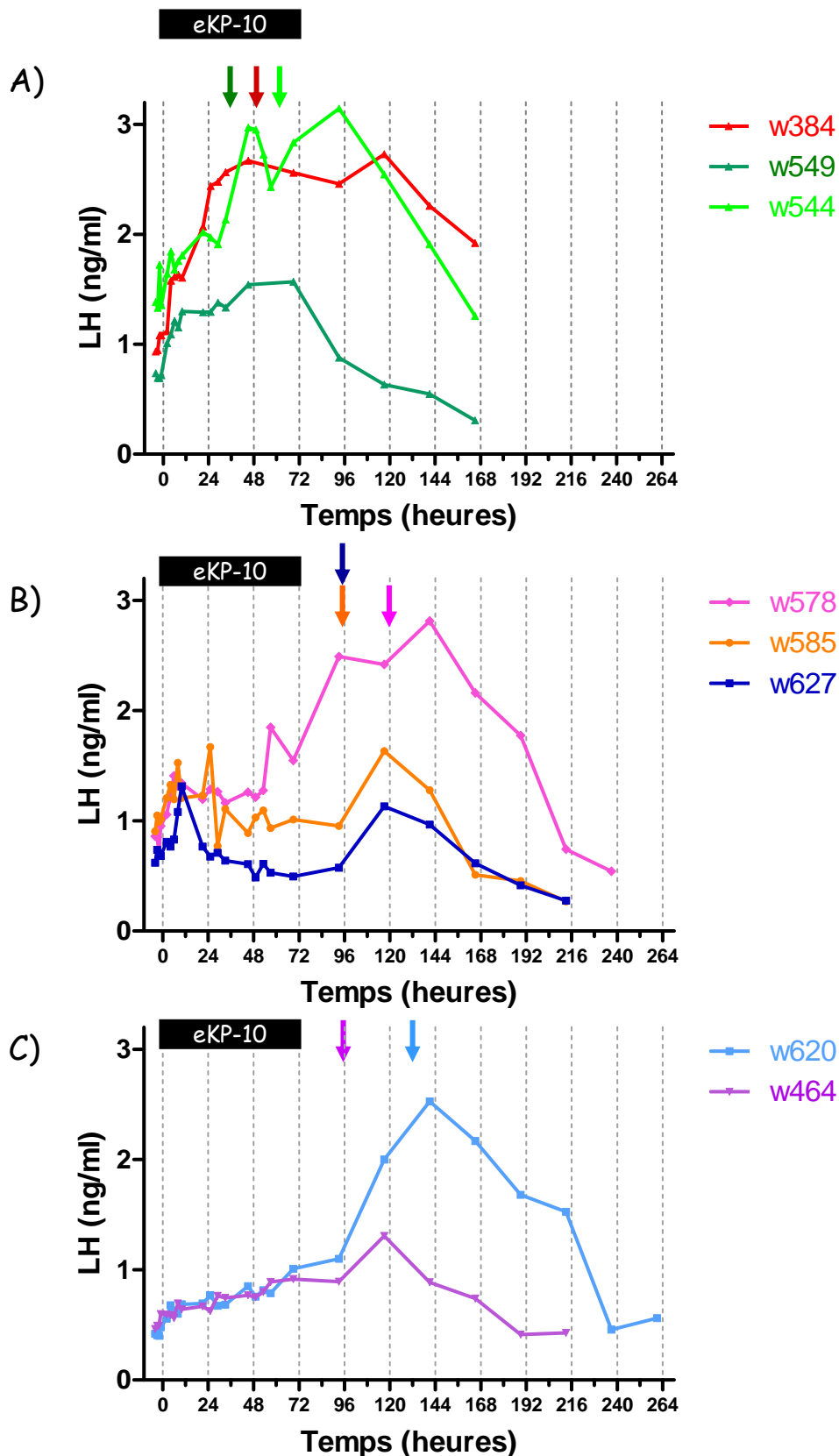


Figure 3.3.8 : Partie 3 - Expérience 2 : Profils individuels de la LH plasmatique pendant et après la perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h pendant 72 heures. (A) les 3 ponettes ayant ovulé pendant la perfusion; (B) les 3 ponettes ayant ovulé après la perfusion, et ayant présenté une stimulation transitoire de LH pendant la perfusion; (C) les 2 ponettes ayant ovulé après la perfusion, et n'ayant pas présenté de stimulation de LH pendant la perfusion. Les flèches de couleur représentent le moment de l'ovulation pour chaque ponette. Les rectangles représentent les durées de perfusion.

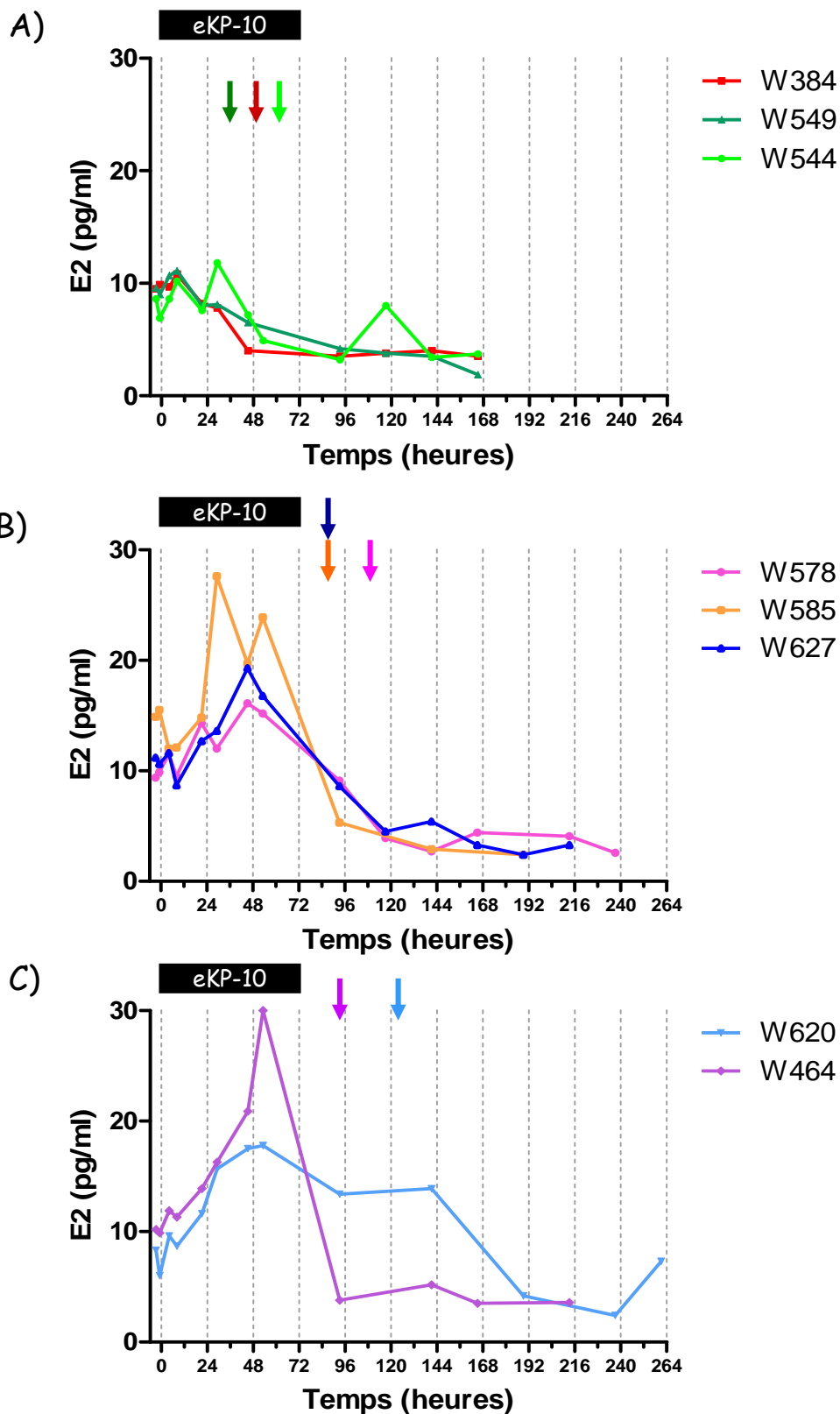


Figure 3.3.9 : Partie 3 - Expérience 2 : Profils individuels de l'E2 plasmatique pendant et après la perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h pendant 72 heures. (A) les 3 ponettes ayant ovulé pendant la perfusion; (B) les 3 ponettes ayant ovulé après la perfusion, et ayant présenté une stimulation transitoire de LH pendant la perfusion; (C) les 2 ponettes ayant ovulé après la perfusion, et n'ayant pas présenté de stimulation de LH pendant la perfusion. Les flèches de couleur représentent le moment de l'ovulation pour chaque ponette. Les rectangles indiquent les durées de perfusion.

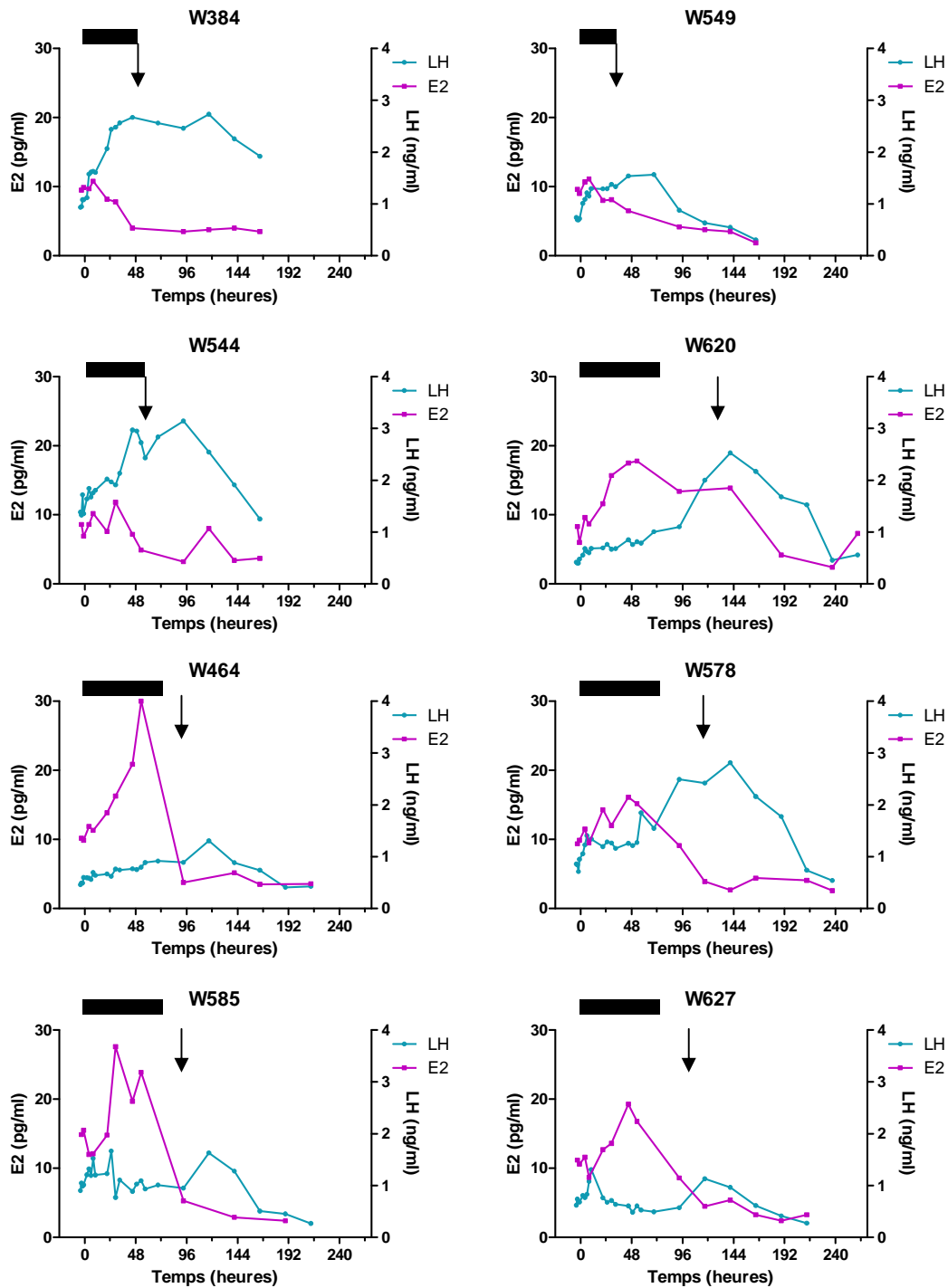


Figure 3.3.10 : Partie 3 - Expérience 2 : Profils individuels plasmatiques de la LH et de l'E2 chez les ponettes ayant reçu une perfusion de eKP-10. Les rectangles représentent les durées de perfusion et la flèche représente l'ovulation.

- Pour les 3 ponettes (W384, W549, W544) qui ont ovulé pendant les 72 heures de perfusion de eKP-10 (**figures 3.3.8.A et 3.3.9.A**) : dès le début de la perfusion, les niveaux de LH sont déjà élevés et atteignent leur maximum avant la fin de la perfusion. L'analyse des profils d'œstradiol correspondants montre des niveaux faibles en début de perfusion (environ 10 pg/ml) qui diminuent pendant la perfusion pour atteindre le niveau de base (environ 3 pg/ml) après l'ovulation.
- Pour 3 (W578, W585, W627) des ponettes ayant ovulé après l'arrêt de la perfusion (**figures 3.3.8.B et 3.3.9.B**) : la perfusion de eKP-10 produit une stimulation transitoire de la LH pendant environ 24 heures. En parallèle, dès le début de la perfusion, les niveaux d'œstradiol diminuent pendant quelques heures avant l'amorce du pic pré-ovulatoire qui a lieu pendant la perfusion et atteint des concentrations de 15 à 30 pg/ml. Le pic péri-ovulatoire de LH commence entre 0 et 24 heures après la fin de la perfusion et les ovulations sont observées entre 24 et 48 heures après la fin de la perfusion quand l'œstradiol rejoint son niveau de base. De façon intéressante, pour 2 des ponettes, les niveaux de LH atteints pendant la stimulation transitoire en début de perfusion sont équivalents à ceux du pic péri-ovulatoire.
- Pour les 2 autres ponettes (W620 et W464) ayant ovulé après l'arrêt de la perfusion (**figures 3.3.8.C et 3.3.9.C**) : la perfusion induit peu ou pas de stimulation de la LH. En parallèle le pic pré-ovulatoire d'œstradiol s'amorce dès le début de la perfusion et atteint son niveau maximal (15 à 30 pg/ml) pendant la perfusion. Le pic péri-ovulatoire de LH commence 24 heures après la fin de la perfusion et les ovulations sont observées entre 24 et 60 heures après la fin de la perfusion, quand l'œstradiol a rejoint son niveau de base.

4. Discussion

Doses réellement administrées :

Comme dans les expériences précédente, les doses de eKP-10 reçues par les ponettes sont légèrement inférieures aux doses théoriques, mais comparables à celles de l'expérience 3 mg/h pendant 72 heures (2,53 mg/h *versus* 2,82 mg/h).

Il existe une certaine disparité entre les doses reçues. Néanmoins il n'existe pas de relation entre la dose reçue et un quelconque effet sur la sécrétion de la LH ou sur l'induction de l'ovulation.

En effet, la ponette W384 est celle qui a reçu la plus forte dose de KP-10 (3,12 mg/h, 10,61 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), cette ponette a le poids le plus faible du lot et a ovulé pendant les 72 heures de perfusion de eKP-10. Au contraire, la ponette W549, qui a également ovulé pendant les 72 heures de perfusion a reçu la dose la plus faible du lot (2,64 mg/h, 6,52 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

Ovulations :

Dans cette expérience, l'intervalle de temps entre l'apparition d'un follicule pré-ovulatoire et l'ovulation a été en moyenne (\pm SD) de 3,13 (\pm 1,13) jours dans le lot témoins, ce qui correspond approximativement à l'estimation de 3 jours que nous avons faite. Dans le lot 3 mg/h, ce délai est en moyenne (\pm SD) de 3,75 (\pm 1,39) jours. La perfusion n'a donc pas avancé, ni synchronisé les ovulations.

Certaines ovulations ont été constatées dans les 2 jours qui suivent l'apparition d'un follicule de taille 32-36 mm, mais ceci dans le lot 3 mg/h (2 ponettes) comme dans le lot témoin (3 ponettes). De façon générale, ces ovulations sont considérées comme relativement précoces, et il est peu probable qu'elles aient été induites par le traitement.

Comme dans l'expérience 6 mg/h pendant le cycle, la croissance folliculaire est ralentie dans le lot traité au cours de la première journée de traitement.

Profils endocriniens :

Il nous paraît intéressant dans un premier temps de revenir une fois encore sur les dernières données de la littérature concernant la dynamique et les relations entre la LH et l'œstradiol qui aboutissent à l'ovulation dans l'espèce équine. Jusqu'à présent il était admis que chez la jument les mécanismes qui conduisent à la genèse du pic péri-ovulatoire de LH sont les mêmes que dans les autres espèces, pour lesquelles le pic de LH ne dure que quelques heures. Le rétrocontrôle positif de l'œstradiol jouerait un rôle majeur avec un pic pré-ovulatoire précédant celui de la LH de 24 à 48 heures. Les récents travaux de Ginther et al. (2007), ont montré au contraire que l'œstradiol administré à des concentrations physiologiques exerçait un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de LH (éventuellement par un relai hypothalamique) à tous les stades du cycle, y compris les stades pré-ovulatoire et post-ovulatoire. Pour la genèse du pic de LH, ces auteurs proposent les événements suivants : le pic de LH présente 2 segments. Le premier commence au cours de la phase pré-ovulatoire et se termine 48 heures avant ovulation. A ce stade, les concentrations d'E2 augmentent jusqu'à atteindre un pic et exercent un rétrocontrôle négatif sur la LH. Quand l'E2 a atteint ce pic et que le follicule est mature, la LH acquiert la capacité à faire chuter l'E2, du fait de l'augmentation des récepteurs

à la LH, sur le follicule. Le deuxième segment de la montée de LH peut alors se produire, provoquant l'ensemble des remaniements dans le follicule, notamment les phénomènes inflammatoires qui aboutissent à l'ovulation 48 h plus tard. L'existence d'un rétrocontrôle positif de l'E2 sur la LH chez la jument, au vu des travaux de Ginther, paraît donc peu vraisemblable. Ceci est peut-être à mettre en relation avec le fait que nous n'avons pas trouvé de neurones à KP dans l'APO (Chapitre I), zone où l'œstradiol exerce un rétrocontrôle positif sur les neurones à KP chez la souris et le rat (Kinoshita *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005).

Dans notre expérience, 3 réponses différentes ont été observées :

- pour les 3 ponettes qui ont ovulé pendant la perfusion, la stimulation de la LH est continue jusqu'à l'ovulation. Les concentrations d'œstradiol sont basses suggérant que le pic a déjà eu lieu ou que la sécrétion de LH induite par le eKP-10 a provoqué la réduction des concentrations d'E2 car le follicule était suffisamment mature. Il est même possible que la chute d'E2, associée à une production de progestérone intrafolliculaire, permette la maturation ultime du follicule. La montée continue de la LH est donc une conséquence de la chute de l'œstradiol à ce moment là. Dans ce lot de 3 ponettes, la perfusion de eKP-10 pourrait avoir induit cet effet. Cependant il n'est pas techniquement possible de l'utiliser dans un traitement d'induction d'ovulation, car ce moment du cycle n'est pas identifiable.

- pour 3 des ponettes qui ont ovulé après la perfusion, la LH est stimulée mais de façon transitoire. La perfusion a débuté pendant le premier segment du pic de LH et a bien permis une augmentation des concentrations de LH à des niveaux équivalents au maximum du pic. Cependant, à ce stade, l'œstradiol n'a pas atteint son pic, le follicule n'est donc pas mature et la LH n'a probablement pas la capacité de le faire chuter suffisamment pour permettre la maturation ultime. En effet, il a été rapporté dans la littérature que le rétrocontrôle négatif de la LH sur l'E2 n'intervient que lorsque le follicule a atteint au minimum 35 mm (Ginther *et al.*, 2007). Quelques heures plus tard, quand l'œstradiol atteint son pic et devient sensible à l'inhibition de la LH, ses concentrations chutent et le 2^{ème} segment de la montée de LH peut s'amorcer jusqu'à l'ovulation qui survient 48 heures plus tard.

- pour les 2 autres ponettes qui ont ovulé après la perfusion, la LH ne semble pas être fortement stimulée par le eKP-10.

Dans notre expérience, il semble donc que les différentes réponses des ponettes à l'administration de eKP-10 soient liées aux différents stades de maturation folliculaire auquel elles se trouvaient au moment de la perfusion, malgré des diamètres de follicules

comparables. Chez la jument, il semble donc que la stimulation exercée par une perfusion de eKP-10 sur la sécrétion de la GnRH et de la LH soit sous le rétrocontrôle permanent de l'E2 au niveau hypophysaire ou hypothalamique. Ce mécanisme permettrait ainsi d'éviter l'ovulation trop précoce de follicules qui ne seraient pas matures. Ainsi dans l'expérience où nous avons administré la dose de 6 mg/h en début de phase folliculaire, les taux élevés de LH pendant plusieurs heures n'ont pas provoqué d'ovulation.

A l'issue de ces réflexions, il est légitime de se demander quels sont les mécanismes mis en jeu lors de l'induction de l'ovulation d'un follicule pré-ovulatoire, avec une dose massive de LH (extraits hypophysaires), d'hCG ou de buséréline. En effet, l'ovulation est obtenue dans un délai moyen de 36 (LH) à 40 (buséréline) heures après injection quel que soit le stade de maturation du follicule.

Dans un cycle avec injection i.v. de LH exogène, la dose administrée est très élevée puisqu'elle dépasse les limites du dosage (200 ng/ml) (Briant, communication personnelle). Elle provoque donc une accélération des phénomènes intrafolliculaires qui aboutissent à l'ovulation en 36 h (Kerban *et al.*, 1999). De plus la montée importante de LH provoque la chute de l'E2 et l'orientation des cellules de granulosa vers la production de progestérone, permettant la reprise de la maturation ovocytaire. Lors de l'ovulation, l'ovocyte est donc mature et apte à être fécondé. Le « vrai » pic de LH endogène est observé après l'ovulation. Appliqué lorsque le follicule pré-ovulatoire n'atteint que 29 mm, ce traitement n'induit l'ovulation que chez la moitié des ponettes (Duchamp, communication personnelle). La LH exogène provoque même l'ovulation de follicules de 22 mm qui ne sont pas matures puisqu'il n'y a pas formation de corps jaune (Briant, 2004). Des essais préalables effectués dans le laboratoire (Briant, communication personnelle), ont montré que la buséréline provoquait une augmentation très rapide de la LH endogène en une heure. Les taux atteints restent dans des limites physiologiques mais sont supérieures à ceux du pic endogène qui suit.

Il apparaît donc qu'avec la LH exogène et les analogues de la GnRH, contrairement au eKP-10, l'augmentation des concentrations endogènes de LH est brutale, plus importante et qu'elle n'est pas soumise au rétrocontrôle négatif de l'œstradiol.

Un autre point qu'il est intéressant d'aborder concerne les isoformes de la LH. L'activité biologique (B) (correspondant à la mesure de la sécrétion de testostérone par des cellules de Leydig murines stimulées par la LH) et l'immunoréactivité (I) de l'hormone varient différemment au cours du cycle. Des travaux menés par Alexander et Irvine illustrent l'hétérogénéité de la LH équine au cours du cycle, avec un ratio B :I élevé pendant l'œstrus et

faible pendant le diestrus (Alexander et Irvine, 1982). Nous ne savons pas quelles isoformes sont libérées sous l'effet d'une perfusion du eKP-10. L'activité biologique des isoformes diffère en fonction de leur point isoélectrique. Les formes de LH ayant un fort contenu en acide sialique ont un point isoélectrique bas, et ont une demi-vie plus longue. Il n'est donc pas exclu que les formes de LH libérées sous l'action du eKP-10 aient un point isoélectrique élevé, ce qui diminuerait leur activité biologique.

Enfin, outre les effets du KP sur le système hypothalamo/hypophysaire, certains auteurs ont proposé un effet du KP directement au niveau ovarien. En effet, chez la ratte adulte, l'expression de l'ARNm du gène *Kiss1* augmente au niveau de l'ovaire aux abords de l'ovulation (Castellano *et al.*, 2006). L'action du KP au niveau ovarien semble néanmoins mineure puisque l'ovulation peut être induite par un traitement utilisant la GnRH chez la souris ou la femme présentant une inactivation du GPR54 (Seminara *et al.*, 2003; Pallais *et al.*, 2006). Enfin, le KP participerait à la régulation de certains aspects du processus ovulatoire, puisqu'un inhibiteur de la Cyclo-Oxygénase 2 (COX-2) supprime l'expression du gène *Kiss1* au niveau ovarien chez la ratte (Gaytan *et al.*, 2009). Parmi les données dont nous disposons chez la jument, la seule qui soit constante dans tous les cycles est la chute de l'œstradiol avant l'ovulation, celle-ci étant provoquée par la LH. Il n'y a donc pour le moment aucun argument pouvant suggérer un rôle du KP au niveau ovarien chez la jument. Il serait toutefois intéressant de l'étudier spécifiquement.

A l'issue de cette expérience, nous constatons que la perfusion de eKP-10 au stade pré-ovulatoire produit également une stimulation transitoire la LH, qui n'est toutefois pas capable d'induire l'ovulation, probablement du fait de régulations propres à l'espèce équine.

D'après l'ensemble de nos expériences, nous pouvons conclure que l'administration continue de eKP-10 nous permet d'obtenir une stimulation répétable des gonadotropines mais seulement de façon transitoire. Nous avons privilégié deux hypothèses, l'épuisement des capacités de sécrétion de l'hypothalamus ou de l'hypophyse. Au cours de l'expérience suivante nous avons donc souhaité préciser où se situaient les limites de l'effet stimulant du eKP-10.

Partie 4 : Essai d'identification des mécanismes impliqués dans la sécrétion transitoire des gonadotropines lors d'une perfusion de eKP-10 en début de phase folliculaire

1. Introduction-Objectifs

Au cours des expériences précédentes nous avons observé de façon répétée qu'une perfusion de eKP-10 ne permettait qu'une stimulation transitoire de la LH et de la FSH, de l'ordre de 24 heures. Pour expliquer cette absence de stimulation prolongée, nous avons proposé 4 hypothèses : 1) une désensibilisation du GPR54, 2) un épuisement du contenu hypothalamique en GnRH, 3) un épuisement du contenu hypophysaire en gonadotropines, 4) un rétrocontrôle de l'œstradiol. Les résultats précédents nous ont permis de privilégier plutôt les hypothèses 2) et 3). Nous avons également proposé que les faibles effets du eKP-10 observés ensuite sur la croissance folliculaire et l'ovulation étaient plutôt attribuables au rétrocontrôle négatif de l'œstradiol qui semble très puissant chez la jument.

Cette expérience avait donc pour objectif d'identifier l'origine de la stimulation transitoire. Nous nous sommes inspirés des travaux menés chez le macaque par Seminara et collaborateurs (2006). Dans cette espèce, une perfusion de KP-10 à forte dose pendant 4 jours entraîne, après une stimulation initiale de 1 à 2 heures, la chute des concentrations plasmatiques de LH pour atteindre, au bout de 12 heures de perfusion, des niveaux équivalents à ceux observés chez les animaux perfusés avec du sérum physiologique. Une injection de NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique) ou de GnRH, administré à ce moment, permet de stimuler la sécrétion de LH, ce qui élimine les hypothèses d'une incapacité de libération de GnRH ou de LH. Les auteurs ont donc conclu que la désensibilisation des récepteurs GPR54 était l'hypothèse la plus plausible (Seminara *et al.*, 2006).

Le NMDA est un agoniste des récepteurs au glutamate intervenant dans les mécanismes de transmission au niveau du système nerveux central et jouant un rôle important dans la régulation neuroendocrine. Les neurones à GnRH expriment l'ARNm de la sous unité NR1 du récepteur NMDA (Ottem *et al.*, 2002). Il est bien établi que le NMDA stimule la LH par l'intermédiaire de la GnRH, bien que son mode d'action reste controversé. Le NMDA stimule la libération de la GnRH dans les cellules GT1-7 par l'intermédiaire des récepteurs NMDA présents au niveau des neurones à GnRH (Mahachoklertwattana *et al.*, 1994). Cependant, aucune expression de la protéine c-Fos n'est observée dans les neurones à GnRH après un traitement avec le NMDA (Lee *et al.*, 1993). En revanche, une administration centrale de NMDA induit une expression de c-Fos dans les neurones produisant les catécholamines et l'oxyde nitrique (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2010), deux populations neuronales qui semblent impliquées dans la régulation de la sécrétion de GnRH (Mahesh et Brann, 2005).

Une injection de NMDA (1 mg/kg ou 5 mg/kg) augmente la sécrétion des gonadotropines pendant environ 1 heure chez des juments ovariectomisées recevant un traitement stéroïdien (E2 + P4) pendant la saison sexuelle (Fitzgerald, 1996), mais également chez les juments entières en inactivité, chez les juments entières cycliques, et chez les juments ovariectomisées pendant la période d'œstrus saisonnier (Fitzgerald, 1996; Fitzgerald et Davison, 1997).

De plus, une perfusion de NMDA (1 mg/kg) chez des juments en diœstrus induit une augmentation des concentrations plasmatiques de LH, FSH et GH (Sticker *et al.*, 2001).

Cependant, la dose de 5 mg/kg entraîne, chez certaines juments, une excitabilité générale accompagnée d'une transpiration importante et d'une augmentation de la fréquence respiratoire. Une dose plus faible de NMDA (1 mg/kg) a une action stimulante moins prononcée sur la sécrétion de GnRH mais n'entraîne pas ces effets secondaires (Fitzgerald, 1996; Fitzgerald et Davison, 1997).

Dans notre expérience nous avons donc comparé chez des ponettes perfusées avec du serum physiologique ou du eKP-10, les effets d'une injection i.v. unique de eKP-10, puis de GnRH, puis de NMDA. Les doses administrées ont été choisies de la façon suivante :

- 1 mg de eKP-10 puisque cette dose stimule les gonadotropines chez la jument (Magee *et al.*, 2009), et chez la ponette (test réalisé au cours de nos expériences préliminaires).
- 25 µg de GnRH puisque Magee et collaborateurs ont montré qu'une injection de 1 mg de rKP-10 induisait une réponse comparable à celle d'une injection de 25 µg de GnRH (Magee *et al.*, 2009).
- 1 mg/kg de NMDA afin d'éviter de potentiels effets secondaires. De plus, par mesure de précaution, nous l'avons administrée en dernier.

2. Matériel et méthodes

a) Animaux et lots

Le lendemain de l'injection de prostaglandine de synthèse $\text{PGF}_{2\alpha}$, les ponettes (âge \pm SD : $8,5 \pm 3,4$ ans) qui présentaient des follicules dont le diamètre était inférieur à 20 mm ont été sélectionnées et affectées aléatoirement dans un des 2 lots suivant :

- Lot témoin : n = 4
- Lot eKP-10 6 mg/h : n = 4

Tableau 3.3.5: Partie 4 : Attribution des ponettes dans chacun des 2 lots (poids des ponettes et taille du plus gros follicule présent lors de l'expérience).

lot	ponette	poids (Kg)	moyenne poids \pm SD	taille follicule traité (mm)	moyennes taille follicule \pm SD
témoin	W 499	331	358 \pm 43	17	14 \pm 2
	W 613	420		13	
	W 486	325		13	
	W 614	355		12	
6 mg/h	W 621	285	328 \pm 41	19	15 \pm 3
	W 600	328		15	
	W 575	317		13	
	W 561	383		12	

Les caractéristiques des ponettes affectées à chaque lot (poids et état ovarien) sont présentées dans le **tableau 3.3.5**.

b) Protocole expérimental

Les ponettes des deux lots ont reçu une perfusion de sérum physiologique pendant 3 heures, puis une perfusion de sérum physiologique (lot témoin) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (lot 6 mg/h), pendant 35 heures.

Dans chaque lot, les ponettes ont reçu successivement une injection i.v. unique :

- Après 20 heures de perfusion : de **eKP-10**, 1 mg (Genecust, doses préparées dans 4 ml d'eau PPI, soit à une concentration de 0,25 mg/ml).
- Après 25 heures de perfusion : de **GnRH**, 25 µg (Fertagyl®, Intervet, doses préparées dans 4 ml d'eau PPI, soit une concentration de 6,25 µg/ml).
- Après 30 heures de perfusion : de **NMDA** 1 mg/kg (N-Méthyl-D-Aspartique, Sigma-aldrich, doses préparées dans 4 ml dans l'eau PPI, soit une concentration de 50 mg/ml).

Un prélèvement sanguin a été effectué toutes les 15 min pendant une heure avant le début de la perfusion, puis un prélèvement toutes les heures pendant les 10 premières heures de perfusion. Avant chaque traitement, un prélèvement a été effectué toutes les 15 min pendant une heure, et après chaque traitement, un prélèvement a été effectué toutes les 15 min pendant une heure, puis toutes les 30 min pendant 3 heures, afin de doser la LH et la FSH.

c) Analyse statistique

Pour chaque hormone, les AUCs ont été calculées pendant les 10 premières heures de perfusion, puis après chaque injection sur une période de 5 heures.

Pour chaque traitement et pour chaque hormone, les valeurs des AUC ont été comparées entre les 2 lots (témoin *versus* 6 mg/h) par un test exact non paramétrique de permutation pour données indépendantes.

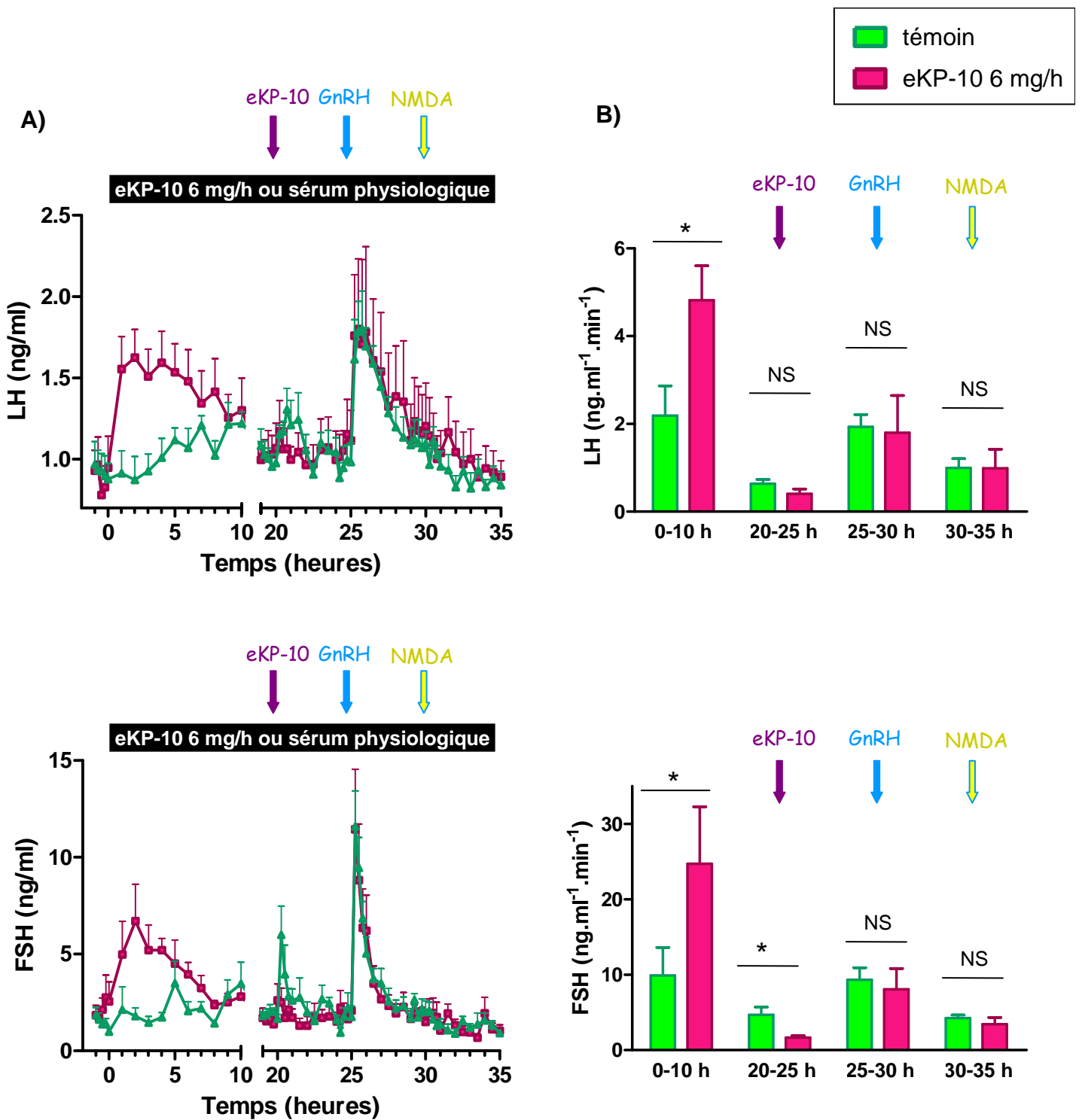


Figure 3.3.13 : Partie 4 : Concentrations plasmatiques de LH (en haut) et FSH (en bas) des ponettes recevant une perfusion de sérum physiologique (n=4) ou de eKP-10 6 mg/h (n=4) pendant 35 heures. Les rectangles horizontaux représentent les durées de perfusion. Pendant la perfusion, les ponettes ont reçu successivement un bolus i.v. de eKP-10 (1 mg, flèche violette), GnRH (25 µg, flèche bleue) et NMDA (1 mg/kg, flèche jaune) au bout de 20 h, 25 h, et 30 h de perfusion respectivement. (A) Profils moyens (± SEM); (B) AUCs moyennes de chaque période. NS : non significatif; * P₂ 0,05.

3. Résultats

Les résultats sont présentés sur les **figures 3.3.13** (profils et AUCs moyens pour LH et FSH), **3.3.14** (profils individuels témoins) et **3.3.15** (profils individuels traitées).

→ Effets durant les 10 premières heures de perfusion

Les AUCs moyennes de LH et de FSH sont supérieures dans le lot traité comparé au lot témoin (**figure 3.3.13.**). Pour la FSH, les taux de base sont atteints au bout de 10 heures.

L'examen des profils individuels montre qu'une ponette (W486) du lot témoin présente une sécrétion épisodique des gonadotropines de type pulsatile, avec 1 pulse toutes les 4 heures environ (**figure 3.3.14**), et que les concentrations plasmatiques de LH et FSH augmentent chez les 4 ponettes du lot 6 mg/h (**figure 3.3.15**).

→ Effet d'un bolus i.v. de eKP-10 pendant la perfusion

Les concentrations plasmatiques de LH et de FSH semblent augmenter dans le lot témoin mais pas dans le lot 6 mg/h (**figure 3.3.13.A**).

Les AUCs moyennes de LH ne diffèrent pas entre les 2 lots ($P=0,13$), alors que les AUCs moyennes de FSH sont supérieures dans le lot témoin comparé au lot 6 mg/h (**figure 3.3.13.B**).

L'examen des profils individuels montre que, dans le lot témoin, les 4 ponettes présentent une augmentation des gonadotropines, d'une intensité et d'une durée variable entre les ponettes. Cinq heures après l'injection de eKP-10, les niveaux plasmatiques en gonadotropines sont proches du niveau basal pour chaque ponette (**figure 3.3.14**). Dans le lot 6 mg/h, 1 ponette (W600) présente une très légère augmentation de la LH, et 2 ponettes (W600 et W561) une légère augmentation de la FSH. Cinq heures après l'injection de eKP-10, les niveaux plasmatiques en gonadotropines sont proches du niveau basal pour chaque ponette (**figure 3.3.15**).

Lot témoin

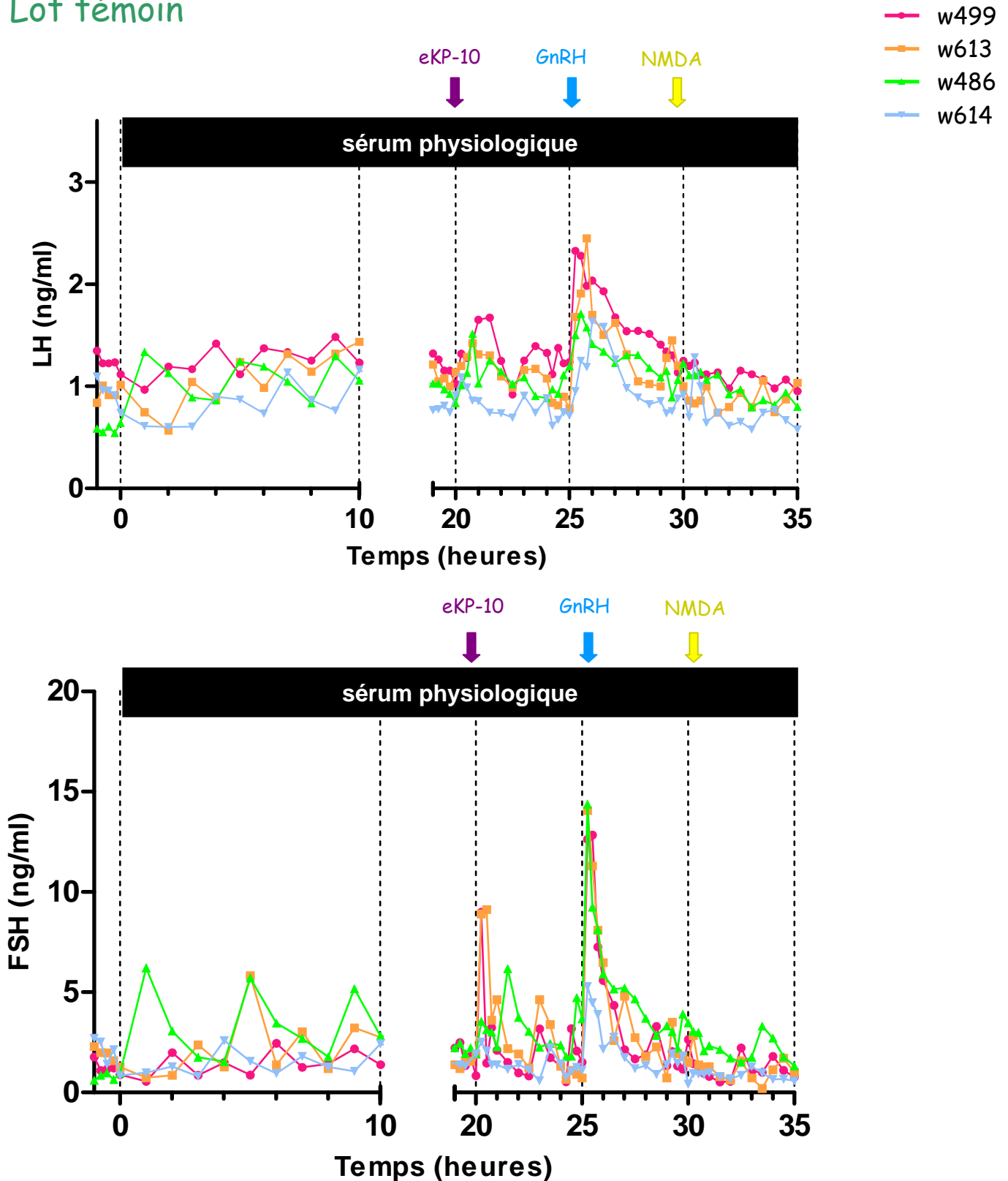


Figure 3.3.14 : Partie 4 : Profils plasmatiques individuels en LH (en haut) et FSH (en bas) des ponettes recevant une perfusion de sérum physiologique (n=4) pendant 35 heures. Les rectangles représentent les durées de perfusion. Pendant la perfusion, les ponettes ont reçu successivement un bolus i.v. de eKP-10 (1 mg, flèche violette), GnRH (25 µg, flèche bleue) et NMDA (1 mg/kg, flèche jaune) au bout de 20 h, 25 h, et 30 h de perfusion respectivement.

Lot eKP-10 6 mg/h

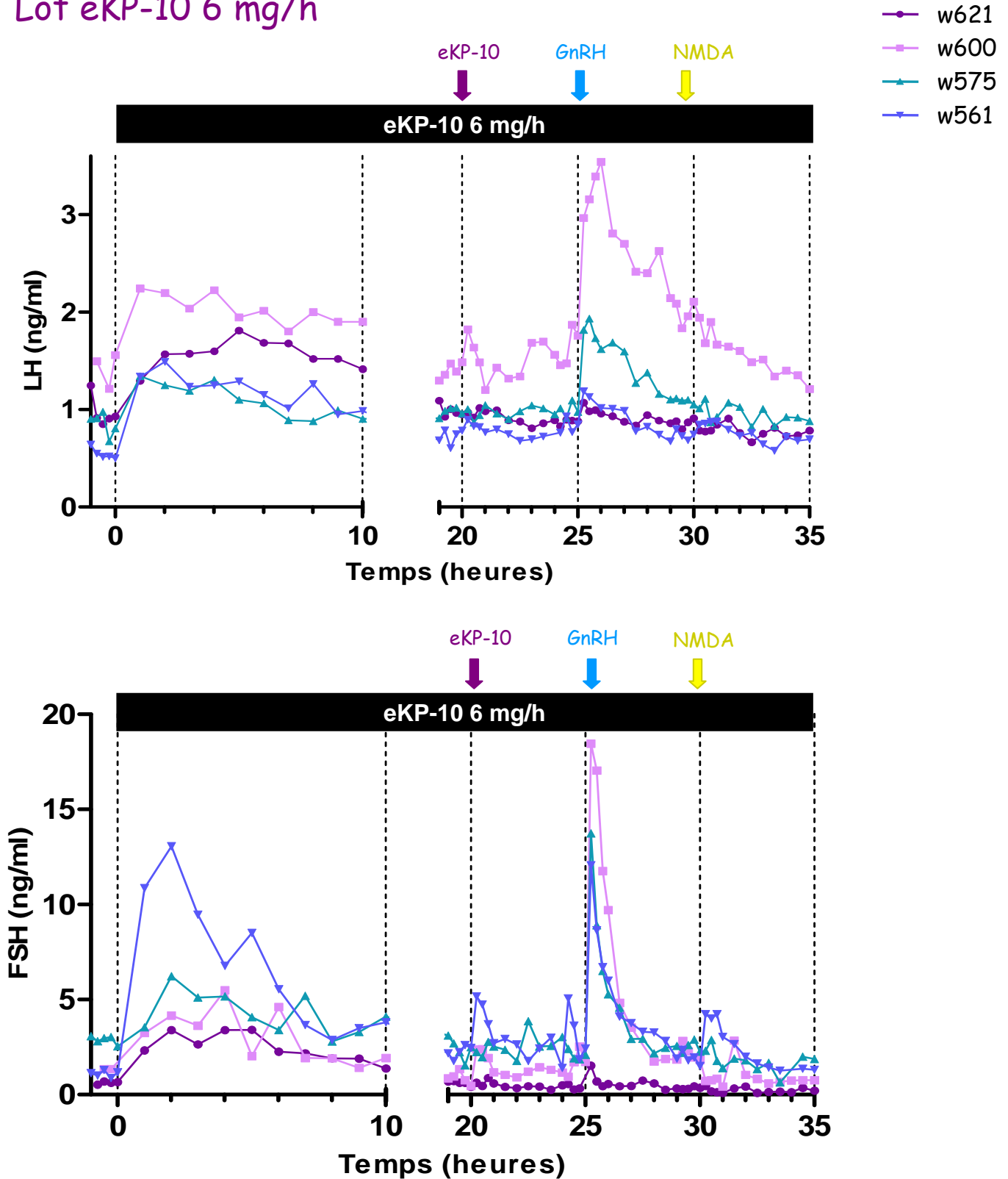


Figure 3.3.15 : Partie 4 : Profils plasmatiques individuels en LH (en haut) et FSH (en bas) des ponettes recevant une perfusion de eKP-10 6 mg/h (n=4) pendant 35 heures. Les rectangles représentent les durées de perfusion. Pendant la perfusion, les ponettes ont reçu successivement un bolus i.v. de eKP-10 (1 mg, flèche violette), GnRH (25 µg, flèche bleue) et NMDA (1 mg/kg, flèche jaune) au bout de 20 h, 25 h, et 30 h de perfusion respectivement.

→ Effet d'un bolus i.v. de GnRH pendant la perfusion

Les concentrations plasmatiques de LH et de FSH augmentent dans les deux lots (**3.3.13.A**).

Les AUCs moyennes de LH et FSH ne diffèrent pas entre les 2 lots ($P = 0,39$ et $P = 0,48$ respectivement) (**figure 3.3.13.B**).

L'examen des profils individuels montre que les ponettes des 2 lots présentent une augmentation de la LH et de la FSH, d'une amplitude et d'une durée plus importante que lors du bolus de eKP-10 (**figure 3.3.14** et **figure 3.3.15**), sauf pour la ponette W621 du lot traité qui ne répond pratiquement pas à l'injection de GnRH (**figure 3.3.15**). Cinq heures après l'injection de GnRH, les niveaux plasmatiques de gonadotropines sont proches du niveau basal pour chaque ponette (**figure 3.3.14** et **figure 3.3.15**).

→ Effet d'un bolus i.v. de NMDA pendant la perfusion

La moyenne des concentrations plasmatiques de LH et de FSH ne semble pas augmenter dans aucun des 2 lots (**figure 3.3.13.A**).

Les AUCs moyennes de LH et FSH ne diffèrent pas entre les 2 lots ($P = 0,30$ et $P = 0,50$ respectivement) (**figure 3.3.13.B**).

L'examen des profils individuels montre qu'une ponette du lot 6 mg/h (W561) présente une légère stimulation de la FSH (**figure 3.3.15**).

4. Discussion

Perfusion de eKP-10 :

La perfusion de eKP-10 a produit une stimulation de LH et de FSH comparable aux précédentes expériences. Au bout de 10 heures, les concentrations de FSH atteignent le niveau basal mais pas les concentrations de LH.

Bolus de eKP-10 :

Avant administration du bolus de eKP-10, 20 heures après le début de la perfusion, les concentrations de LH et de FSH ont rejoint le niveau basal dans le lot traité ; la perfusion de eKP-10 a donc bien induit une stimulation transitoire comme dans les expériences

précédentes. Après administration du bolus, la sécrétion des gonadotropines est globalement plus importante dans le lot témoin. Elle est comparable à celle que nous avons observée au cours des expériences préliminaires sur les ponettes en anœstrus. La faible réponse de 2 ponettes dans le lot traité nous permet d'écartier raisonnablement l'hypothèse d'une désensibilisation totale des récepteurs. Il est cependant possible que le bolus de eKP-10 ait pu activer une sécrétion de GnRH contrairement à un apport continu et régulier de plus faible concentration par recrutement de récepteurs non désensibilisés.

On ne peut pas exclure également qu'un second site de liaison au KP soit activé lors de l'administration du bolus de eKP-10. En effet, les souris Kiss1^{-/-} et GPR54^{-/-} présentent un hypogonadisme hypogonadotrope, or le phénotype GPR54^{-/-} semble moins sévère puisque la sécrétion des neurones à GnRH est maintenue à un certain niveau (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2007; Lapatto *et al.*, 2007; Chan *et al.*, 2009). Il serait donc intéressant de rechercher si le KP-10 pourrait être le ligand d'autres récepteurs.

Bolus de GnRH :

Si l'on s'intéresse tout d'abord au lot témoin, le bolus de 25 µg de GnRH a provoqué une stimulation des gonadotropines supérieure à celle observée avec le bolus de eKP-10. Nous avons déjà observé une différence d'effet entre le eKP-10 et la buséreline au cours des expériences préliminaires, mais cette dernière avait été administrée à forte dose. Magee et collaborateurs n'avaient au contraire pas constaté de différence entre une injection i.v. de 1 mg de mKP-10 et une injection i.v. de 25 µg de GnRH sur la sécrétion de LH et FSH chez la jument en diestrus (Magee *et al.*, 2009). Si l'on s'intéresse au lot traité, la réponse à la GnRH n'est globalement pas différente de celle du lot témoin. Cependant l'étude des profils individuels révèle que si toutes les ponettes du lot témoin montrent une stimulation relativement homogène, dans le lot traité, 2 ponettes ont une faible stimulation de la LH et 1 ponette une faible stimulation de la FSH. Il est donc difficile de conclure avec certitude sur cette partie de l'expérience. Néanmoins, il semble probable que les capacités de réponse de l'hypophyse soient altérées chez ces animaux.

Bolus de NMDA :

Contrairement à ce que nous attendions, aucune ponette du lot témoin ne présente de stimulation après l'injection de NMDA et une ponette du lot traité a montré une stimulation de la FSH.

La dose de 1 mg/kg était peut-être insuffisante pour permettre une stimulation à ce stade du cycle. En effet, une injection de NMDA chez le macaque ne stimule la LH qu'en fin de phase folliculaire, ce qui suggère que la présence de l'œstradiol est nécessaire. Cependant, les effets sont plus nets lorsque l'injection est réalisée pendant la phase lutéale (Reyes *et al.*, 1991). De la même façon, chez des brebis ovariectomisées, les effets du NMDA ne sont visibles qu'en présence d'œstradiol, suggérant ainsi que le niveau basal de LH au moment de l'injection de NMDA a une influence sur la libération de la LH (Estienne *et al.*, 1990). Nous avons également envisagé la possibilité que le NMDA ait été inactivé lors de la préparation ou de l'injection. En raison des risques d'effets secondaires de la molécule nous avons effectué un suivi clinique des ponettes lors des injections. Nous n'avons pas observé de modification du rythme cardiaque, du rythme respiratoire ou de la transpiration des ponettes. En revanche, toutes les ponettes se sont abreuvées abondamment dans la minute qui a suivi l'injection de NMDA. Or, il est rapporté dans la littérature que le NMDA stimule la libération de la vasopressine (hormone anti-diurétique) (Swenson *et al.*, 1998). Le NMDA n'était donc pas inactivé lors de l'injection.

Enfin, l'injection de NMDA ayant été effectuée seulement 5 heures après celle de GnRH, compte tenu de la décharge massive des gonadotropines suite à cette dernière, il est tout à fait possible que les stocks de LH immédiatement libérables aient été épuisés.

A l'issue de cette expérience, nous pouvons dire que les capacités de réponse de l'hypophyse chez les animaux perfusés par le eKP-10 ne paraissent pas fortement altérées. L'hypothèse d'une moindre libération de la GnRH sous l'action du eKP-10 paraît plus vraisemblable. Il reste à déterminer si ce défaut de sécrétion du peptide résulte d'un stock hypothalamique insuffisant, et/ou d'une désensibilisation partielle des récepteurs GPR54. Par ailleurs, nous n'avons pas testé la potentielle implication du rétrocontrôle négatif de l'œstradiol dans cette expérience.

Chapitre IV : Essais en période d'anoestrus saisonnier

1. Introduction-Objectifs

Nous avons montré au cours des expériences préliminaires que la libération des gonadotropines pouvait être stimulée avec une injection i.v. unique de kisspeptide chez la ponette en anœstrus. De plus, il a été clairement établi que l'hypophyse de juments en anœstrus était capable de répondre à une stimulation prolongée. En effet, lorsque la GnRH native est administrée par voie sous-cutanée pendant 28 jours via une pompe osmotique à la dose de 100 ng/kg/h, les concentrations plasmatiques de LH augmentent pendant toute la durée de l'administration du peptide et l'ovulation peut avoir lieu dans les 15 à 27 jours après le début du traitement (Hyland et al., 1987). Une administration continue ou pulsatile de 20 µg/h, par voie i.v., est également capable d'induire une augmentation soutenue de la LH, une croissance folliculaire et une ovulation, dans un délai plus court lorsque l'administration est pulsatile (Becker et Johnson, 1992). Bien qu'une perfusion continue de GnRH soit capable d'induire un cycle en contre saison chez la brebis par exemple (McNatty *et al.*, 1988), la pulsativité de la GnRH est néanmoins déterminante pour le maintien de la sécrétion de LH chez le macaque (Wildt *et al.*, 1981).

Chez la jument, une administration de GnRH est capable de stimuler la LH alors même que le contenu hypophysaire et les concentrations plasmatiques sont faibles pendant la période d'anœstrus (Silvia *et al.*, 1986). Or le nombre de cellules gonadotropes à LH varie peu au cours des saisons, suggérant une capacité de synthèse relativement constante, mais dépendante de signaux appropriés.

L'ensemble de ces données nous a conduits à formuler l'hypothèse qu'en période d'anœstrus il serait peut-être possible de stimuler durablement la libération des hormones gonadotropes par administration de eKP-10, jusqu'à l'obtention d'ovulations. En période de cyclicité, nous avons proposé que le rétrocontrôle négatif de l'œstradiol pouvait être un facteur modérant les effets du KP lors de traitements de plus de 3 jours. Or, lors de cycles induits en période d'anœstrus par administration de GnRH (Hyland *et al.*, 1987) ou de LH (Schauer *et al.*, 2011), la sécrétion d'œstradiol n'est pas stimulée. Nous avons donc estimé que c'était un argument supplémentaire pour espérer induire des cycles avec le KP en période d'anœstrus.

Pour une première approche de cette hypothèse, nous avons comparé les effets d'une perfusion de eKP-10 aux 2 doses optimales de 3 et 6 mg/h, avec une perfusion de GnRH

Tableau 4.1: Chapitre IV : Attribution des ponettes dans chacun des 4 lots (poids des ponettes et taille du plus gros follicule présent lors de l'expérience).

lot	ponette	poids (Kg)	moyenne poids \pm SD	taille follicule traité (mm)	moyennes taille follicule \pm SD
Témoin	W 556	329	276 \pm 49	15	16 \pm 2
	W 632	232		18	
	W 634	235		13	
	W 641	306		17	
GnRH	W 574	328	319 \pm 73	15	15 \pm 1
	W 635	208		16	
	W 549	412		16	
	W 556	329		13	
3 mg/h	W 640	264	293 \pm 52	16	16 \pm 3
	W 632	232		18	
	W 598	302		11	
	W 578	372		17	
6 mg/h	W 591	338	303 \pm 35	17	16 \pm 2
	W 641	306		14	
	W 638	322		17	
	W 597	245		15	

native, pendant 72 heures, chez des ponettes en anoestrus. Nous avons choisi d'administrer la GnRH à la concentration de 20 µg/h, car cette dose stimule la sécrétion de LH en période d'anoestrus et permet d'obtenir des ovulations environ deux semaines plus tard (Becker et Johnson, 1992).

2. Matériel et méthodes

a) Animaux et lots

Cette expérience a nécessité 16 ponettes (âge \pm SD: 6,2 \pm 3,1 ans) en inactivité ovarienne, pendant la saison d'anoestrus saisonnier (janvier).

Les ponettes ont été affectées aléatoirement dans un des 4 lots suivants :

- Lot témoin : sérum physiologique, n=4
- Lot GnRH : GnRH 20 µg/h, n=4
- Lot 3 mg/h : eKP-10 3 mg/h, n=4
- Lot 6 mg/h: eKP-10 6 mg/h, n=4

Les caractéristiques des ponettes affectées à chaque lot (poids et état ovarien) sont présentées dans le **tableau 4.1**.

b) Protocole expérimental :

Cette expérience a été conduite selon le protocole de perfusion décrit dans le « matériels et méthodes communs ». Le jour de l'expérience, les ponettes ont reçu une perfusion de sérum physiologique pendant 6 heures, puis un des 4 traitements pendant 72 heures.

Des prélèvements sanguins ont été effectués avec le système Vacutainer® toutes les 2 heures pendant les 6 heures avant le début du traitement, et pendant les 10 premières heures du traitement. Ensuite, la fréquence des prélèvements sanguins a été de 4 par jour jusqu'à la fin des 72 heures de traitement. Enfin, 3 prélèvements sanguins ont été effectués durant les 3 jours qui ont suivi la fin du traitement. Ces prélèvements sanguins ont été utilisés pour le dosage de la FSH, de la LH, et de l'E2.

Des échographies ont été réalisées tous les 2 à 3 jours afin de suivre l'évolution de la croissance folliculaire pendant toute la durée de l'expérience.

Tableau 4.2: Chapitre IV : Dose reçue par chaque ponette, calculée en fonction de leur poids et du volume restant dans les poches de perfusion à chaque changement de poche

Lot	Ponette	Poids (Kg)	Dose ($\mu\text{g/h}$)	Dose ($\mu\text{g/kg/h}$)
GnRH 20 μg	W 574	328	17,2	0,0524
	W 635	208	14,4	0,0692
	W 549	412	17,4	0,0422
	W 556	329	18,5	0,0562

Lot	Ponette	Poids (Kg)	Dose (mg/h)	Dose (mg/kg/h)
eKP-10 3 mg/h	W 640	264	2,5	0,0095
	W 632	232	2,8	0,0121
	W 598	302	3	0,0099
	W 578	372	2,8	0,0075
eKP-10 6 mg/h	W 591	338	4,5	0,0133
	W 641	306	4,8	0,0157
	W 638	322	5,8	0,0180
	W 597	245	5,7	0,0233

c) Analyse statistique

Les valeurs d'AUC des paramètres endocriniens et la taille des follicules ont été comparées entre les lots par un test exact non paramétrique de Kruskal et Wallis pour données indépendantes. Lorsque la différence globale était significative, les valeurs d'AUCs de chaque lot traité ont été comparées à celles du lot témoin, par un test exact de permutation pour mesures indépendantes en appliquant la correction de Bonferroni.

3. Résultats

→ Dose réellement reçue

Les doses reçues par chaque ponette sont représentées dans le **tableau 4.2**.

Quel que soit le traitement, la dose perfusée est toujours inférieure à la dose théorique. Elle est en moyenne de $16,9 \pm 0,76$ µg/ml de GnRH dans le lot GnRH, et de $2,8 \pm 0,09$ mg/ml et $5,2 \pm 0,28$ mg/ml de eKP-10 dans les lots 3 mg/h et 6 mg/h respectivement.

→ Effets pendant les 10 premières heures de perfusion sur les paramètres endocriniens

La LH

Les concentrations plasmatiques de LH durant les 10 premières heures de perfusion sont représentées sur la **figure 4.1**.

Dans les 2 heures suivant le début de la perfusion, les concentrations moyennes augmentent dans les 3 lots traités pour atteindre des concentrations maximales comprises entre 0,30 et 0,37 ng/ml (**figure 4.1.A**). Ensuite, les concentrations semblent diminuer progressivement, mais restent cependant légèrement supérieures au niveau basal.

Etant donné la variabilité du niveau de base pendant la période contrôle (-6h – 0h) dans les 4 lots, celui-ci a été retranché des concentrations mesurées pendant la perfusion. Les

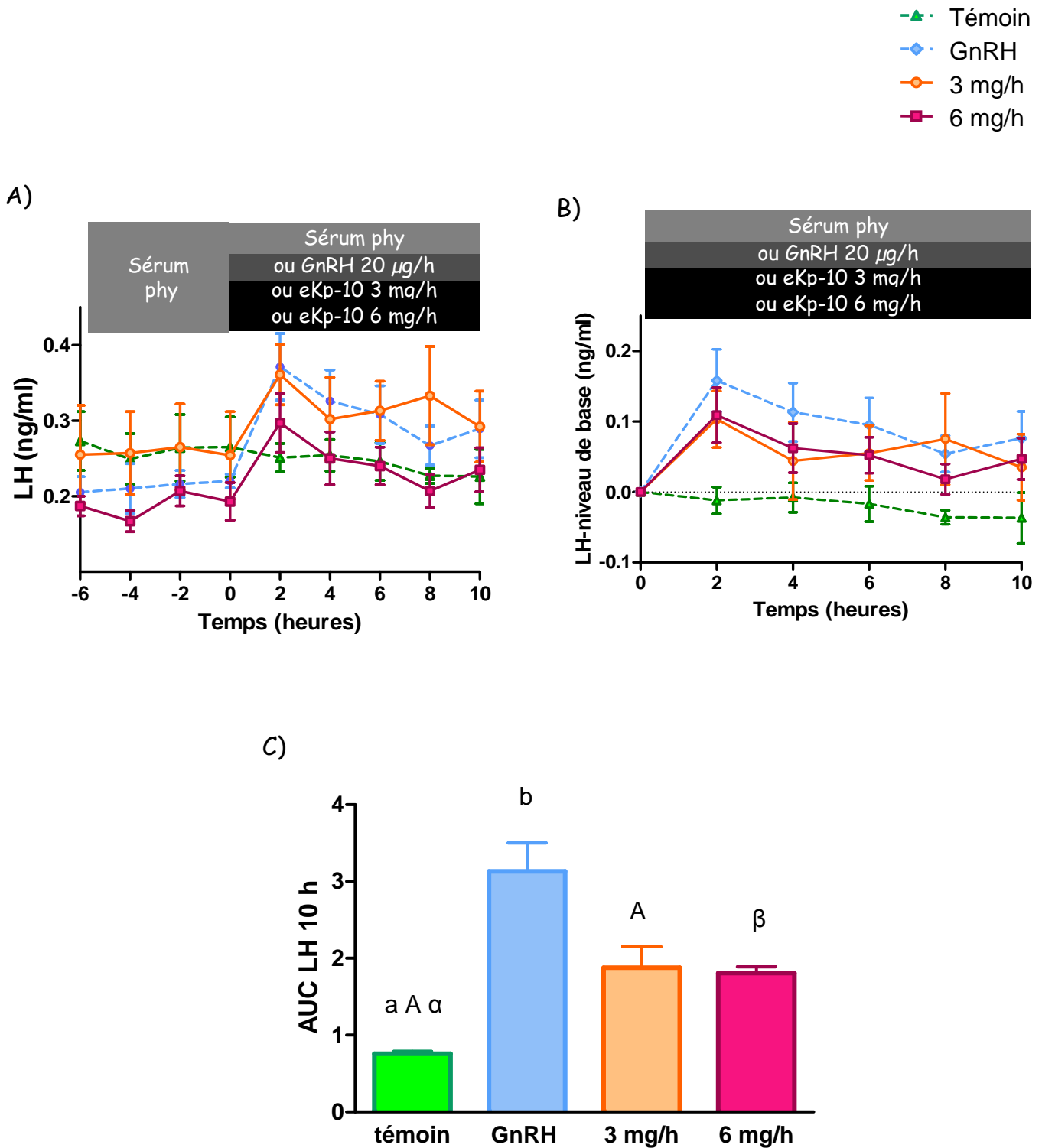


Figure 4.1: Chapitre IV : Concentrations plasmatiques de LH durant les 10 premières heures de perfusion de sérum physiologique (n=4), ou de GnRH à la dose de 20 $\mu\text{g}/\text{h}$ (n=4), ou de eKp-10 à la dose de 3 mg/h (n=4) ou de eKp-10 à la dose de 6 mg/h (n=4). Les rectangles horizontaux représentent les durées de perfusion. (A) Moyennes (\pm SEM); (B) Moyennes (\pm SEM) après retranchement du niveau de base; (C) AUCs moyennes (+ SEM). Les lots différant du lot témoin sont représentés par des lettres différentes (minuscules, majuscules, grecques).

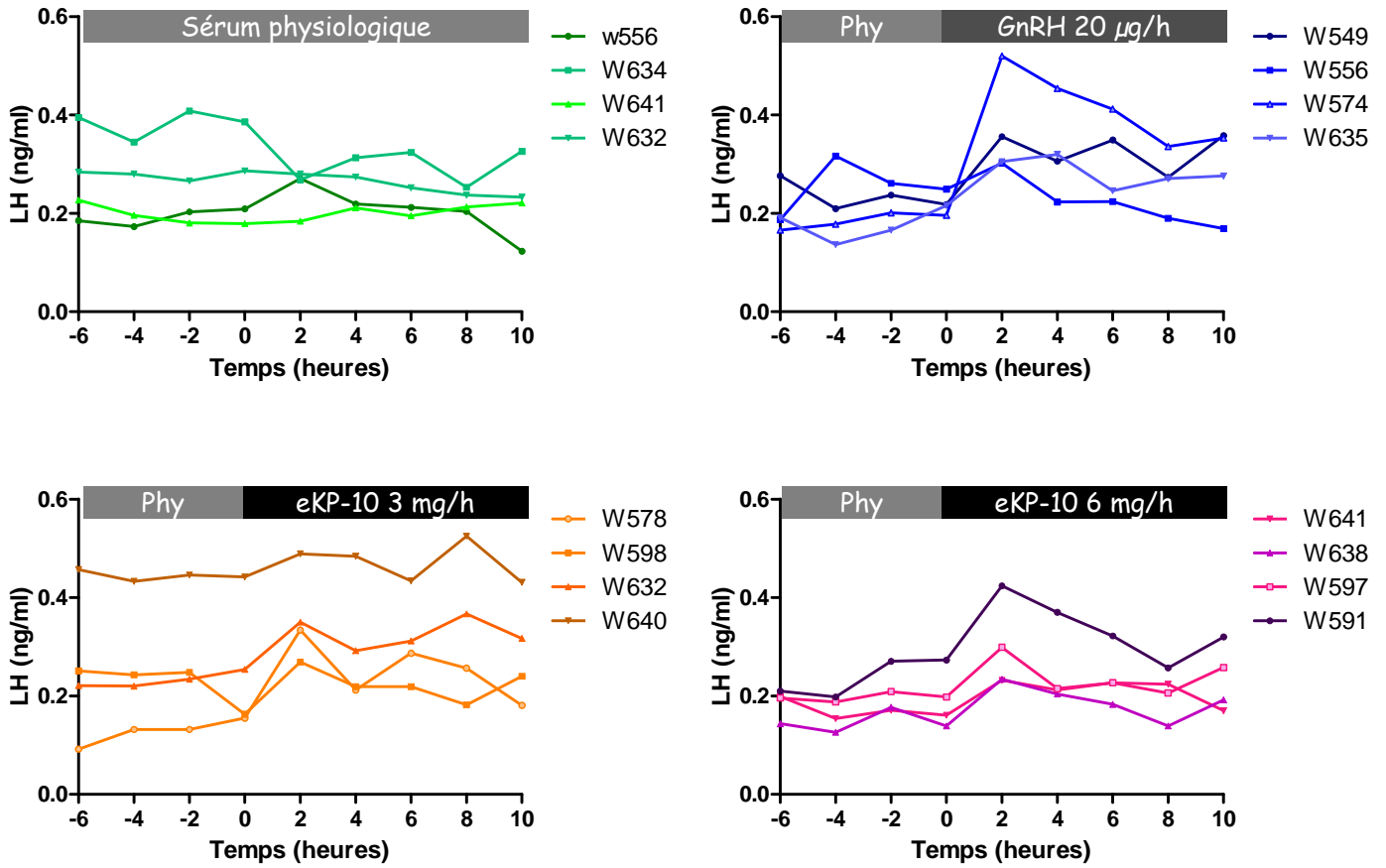


Figure 4.2: Chapitre IV : Profils individuels des concentrations plasmatiques de LH pendant les 10 premières heures de perfusion de sérum physiologique (n=4), ou de GnRH à la dose de 20 µg/h (n=4), ou de eKP-10 à la dose de 3 mg/h (n=4) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (n=4). Les rectangles représentent les durées de perfusion.

amplitudes de stimulation de la LH, représentées sur la **figure 4.1.B**, sont globalement différentes entre les lots. Elles sont supérieures dans chaque lot traité, $0,16 (\pm 0,04)$, $0,10 (\pm 0,04)$ et $0,11 (\pm 0,04)$ ng/ml, dans les lots GnRH, 3 mg/h et 6 mg/h respectivement, comparées à celle du lot témoin, $-0,01 (\pm 0,02)$ ng/ml.

Les valeurs d'AUCs de la LH durant les 10 premières heures de perfusion diffèrent globalement entre les lots (**figure 4.1.C**). Elles sont supérieures dans les lots GnRH et 6 mg/h comparées à celle du lot témoin.

L'examen des profils individuels montre que les 4 ponettes présentent une augmentation des concentrations de LH dans les lots GnRH et 6 mg/h. Seules 3 ponettes présentent cette augmentation dans le lot 3 mg/h. Enfin, dans le lot témoin, aucune ponette ne présente d'augmentation des concentrations de LH (**figure 4.2**).

La FSH

Les concentrations plasmatiques de FSH durant les 10 premières heures de perfusion sont représentées sur la **figure 4.3**.

Comme pour la LH, les concentrations moyennes augmentent dans les 2 heures suivant le début de la perfusion dans les 3 lots traités pour atteindre des valeurs maximales de $7,90 \pm 2,22$ ng/ml, $3,95 \pm 0,87$ ng/ml et $4,22 \pm 1,10$ ng/ml dans les lots GnRH, 3 mg/h et 6 mg/h, respectivement (**figure 4.3.A**). Dans les 3 lots, ces concentrations diminuent ensuite progressivement, pour atteindre des valeurs proches du niveau basal.

Comme pour la LH, le niveau basal a été retranché des concentrations mesurées pendant la perfusion. Les amplitudes de stimulation de la FSH, représentées sur la **figure 4.3.B**, diffèrent globalement entre les lots. Les concentrations maximales atteintes dans les lots GnRH ($6,68 \pm 1,84$ ng/ml) et 6 mg/h ($3,42 \pm 0,86$ ng/ml,) sont supérieures à celles du lot témoin ($0,32 \pm 0,25$ ng/ml). Celles du lot 3 mg/h ($2,40 \pm 0,52$ ng/ml), ne diffèrent pas de celles du lot témoin ($P = 0,16$).

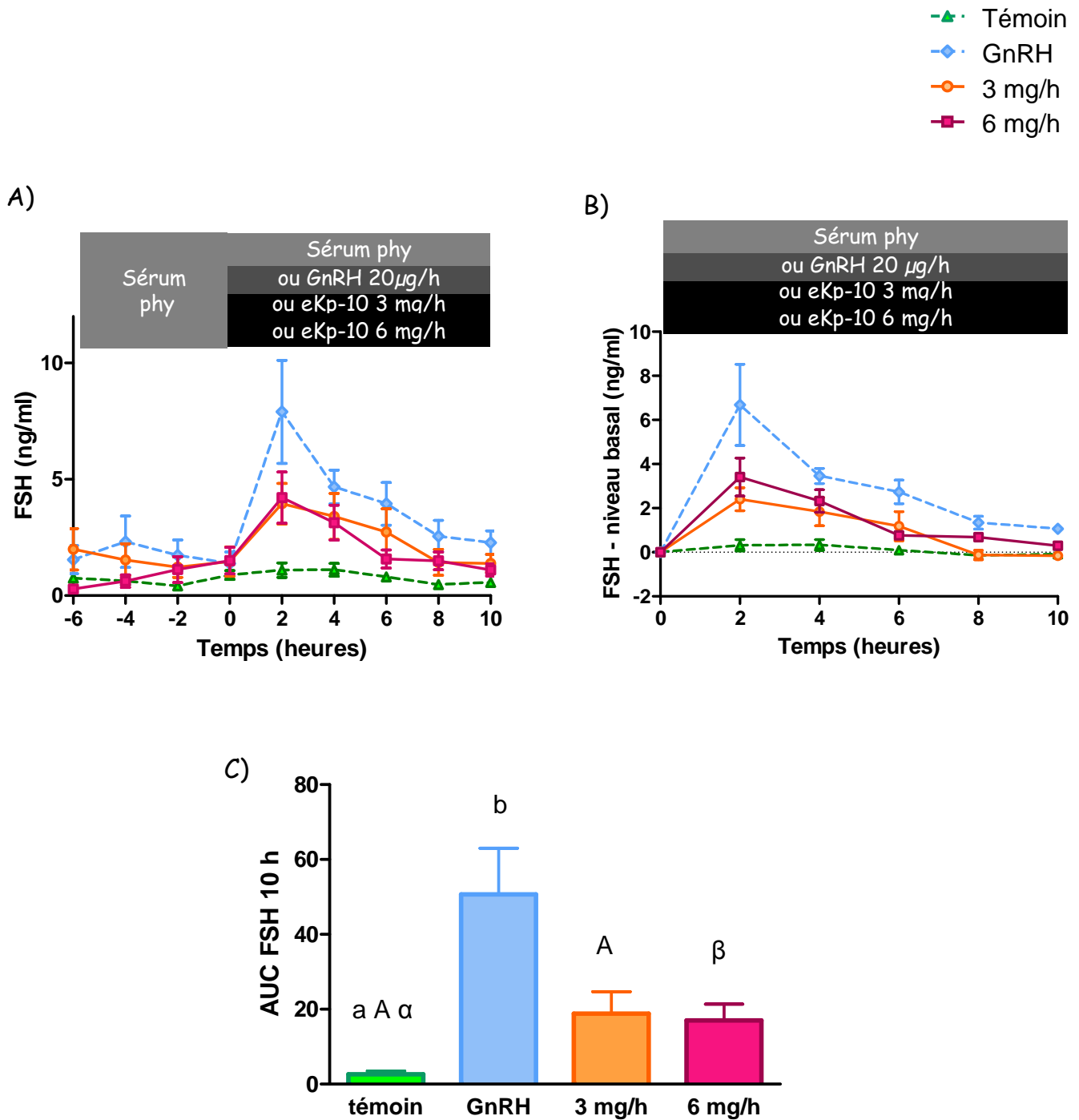


Figure 4.3: Chapitre IV : Concentrations plasmatiques de FSH durant les 10 premières heures de perfusion de sérum physiologique (n=4), ou de GnRH à la dose de 20 $\mu\text{g}/\text{h}$ (n=4), ou de eKp-10 à la dose de 3 mg/h (n=4) ou de eKp-10 à la dose de 6 mg/h (n=4). Les rectangles horizontaux représentent les durées de perfusion. (A) Moyennes (\pm SEM); (B) Moyennes (\pm SEM) après retranchement du niveau de base; (C) AUCs moyennes (\pm SEM). Les lots différant du lot témoin sont représentés par des lettres différentes (minuscules, majuscules, grecques).

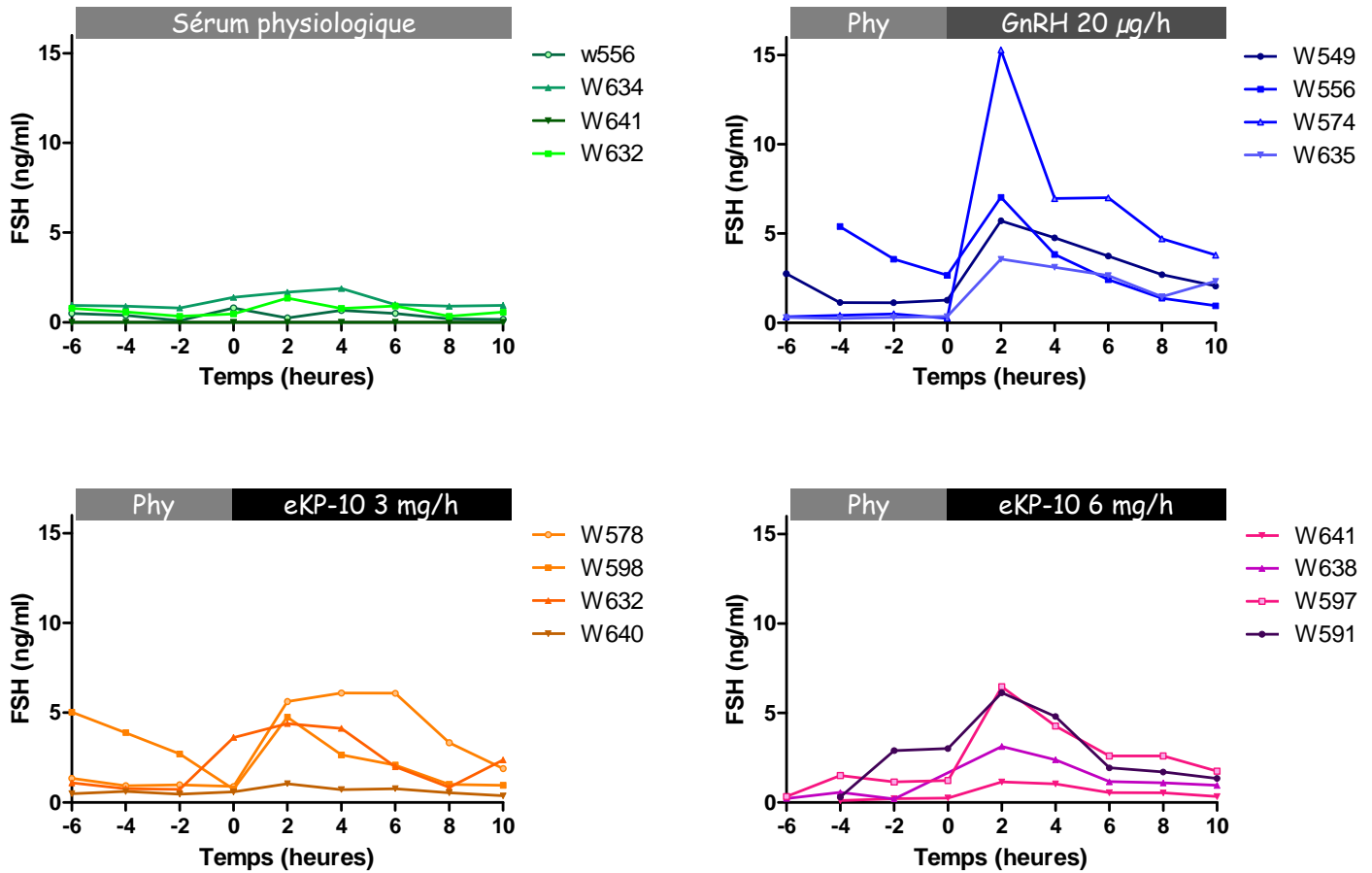


Figure 4.4: Chapitre IV : Profils individuels des concentrations plasmatiques de FSH pendant les 10 premières heures de perfusion de sérum physiologique (n=4), ou de GnRH à la dose de 20 µg/h (n=4), ou de eKP-10 à la dose de 3 mg/h (n=4) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (n=4). Les rectangles représentent les durées de perfusion.

Les valeurs d'AUCs de la FSH durant les 10 premières heures de perfusion diffèrent entre les lots (**figure 4.3.C**). Elles sont supérieures dans les lots GnRH et 6 mg/h comparées à celles du lot témoin.

L'examen des profils individuels montre que les 4 ponettes présentent une augmentation des concentrations de FSH dans les lots GnRH et 6 mg/h. Seules 3 ponettes présentent cette augmentation dans le lot 3 mg/h. Enfin, dans le lot témoin, aucune ponette ne présente d'augmentation des concentrations de FSH (**figure 4.4**).

→ Effets pendant et après les 72 heures de perfusion sur les paramètres endocriniens

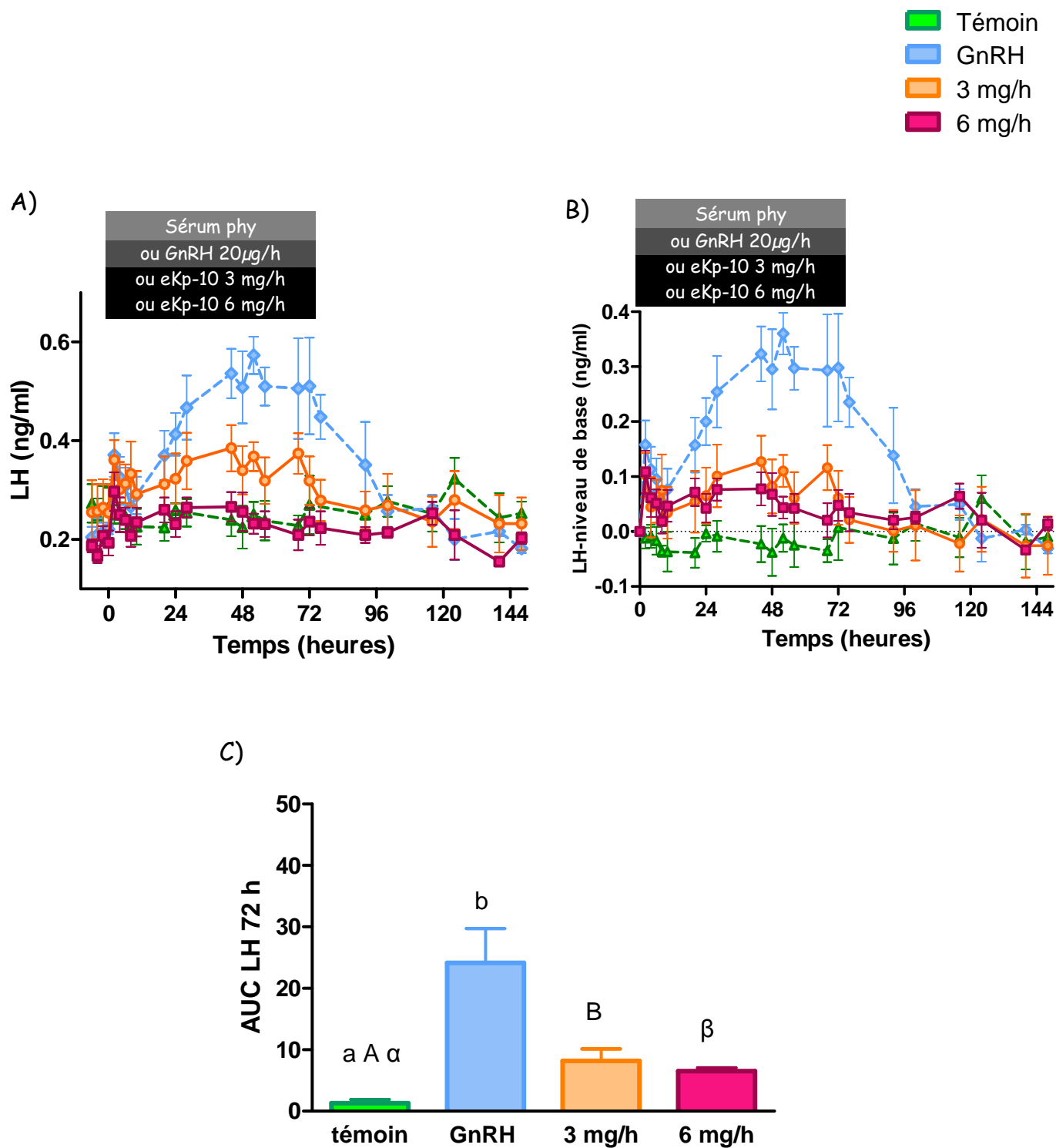
La LH

Les concentrations plasmatiques moyennes de LH pendant et après les 72 heures de perfusion sont présentés sur la **figure 4.5**.

Dans le lot témoin, les concentrations moyennes restent stables pendant toute la durée de la perfusion. Dans les lots GnRH, 3 mg/h et 6 mg/h, la stimulation transitoire observée au cours des 10 premières heures de perfusion est suivie d'un second épisode de stimulation pendant les 72 heures de perfusion. L'amplitude de cette deuxième stimulation semble plus importante pour le lot GnRH, comparée à celle des lots 3 mg/h et 6 mg/h. Après l'arrêt de la perfusion, les niveaux de LH diminuent pour atteindre le niveau de base dans les 24 heures suivantes (**figure 4.5.A**).

Lorsque les niveaux avant perfusion sont retranchés des niveaux en cours de perfusion, la moyenne des concentrations à l'arrêt de la perfusion diffère globalement entre les lots. Ils sont de 0,007 (\pm 0,06) ng/ml, 0,30 (\pm 0,09) ng/ml, 0,06 (\pm 0,05) ng/ml, et 0,04 (\pm 0,03) ng/ml dans les lots témoin, GnRH, 3 mg/h et 6 mg/h respectivement. Lorsque ces valeurs sont comparées 2 à 2 par rapport à celles du lot témoin, seules les valeurs du lot GnRH sont supérieures à celles du lot témoin (**figure 4.5.B**).

L'augmentation des concentrations plasmatiques de LH pendant les 72 heures de perfusion, dans les 3 lots traités, se traduit par une différence globale dans les valeurs d'AUCs



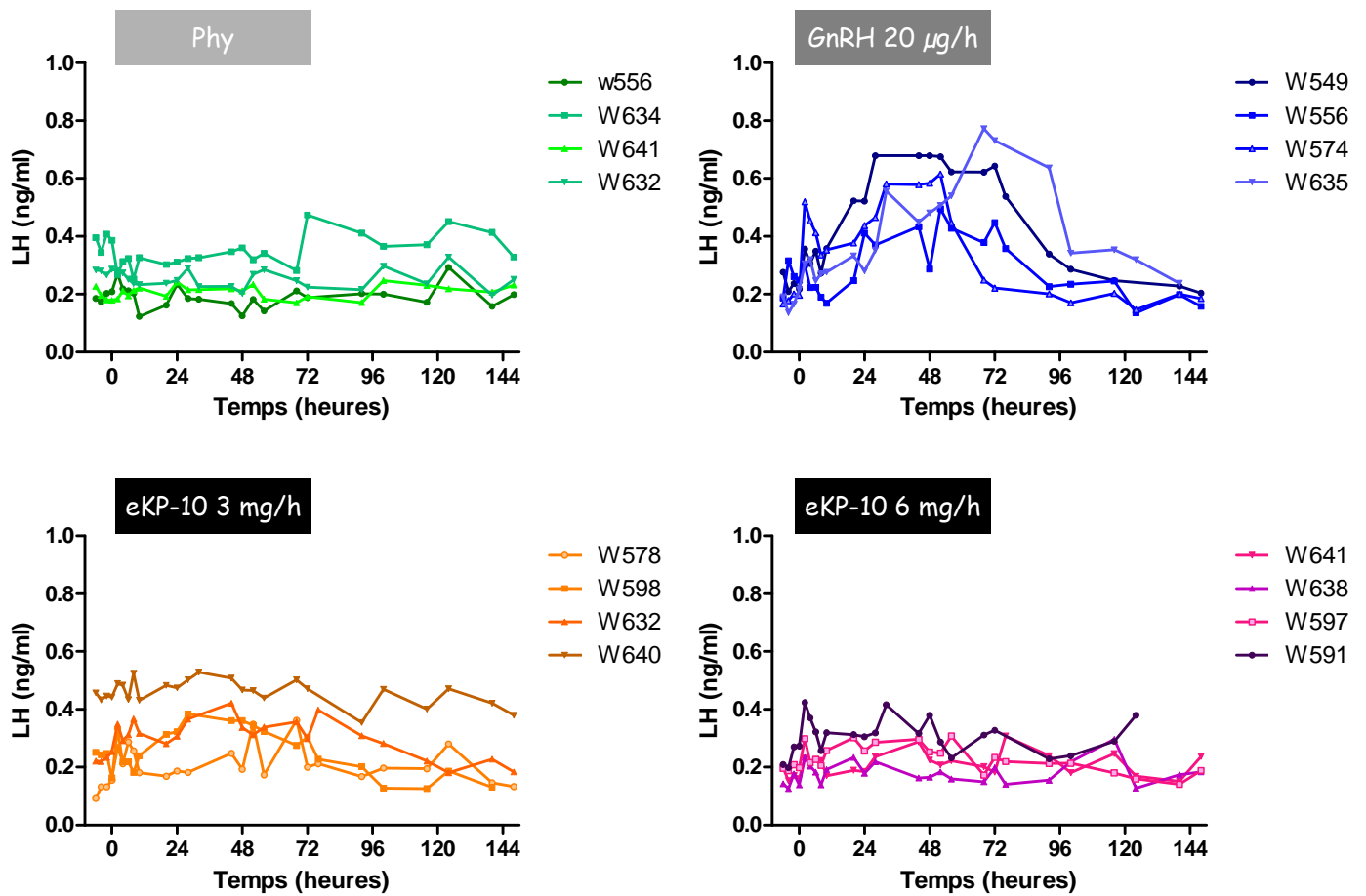


Figure 4.6: Chapitre IV : Profils individuels des concentrations plasmatiques de LH pendant et après les 72 heures de perfusion de sérum physiologique (n=4), ou de GnRH à la dose de 20 µg/h (n=4), ou de eKP-10 à la dose de 3 mg/h (n=4) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (n=4). Les rectangles représentent les durées de perfusion.

(**figure 4.5.C**). Lorsque ces valeurs sont comparées 2 à 2 par rapport à celle du lot témoin, elles sont supérieures dans les 3 lots traités comparées à celle du lot témoin.

L'examen des profils individuels (**figure 4.6**) montre que :

- Dans le lot témoin, aucune ponette ne montre d'augmentation de la LH en cours de perfusion.
- Dans le lot GnRH, toutes les ponettes montrent un profil biphasique et pour 3 des ponettes, des niveaux de LH élevés sont maintenus pendant les 72 heures de perfusion. Pour la ponette W574, les concentrations de LH diminuent brusquement au bout de 52 heures de perfusion. A ce moment, le système de perfusion a dû être débranché car le cathéter était sorti accidentellement de la veine jugulaire.
- Dans le lot 3 mg/h, les niveaux de base en LH sont très hétérogènes, et les concentrations plasmatiques augmentent de façon très variable entre les 4 ponettes.
- Dans le lot 6 mg/h, les niveaux de base en LH sont plus homogènes, et les concentrations plasmatiques augmentent légèrement chez les 4 ponettes.

La FSH

Les concentrations plasmatiques moyennes de FSH pendant et après les 72 heures de perfusion sont présentés sur la **figure 4.7**.

Dans le lot témoin, les concentrations restent au niveau de base pendant toute la durée de la perfusion. Dans les 3 lots traités, après la stimulation initiale observée au cours des 10 premières heures, il ne semble pas y avoir de second épisode de sécrétion (**figure 4.7.A**). Lorsque les niveaux avant perfusion sont retranchés des niveaux atteints pendant la perfusion, les concentrations de FSH, après la stimulation transitoire, rejoignent le niveau de base dans les 4 lots (**figure 4.7.B**).

Les valeurs d'AUCs de la FSH durant les 72 heures de perfusion ne diffèrent pas entre les lots ($P = 0,095$) (**figure 4.7.C**).

L'examen des profils individuels montre que, après l'épisode de stimulation transitoire, les concentrations plasmatiques de FSH restent basses chez toutes les ponettes des 3 lots traités (**figure 4.8**).

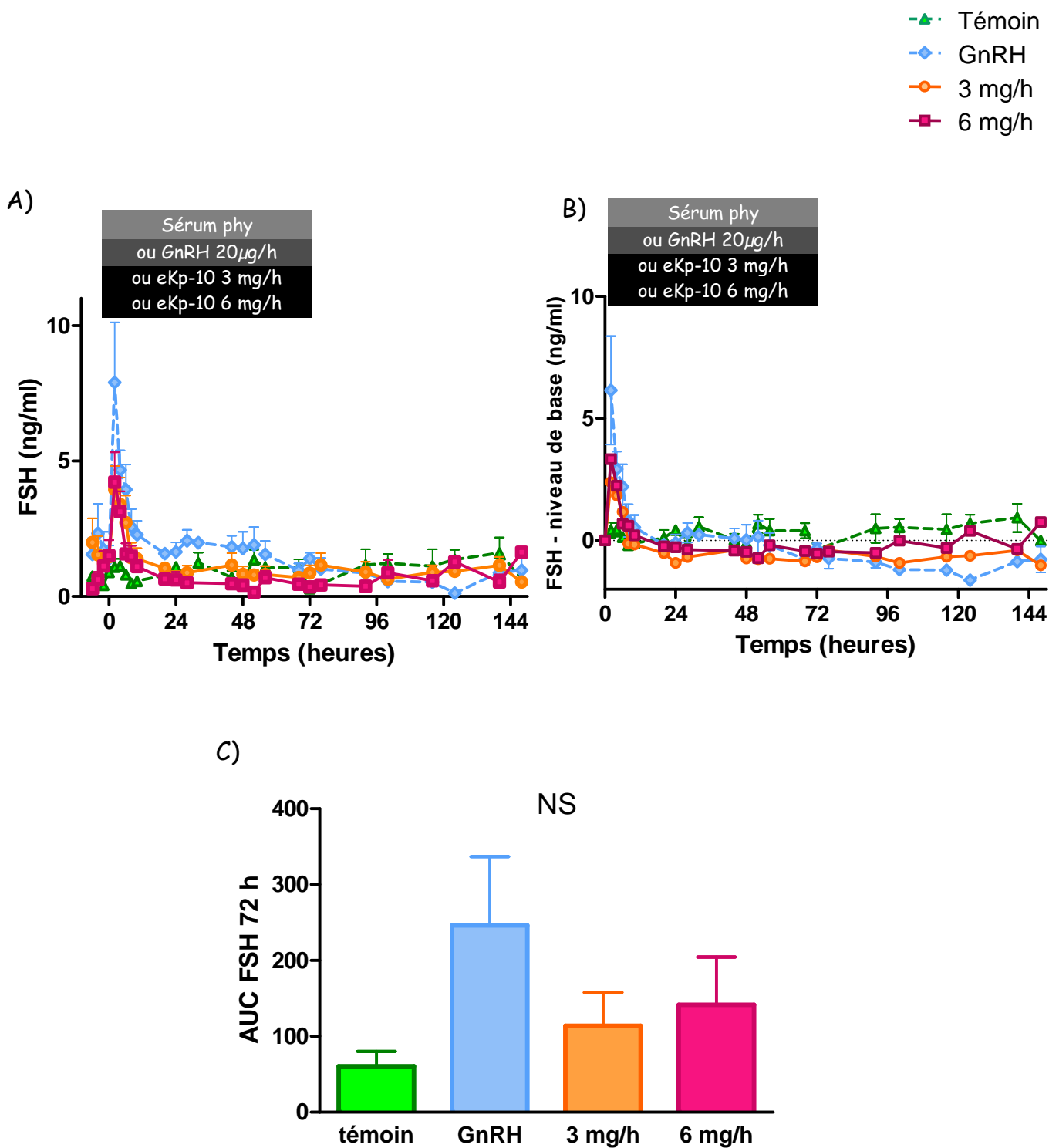


Figure 4.7: Chapitre IV : Concentrations plasmatiques de FSH pendant et après les 72 heures de perfusion de sérum physiologique (n=4), ou de GnRH à la dose de 20 µg/h (n=4), ou de eKp-10 à la dose de 3 mg/h (n=4) ou de eKp-10 à la dose de 6 mg/h (n=4). Les rectangles horizontaux représentent les durées de perfusion. (A) Moyennes (± SEM); (B) Moyennes (± SEM) après retranchement du niveau de base; (C) AUCs moyennes (+ SEM). NS : non significatif.

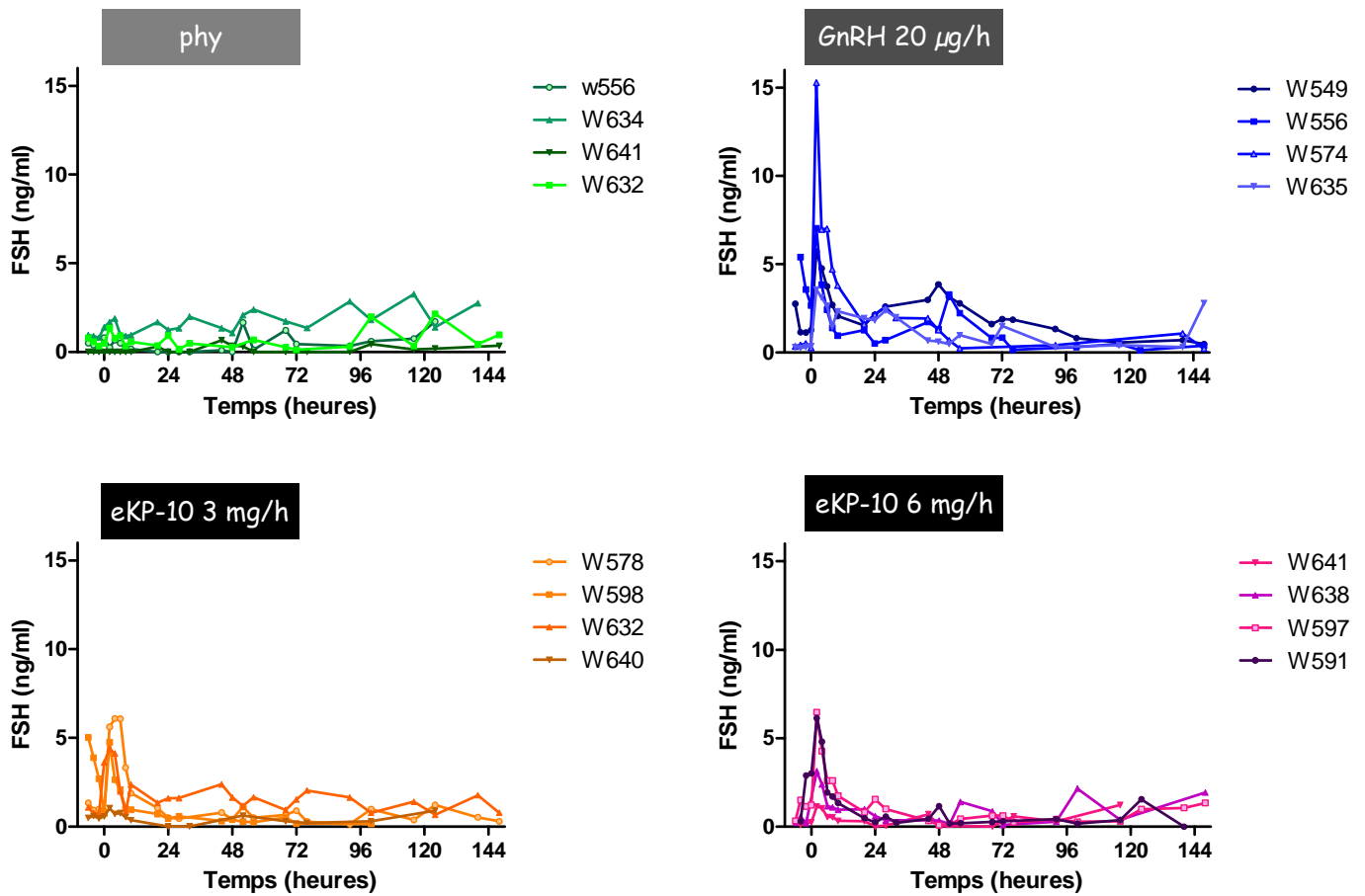
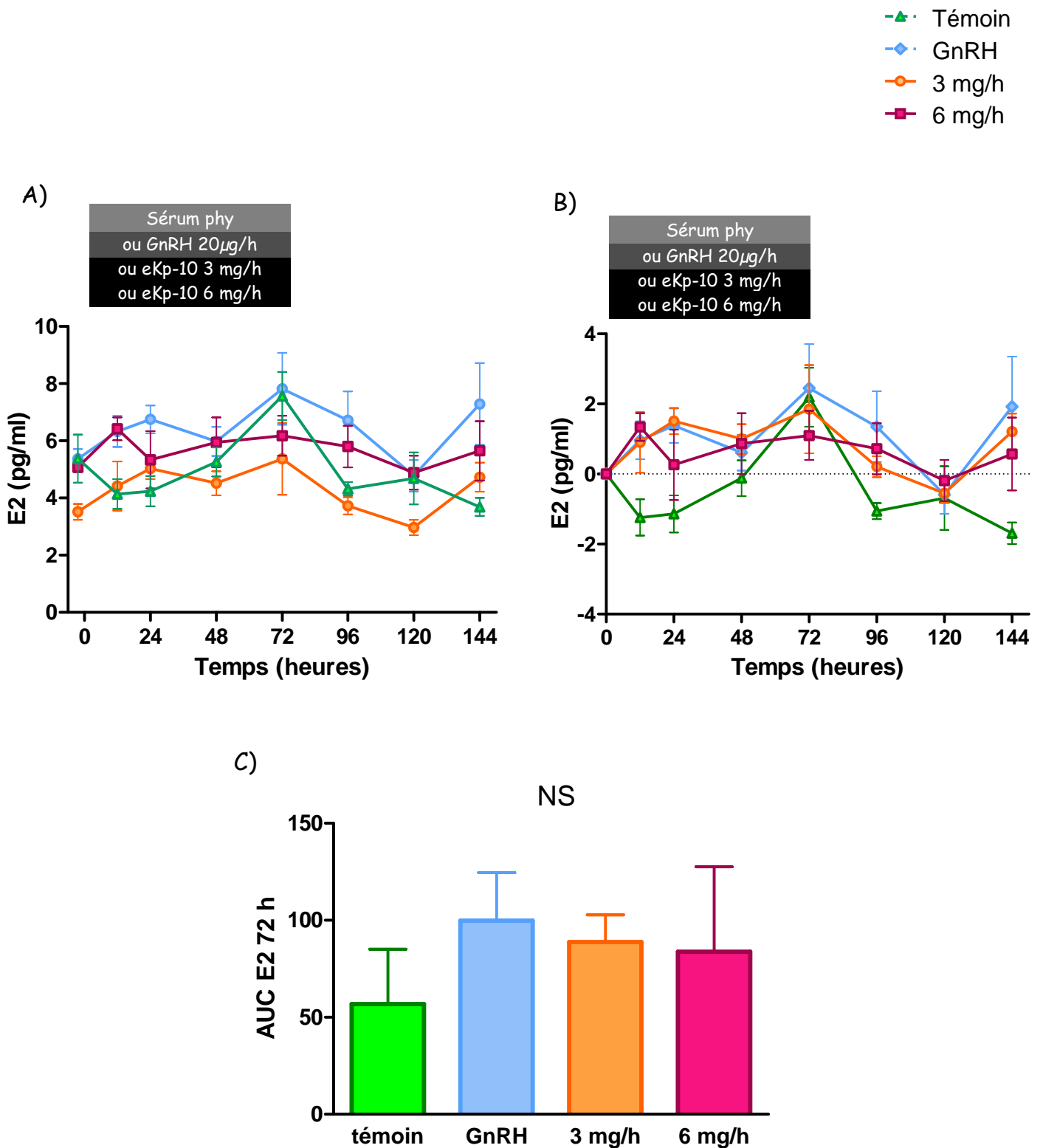


Figure 4.8 : Chapitre IV : Profils individuels des concentrations plasmatiques de **FSH** pendant et après les 72 heures de perfusion de sérum physiologique (n=4), ou de GnRH à la dose de 20 µg/h (n=4), ou de eKP-10 à la dose de 3 mg/h (n=4) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (n=4). Les rectangles représentent les durées de perfusion.



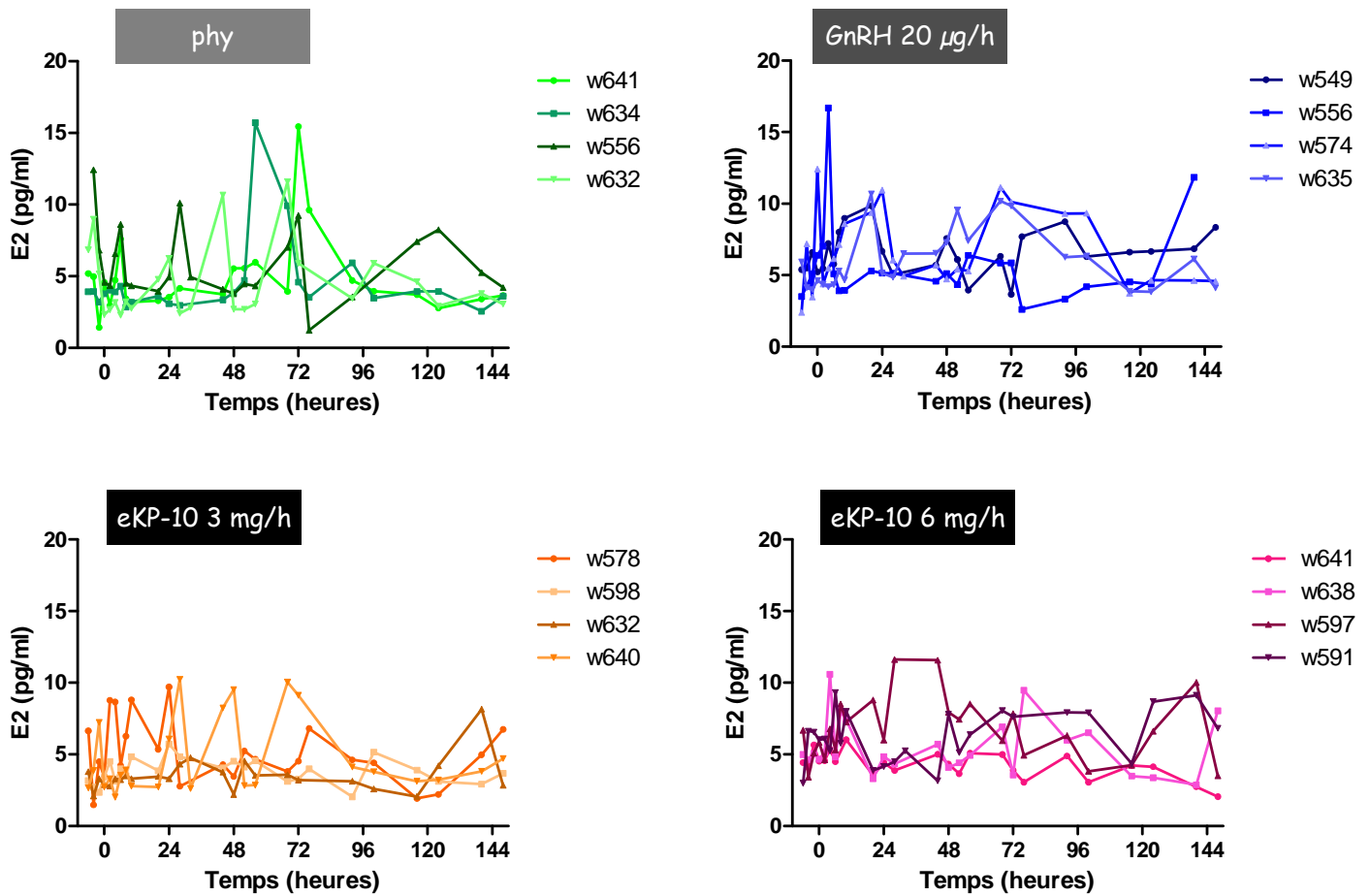


Figure 4.10 : Chapitre IV : Profils individuels des concentrations plasmatiques d'E2 pendant et après les 72 heures de perfusion de sérum physiologique (n=4), ou de GnRH à la dose de 20 µg/h (n=4), ou de eKP-10 à la dose de 3 mg/h (n=4) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (n=4). Les rectangles représentent les durées de perfusion.

L'œstradiol

Les concentrations plasmatiques moyennes d'E2 pendant et après les 72 heures de perfusion sont présentées sur la **figure 4.9**.

Ces concentrations ne semblent pas évoluer dans aucun des 4 lots pendant toute la durée de l'expérience, avec ou sans retranchement des niveaux avant perfusion (**figure 4.9.A et B**).

Les valeurs d'AUCs de l'E2 durant les 72 heures de perfusion ne diffèrent pas globalement entre les lots ($P = 0,36$) (**figure 4.9.C**).

L'examen des profils individuels montre une fluctuation importante des niveaux de l'E2, entre 0 et 15 pg/ml, pendant la totalité de l'expérience chez toutes les ponettes (**figure 4.10**).

La croissance folliculaire

L'évolution de la croissance folliculaire pendant les 6 jours de l'expérience est présentée sur la **figure 4.11**.

La taille moyenne (\pm SD) des plus gros follicules avant perfusion est assez homogène: 15,75 (\pm 2,22), 15,00 (\pm 1,41), 15,50 (\pm 3,11), et 15,75 (\pm 1,50) mm de diamètre pour les ponettes des lots témoin, GnRH, 3 mg/h et 6 mg/h respectivement.

La taille moyenne (\pm SD) des plus gros follicules au bout des 72 heures de perfusion est plus hétérogène mais ne diffère pas entre les 4 lots ($P = 0,44$): 14,50 (\pm 3,11), 17,00 (\pm 2,94), 18,75 (\pm 4,79), et 18,75 (\pm 3,77) mm de diamètre chez les ponettes du lot témoin, GnRH, 3 mg/h et 6 mg/h respectivement.

La taille moyenne (\pm SD) des plus gros follicules au bout de 6 jours (soit 3 jours après l'arrêt de la perfusion) est également hétérogène mais ne diffère pas entre les 4 lots ($P = 0,66$): 16,50 (\pm 3,70), 17,50 (\pm 4,12), 19,75 (\pm 5,32), et 19,25 (\pm 3,20) mm de diamètre chez les ponettes du lot témoin, GnRH, 3 mg/h et 6 mg/h respectivement.

L'examen des profils individuels (**figure 4.12**) montre que la taille du plus gros follicule :

- n'augmente pas chez les 4 ponettes du lot témoin
- augmente chez 2 ponettes sur 4 du lot GnRH
- augmente chez 3 ponettes sur 4 du lot 3 mg/h
- augmente chez 2 ponettes sur 4 du lot 6 mg/h

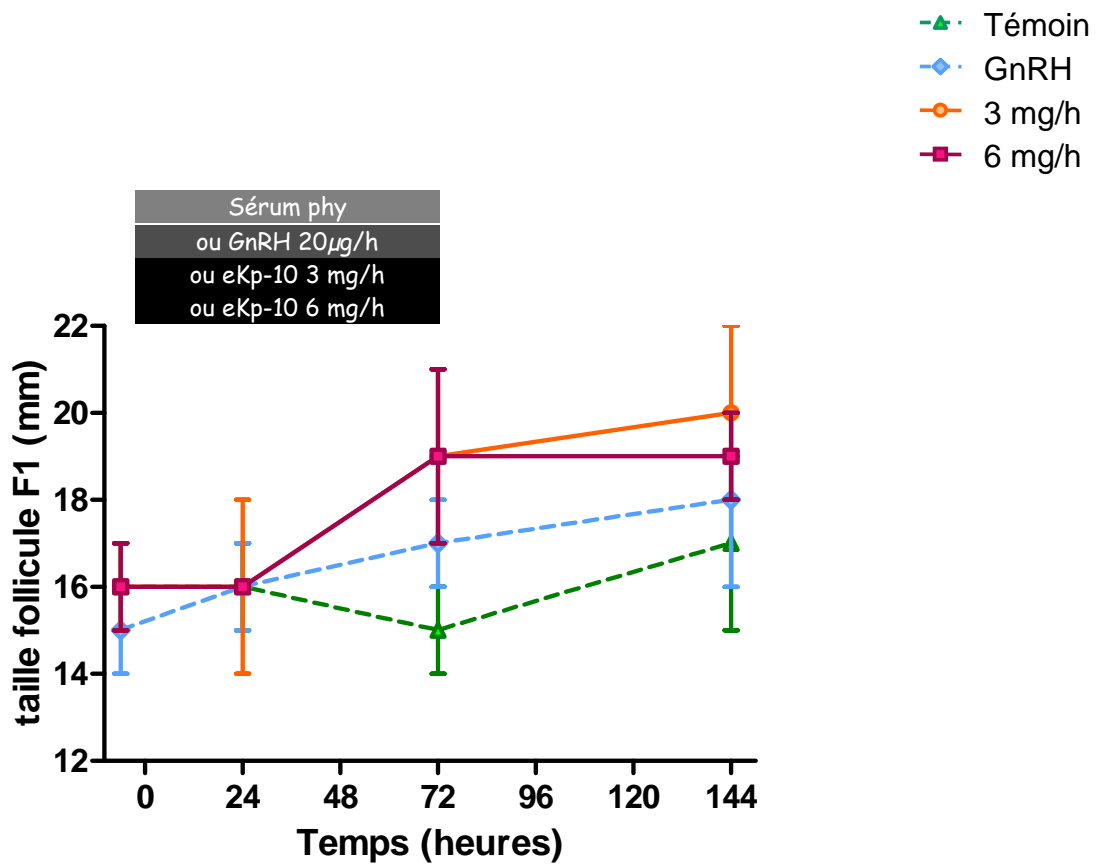


Figure 4.11 : Chapitre IV : Evolution moyenne (\pm SD) de la **taille du plus gros follicule** pendant et après les 72 heures de perfusion de sérum physiologique (n=4), GnRH à la dose de 20 μ g/h (n=4), eKP-10 à la dose de 3 mg/h (n=4) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (n=4). Les rectangles représentent les durées de perfusion.

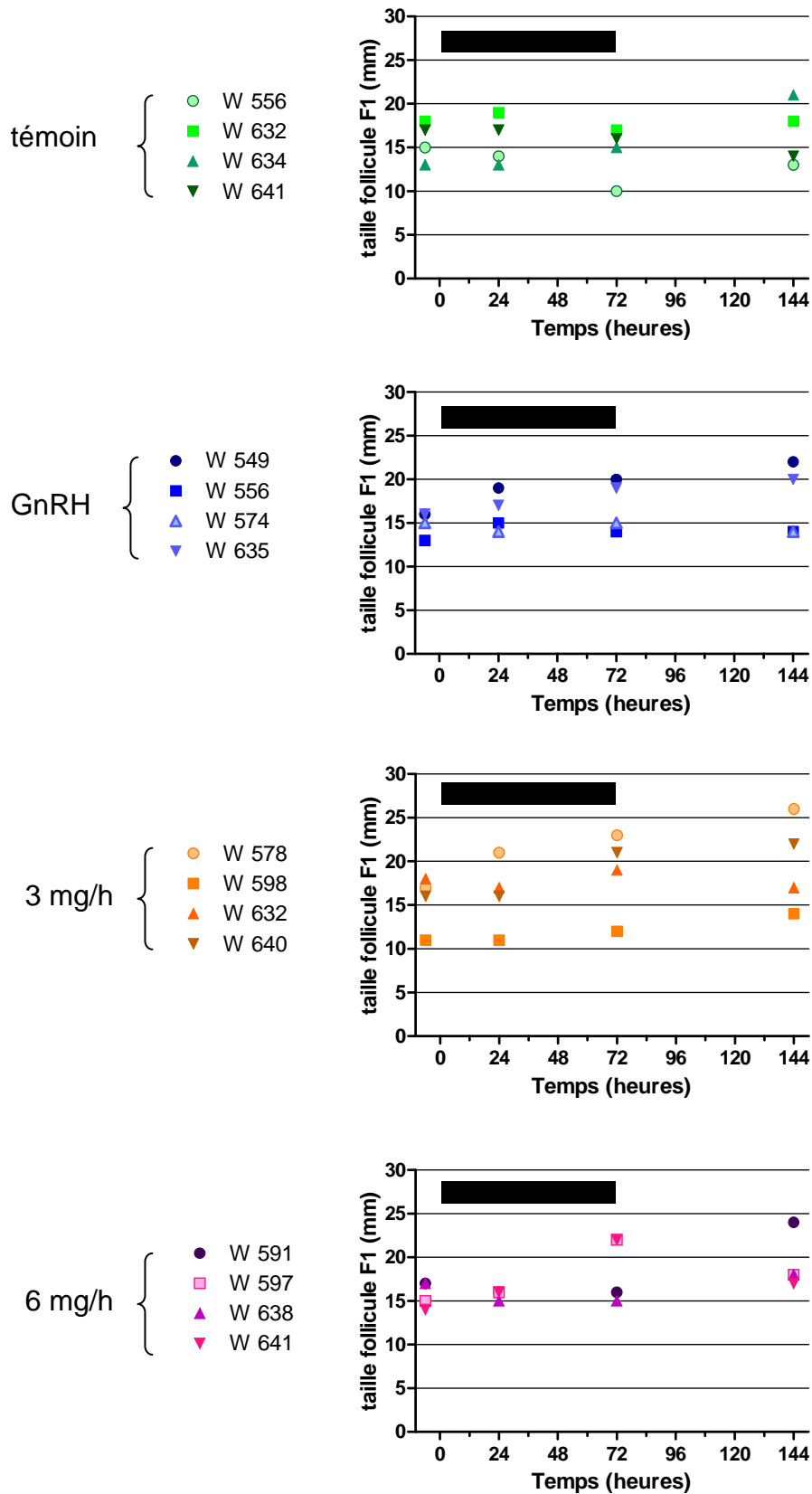


Figure 4.12 : Chapitre IV : Profils individuels de l'évolution de la **taille du plus gros follicule** pendant et après les 72 heures de perfusion de sérum physiologique (n=4), GnRH à la dose de 20 µg/h (n=4), eKP-10 à la dose de 3 mg/h (n=4) ou de eKP-10 à la dose de 6 mg/h (n=4). Les rectangles représentent les durées de perfusion.

4. Discussion

Comme dans les expériences réalisées en période de cyclicité, la stimulation de LH induite par le eKP-10 est transitoire. Il en est de même avec la GnRH. Ainsi la stimulation transitoire des gonadotropines serait attribuable en grande partie à une limitation des capacités de sécrétion de l'hypophyse. De plus, en période d'anoestrus, après cet épisode de sécrétion transitoire de quelques heures, la sécrétion de LH est de nouveau stimulée pendant le reste de la perfusion.

Doses réellement reçues :

Comme dans les expériences précédente, les doses de eKP-10 reçues par les ponettes sont légèrement inférieures aux doses théoriques, mais comparables à celles de l'expérience 3 et 6 mg/h pendant 72 h en période de cyclicité (2,53 *versus* 2,78 mg/h et 4,95 *versus* 5,2 mg/h respectivement).

Néanmoins, les ponettes du lot 6 mg/h ont toutes reçu une dose correspondant approximativement au double de la dose reçue par les ponettes du lot 3 mg/h.

Profils endocriniens :

Cette expérience montre qu'une perfusion de eKP-10 aux doses de 3 et 6 mg/h est capable d'induire une augmentation des concentrations plasmatiques de LH et FSH chez la ponette en anoestrus. Une stimulation transitoire est observée au cours des 10 premières heures de perfusion, avec un maximum de concentration atteint au bout de 2 heures. Ce profil est semblable à celui observé dans les expériences de perfusion en période de cyclicité. En revanche, les concentrations plasmatiques de LH augmentent à nouveau après cette stimulation transitoire ce qui n'avait pas été observé pendant la période de cyclicité. La perfusion de GnRH induit également une stimulation biphasique de la LH et monophasique de la FSH.

Pendant les 10 premières heures de perfusion :

Pendant les 10 premières heures de perfusion, les profils de sécrétion sont très comparables entre les lots traités avec le eKP-10 et avec la GnRH. La stimulation transitoire des gonadotropines dans le lot GnRH peut être raisonnablement attribuée à un épuisement du stock hypophysaire immédiatement libérable. En effet, il est bien établi que le récepteur équin

de la GnRH est particulièrement résistant à la désensibilisation (Porter MB, 2002) ; de plus la stimulation de la LH semble reprendre au bout d'une vingtaine d'heures, ce qui ne serait pas le cas si la GnRH avait provoqué une désensibilisation. La stimulation transitoire des gonadotropines également observée dans les 2 lots traités avec le eKP-10, nous permet d'appliquer raisonnablement le même raisonnement pour ces 2 lots. En période de cyclicité, nous avons également observé cette réponse avec le eKP-10, mais avec des concentrations de gonadotropines presque 10 fois supérieures. Les auteurs utilisant la GnRH en période d'anoestrus ont également rapporté cette différence relative de concentrations (Williams et al., 2000), confirmant les moindres capacités de synthèse et/ou de libération de la LH pendant la période d'anoestrus.

La stimulation transitoire des gonadotropines en période de cyclicité peut donc être attribuée, au moins en partie, à un épuisement du stock hypophysaire immédiatement disponible.

Pendant et après les 72 heures de perfusion :

LH :

Les concentrations plasmatiques augmentent de nouveau dans les 3 lots traités après l'épisode de stimulation transitoire, mais l'amplitude de cette augmentation est plus élevée avec la perfusion de GnRH. Ainsi, dans les 2 lots traités avec l'eKP-10, les concentrations de LH restent maintenues à un niveau constant alors qu'elles atteignent des niveaux 3 fois plus élevés dans le lot GnRH. Cette reprise de sécrétion peut être attribuable à une synthèse *de novo* de LH puisqu'une nouvelle synthèse de cette hormone peut se produire en une vingtaine d'heures environ (C. Taragnat, communication personnelle). Néanmoins il existe une forte différence des concentrations plasmatiques de LH observées entre le traitement par la GnRH ou le eKP-10 à ce stade. Une libération de GnRH sous l'influence du eKP-10 dans une proportion très inférieure aux quantités produites par le traitement direct avec la GnRH est certainement l'hypothèse la plus probable qui permet d'expliquer ces différences.

Ce profil de sécrétion biphasique de la LH au cours des premières heures de perfusion de GnRH n'est pas rapporté dans la bibliographie. Hyland et collaborateurs (1987) ont bien observé un profil bi-phasique de la sécrétion de LH, mais beaucoup plus tard. En effet, des juments recevant une perfusion de GnRH ($100 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) pendant 28 jours par l'intermédiaire de pompes osmotiques placées sous la peau, présentent un premier pic de LH au bout de 7 jours et un second pic au bout de 21 jours de traitement (Hyland *et al.*, 1987). Les juments ayant ovulé pendant le traitement ont présenté ce profil bi-phasique. Les juments ayant ovulé en cours de traitement ont présenté les 2 pics de LH, contrairement aux juments

n'ayant pas ovulé qui n'ont présenté que le premier pic. Cependant, lors de ces expériences, les prélèvements sanguins ont été effectués de façon plus espacée que dans notre expérience et n'ont peut-être pas permis d'observer l'épisode de stimulation transitoire précoce.

Enfin, au vu des données de la littérature, il ne faut pas oublier l'effet inhibiteur des RFRPs (RFamide-related peptide). Ces molécules ayant un fort rôle inhibiteur sur la sécrétion de la GnRH en contre saison. Les RFRPs pourraient diminuer la synthèse de la GnRH et donc par conséquent, l'action stimulante du KP serait restreinte aux quantités de GnRH synthétisées.

Ces résultats amènent aux constats suivants :

- la GnRH est plus efficace pour stimuler la LH que le eKP-10. Ceci confirme les résultats de l'expérience précédente comparant les effets d'une injection unique de eKP-10 et de GnRH,
- avec le eKP-10 en période d'anoestrus, contrairement à ce que nous avons observé en période de cyclicité, la stimulation de la sécrétion de LH reprend et se maintient pendant le reste de la perfusion.

La principale différence que nous mettons en évidence entre la période de cyclicité et la période d'anoestrus est la sécrétion d'œstradiol qui est stimulée en période de cyclicité et pas en période d'anoestrus. Cette stéroïdogénèse réduite lors de traitements d'induction de cycles en période d'anoestrus a déjà été rapportée par différents auteurs (Hyland *et al.*, 1987; Schauer *et al.*, 2011). L'hypothèse que nous avons émise en période de cyclicité sur un effet modérateur du KP passant par l'œstradiol est ici renforcée. Le rétrocontrôle négatif de l'œstradiol limiterait une stimulation trop rapide de la croissance folliculaire par le système KP. En conséquence, la dynamique du cycle pourrait n'être que très peu modifiée. En période d'anoestrus, par contre, l'administration de eKP-10, en maintenant une stimulation continue de la LH, pourrait être capable d'induire un cycle, même si le rétrocontrôle de l'œstradiol se met ultérieurement en place.

FSH :

Après l'épisode de stimulation transitoire, les niveaux de FSH restent bas, contrairement à ceux de LH, et ce dans les 3 lots traités. Ces données suggèrent une régulation différentielle du eKP-10 et de la GnRH sur la sécrétion de LH et de FSH pendant l'anoestrus. L'équipe de Becker et collaborateurs a montré qu'une perfusion de GnRH chez des juments en anoestrus induisait une augmentation des concentrations plasmatiques de LH alors que celles de FSH

n'étaient pas différentes des témoins. On doit noter que lors de cette expérience il existe une grande variabilité des niveaux plasmatiques de FSH entre les groupes. De plus, il semblerait que les concentrations de FSH aient diminué pendant la perfusion (Becker et Johnson, 1992). Il est à noter que dans cette expérience, un seul prélèvement par jour avait été effectué, ne permettant pas d'observer d'éventuelles variations rapides de l'hormone. Les auteurs suggèrent que la diminution des concentrations plasmatiques de FSH pourrait provenir d'une sécrétion d'inhibine et /ou d'E2 par les follicules, en réponse à la perfusion de GnRH. Or, chez la jument, l'E2 n'est pas stimulé suite à une administration de GnRH ou de eLH pendant la période d'anoestrus (Hyland *et al.*, 1987; Schauer *et al.*, 2011). Dans notre expérience, nous n'avons observé de variations des concentrations plasmatiques d'E2 dans aucun des 3 lots traités. Il serait donc intéressant d'étudier les variations d'inhibine suite à une perfusion de KP afin d'évaluer son effet sur la sécrétion de FSH.

Enfin, la différence entre les profils de sécrétion des hormones LH et FSH suite à la perfusion de eKP-10 pourrait provenir du mode d'administration continue qui favoriserait plutôt la sécrétion de LH, en induisant des fréquences rapides de libération de la GnRH. La sécrétion de FSH serait alors absente due au fait que la synthèse de la sous unité β de la FSH est favorisée lorsque la pulsativité de la GnRH est faible (Kaiser *et al.*, 1997). L'origine de cette dissociation de sécrétion entre la LH et la FSH lors d'une perfusion de eKP-10 reste cependant à confirmer. Néanmoins, un simple phénomène de désensibilisation des récepteurs GPR54 n'expliquerait pas que la sécrétion soit transitoire spécifiquement pour la FSH.

Si nous comparons les résultats de cette expérience avec ceux obtenus chez la brebis, la différence majeure concerne les profils de sécrétion de l'E2. En effet chez la brebis en anoestrus, la perfusion de KP-10 induit une stimulation de la LH qui stimule fortement la sécrétion d'E2. Si les concentrations plasmatiques d'E2 atteignent un certain seuil, elles entraînent un rétrocontrôle négatif puis positif sur la sécrétion de LH conduisant à l'apparition du pic pré-ovulatoire une vingtaine d'heures plus tard (Caraty *et al.*, 2007; Sebert *et al.*, 2010). Dans notre expérience, aucun des lots traités ne montre de stimulation des concentrations d'E2. Ceci est conforme aux résultats de Hyland et collaborateurs (1987) qui n'ont pas observé d'augmentation des concentrations plasmatiques d'E2, chez la jument en anoestrus recevant une perfusion sous-cutanée de GnRH ($100 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$) pendant 28 jours (Hyland *et al.*, 1987). Les différences observées entre les deux espèces relatives aux effets du

KP-10 sur l'axe gonadotrope et l'ovulation semblent donc attribuables à des dynamiques de croissance folliculaire et de rétrocontrôle de l'œstradiol différentes.

Croissance folliculaire :

Aucun effet n'est observé sur la croissance folliculaire pendant et après la perfusion de eKP-10 ou de GnRH. Pour espérer voir un effet, il aurait probablement fallu appliquer le traitement plus longtemps, puisque le traitement de GnRH (perfusion i.v. 20 µg/h) permet d'obtenir des ovulations en moyenne après 12 jours de traitement (Becker et Johnson, 1992).

La suite logique de cette expérience serait donc d'appliquer le traitement de eKP-10 pendant une plus longue durée, afin de vérifier si, à l'instar de la GnRH, il permet de maintenir une stimulation de LH qui soutient la croissance folliculaire jusqu'à l'ovulation.

Discussion générale/Conclusion

1. Principaux résultats obtenus et hypothèses formulées

Au cours de ce travail, nous avons montré pour la première fois que des cellules immunoréactives pour le KP étaient présentes dans l'hypothalamus de la jument au moment de l'ovulation. Leur distribution et leur proximité avec le système à GnRH indique que, comme pour les autres espèces, ce système exerce probablement un rôle majeur dans la régulation de la fonction de reproduction chez la jument.

Lors de toutes les expériences en période de cyclicité ou d'anoestrus, nous avons observé suite à une administration continue du peptide, une stimulation transitoire de la LH et de la FSH, pendant une vingtaine d'heures. Il est vraisemblable qu'un épuisement ou une forte diminution de la réserve hypothalamique en GnRH et/ou de la réserve hypophysaire en gonadotropines soit principalement responsable de ce mécanisme. Il ne semble donc pas possible de stimuler de façon continue la libération des hormones gonadotropes avec ce type de molécule, ou de traitement, chez la jument. Un effet similaire a été observé chez d'autres espèces. Néanmoins, en particulier chez la brebis, la prolongation de la stimulation continue de KP a permis d'induire un pic préovulatoire de LH et une ovulation. Le travail mené pendant la période de cyclicité, montre que nous n'avons pas réussi à maîtriser le cycle de la ponette avec une perfusion de eKP-10. Il est vraisemblable que pour cette espèce, un délai incompressible nécessaire à la croissance du follicule jusqu'à l'ovulation existe, limitant les effets d'une stimulation plus intense ou plus prolongée des gonadotropines que lors d'un cycle naturel. Par ailleurs, les mécanismes mis en jeu semblent différents de ceux qui s'exercent chez d'autres espèces, comme chez la brebis par exemple. Un rétrocontrôle négatif permanent de l'œstradiol, y compris en phase pré-ovulatoire, semble présider chez la jument. Cette particularité semble exclure toute possibilité de sur-stimulation ou d'interventions pharmacologiques ayant pour objectif d'avancer et/ou de multiplier le nombre d'ovulations. Finalement, en période d'anoestrus, même si les effets d'une perfusion de eKP-10 semblent moins efficaces sur la libération de la LH comparés à une perfusion de GnRH, la sécrétion de LH est maintenue pendant toute la durée d'administration du peptide. Ce dernier résultat est encourageant. Il permet d'espérer l'induction d'un cycle par une perfusion prolongée de kisspeptide chez cette espèce si des outils adéquats d'administration de ces molécules (agonistes, forme à dégradation lente et donc à effet prolongé...) deviennent disponibles.

Il nous paraît important de souligner ici les difficultés techniques d'utilisation du modèle équin auxquelles nous avons été confrontés durant les expérimentations. En effet, la lourdeur

des manipulations du fait de contraintes liées à l'animal lui-même (poids, dangerosité des interventions, problèmes liés aux perfusions en continu en laissant l'animal libre de ses mouvements pour limiter le « stress » des expérimentations....) ont limité le nombre de ponettes affectées à chaque lot. Cet élément est important car, comme pour tout matériel biologique et en particulier quand on s'adresse à des individus d'une population, il existe toujours une certaine variabilité. Nous avons essayé au cours de ce travail de la réduire au maximum, notamment en sélectionnant les animaux à un stade du cycle donné et pour une taille précise du follicule dominant. Néanmoins, une augmentation du nombre de ponettes par lot, de 4 à 6-8, nous aurais permis parfois d'éliminer ou de gommer le poids d'un animal atypique (par exemple animal ne répondant pas à l'injection de prostaglandine ou de GnRH), de mieux cerner l'effet ou l'absence d'effet d'un traitement et de faire ressortir des différences statistiques entre les groupes.

2. Questions restant posées à l'issue de ce travail

→ **Pourquoi les doses utilisées chez la jument sont-elles si élevées ?**

Il est rapporté dans la littérature qu'une dose aussi faible que 1 fmol de KP-54 entraîne une libération de la LH chez la souris (Gottsch *et al.*, 2004). Chez la jument, il ressort de nos expériences et de celle de Magee et collaborateurs (2009) que les doses efficaces sont bien supérieures à celles utilisées dans les autres espèces. Il serait intéressant de comprendre pourquoi les doses efficaces chez la jument sont si élevées.

Chez la brebis en inactivité, une perfusion de KP-10 à la dose de 20 µg/h est capable de stimuler la sécrétion de LH de façon suffisante pour induire un cycle complet suivi d'une ovulation. Le poids moyen d'une brebis se situe aux alentours de 60 kg, ce qui correspond à une concentration de 0,33 µg/h/kg. Chez la jument poney en inactivité, une perfusion de eKP-10 à la dose de 3 mg/h stimule la LH mais ne semble néanmoins pas capable d'induire un cycle. Le poids moyen d'une jument poney est d'environ 300 kg, ce qui correspond à une concentration de 10 µg/h/kg. Il y a donc un facteur 30 entre les doses utilisées chez la jument et celle stimulantes chez la brebis.

Si l'on s'intéresse aux doses de GnRH utilisées en perfusion intraveineuse pour induire un cycle en contre saison, la dose minimale chez la brebis (60 kg) est de 0,125 µg/h, soit 0,002 µg/h/kg (McNatty *et al.*, 1988). Chez la jument (400 kg), la dose est de 20 µg/h soit 0,05

µg/h/kg (Becker et Johnson, 1992). Il y a donc un facteur 25 entre les doses utilisées chez la jument et chez la brebis.

En conséquence, le rapport des doses efficaces chez la brebis et la jument pour observer un effet stimulant est semblable pour le KP-10 et la GnRH. Il est très probable que ces deux observations sont fortement liées, les effets du KP étant majoritairement, si ce n'est exclusivement transmis par la GnRH. Nous ne disposons que de peu d'éléments pour proposer des hypothèses à cette faible sensibilité de l'espèce équine à la GnRH et au KP. Au plan neuroanatomique les deux espèces diffèrent. L'hypophyse est située dans une selle turcique fermée chez la brebis et ouverte chez la jument. Il est donc possible que les systèmes de vascularisation de l'hypophyse et de l'éminence médiane diffèrent entre ces espèces, aboutissant à une différence de biodisponibilité immédiate de ces peptides quand ils sont administrés par voie périphérique. Néanmoins, d'autres facteurs peuvent intervenir dans la réponse de l'hypophyse à ces stimulations. C'est par exemple la disponibilité et le nombre de récepteurs à la GnRH présents dans la glande et en particulier leurs variations au cours du cycle. Pour l'espèce équine, les données concernant ce point sont pratiquement inexistantes. Enfin, le projet initial de cette thèse, qui était de contrôler la reproduction chez la ponette par le kisspeptide, semble peu réaliste pour des raisons de rentabilité et faisabilité, le eKP-10 devant être utilisé à des concentrations très élevées.

→ Pourquoi la sécrétion de FSH est-elle plus stimulée que celle de LH lors de perfusion de eKP-10 de courte durée ?

Ce résultat diffère de celui obtenu dans d'autres espèces. Par exemple chez la brebis l'amplitude des variations de FSH en réponse à un traitement par le kisspeptide est bien moindre que celle de la LH (Caraty *et al.*, 2007). Par ailleurs, chez la ponette, les profils de sécrétion de la FSH sont plus homogènes que ceux de la LH. Nous ne disposons pas pour l'instant de données nous permettant d'expliquer ce résultat. Si l'on s'intéresse à la demi-vie de ces hormones, elle est supérieure pour la FSH par rapport à la LH aussi bien chez les équins que les ovins (cf synthèse bibliographique). Il est bien connu que ces hormones sont polymorphes avec 13 isoformes pour la LH ovine (Keel *et al.*, 1990; Zalesky *et al.*, 1992) et 9 isoformes pour la FSH ovine (Keel et Schanbacher, 1987). Par ailleurs le contenu en acide sialique de ces isoformes est en relation étroite avec leur demi-vie. On peut se demander au vu des profils de libération de la FSH en réponse au kisspeptide si les formes secrétées ne sont pas majoritairement des formes à demi-vie courte compte tenu de la diminution rapide

des concentrations de l'hormone mesurée dans le sang des ponettes. Inversement, les études de demi-vie ayant utilisé des hormones purifiées à partir d'hypophyse entières doivent peut-être aussi être reconsidérées. En effet, les formes présentes dans l'hypophyse ne sont probablement pas identiques à celles libérées dans la circulation sanguine. Il n'existe pour le moment aucune donnée bibliographique qui indique les isoformes libérées chez les équins.

→ Qu'elle est la durée optimale d'une perfusion de eKP-10 ?

Un point intéressant à discuter concerne les effets obtenus sur la sécrétion de la LH pendant la période de cyclicité en fonction du temps de perfusion du eKP-10. Nous avons remarqué que, plus la durée de perfusion augmente, moins les effets stimulants sur la sécrétion de la LH sont visibles. Prenons l'exemple d'une perfusion de eKP-10 à la dose de 6 mg/h en début de phase folliculaire. Elle induit une stimulation de la LH dont les niveaux restent élevés après l'arrêt de la perfusion et pendant tout le cycle. Une perfusion de 72 heures induit une stimulation de la LH pendant les 10 premières heures, puis les niveaux diminuent pendant le reste de la perfusion mais le démarrage du pic pré-ovulatoire tend à être avancé et les ponettes traitées ovulent un jour plus tôt que les témoins. Enfin, une perfusion pendant un cycle complet (jusqu'à ovulation naturelle) induit une stimulation de la LH pendant les 10 premières heures de perfusion, puis les niveaux diminuent pendant la perfusion mais le démarrage du pic pré-ovulatoire n'est pas avancé et les ovulations ne diffèrent pas entre les animaux traités et les témoins.

Comme nous l'avons montré dans ce travail cette absence d'effet net d'une perfusion de eKP-10 pendant tout le cycle résulte probablement de la mise en place d'un système que l'on pourrait qualifier de réfractaire. Celui-ci pourrait inclure une diminution des stocks de gonadotropines et de GnRH disponibles, des phénomènes de désensibilisation partielle ou de rétrocontrôle négatif.

Au vu de ces constatations, il aurait peut être été intéressant de réaliser des perfusions fractionnées (6 heures de eKP-10 tous les jours du cycle et à la même heure) afin de déterminer si les effets stimulants sur la LH peuvent être répétés tout au long de l'expérimentation. Toutefois, une étude ayant montré que l'expression du gène GPR54 était plus importante à 13 h qu'à 01 h chez le macaque femelle (Eghlidi *et al.*, 2010), il faudrait au préalable déterminer si il existe une période optimum de réponse au KP exogène.

→ **L'administration continue du eKP-10 permet-elle une stimulation optimale des gonadotropines ?**

Au niveau de l'éminence médiane, la sécrétion du KP est pulsatile chez le singe femelle au moment de la puberté, avec un pulse par heure environ, et 75 % des pulses de KP sont associés à un pulse de GnRH (Keen *et al.*, 2008). De plus, il a été montré dans plusieurs espèces qu'un antagoniste du KP bloquait le caractère pulsatile de la sécrétion du couple GnRH/LH (Roseweir *et al.*, 2009). Certaines données suggèrent que le KP interviendrait dans la modulation de la sécrétion de GnRH et non comme un générateur de pulses de la GnRH. Chez une patiente atteinte d'hypogonadisme hypogonadotrope due à l'inactivation du récepteur GPR54, la fréquence des pulses de LH est normale mais l'amplitude des pulses est réduite (Tenenbaum-Rakover *et al.*, 2007). De plus, chez la ratte, une administration de KP-10 par voie i.v. entraîne une augmentation de la sécrétion de LH qui n'est pas associée à un changement de la fréquence de l'activité électrique des neurones de l'hypothalamus (Kinsey-Jones *et al.*, 2008).

Si la fréquence des pulses de GnRH n'est pas affectée par le KP, il est probable que ce soit l'amplitude des pulses qui est régulée. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse qu'une perfusion de KP entraîne une libération plus importante de la GnRH au niveau de l'éminence médiane, peut être par un « recrutement » d'un plus grand nombre de vésicules de sécrétion.

Enfin, il a été montré chez la jument en anœstrus saisonnier, mais aussi chez d'autres espèces, que pour permettre une stimulation optimale de la LH, la GnRH devait être administrée sous forme pulsatile plutôt que sous forme continue (Becker et Johnson, 1992), même si cette dernière est capable d'induire un cycle en contre-saison. Ce résultat n'est pas surprenant puisque la sécrétion de la GnRH endogène est pulsatile (Alexander et Irvine, 1987). ***Il serait donc intéressant d'administrer le KP à des juments sous une forme pulsatile.*** Ce régime d'administration du KP s'est révélée efficace chez l'agnelle prépubère pour induire l'ovulation (Redmond *et al.*, 2011).

→ **Existerait-il d'autres explications à la stimulation transitoire des gonadotropines observée pendant une perfusion longue durée de KP ?**

Une hypothèse alternative à celles déjà évoquées dans ce manuscrit concernerait la spécificité de la liaison du KP exogène avec son récepteur le GPR54 lors d'un apport de fortes doses du

peptide. Il n'est pas exclu que d'autres voies d'activation soient mises en jeu lors d'une exposition prolongée au KP exogène. En effet, il a été montré récemment que le KP-10 était capable de lier et d'activer les récepteurs NPFF (neuropeptide FF) (Oishi *et al.*, 2011). Rappelons que le NPFF a une action inhibitrice sur la sécrétion de la GnRH. ***Il serait intéressant d'étudier les effets d'un antagoniste des récepteurs NPFF, tel que le RF9, puis de l'associer à la perfusion de eKP-10.*** Chez le rat, il a été montré qu'une administration i.c.v. ou périphérique (voie intrapéritonéale) de RF9 était capable de stimuler les gonadotropines, et qu'une co-administration par voie i.c.v. de RF9 et de KP-10 avait un effet potentialisant sur la sécrétion des gonadotropines (Pineda *et al.*, 2010). Enfin, s'il est envisagé que le KP puisse agir sur un autre récepteur que le GPR54, l'inverse est peu probable puisque le GPR54 n'est pas activé en présence d'autres peptides de la famille des RF-amides (Muir *et al.*, 2001).

→ **Quels sont les sites de fixation et/ou d'action du KP ?**

Chez la plupart des espèces étudiées, il est bien établi que le KP agit en amont des neurones à GnRH pour stimuler sa libération. Toutefois les sites anatomiques précis où la molécule agit (corps cellulaire ou terminaisons) restent à ce jour l'objet de débat. De même, les cibles potentielles du KP exogène lors d'un apport périphérique ne sont pas connues. Certaines études suggèrent que le KP exogène agirait au niveau des organes circumventriculaires. Ces organes ne possèdent pas de barrière hémato-encéphalique, mais sont pourvus d'une vascularisation riche leur permettant un échange entre le sang et le liquide céphalo-rachidien (voir synthèse bibliographique). De plus, de fortes doses de KP administrées par voie i.v. n'augmentent pas la quantité de KP présente dans le liquide céphalo-rachidien chez la brebis (Caraty, communication personnelle). Ces données suggèrent que le KP exogène agirait probablement au niveau de l'éminence médiane comme cela est suggéré chez la souris par d'autres auteurs (d'Anglemont de Tassigny *et al.*, 2008). Concernant ce point, il n'existe aucune donnée dans la bibliographie sur l'espèce équine. ***Il serait donc intéressant de réaliser un marquage du KP au technétium et de l'injecter par voie périphérique à des juments afin d'observer le lieu de fixation et d'élimination du KP marqué grâce à une caméra 2D.*** Il a également été suggéré un rôle du KP au niveau ovarien étant donné la présence de l'ARNm du Kiss1 et du GPR54 chez le rat et le primate (Castellano *et al.*, 2006; Gaytan *et al.*, 2009). Pour vérifier un éventuel effet direct du eKP-10 au niveau ovarien, des analyses de ponctions

de liquide folliculaire pourraient être envisagées après injection du eKP-10 par voie générale ou après injection dans le follicule.

→ Quels sont les facteurs pouvant influencer la réponse au KP ?

➤ L'état métabolique ?

Une étude a montré que l'expression de l'ARNm du gène Kiss1 au niveau de l'ARC était réduite chez les souris déficientes pour la leptine (ob/ob), comparée aux souris sauvages. De plus, un traitement à la leptine restaure en partie l'expression de l'ARNm du gène Kiss1 chez les souris ob/ob (Smith *et al.*, 2006a). Cependant, aucune donnée ne montre de lien direct entre la leptine et l'expression de l'ARNm du gène Kiss1. Il existe de nombreuses preuves de l'action inhibitrice de la leptine sur la sécrétion du NPY, et de récentes études montrent que l'ARNm du GPR54 est présent dans une lignée cellulaire sécrétant le NPY. Lorsque ces cellules sont traitées avec du KP-10 (10 nM), l'expression de l'ARNm du NPY augmente (Kim *et al.*, 2010). Il n'est donc pas exclu qu'il y ait une interaction réciproque entre le KP et le NPY afin de réguler la sécrétion de la GnRH (Backholer *et al.*, 2010).

La vitesse de croissance des follicules, la biodisponibilité des IGF-1 ainsi que les concentrations plasmatiques d'E2 sont supérieures chez les juments bien nourries comparées aux juments restreintes (Salazar-Ortiz J., 2004; Salazar-Ortiz *et al.*, 2011). Par ailleurs, il est clairement établi que les juments présentant une note d'état corporel élevée présentent des cycles tout au long de l'année, y compris pendant la période d'ancestrus. Les concentrations plasmatiques de leptine sont généralement supérieures chez un tiers de ces juments (Gentry *et al.*, 2002). Il n'est donc pas exclu que chez les juments ayant une note d'état corporel élevée, les niveaux endogènes de KP soient élevés. Il ne serait donc pas possible d'activer d'avantage le GPR54 par le KP exogène. Toutefois, le mécanisme d'action n'est pas très clair puisque la leptine ne semble pas intervenir directement dans la régulation de la sécrétion du KP. Les juments de race poney sont considérées comme étant « rustiques » et ont généralement une note d'état corporel supérieure à celle des juments de selle. ***Il serait donc intéressant de reproduire nos expériences sur des juments de selle, ou encore de comparer les effets du KP sur des juments poney ayant une note d'état corporel faible et fort.*** En effet, chez le rat femelle adulte sous alimenté, la durée de sécrétion de la LH suite à l'administration intracérébrale de KP est augmentée (Roa *et al.*, 2008b).

➤ Le stress

Les effets du stress sur la suppression de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadotrope sont bien connus. Toutefois, le stress est un processus complexe qui revêt plusieurs formes. Il peut être d'ordre psychologique, métabolique ou encore immunologique. D'autre part, un stress aigu aura tendance à avoir un effet stimulant sur la sécrétion de la LH, alors qu'un stress chronique aura un effet délétère. Des études montrent que le stress, qu'il soit sous forme psychologique, métabolique ou immunologique, entraîne une diminution de l'expression de l'ARNm du gène *kiss1* et/ou *GPR54* au niveau de l'APO et de l'ARC chez le rat (Kinsey-Jones *et al.*, 2009). Dans nos conditions expérimentales, il semble peu probable que les ponettes aient été dans des conditions de stress immunologique car leur température corporelle a été relevée quotidiennement (même heure chaque jour) et aucune élévation de celle-ci n'a été observée (température rectale comprise entre 37 et 38°C). De plus, il a été montré chez le macaque qu'un bolus de KP-10 (1 ou 3 µg/kg) administré par voie i.v. entraîne une augmentation de la sécrétion de LH plasmatique, mais n'a aucun effet sur la sécrétion de cortisol plasmatique (Ramaswamy *et al.*, 2009).

Un stress métabolique est également à exclure étant donné que chaque ponette avait un accès *ad libitum* à l'eau et à la paille, et qu'un filet à foin était rempli 3 à 4 fois par 24 heures. Un stress « psychologique » modéré ne peut pas être exclu, étant donné notre présence continue et la contrainte du dispositif de perfusion. Il a été montré chez le rat qu'un stress psychologique, provoqué par une immobilisation, entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm du RFRP associé à une diminution des concentrations plasmatiques de LH (Kirby *et al.*, 2009). Cet effet semble peu probable dans nos expériences puisque les ponettes des lots témoins étaient placées dans les mêmes conditions expérimentales que les ponettes des lots traités (la seule différence résidait dans l'absence d'ajout de eKP-10 dans les poches de sérum physiologique) et qu'aucune diminution de la LH plasmatique n'a été observée.

3. Quelle pourrait être la suite à donner à ce travail dans le but de continuer à explorer les potentialités du kisspeptide dans le contrôle du cycle de la jument ?

→ **Essai de perfusion longue durée de eKP-10 pendant la période d'anoestrus.**

Concernant l'administration de kisspeptide chez la jument, le résultat le plus encourageant est celui obtenu avec une perfusion de eKP-10 pendant 72 h en période d'anoestrus saisonnier. Il serait donc intéressant de tester les effets d'une perfusion de plus longue durée, afin de vérifier si elle permettrait de stimuler la croissance folliculaire jusqu'à l'obtention d'un follicule de taille pré-ovulatoire et d'une ovulation. Cependant, le système de perfusion par voie i.v. nécessite une surveillance permanente des ponettes et rend donc difficile sa réalisation dans de bonnes conditions. Par ailleurs, ce mode d'administration est incompatible avec une utilisation de cette méthode à plus large échelle sur le plan expérimental et encore plus, en vue d'une application potentielle sur le terrain. En conséquence, un certain nombre de verrous technologiques restent à lever avant de pouvoir entreprendre ces études.

→ **Tester un autre mode d'administration que la perfusion par voie i.v.**

Nous avons au préalable envisagé de réaliser une étude de pharmacocinétique-pharmacodynamie en comparant différents modes d'administration (voies intraveineuse, intramusculaire et sous-cutanée). Celle-ci nous aurait permis de définir la meilleure voie d'administration du Kp permettant une stimulation optimale des gonadotropines et compatible avec une utilisation sur le terrain. Malheureusement, le dosage du KP dans le plasma équin est délicat et nous a posé quelques difficultés. Comme pour beaucoup de peptides, le dosage direct dans le plasma est impossible compte tenu de liaisons avec différentes protéines plasmatiques. L'extraction méthanolique permet de traiter un nombre d'échantillons important, en revanche le taux d'extraction est faible (10 à 20%). D'après nos tests de « surcharge », il semblerait que ce taux d'extraction soit encore moindre concernant le eKP-10 comparé au oKP-10. De plus, un essai avec une surcharge de eKP-10 radioactif montre que 30% du eKP-10 reste piégé dans le culot lors d'une extraction méthanolique (données non présentées dans le manuscrit). Seule l'utilisation de cartouches Sep-Pak® permet un bon rendement d'extraction du oKp10 mais leur emploi est lourd et coûteux, et

donc peu compatible pour des dosages sur de larges séries d'échantillons (Caraty, communication personnelle).

Concernant la voie d'administration, il est à noter qu'une injection de KP-10 par voie i.v. a un effet stimulant plus important (de l'ordre de 20 fois) qu'une injection par voie i.m. (chez la brebis, (Caraty *et al.*, 2007); chez les bovins prépubères, (Ezzat Ahmed *et al.*, 2009)) sur la sécrétion des gonadotropines LH et FSH. Nous avons-nous mêmes testé sur 4 ponettes les effets d'injections de eKP-10 par voie sous-cutanée (injection de 8 mg, 3 fois pas jour) au cours d'un cycle, mais aucun effet stimulant n'a été observé que ce soit sur la sécrétion des gonadotropines, sur la croissance folliculaire ou encore sur l'ovulation (données non présentées dans ce manuscrit). Enfin, l'utilisation de pompes osmotiques (Alzet®) permettant un apport continu par voie sous-cutanée de l'eKP-10 paraît difficilement envisageable. Ces pompes peuvent contenir au plus 2 ml de solution et, compte tenu des doses à administrer et des limites de solubilité du peptide, ne sont donc pas adaptées à une administration en continu du eKP-10. Au vu de ces considérations, nous avons réalisé l'ensemble de nos expérimentations en utilisant la voie intraveineuse. Ceci n'exclut pas pour le futur la voie s.c. mais, en l'absence de molécules à activité KP facilement résorbables et/ou ayant une activité supérieure, cette voie paraît à l'heure actuelle peu prometteuse.

→ Utilisation d'agonistes du KP-10

Malgré une affinité semblable pour le GPR54, le KP-10 a une demi-vie plus courte que celle du KP-54 (de l'ordre de 30 minutes), probablement à cause d'une dégradation plus rapide de la forme courte. Il serait donc tentant de réaliser des essais en utilisant le KP-54. Toutefois le coût de cette molécule rend son utilisation prohibitive pour l'espèce équine. L'utilisation d'agonistes du KP-10 à plus forte activité biologique serait une solution à envisager. Par exemple, il a été montré chez la souris mâle adulte qu'une injection intrapéritonéale d'un analogue du KP-10 ((Baldwin *et al.*)¹ KP-10) induisait une stimulation de la LH 4 fois plus importante que celle obtenue lors d'une injection de KP-10 natif à la même dose (Curtis *et al.*, 2010). Toutefois cette augmentation d'activité reste modeste et elle est insuffisante pour entreprendre ces essais dans l'espèce équine.

4. Perspectives, conclusions et applications à d'autres espèces d'élevage

Une administration de KP permet de synchroniser les pics de LH chez la brebis cyclique et d'induire un cycle chez la brebis en inactivité. Notre travail montre que ces objectifs semblent beaucoup plus difficiles à atteindre chez la jument cyclique du fait de régulations propres à l'espèce. Bien sûr les progrès concernant la chimie des agonistes du kisspeptide devrait nous fournir de nouvelles molécules permettant des expérimentations plus faciles et moins contraignantes. Néanmoins, il semble que les mécanismes physiologiques mis en jeu soient beaucoup plus complexes ou du moins beaucoup plus difficiles à contrôler sur une phase folliculaire de 10 jours (jument) que pour une phase folliculaire de 2-3 jours (brebis). Avant de reprendre des essais chez la jument, il serait peut être intéressant de réaliser des essais avec le kisspeptide chez la chèvre ou la vache par exemple, qui possèdent également une phase folliculaire courte (3 à 4 jours). A l'heure actuelle, nos travaux semblent indiquer que c'est pour l'induction de cycles pendant l'anoestrus saisonnier, qu'une application potentielle du kisspeptide dans l'espèce équine est réalisable.

Les travaux en cours du laboratoire, visant à développer des agonistes et des formes retard de cette famille de molécules, en permettant de simplifier grandement les protocoles, devraient à l'avenir faciliter ce type d'études.

Références bibliographiques

References

A

Acosta, T.J., Beg, M.A., Ginther, O.J., 2004. Aberrant blood flow area and plasma gonadotropin concentrations during the development of dominant-sized transitional anovulatory follicles in mares. *Biol Reprod* 71, 637-642.

Advis, J.P., Klein, J., Kuljis, R.O., Sarkar, D.K., McDonald, J.M., Conover, C.A., 2003. Regulation of gonadotropin releasing hormone release by neuropeptide Y at the median eminence during the preovulatory period in ewes. *Neuroendocrinology* 77, 246-257.

Alexander, S., Irvine, C.H., 1982. Radioimmunoassay and in-vitro bioassay of serum LH throughout the equine oestrous cycle. *J Reprod Fertil Suppl* 32, 253-260.

Alexander, S.L., Irvine, C.H., 1986. Effect of graded doses of gonadotrophin-releasing hormone on serum LH concentrations in mares in various reproductive states: comparison with endogenously generated LH pulses. *J Endocrinol* 110, 19-26.

Alexander, S.L., Irvine, C.H., 1987. Secretion rates and short-term patterns of gonadotrophin-releasing hormone, FSH and LH throughout the periovulatory period in the mare. *J Endocrinol* 114, 351-362.

Allen, W.R., Sanderson, M.W., Greenwood, R.E., Ellis, D.R., Crowhurst, J.S., Simpson, D.J., Rosedale, P.D., 1987. Induction of ovulation in anoestrous mares with a slow-release implant of a GnRH analogue (ICI 118 630). *J Reprod Fertil Suppl* 35, 469-478.

Alvarenga, M.A., McCue, P.M., Bruemmer, J., Neves Neto, J.R., Squire, E.L., 2001. Ovarian superstimulatory response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology* 56, 879-887.

Ansel, L., Bentsen, A.H., Ancel, C., Bolborea, M., Klosen, P., Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V., 2011. Peripheral kisspeptin reverses short photoperiod-induced gonadal regression in Syrian hamsters by promoting GNRH release. *Reproduction* 142, 417-425.

Asa, C.S., Goldfoot, D.A., Garcia, M.C., Ginther, O.J., 1980. Sexual behavior in ovariectomized and seasonally anovulatory pony mares (*Equus caballus*). *Hormones and Behavior* 14, 46-54.

Aurich, C., Daels, P.F., Ball, B.A., Aurich, J.E., 1995. Effects of gonadal steroids on the opioid regulation of LH and prolactin release in ovariectomized pony mares. *J Endocrinol* 147, 195-202.

B

Backholer, K., Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Iqbal, J., Ogawa, S., Li, Q., Clarke, I.J., 2010. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 151, 2233-2243.

Baldwin, D.M., Roser, J.F., Muyan, M., Lasley, B., Dybdal, N., 1991. Direct effects of free and conjugated steroids on GnRH stimulated LH release in cultured equine anterior pituitary cells. *J Reprod Fertil Suppl* 44, 327-332.

Barrell, G.K., Moenter, S.M., Caraty, A., Karsch, F.J., 1992. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biol Reprod* 46, 1130-1135.

Becker, S.E., Johnson, A.L., 1992. Effects of gonadotropin-releasing hormone infused in a pulsatile or continuous fashion on serum gonadotropin concentrations and ovulation in the mare. *J Anim Sci* 70, 1208-1215.

Beg, M.A., Ginther, O.J., 2006. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction* 132, 365-377.

- Belin, F., Goudet, G., Duchamp, G., Gerard, N., 2000. Intrafollicular concentrations of steroids and steroidogenic enzymes in relation to follicular development in the mare. *Biol Reprod* 62, 1335-1343.
- Bergfelt, D.R., Gastal, E.L., Ginther, O.J., 2001. Response of estradiol and inhibin to experimentally reduced luteinizing hormone during follicle deviation in mares. *Biol Reprod* 65, 426-432.
- Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1985. Delayed follicular development and ovulation following inhibition of FSH with equine follicular fluid in the mare. *Theriogenology* 24, 99-108.
- Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1992. Embryo loss following GnRH-induced ovulation in anovulatory mares. *Theriogenology* 38, 33-43.
- Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1993. Relationships between FSH surges and follicular waves during the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 39, 781-796.
- Bergfelt, D.R., Mann, B.G., Schwartz, N.B., Ginther, O.J., 1991. Circulating concentrations of immunoreactive inhibin and FSH during the estrous cycle of mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 11, 319-322.
- Besecke, L.M., Wolfe, A.M., Pierce, M.E., Takahashi, J.S., Levine, J.E., 1994. Neuropeptide Y stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from superfused hypothalamic GT1-7 cells. *Endocrinology* 135, 1621-1627.
- Bilban, M., Ghaffari-Tabrizi, N., Hintermann, E., Bauer, S., Molzer, S., Zoratti, C., Malli, R., Sharabi, A., Hiden, U., Graier, W., Knofler, M., Andrae, F., Wagner, O., Quaranta, V., Desoye, G., 2004. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci* 117, 1319-1328.
- Biran, J., Ben-Dor, S., Levavi-Sivan, B., 2008. Molecular Identification and Functional Characterization of the Kisspeptin/Kisspeptin Receptor System in Lower Vertebrates. *Biol Reprod*.
- Briant, C., 2004. Stimulation ovarienne chez la ponette Welsh en vue de la production d'embryons. Limites physiologiques et techniques. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'université de Tours.
- Briant, C., Ottogalli, M., Morel, M., Guillaume, D., 2003. Use of a GnRH antagonist, antarelix, associated or not with hCG, to control ovulation in cyclic pony mares. *Domest Anim Endocrinol* 24, 305-322.
- Briant, C., Schneider, J., Guillaume, D., Ottogalli, M., Duchamp, G., Bruneau, B., Caraty, A., 2006. Kisspeptin induces ovulation in cycling Welsh pony mares. *Animal Reproduction Science* 94, 217-219.
- Briant, C., Toutain, P.L., Ottogalli, M., Magallon, T., Guillaume, D., 2004. Kinetic studies and production rate of equine (e) FSH in ovariectomized pony mares. Application to the determination of a dosage regimen for eFSH in a superovulation treatment. *J Endocrinol* 182, 43-54.
- Burns, P.J., Douglas, R.H., 1981. Effects of daily administration of estradiol-17 beta on follicular growth, ovulation, and plasma hormones in mares. *Biol Reprod* 24, 1026-1031.

C

- Canépa S., Lainé A.L., Bluteau A., Fagu C., Flon C., Monniaux D., 2008. Cahier techniques de l'INRA, 64, 19-30.
- Caraty, A., Evans, N.P., Fabre-Nys, C.J., Karsch, E.J., 1995. The preovulatory gonadotrophin-releasing hormone surge: a neuroendocrine signal for ovulation. *J Reprod Fertil Suppl* 49, 245-255.
- Caraty, A., Fabre-Nys, C., Delaleu, B., Locatelli, A., Bruneau, G., Karsch, F.J., Herbison, A., 1998. Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 139, 1752-1760.

- Caraty, A., Franceschini, I., Hoffman, G.E., 2010. Kisspeptin and the preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe: basic aspects and potential applications in the control of ovulation. *J Neuroendocrinol* 22, 710-715.
- Caraty, A., Smith, J.T., Lomet, D., Ben Said, S., Morrissey, A., Cognie, J., Doughton, B., Baril, G., Briant, C., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin synchronizes preovulatory surges in cyclical ewes and causes ovulation in seasonally acyclic ewes. *Endocrinology* 148, 5258-5267.
- Carnevale, E.M., 2008. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology* 69, 23-30.
- Carnevale, E.M., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1993. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. *Animal Reproduction Science* 31, 287-299.
- Castano, J.P., Martinez-Fuentes, A.J., Gutierrez-Pascual, E., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., Malagon, M.M., 2009. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: do multiple signals underlie function diversity? *Peptides* 30, 10-15.
- Castellano, J.M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navarro, V.M., Bellido, C., Dieguez, C., Aguilar, E., Sanchez-Criado, J.E., Pellicer, A., Pinilla, L., Gaytan, F., Tena-Sempere, M., 2006. Expression of KiSS-1 in rat ovary: putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 147, 4852-4862.
- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., Vazquez, M.J., Vigo, E., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M., 2005. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 146, 3917-3925.
- Chalivoix, S., Bagnolini, A., Caraty, A., Cognie, J., Malpoux, B., Dufourny, L., 2010. Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *J Neuroendocrinol* 22, 110-118.
- Chan, Y.M., Broder-Fingert, S., Wong, K.M., Seminara, S.B., 2009. Kisspeptin/Gpr54-independent gonadotrophin-releasing hormone activity in Kiss1 and Gpr54 mutant mice. *J Neuroendocrinol* 21, 1015-1023.
- Checura, C.M., Beg, M.A., Parrish, J.J., Ginther, O.J., 2010. Positive effect of FSH but not LH on early development of the dominant follicle in mares. *Reprod Fertil Dev* 22, 1092-1099.
- Clarke, I.J., Backholer, K., Tilbrook, A.J., 2005. Y2 receptor-selective agonist delays the estrogen-induced luteinizing hormone surge in ovariectomized ewes, but y1-receptor-selective agonist stimulates voluntary food intake. *Endocrinology* 146, 769-775.
- Clarke, I.J., Pompolo, S., Scott, C.J., Rawson, J.A., Caddy, D., Jakubowska, A.E., Pereira, A.M., 2001. Cells of the Arcuate Nucleus and Ventromedial Nucleus of the Ovariectomized Ewe that Respond to Oestrogen: A Study Using Fos Immunohistochemistry. *Journal of Neuroendocrinology* 13, 934-941.
- Clarke, I.J., Rao, A., Fallest, P.C., Shupnik, M.A., 1993. Transcription rate of the follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit gene is reduced by inhibin in sheep but this does not fully explain the decrease in mRNA. *Mol Cell Endocrinol* 91, 211-216.
- Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Moreno, A.S., Colledge, W.H., Herbison, A.E., 2008. Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 28, 8691-8697.
- Clements, M.K., McDonald, T.P., Wang, R., Xie, G., O'Dowd, B.F., George, S.R., Austin, C.P., Liu, Q., 2001. FMRFamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 1189-1193.
- Clifford H.G, I., 1983. Pituitary hormones: Basic aspects. *Journal of Equine Veterinary Science* 3, 203-207.

Combarrous Y, G.C., Crépieux P, Chopineau M, Cournis R, 2001. Les gonadotropines : structure, fonctions, mécanismes d'action. Eds C Thibault & MC Lévasseur Paris INRA Ellipses.

Conn, P.M., Huckle, W.R., Andrews, W.V., McArdle, C.A., 1987. The molecular mechanism of action of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the pituitary. *Recent Prog Horm Res* 43, 29-68.

Cooper, D.A., Cartmill, J.A., Saldarriaga, J.P., Zuluaga, J.F., Williams, G.L., 2006. Seasonal reproduction in mares is not regulated by changes in the frequency or amplitude of GnRH pulses. *Biol. Reprod.*, 166-167.

Crowder, M.E., Herring, R.D., Nett, T.M., 1986. Rapid recovery of gonadotroph function after down-regulation of receptors for GnRH in ewes. *J Reprod Fertil* 78, 577-585.

Cuervo-Arango, J., Newcombe, J.R., 2008. Repeatability of preovulatory follicular diameter and uterine edema pattern in two consecutive cycles in the mare and how they are influenced by ovulation inductors. *Theriogenology* 69, 681-687.

Cuervo-Arango, J., Newcombe, J.R., 2009. The effect of hormone treatments (hCG and cloprostenol) and season on the incidence of hemorrhagic anovulatory follicles in the mare: a field study. *Theriogenology* 72, 1262-1267.

Curtis, A.E., Cooke, J.H., Baxter, J.E., Parkinson, J.R., Bataveljic, A., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Murphy, K.G., 2010. A kisspeptin-10 analog with greater in vivo bioactivity than kisspeptin-10. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E296-303.

D

d'Anglemont de Tassigny, X., Ackroyd, K.J., Chatzidaki, E.E., Colledge, W.H., 2010. Kisspeptin signaling is required for peripheral but not central stimulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by NMDA. *J Neurosci* 30, 8581-8590.

d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Carlton, M.B., Colledge, W.H., 2008. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149, 3926-3932.

d'Anglemont de Tassigny, X., Fagg, L.A., Dixon, J.P., Day, K., Leitch, H.G., Hendrick, A.G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M.B., Aparicio, S.A., Colledge, W.H., 2007. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10714-10719.

Daels, P.F., Ammon, D.C., Stabenfeldt, G.H., Liu, I.K., Hughes, J.P., Lasley, B.L., 1991. Urinary and plasma estrogen conjugates, estradiol and estrone concentrations in nonpregnant and early pregnant mares. *Theriogenology* 35, 1001-1017.

Davis, G.H., Johnstone, P.D., 1985. Ovulation response to pregnant mares' serum gonadotrophin in prepubertal ewe lambs of different Booroola genotypes. *Animal Reproduction Science* 9, 145-151.

Davis, J.S., Weakland, L.L., West, L.A., Farese, R.V., 1986. Luteinizing hormone stimulates the formation of inositol trisphosphate and cyclic AMP in rat granulosa cells. Evidence for phospholipase C generated second messengers in the action of luteinizing hormone. *Biochem J* 238, 597-604.

de Roux, N., Genin, E., Carel, J.C., Matsuda, F., Chaussain, J.L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10972-10976.

Decourt, C., Tillet, Y., Caraty, A., Franceschini, I., Briant, C., 2008. Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus Interactions with GnRH neuronal system. *J Chem Neuroanat* 36, 131-137.

Denning-Kendall, P.A., Wathes, D.C., 1994. Acute effects of prostaglandin F2 alpha, luteinizing hormone, and estradiol on second messenger systems and on the secretion of oxytocin and progesterone from granulosa and early luteal cells of the ewe. *Biol Reprod* 50, 765-773.

- Desroziers, E., Mikkelsen, J., Simonneaux, V., Keller, M., Tillet, Y., Caraty, A., Franceschini, I., 2010. Mapping of kisspeptin fibres in the brain of the pro-oestrous rat. *J Neuroendocrinol* 22, 1101-1112.
- Dhillon, W.S., Chaudhri, O.B., Patterson, M., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Badman, M.K., McGowan, B.M., Amber, V., Patel, S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2005. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6609-6615.
- Dhillon, W.S., Chaudhri, O.B., Thompson, E.L., Murphy, K.G., Patterson, M., Ramachandran, R., Nijher, G.K., Amber, V., Kokkinos, A., Donaldson, M., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2007. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 3958-3966.
- Dial, G.D., Dial, O.K., Wilkinson, R.S., Dziuk, P.J., 1984. Endocrine and ovulatory responses of the gilt to exogenous gonadotropins and estradiol during sexual maturation. *Biol Reprod* 30, 289-299.
- Diekman, M.A., Braun, W., Peter, D., Cook, D., 2002. Seasonal serum concentrations of melatonin in cycling and noncycling mares. *J Anim Sci* 80, 2949-2952.
- Diskin, M.G., Mackey, D.R., Roche, J.F., Sreenan, J.M., 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 78, 345-370.
- Donadeu, F.X., Ginther, O.J., 2001. Effect of number and diameter of follicles on plasma concentrations of inhibin and FSH in mares. *Reproduction* 121, 897-903.
- Donadeu, F.X., Ginther, O.J., 2002. Follicular waves and circulating concentrations of gonadotrophins, inhibin and oestradiol during the anovulatory season in mares. *Reproduction* 124, 875-885.
- Donadeu, F.X., Ginther, O.J., 2003. Interactions of follicular factors and season in the regulation of circulating concentrations of gonadotrophins in mares. *Reproduction* 125, 743-750.
- Donadeu, F.X., Watson, E.D., 2007. Seasonal changes in ovarian activity: lessons learnt from the horse. *Anim Reprod Sci* 100, 225-242.
- Douglas, R.H., Ginther, O.J., Nuti, L., 1974. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. *Theriogenology* 2, 133-141.
- Driancourt, M.A., 1979. Follicular kinetics in the mare ovary. *Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique* 19, 1443-1453.
- Driancourt, M.A., 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55, 1211-1239.
- Driancourt, M.A., Levasseur, M.C., 2001. Cycles estriens et cycles menstruels, La reproduction chez les mammifères et l'homme, Eds C Thibault & MC Levasseur Paris INRA Ellipses, pp. 680-698.
- Driancourt, M.A., Paris, A., Roux, C., Mariana, J.C., Palmer, E., 1982. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reprod Nutr Dev* 22, 1035-1047.
- Duchamp, G., Bour, B., Combarrous, Y., Palmer, E., 1987. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. *J Reprod Fertil Suppl* 35, 221-228.
- Duchamp, G., Levy, I., Briant, C., Bruneau, B., Caraty, A., 2007. Induction d'ovulation chez la jument : l'injection unique d'une forte dose de busérelina est efficace. 33ème journée de la recherche équine, Paris, 8 mars 2007.
- Dungan, H.M., Gottsch, M.L., Zeng, H., Gragerov, A., Bergmann, J.E., Vassilatis, D.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2007. The role of kisspeptin-GPR54 signaling in the tonic regulation and surge release of gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone. *J Neurosci* 27, 12088-12095.

E

Eagle, R.C., Tortonesi, D.J., 2000. Characterization and distribution of gonadotrophs in the pars distalis and pars tuberalis of the equine pituitary gland during the estrous cycle and seasonal anestrus. *Biol Reprod* 63, 826-832.

Eghlidi, D.H., Haley, G.E., Noriega, N.C., Kohama, S.G., Urbanski, H.F., 2010. Influence of age and 17 β -estradiol on kisspeptin, neurokinin B, and prodynorphin gene expression in the arcuate-median eminence of female rhesus macaques. *Endocrinology* 151, 3783-3794.

Espey, L.L., 1980. Ovulation as an inflammatory reaction--a hypothesis. *Biol Reprod* 22, 73-106.

Estienne, M.J., Schillo, K.K., Hileman, S.M., Green, M.A., Hayes, S.H., 1990. Effect of N-methyl-D,L-aspartate on luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes in the absence and presence of estradiol. *Biol Reprod* 42, 126-130.

Estrada, K.M., Clay, C.M., Pompolo, S., Smith, J.T., Clarke, I.J., 2006. Elevated KiSS-1 expression in the arcuate nucleus prior to the cyclic preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe suggests a stimulatory role for kisspeptin in oestrogen-positive feedback. *J Neuroendocrinol* 18, 806-809.

Evans, M.J., Irvine, C.H., 1975. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*, 193-200.

Evans, N.P., Dahl, G.E., Padmanabhan, V., Thrun, L.A., Karsch, F.J., 1997. Estradiol requirements for induction and maintenance of the gonadotropin-releasing hormone surge: implications for neuroendocrine processing of the estradiol signal. *Endocrinology* 138, 5408-5414.

Ezzat Ahmed, A., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Yamashita, T., Hirata, T.I., Sawai, K., Hashizume, T., 2009. Characteristics of the Stimulatory Effect of Kisspeptin-10 on the Secretion of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Growth Hormone in Prepubertal Male and Female Cattle. *J Reprod Dev*.

F

Fair, T., 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78, 203-216.

Fay, J.E., Douglas, R.H., 1987. Changes in thecal and granulosa cell LH and FSH receptor content associated with follicular fluid and peripheral plasma gonadotrophin and steroid hormone concentrations in preovulatory follicles of mares. *J Reprod Fertil Suppl* 35, 169-181.

Fitzgerald, B.P., 1996. Effects of administration of N-methyl-D,L-aspartate (NMA) on gonadotropin secretion in untreated and steroid-treated ovariectomized mares during the breeding season and in intact and ovariectomized mares during anestrus. *Domest Anim Endocrinol* 13, 211-218.

Fitzgerald, B.P., Davison, L.A., 1997. Comparison of the effects of N-methyl-DL-aspartic acid on gonadotropin and prolactin secretion in anestrus mares and mares exhibiting estrous cycles during anestrus. *Biol Reprod* 57, 36-42.

Fitzgerald, B.P., l'Anson, H., Legan, S.J., Loy, R.G., 1985. Changes in patterns of luteinizing hormone secretion before and after the first ovulation in the postpartum mare. *Biol Reprod* 33, 316-323.

Fitzgerald, B.P., l'Anson, H., Loy, R.G., Legan, S.J., 1983. Evidence that changes in LH pulse frequency may regulate the seasonal modulation of LH secretion in ovariectomized mares. *J Reprod Fertil* 69, 685-692.

Forbes, S., Li, X.F., Kinsey-Jones, J., O'Byrne, K., 2009. Effects of ghrelin on Kisspeptin mRNA expression in the hypothalamic medial preoptic area and pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Neurosci Lett* 460, 143-147.

Foster, J.P., Evans, M.J., Irvine, C.H., 1979. Differential release of LH and FSH in cyclic mares in response to synthetic Gn-RH. *J Reprod Fertil* 56, 567-572.

Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., Caraty, A., 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 401, 225-230.

Freedman, L.J., Garcia, M.C., Ginther, O.J., 1979. Influence of photoperiod and ovaries on seasonal reproductive activity in mares. *Biol Reprod* 20, 567-574.

Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., Gustafson, E.L., 2003. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1357-1363.

G

Garcia, M.C., Ginther, O.J., 1975. Plasma luteinizing hormone concentration in mares treated with gonadotropin-releasing hormone and estradiol. *Am J Vet Res* 36, 1581-1584.

Garcia, M.C., Ginther, O.J., 1976. Effects of ovariectomy and season on plasma luteinizing hormone in mares. *Endocrinology* 98, 958-962.

Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A., Ginther, O.J., 2004. Interrelationships among follicles during the common-growth phase of a follicular wave and capacity of individual follicles for dominance in mares. *Reproduction* 128, 417-422.

Gastal, E.L., Gastal, M.O., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., 1997. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biol Reprod* 57, 1320-1327.

Gaytan, F., Gaytan, M., Castellano, J.M., Romero, M., Roa, J., Aparicio, B., Garrido, N., Sanchez-Criado, J.E., Millar, R.P., Pellicer, A., Fraser, H.M., Tena-Sempere, M., 2009. KiSS-1 in the mammalian ovary: distribution of kisspeptin in human and marmoset and alterations in KiSS-1 mRNA levels in a rat model of ovulatory dysfunction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E520-531.

Gentry, L.R., Thompson, D.L., Jr., Gentry, G.T., Jr., Davis, K.A., Godke, R.A., Cartmill, J.A., 2002. The relationship between body condition, leptin, and reproductive and hormonal characteristics of mares during the seasonal anovulatory period. *J Anim Sci* 80, 2695-2703.

Gerard, N., Caillaud, M., Martoriati, A., Goudet, G., Lalmanach, A.C., 2004. The interleukin-1 system and female reproduction. *J Endocrinol* 180, 203-212.

Gerard, N., Monget, P., 1998. Intrafollicular insulin-like growth factor-binding protein levels in equine ovarian follicles during preovulatory maturation and regression. *Biol Reprod* 58, 1508-1514.

Ginther, O.J., 1974. Occurrence of anestrus, estrus, diestrus, and ovulation over a 12-month period in mares. *Am J Vet Res* 35, 1173-1179.

Ginther, O.J., 1992. *Reproductive biology of the mare; basic and applied aspects*; 2nd edition. Equiservices, Cross Plains, WI.

Ginther, O.J., 2000. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim Reprod Sci* 60-61, 61-79.

Ginther, O.J., Almamun, M., Shahiduzzaman, A.K., Beg, M.A., 2010. Disruption of the periovulatory LH surge by a transient increase in circulating 17beta-estradiol at the time of ovulation in mares. *Anim Reprod Sci* 117, 178-182.

Ginther, O.J., Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Donadeu, F.X., Kot, K., 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol Reprod* 65, 638-647.

Ginther, O.J., Beg, M.A., Donadeu, F.X., Bergfelt, D.R., 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 78, 239-257.

- Ginther, O.J., Beg, M.A., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Cooper, D.A., 2009. Treatment with human chorionic gonadotropin (hCG) for ovulation induction is associated with an immediate 17beta-estradiol decrease and a more rapid LH increase in mares. *Anim Reprod Sci* 114, 311-317.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A., 2005a. In vivo effects of pregnancy-associated plasma protein-A, activin-A and vascular endothelial growth factor on other follicular-fluid factors during follicle deviation in mares. *Reproduction* 129, 489-496.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A., 2005b. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biol Reprod* 73, 315-323.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A., 2008a. Dynamics of the Equine Preovulatory Follicle and Perioovulatory Hormones: What's New? *Journal of Equine Veterinary Science* 28, 454-460.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Beg, M.A., 2008b. Passage of postovulatory follicular fluid into the peritoneal cavity and the effect on concentrations of circulating hormones in mares. *Anim Reprod Sci* 107, 1-8.
- Ginther, O.J., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Checure, C.M., Beg, M.A., 2004. Dose-response study of intrafollicular injection of insulin-like growth factor-I on follicular fluid factors and follicle dominance in mares. *Biol Reprod* 70, 1063-1069.
- Ginther, O.J., Gastal, M.O., Gastal, E.L., Jacob, J.C., Beg, M.A., 2008c. Induction of haemorrhagic anovulatory follicles in mares. *Reprod Fertil Dev* 20, 947-954.
- Ginther, O.J., Utt, M.D., Beg, M.A., Gastal, E.L., Gastal, M.O., 2007. Negative effect of estradiol on luteinizing hormone throughout the ovulatory luteinizing hormone surge in mares. *Biol Reprod* 77, 543-550.
- Ginther, O.J., Utt, M.D., Bergfelt, D.R., Beg, M.A., 2006. Controlling interrelationships of progesterone/LH and estradiol/LH in mares. *Anim Reprod Sci* 95, 144-150.
- Ginther, O.J., Whitmore, H.L., Squires, E.L., 1972. Characteristics of estrus, diestrus, and ovulation in mares and effects of season and nursing. *Am J Vet Res* 33, 1935-1939.
- Glazar, B.S., McCue, P.M., Bruemmer, J.E., Squires, E.L., 2004. Deslorelin on Day 8 or 12 postovulation does not luteinize follicles during an artificially maintained diestrus phase in the mare. *Theriogenology* 62, 57-64.
- Goodman, R.L., Coolen, L.M., Anderson, G.M., Hardy, S.L., Valent, M., Connors, J.M., Fitzgerald, M.E., Lehman, M.N., 2004. Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology* 145, 2959-2967.
- Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., de Oliveira, C.V., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148, 5752-5760.
- Gottsch, M.L., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. From KISS1 to kisspeptins: An historical perspective and suggested nomenclature. *Peptides* 30, 4-9.
- Gottsch, M.L., Cunningham, M.J., Smith, J.T., Popa, S.M., Acohido, B.V., Crowley, W.F., Seminara, S., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2004. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 145, 4073-4077.
- Goudet, G., Belin, F., Bezard, J., Gerard, N., 1999. Intrafollicular content of luteinizing hormone receptor, alpha-inhibin, and aromatase in relation to follicular growth, estrous cycle stage, and oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Biol Reprod* 60, 1120-1127.
- Greaves, H.E., Kalariotes, V., Cleaver, B.D., Porter, M.B., Sharp, D.C., 2001. Effects of ovarian input on GnRH and LH secretion immediately postovulation in pony mares. *Theriogenology* 55, 1095-1106.
- Guillaume, D., Bruneau, B., Briant, C., 2002. Comparison of the effects of two GnRH antagonists on LH and FSH secretion, follicular growth and ovulation in the mare. *Reprod Nutr Dev* 42, 251-264.

Guillaume, D., Duchamp, G., Nagy, P., Palmer, E., 2000. Determination of minimum light treatment required for photostimulation of winter anoestrous mares. *J Reprod Fertil Suppl*, 205-216.

Guillou, F., Combarous, Y., 1983. Purification of equine gonadotropins and comparative study of their acid-dissociation and receptor-binding specificity. *Biochim Biophys Acta* 755, 229-236.

Gutierrez-Pascual, E., Leprince, J., Martinez-Fuentes, A.J., Segalas-Milazzo, I., Pineda, R., Roa, J., Duran-Prado, M., Guilhaudis, L., Desperrois, E., Lebreton, A., Pinilla, L., Tonon, M.C., Malagon, M.M., Vaudry, H., Tena-Sempere, M., Castano, J.P., 2009. In vivo and in vitro structure-activity relationships and structural conformation of Kisspeptin-10-related peptides. *Mol Pharmacol* 76, 58-67.

Gutierrez-Pascual, E., Martinez-Fuentes, A.J., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Malagon, M.M., Castano, J.P., 2007. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol* 19, 521-530.

H

Han, S.K., Gottsch, M.L., Lee, K.J., Popa, S.M., Smith, J.T., Jakawich, S.K., Clifton, D.K., Steiner, R.A., Herbison, A.E., 2005. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 25, 11349-11356.

Harrison, L.A., Squires, E.L., Nett, T.M., McKinnon, A.O., 1990. Use of gonadotropin-releasing hormone for hastening ovulation in transitional mares. *J Anim Sci* 68, 690-699.

Hart, P.J., Squires, E.L., Imel, K.J., Nett, T.M., 1984. Seasonal variation in hypothalamic content of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), pituitary receptors for GnRH, and pituitary content of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the mare. *Biol Reprod* 30, 1055-1062.

Hashizume, T., Saito, H., Sawada, T., Yaegashi, T., Ezzat, A.A., Sawai, K., Yamashita, T., 2010. Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats. *Anim Reprod Sci* 118, 37-41.

Herde, M.K., Geist, K., Campbell, R.E., Herbison, A.E., 2011. Gonadotropin-releasing hormone neurons extend complex highly branched dendritic trees outside the blood-brain barrier. *Endocrinology* 152, 3832-3841.

Hiden, U., Bilban, M., Knofler, M., Desoye, G., 2007. Kisspeptins and the placenta: regulation of trophoblast invasion. *Rev Endocr Metab Disord* 8, 31-39.

Hines, K.K., Affleck, K.J., Barrows, S.P., Murdoch, W.L., Fitzgerald, B.P., Loy, R.G., 1991. Follicle-stimulating hormone pulse amplitude decreases with the onset of the breeding season in the mare. *Biol Reprod* 44, 516-521.

Hoffman, G.E., Le, W.W., Franceschini, I., Caraty, A., Advis, J.P., 2011. Expression of fos and in vivo median eminence release of LHRH identifies an active role for preoptic area kisspeptin neurons in synchronized surges of LH and LHRH in the ewe. *Endocrinology* 152, 214-222.

Homma, T., Sakakibara, M., Yamada, S., Kinoshita, M., Iwata, K., Tomikawa, J., Kanazawa, T., Matsui, H., Takatsu, Y., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Maeda, K., Tsukamura, H., 2009. Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biol Reprod* 81, 1216-1225.

Horikoshi, Y., Matsumoto, H., Takatsu, Y., Ohtaki, T., Kitada, C., Usuki, S., Fujino, M., 2003. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 914-919.

Hyland, J.H., Wright, P.J., Clarke, I.J., Carson, R.S., Langsford, D.A., Jeffcott, L.B., 1987. Infusion of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) induces ovulation and fertile oestrus in mares during seasonal anoestrus. *J Reprod Fertil Suppl* 35, 211-220.

I

Irvine, C.H., 1979. Kinetics of gonadotrophins in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*, 131-141.

Irvine, C.H., Alexander, S.L., 1987. A novel technique for measuring hypothalamic and pituitary hormone secretion rates from collection of pituitary venous effluent in the normal horse. *J Endocrinol* 113, 183-192.

Irvine, C.H., Alexander, S.L., 1994. The dynamics of gonadotrophin-releasing hormone, LH and FSH secretion during the spontaneous ovulatory surge of the mare as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood. *J Endocrinol* 140, 283-295.

Irvine, C.H., Alexander, S.L., 1997. Patterns of secretion of GnRH, LH and FSH during the postovulatory period in mares: mechanisms prolonging the LH surge. *J Reprod Fertil* 109, 263-271.

Irvine, C.H., Turner, J.E., Alexander, S.L., Shand, N., van Noordt, S., 1998. Gonadotrophin profiles and dioestrous pulsatile release patterns in mares as determined by collection of jugular blood at 4 h intervals throughout an oestrous cycle. *J Reprod Fertil* 113, 315-322.

Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B.V., Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80, 264-272.

J

Jacob, J.C., Gastal, E.L., Gastal, M.O., Carvalho, G.R., Beg, M.A., Ginther, O.J., 2009. Temporal relationships and repeatability of follicle diameters and hormone concentrations within individuals in mares. *Reprod Domest Anim* 44, 92-99.

K

Kadokawa, H., Matsui, M., Hayashi, K., Matsunaga, N., Kawashima, C., Shimizu, T., Kida, K., Miyamoto, A., 2008. Peripheral administration of kisspeptin-10 increases plasma concentrations of GH as well as LH in prepubertal Holstein heifers. *J Endocrinol* 196, 331-334.

Kaiser, U.B., Jakubowiak, A., Steinberger, A., Chin, W.W., 1997. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology* 138, 1224-1231.

Kanda, S., Akazome, Y., Matsunaga, T., Yamamoto, N., Yamada, S., Tsukamura, H., Maeda, K., Oka, Y., 2008. Identification of KiSS-1 product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*oryzias latipes*). *Endocrinology* 149, 2467-2476.

Kauffman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., Tena-Sempere, M., 2007. Sexual differentiation of Kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148, 1774-1783.

Kavvasoglu, S., Ozkan, Z.S., Kumbak, B., Simsek, M., Ilhan, N., 2011. Association of kisspeptin-10 levels with abortus imminens: a preliminary study. *Arch Gynecol Obstet*.

Keel, B.A., Harms, R.L., Grotjan, H.E., Jr., 1990. Characterization of the acidic forms of ovine pituitary luteinizing hormone. *Acta Endocrinol (Copenh)* 123, 563-570.

Keel, B.A., Schanbacher, B.D., 1987. Charge microheterogeneity of ovine follicle-stimulating hormone in rams and steroid-treated wethers. *Biol Reprod* 37, 786-796.

Keen, K.L., Wegner, F.H., Bloom, S.R., Ghatei, M.A., Terasawa, E., 2008. An increase in kisspeptin-54 release occurs with the pubertal increase in luteinizing hormone-releasing hormone-1 release in the stalk-median eminence of female rhesus monkeys in vivo. *Endocrinology* 149, 4151-4157.

Kerban, A., Boerboom, D., Sirois, J., 1999. Human chorionic gonadotropin induces an inverse regulation of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in theca interna and granulosa cells of equine preovulatory follicles. *Endocrinology* 140, 667-674.

- Khorram, O., Pau, K.Y., Spies, H.G., 1987. Bimodal effects of neuropeptide Y on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone in conscious rabbits. *Neuroendocrinology* 45, 290-297.
- Kilmer, D.M., Sharp, D.C., Berglund, L.A., Grubaugh, W., McDowell, K.J., Peck, L.S., 1982. Melatonin rhythms in Pony mares and foals. *J Reprod Fertil Suppl* 32, 303-307.
- Kim, G.L., Dhillon, S.S., Belsham, D.D., 2010. Kisspeptin directly regulates neuropeptide Y synthesis and secretion via the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in NPY-secreting hypothalamic neurons. *Endocrinology* 151, 5038-5047.
- Kimura, J., Hirano, Y., Takemoto, S., Nambo, Y., Ishinazaka, T., Himeno, R., Mishima, T., Tsumagari, S., Yokota, H., 2005. Three-dimensional reconstruction of the equine ovary. *Anat Histol Embryol* 34, 48-51.
- King, S.S., Douglas, B.L., Roser, J.F., Silvia, W.J., Jones, K.L., 2010. Differential luteolytic function between the physiological breeding season, autumn transition and persistent winter cyclicity in the mare. *Anim Reprod Sci* 117, 232-240.
- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Maeda, K., 2005. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146, 4431-4436.
- Kinsey-Jones, J.S., Li, X.F., Knox, A.M., Wilkinson, E.S., Zhu, X.L., Chaudhary, A.A., Milligan, S.R., Lightman, S.L., O'Byrne, K.T., 2009. Down-regulation of hypothalamic kisspeptin and its receptor, Kiss1r, mRNA expression is associated with stress-induced suppression of luteinising hormone secretion in the female rat. *J Neuroendocrinol* 21, 20-29.
- Kinsey-Jones, J.S., Li, X.F., Luckman, S.M., O'Byrne, K.T., 2008. Effects of kisspeptin-10 on the electrophysiological manifestation of gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the female rat. *Endocrinology* 149, 1004-1008.
- Kirby, E.D., Geraghty, A.C., Ubuka, T., Bentley, G.E., Kaufer, D., 2009. Stress increases putative gonadotropin inhibitory hormone and decreases luteinizing hormone in male rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11324-11329.
- Kirby, H.R., Maguire, J.J., Colledge, W.H., Davenport, A.P., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVII. Kisspeptin receptor nomenclature, distribution, and function. *Pharmacol Rev* 62, 565-578.
- Klett, D., Bernard, S., Lecompte, F., Leroux, H., Magallon, T., Locatelli, A., Lepape, A., Combarnous, Y., 2003. Fast renal trapping of porcine luteinizing hormone (pLH) shown by ¹²³I-scintigraphic imaging in rats explains its short circulatory half-life. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 64.
- Knight, P.G., Beard, A.J., Wrathall, J.H., Castillo, R.J., 1989. Evidence that the bovine ovary secretes large amounts of monomeric inhibin alpha subunit and its isolation from bovine follicular fluid. *J Mol Endocrinol* 2, 189-200.
- Knight, P.G., Glistler, C., 2001. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* 121, 503-512.
- Kotani, M., Detheux, M., Vandenbogaerde, A., Communi, D., Vanderwinden, J.M., Le Poul, E., Brezillon, S., Tyldesley, R., Suarez-Huerta, N., Vandeput, F., Blanpain, C., Schiffmann, S.N., Vassart, G., Parmentier, M., 2001. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276, 34631-34636.
- Krege, J.H., Hodgkin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., Smithies, O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15677-15682.

L

- Lapatto, R., Pallais, J.C., Zhang, D., Chan, Y.M., Mahan, A., Cerrato, F., Le, W.W., Hoffman, G.E., Seminara, S.B., 2007. Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology* 148, 4927-4936.
- Lapin, D.R., Ginther, O.J., 1977. Induction of ovulation and multiple ovulations in seasonally anovulatory and ovulatory mares with an equine pituitary extract. *J Anim Sci* 44, 834-842.
- Lardic L., Rico C., Monniaux D., 2010. Tests de sensibilité d'un kit DIASOURCE de dosage d' oestradiol-17 β , 27 ème Colloque IBS, CORATA, Marseille, 15-17 septembre 2010.
- Lee, D.K., Nguyen, T., O'Neill, G.P., Cheng, R., Liu, Y., Howard, A.D., Coulombe, N., Tan, C.P., Tang-Nguyen, A.T., George, S.R., O'Dowd, B.F., 1999. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 446, 103-107.
- Lee, J.H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88, 1731-1737.
- Lee, J.H., Welch, D.R., 1997. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer Res* 57, 2384-2387.
- Lee, J.Y., Moon, J.S., Eu, Y.J., Lee, C.W., Yang, S.T., Lee, S.K., Jung, H.H., Kim, H.H., Rhim, H., Seong, J.Y., Kim, J.I., 2009. Molecular interaction between kisspeptin decapeptide analogs and a lipid membrane. *Arch Biochem Biophys* 485, 109-114.
- Lee, W.S., Abbud, R., Hoffman, G.E., Smith, M.S., 1993. Effects of N-methyl-D-aspartate receptor activation on cFos expression in luteinizing hormone-releasing hormone neurons in female rats. *Endocrinology* 133, 2248-2254.
- Lehman, M.N., Merkley, C.M., Coolen, L.M., Goodman, R.L., 2010. Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res* 1364, 90-102.
- Lents, C.A., Heidorn, N.L., Barb, C.R., Ford, J.J., 2008. Central and peripheral administration of kisspeptin activates gonadotropin but not somatotropin secretion in prepubertal gilts. *Reproduction* 135, 879-887.
- Levy, I., Duchamp, G., 2007. A single subcutaneous administration of buserelin induces ovulation in the mare: field data. *Reprod Domest Anim* 42, 550-554.
- Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I.J., Smith, J.T., 2011. Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *J Neuroendocrinol* 23, 871-882.
- Lindzey, J., Jayes, F.L., Yates, M.M., Couse, J.F., Korach, K.S., 2006. The bi-modal effects of estradiol on gonadotropin synthesis and secretion in female mice are dependent on estrogen receptor- α . *J Endocrinol* 191, 309-317.
- Liu, X., Lee, K., Herbison, A.E., 2008. Kisspeptin excites gonadotropin-releasing hormone neurons through a phospholipase C/calcium-dependent pathway regulating multiple ion channels. *Endocrinology* 149, 4605-4614.
- Lofstedt, R.M., Patel, J.H., 1989. Evaluation of the ability of altrenogest to control the equine estrous cycle. *J Am Vet Med Assoc* 194, 361-364.
- Louis, G.W., Greenwald-Yarnell, M., Phillips, R., Coolen, L.M., Lehman, M.N., Myers, M.G., Jr., 2011. Molecular mapping of the neural pathways linking leptin to the neuroendocrine reproductive axis. *Endocrinology* 152, 2302-2310.
- Loy, R.G., Buell, J.R., Stevenson, W., Hamm, D., 1979. Sources of variation in response intervals after prostaglandin treatment in mares with functional corpora lutea. *J Reprod Fertil Suppl*, 229-235.

Luque, R.M., Cordoba-Chacon, J., Gahete, M.D., Navarro, V.M., Tena-Sempere, M., Kineman, R.D., Castano, J.P., 2011. Kisspeptin regulates gonadotroph and somatotroph function in nonhuman primate pituitary via common and distinct signaling mechanisms. *Endocrinology* 152, 957-966.

Luque, R.M., Kineman, R.D., Tena-Sempere, M., 2007. Regulation of hypothalamic expression of KiSS-1 and GPR54 genes by metabolic factors: analyses using mouse models and a cell line. *Endocrinology* 148, 4601-4611.

M

Magee, C., Foradori, C.D., Bruemmer, J.E., Arreguin-Arevalo, J.A., McCue, P.M., Handa, R.J., Squires, E.L., Clay, C.M., 2009. Biological and anatomical evidence for kisspeptin regulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis of estrous horse mares. *Endocrinology* 150, 2813-2821.

Mahachoklertwattana, P., Sanchez, J., Kaplan, S.L., Grumbach, M.M., 1994. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors mediate the release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by NMDA in a hypothalamic GnRH neuronal cell line (GT1-1). *Endocrinology* 134, 1023-1030.

Mahesh, V.B., Brann, D.W., 2005. Regulatory role of excitatory amino acids in reproduction. *Endocrine* 28, 271-280.

Martoriati, A., Gerard, N., 2003. Interleukin-1 (IL-1) system gene expression in granulosa cells: kinetics during terminal preovulatory follicle maturation in the mare. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 42.

Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H., Ohtaki, T., 2004. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 383-388.

Matteri, R.L., Papkoff, H., Ng, D.A., Swedlow, J.R., Chang, Y.S., 1986. Isolation and characterization of three forms of luteinizing hormone from the pituitary gland of the horse. *Biol Reprod* 34, 571-578.

McCue, P.M., Carney, N.J., Hughes, J.P., Rivier, J., Vale, W., Lasley, B.L., 1992. Ovulation and embryo recovery rates following immunization of mares against an inhibin alpha-subunit fragment. *Theriogenology* 38, 823-831.

McCue, P.M., Squires, E.L., 2002. Persistent anovulatory follicles in the mare. *Theriogenology* 58, 541-543.

McDonald, J.K., Lumpkin, M.D., Samson, W.K., McCann, S.M., 1985. Neuropeptide Y affects secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 561-564.

McKinnon, A.O., Voss, J.L., 1993. *Equine Reproduction*, In: Lea & Febiger, P., London (Ed.).

McNatty, K.P., Hudson, N.L., Ball, K., Forbes, S., 1988. Treatment of seasonally anestrus Romney ewes with continuous infusion of low doses of GnRH: effects on estrus, ovulation and plasma progesterone concentration. *Theriogenology* 30, 953-960.

Mead, E.J., Maguire, J.J., Kuc, R.E., Davenport, A.P., 2007. Kisspeptins are novel potent vasoconstrictors in humans, with a discrete localization of their receptor, G protein-coupled receptor 54, to atherosclerosis-prone vessels. *Endocrinology* 148, 140-147.

Melrose, P.A., Pickel, C., Cheramie, H.S., Henk, W.G., Littlefield-Chabaud, M.A., French, D.D., 1994. Distribution and morphology of immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the basal forebrain of ponies. *J Comp Neurol* 339, 269-287.

Messenger, S., Chatzidakis, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinger, I., Lomet, D., Carlton, M.B., Colledge, W.H., Caraty, A., Aparicio, S.A., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 1761-1766.

Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V., 2009. The neuroanatomy of the kisspeptin system in the mammalian brain. *Peptides* 30, 26-33.

Moore, L.G., Ng Chie, W., Hudson, N.L., McNatty, K.P., 2000. Isoforms and half-life of FSH from sheep with different reproductive states. *J Endocrinol* 165, 185-192.

Morel, M.C., Newcombe, J.R., Hayward, K., 2010. Factors affecting pre-ovulatory follicle diameter in the mare: the effect of mare age, season and presence of other ovulatory follicles (multiple ovulation). *Theriogenology* 74, 1241-1247.

Morris, J.A., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., 2004. Sexual differentiation of the vertebrate nervous system. *Nat Neurosci* 7, 1034-1039.

Muir, A.I., Chamberlain, L., Elshourbagy, N.A., Michalovich, D., Moore, D.J., Calamari, A., Szekeres, P.G., Sarau, H.M., Chambers, J.K., Murdock, P., Steplewski, K., Shabon, U., Miller, J.E., Middleton, S.E., Darker, J.G., Larminie, C.G., Wilson, S., Bergsma, D.J., Emson, P., Faull, R., Philpott, K.L., Harrison, D.C., 2001. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276, 28969-28975.

N

Nagaoka, K., Nambo, Y., Nagamine, N., Nagata, S.I., Tanaka, Y., Shinbo, H., Tsunoda, N., Taniyama, H., Watanabe, G., Groome, N.P., Taya, K., 1999. A selective increase in circulating inhibin and inhibin pro-alphaC at the time of ovulation in the mare. *Am J Physiol* 277, E870-875.

Nagy, P., Huszenicza, G., Reiczigel, J., Juhasz, J., Kulcsar, M., Abavary, K., Guillaume, D., 2004. Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares. *Theriogenology* 61, 203-214.

Nambo, Y., Kaneko, H., Nagata, S., Oikawa, M., Yoshihara, T., Nagamine, N., Watanabe, G., Taya, K., 1998. Effect of passive immunization against inhibin on FSH secretion, folliculogenesis and ovulation rate during the follicular phase of the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 50, 545-557.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Barreiro, M.L., Roa, J., Sanchez-Criado, J.E., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2004. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 145, 4565-4574.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2005a. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 146, 1689-1697.

Navarro, V.M., Castellano, J.M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Nogueiras, R., Vazquez, M.J., Barreiro, M.L., Magni, P., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2005b. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 146, 156-163.

Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29, 11859-11866.

Noden, P.A., Oxender, W.D., Hafs, H.D., 1975. The cycle of oestrus, ovulation and plasma levels of hormones in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*, 189-192.

Noden, P.A., Oxender, W.D., Hafs, H.D., 1978. Early changes in serum progesterone, estradiol and LH during prostaglandin F₂α-induced luteolysis in mares. *J Anim Sci* 47, 666-671.

O

Oakley, A.E., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2009. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 30, 713-743.

Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa,

T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2001. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411, 613-617.

Oishi, S., Misu, R., Tomita, K., Setsuda, S., Masuda, R., Ohno, H., Naniwa, Y., Ieda, N., Inoue, N., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.-i., Hirasawa, A., Tsujimoto, G., Fujii, N., 2011. Activation of Neuropeptide FF Receptors by Kisspeptin Receptor Ligands. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2, 53-57.

Ottm, E.N., Godwin, J.G., Petersen, S.L., 2002. Glutamatergic Signaling through the N-Methyl-d-Aspartate Receptor Directly Activates Medial Subpopulations of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) Neurons, But Does Not Appear to Mediate the Effects of Estradiol on LHRH Gene Expression. *Endocrinology* 143, 4837-4845.

Oxender, W.D., Noden, P.A., Hafs, H.D., 1977. Estrus, ovulation, and serum progesterone, estradiol, and LH concentrations in mares after an increased photoperiod during winter. *Am J Vet Res* 38, 203-207.

P

Pallais, J.C., Bo-Abbas, Y., Pitteloud, N., Crowley, W.F., Jr., Seminara, S.B., 2006. Neuroendocrine, gonadal, placental, and obstetric phenotypes in patients with IHH and mutations in the G-protein coupled receptor, GPR54. *Mol Cell Endocrinol* 254-255, 70-77.

Palmer, E., 1978. Control of the oestrous cycle of the mare. *J Reprod Fertil* 54, 495-505.

Palmer, E., Driancourt, M.A., Ortavant, R., 1982. Photoperiodic stimulation of the mare during winter anoestrus. *J Reprod Fertil Suppl* 32, 275-282.

Palmer, E., Jousset, B., 1975. Urinary oestrogen and plasma progesterone levels in non-pregnant mares. *J Reprod Fertil Suppl*, 213-221.

Palmer, E., Terqui, M., 1977. The measurement of total plasma oestrogens during the follicular phase of the mare's oestrous cycle. *Theriogenology* 7, 331-338.

Park, D.W., Lee, S.K., Hong, S.R., Han, A.R., Kwak-Kim, J., Yang, K.M., 2012. Expression of Kisspeptin and its Receptor GPR54 in the First Trimester Trophoblast of Women with Recurrent Pregnancy Loss. *Am J Reprod Immunol* 67, 132-139.

Pasquier, J., Lafont, A.G., Leprince, J., Vaudry, H., Rousseau, K., Dufour, S., 2011. First evidence for a direct inhibitory effect of kisspeptins on LH expression in the eel, *Anguilla anguilla*. *Gen Comp Endocrinol* 173, 216-225.

Patterson, M., Murphy, K.G., Thompson, E.L., Patel, S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2006. Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *J Neuroendocrinol* 18, 349-354.

Pheng, V., Uenoyama, Y., Homma, T., Inamoto, Y., Takase, K., Yoshizawa-Kumagaye, K., Isaka, S., Watanabe, T.X., Ohkura, S., Tomikawa, J., Maeda, K., Tsukamura, H., 2009. Potencies of centrally- or peripherally-injected full-length kisspeptin or its C-terminal decapeptide on LH release in intact male rats. *J Reprod Dev* 55, 378-382.

Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Sanchez-Garrido, M.A., Romero, M., Ruiz-Pino, F., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Blumenrohr, M., Pinilla, L., van Noort, P.I., Tena-Sempere, M., 2010. Characterization of the potent gonadotropin-releasing activity of RF9, a selective antagonist of RF-amide-related peptides and neuropeptide FF receptors: physiological and pharmacological implications. *Endocrinology* 151, 1902-1913.

Plant, T.M., Ramaswamy, S., Dipietro, M.J., 2006. Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (*Macaca mulatta*) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* 147, 1007-1013.

Plotka, E.D., Foley, C.W., Witherspoon, D.M., Schmoller, G.C., Goetsch, D.D., 1975. Perioviulatory changes in peripheral plasma progesterone and estrogen concentrations in the mare. *Am J Vet Res* 36, 1359-1362.

Pompolo, S., Pereira, A., Estrada, K.M., Clarke, I.J., 2006. Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain. *Endocrinology* 147, 804-810.

Porter, M., Sharp, D., 2002. Gonadotropin-releasing hormone receptor trafficking may explain the relative resistance to pituitary desensitization in mares. *Theriogenology* 58, 523-526.

Porter MB, S.D., 2002. Gonadotropin-releasing hormone receptor trafficking may explain the relative resistance to pituitary desensitization in mares. *Theriogenology* 58, 523-526.

R

Ramaswamy, S., Gibbs, R.B., Plant, T.M., 2009. Studies of the localisation of kisspeptin within the pituitary of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) and the effect of kisspeptin on the release of non-gonadotropic pituitary hormones. *J Neuroendocrinol* 21, 795-804.

Ramaswamy, S., Guerriero, K.A., Gibbs, R.B., Plant, T.M., 2008. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 149, 4387-4395.

Rance, N.E., Bruce, T.R., 1994. Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 60, 337-345.

Redmond, J.S., Macedo, G.G., Velez, I.C., Caraty, A., Williams, G.L., Amstalden, M., 2011. Kisspeptin activates the hypothalamic-adenohypophyseal-gonadal axis in prepubertal ewe lambs. *Reproduction* 141, 541-548.

Revel, F.G., Ansel, L., Klosen, P., Saboureau, M., Pevet, P., Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V., 2007. Kisspeptin: a key link to seasonal breeding. *Rev Endocr Metab Disord* 8, 57-65.

Revel, F.G., Saboureau, M., Masson-Pevet, M., Pevet, P., Mikkelsen, J.D., Simonneaux, V., 2006. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 16, 1730-1735.

Reyes, A., Xia, L.N., Ferin, M., 1991. Modulation of the effects of N-methyl-D,L-aspartate on luteinizing hormone by the ovarian steroids in the adult rhesus monkey. *Neuroendocrinology* 54, 405-411.

Richard, N., Galmiche, G., Corvaisier, S., Caraty, A., Kottler, M.L., 2008. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 20, 381-393.

Richards, J.S., Hedin, L., 1988. Molecular aspects of hormone action in ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Annu Rev Physiol* 50, 441-463.

Roa, J., Vigo, E., Castellano, J.M., Gaytan, F., Navarro, V.M., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Ederveen, A.G., Pinilla, L., van Noort, P.I., Tena-Sempere, M., 2008a. Opposite roles of estrogen receptor (ER)-alpha and ERbeta in the modulation of luteinizing hormone responses to kisspeptin in the female rat: implications for the generation of the preovulatory surge. *Endocrinology* 149, 1627-1637.

Roa, J., Vigo, E., Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Casanueva, F.F., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2006. Hypothalamic expression of KiSS-1 system and gonadotropin-releasing effects of kisspeptin in different reproductive states of the female Rat. *Endocrinology* 147, 2864-2878.

Roa, J., Vigo, E., Garcia-Galiano, D., Castellano, J.M., Navarro, V.M., Pineda, R., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., 2008b. Desensitization of gonadotropin responses to kisspeptin in the female rat: analyses of LH and FSH secretion at different developmental and metabolic states. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294, E1088-1096.

Robertson, D.M., de Vos, F.L., Foulds, L.M., McLachlan, R.I., Burger, H.G., Morgan, F.J., Hearn, M.T., de Kretser, D.M., 1986. Isolation of a 31 kDa form of inhibin from bovine follicular fluid. *Mol Cell Endocrinol* 44, 271-277.

Rometo, A.M., Krajewski, S.J., Voytko, M.L., Rance, N.E., 2007. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 2744-2750.

Roseweir, A.K., Kauffman, A.S., Smith, J.T., Guerriero, K.A., Morgan, K., Pielecka-Fortuna, J., Pineda, R., Gottsch, M.L., Tena-Sempere, M., Moenter, S.M., Terasawa, E., Clarke, I.J., Steiner, R.A., Millar, R.P., 2009. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci* 29, 3920-3929.

S

Salazar-Ortiz, J., Camous, S., Briant, C., Lardic, L., Chesneau, D., Guillaume, D., 2011. Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (*Equus caballus*). *Reprod Biol Endocrinol* 9, 130.

Salazar-Ortiz J., A.E., Delpuech T., Monget P., Guillaume D. , 2004. Effet du niveau d'alimentation sur la croissance folliculaire et certains taux hormonaux plasmatiques de la jument. 30ème Journée de la Recherche équine - Les Haras Nationaux Paris, p:15-27

Schauer, S.N., Briant, C., Ottogalli, M., Decourt, C., Handel, I.G., Donadeu, F.X., 2011. Supplementation of equine early spring transitional follicles with luteinizing hormone stimulates follicle growth but does not restore steroidogenic activity. *Theriogenology* 75, 1076-1084.

Scoggin, C.F., Meira, C., McCue, P.M., Carnevale, E.M., Nett, T.M., Squires, E.L., 2002. Strategies to improve the ovarian response to equine pituitary extract in cyclic mares. *Theriogenology* 58, 151-164.

Sebert, M.E., Lomet, D., Said, S.B., Monget, P., Briant, C., Scaramuzzi, R.J., Caraty, A., 2010. Insights into the mechanism by which kisspeptin stimulates a preovulatory LH surge and ovulation in seasonally acyclic ewes: potential role of estradiol. *Domest Anim Endocrinol* 38, 289-298.

Seidah, N.G., Chrétien, M., 1999. Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Research* 848, 45-62.

Seminara, S.B., Dipietro, M.J., Ramaswamy, S., Crowley, W.F., Jr., Plant, T.M., 2006. Continuous human metastatin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (*Macaca mulatta*): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* 147, 2122-2126.

Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Jr., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwino, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaugenhaupt, S.A., Gusella, J.F., O'Rahilly, S., Carlton, M.B., Crowley, W.F., Jr., Aparicio, S.A., Colledge, W.H., 2003. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349, 1614-1627.

Shahab, M., Mastronardi, C., Seminara, S.B., Crowley, W.F., Ojeda, S.R., Plant, T.M., 2005. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2129-2134.

Sharp, D.C., Grubbaugh, W.R., 1987. Use of push-pull perfusion techniques in studies of gonadotrophin-releasing hormone secretion in mares. *J Reprod Fertil Suppl* 35, 289-296.

Sherwood, O.D., McShan, W.H., 1977. *Gonadotropins, Reproduction in domestic animals.*, Academic Press., New York USA, pp. 17-47.

Silvia, P.J., Meyer, S.L., Fitzgerald, B.P., 1995. Pulsatile gonadotropin secretion determined by frequent sampling from the intercavernous sinus of the mare: possible modulatory role of progesterone during luteolysis. *Biol Reprod* 53, 438-446.

Silvia, P.J., Squires, E.L., Nett, T.M., 1986. Changes in the hypothalamic-hypophyseal axis of mares associated with seasonal reproductive recrudescence. *Biol Reprod* 35, 897-905.

- Singh, J., Adams, G.P., 1998. Immunohistochemical distribution of follistatin in dominant and subordinate follicles and the corpus luteum of cattle. *Biol Reprod* 59, 561-570.
- Sirois, J., Kimmich, T.L., Fortune, J.E., 1991. Steroidogenesis by equine preovulatory follicles: relative roles of theca interna and granulosa cells. *Endocrinology* 128, 1159-1166.
- Smith, J.T., Acohido, B.V., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2006a. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 18, 298-303.
- Smith, J.T., Clay, C.M., Caraty, A., Clarke, I.J., 2007. KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 148, 1150-1157.
- Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2005. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 146, 3686-3692.
- Smith, J.T., Li, Q., Pereira, A., Clarke, I.J., 2009a. Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 150, 5530-5538.
- Smith, J.T., Li, Q., Yap, K.S., Shahab, M., Roseweir, A.K., Millar, R.P., Clarke, I.J., 2011. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology* 152, 1001-1012.
- Smith, J.T., Popa, S.M., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., 2006b. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 26, 6687-6694.
- Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Caraty, A., Millar, R.P., Clarke, I.J., 2008. Kisspeptin is present in ovine hypophysial portal blood but does not increase during the preovulatory luteinizing hormone surge: evidence that gonadotropes are not direct targets of kisspeptin in vivo. *Endocrinology* 149, 1951-1959.
- Smith, J.T., Saleh, S.N., Clarke, I.J., 2009b. Seasonal and Cyclical Change in the Luteinizing Hormone Response to Kisspeptin in the Ewe. *Neuroendocrinology*.
- Smith, J.T., Shahab, M., Pereira, A., Pau, K.Y., Clarke, I.J., 2010. Hypothalamic expression of KISS1 and gonadotropin inhibitory hormone genes during the menstrual cycle of a non-human primate. *Biol Reprod* 83, 568-577.
- Spicer, L.J., Echterkamp, S.E., 1995. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest Anim Endocrinol* 12, 223-245.
- Spicer, L.J., Santiago, C.A., Davidson, T.R., Bridges, T.S., Chamberlain, C.S., 2005. Follicular fluid concentrations of free insulin-like growth factor (IGF)-I during follicular development in mares. *Domest Anim Endocrinol* 29, 573-581.
- Squires, E.L., 2006. Superovulation in mares. *Vet Clin North Am Equine Pract* 22, 819-830.
- Stabenfeldt, G.H., Hughes, J.P., Evans, J.W., Neely, D.P., 1974. - Spontaneous Prolongation of Luteal Activity in the Mare. - 6, - 163.
- Stafford, L.J., Xia, C., Ma, W., Cai, Y., Liu, M., 2002. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer Res* 62, 5399-5404.
- Sticker, L.S., Thompson, D.L., Jr., Gentry, L.R., 2001. Pituitary hormone and insulin responses to infusion of amino acids and N-methyl-D,L-aspartate in horses. *J Anim Sci* 79, 735-744.
- Strauss, S.S., Chen, C.L., Kalra, S.P., Sharp, D.C., 1979. Localization of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in the hypothalamus of ovariectomized pony mares by season. *J Reprod Fertil Suppl*, 123-129.
- Swenson, K.L., Badre, S.E., Morsette, D.J., Sladek, C.D., 1998. N-methyl-D-aspartic acid stimulation of vasopressin release: role in osmotic regulation and modulation by gonadal steroids. *J Neuroendocrinol* 10, 679-685.

T

Tanaka, Y., Nagamine, N., Nambo, Y., Nagata, S., Nagaoka, K., Tsunoda, N., Taniyama, H., Yoshihara, T., Oikawa, M., Watanabe, G., Taya, K., 2000. Ovarian secretion of inhibin in mares. *J Reprod Fertil Suppl*, 239-245.

Tenenbaum-Rakover, Y., Commenges-Ducos, M., Iovane, A., Aumas, C., Admoni, O., de Roux, N., 2007. Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 1137-1144.

Thompson, E.L., Amber, V., Stamp, G.W., Patterson, M., Curtis, A.E., Cooke, J.H., Appleby, G.F., Dhillon, W.S., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., Murphy, K.G., 2009. Kisspeptin-54 at high doses acutely induces testicular degeneration in adult male rats via central mechanisms. *Br J Pharmacol* 156, 609-625.

Thompson, E.L., Murphy, K.G., 2010. Modulation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis by selective ligands of the KISS1R. *Curr Opin Investig Drugs* 11, 432-439.

Thompson, E.L., Murphy, K.G., Patterson, M., Bewick, G.A., Stamp, G.W., Curtis, A.E., Cooke, J.H., Jethwa, P.H., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2006. Chronic subcutaneous administration of kisspeptin-54 causes testicular degeneration in adult male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E1074-1082.

Thompson, E.L., Patterson, M., Murphy, K.G., Smith, K.L., Dhillon, W.S., Todd, J.F., Ghatei, M.A., Bloom, S.R., 2004. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 16, 850-858.

Thorson, J.F., Allen, C.C., Amstalden, M., Williams, G.L., 2010. GnRH therapeutics in the anovulatory mare revisited: physiological implications and clinical benefits of inducing reproductive transition with native hormone. *Animal Reproduction Science* 121, 22-23.

Tomita, K., Oishi, S., Cluzeau, J., Ohno, H., Navenot, J.M., Wang, Z.X., Peiper, S.C., Akamatsu, M., Fujii, N., 2007. SAR and QSAR studies on the N-terminally acylated pentapeptide agonists for GPR54. *J Med Chem* 50, 3222-3228.

Tomita, K., Oishi, S., Ohno, H., Peiper, S.C., Fujii, N., 2008. Development of novel G-protein-coupled receptor 54 agonists with resistance to degradation by matrix metalloproteinase. *J Med Chem* 51, 7645-7649.

Tortonese, D.J., Gregory, S.J., Eagle, R.C., Sneddon, C.L., Young, C.L., Townsend, J., 2001. The equine hypophysis: a gland for all seasons. *Reprod Fertil Dev* 13, 591-597.

Tovar, S., Vazquez, M.J., Navarro, V.M., Fernandez-Fernandez, R., Castellano, J.M., Vigo, E., Roa, J., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M., 2006. Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology* 147, 2696-2704.

Townsend, J., Westcott, K., Tortonese, D.J., 2009. Gonadotrophin subunit and GnRH receptor gene expression in the pars distalis of the equine pituitary. *Gen Comp Endocrinol* 160, 236-242.

True, C., Kirigiti, M.A., Kievit, P., Grove, K.L., Susan Smith, M., 2011. Leptin is not the critical signal for kisspeptin or luteinising hormone restoration during exit from negative energy balance. *J Neuroendocrinol*.

Turner, D.D., Garcia, M.C., Ginther, O.J., 1979. Follicular and gonadotropic changes throughout the year in pony mares. *Am J Vet Res* 40, 1694-1700.

U - V

Uenoyama, Y., Inoue, N., Pheng, V., Homma, T., Takase, K., Yamada, S., Ajiki, K., Ichikawa, M., Okamura, H., Maeda, K.I., Tsukamura, H., 2011. Ultrastructural evidence of kisspeptin-gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) interaction in the median eminence of female rats: implication of axo-axonal regulation of GnRH release. *J Neuroendocrinol* 23, 863-870.

Um, H.N., Han, J.M., Hwang, J.I., Hong, S.I., Vaudry, H., Seong, J.Y., 2010. Molecular coevolution of kisspeptins and their receptors from fish to mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1200, 67-74.

van Aerle, R., Kille, P., Lange, A., Tyler, C.R., 2008. Evidence for the existence of a functional Kiss1/Kiss1 receptor pathway in fish. *Peptides* 29, 57-64.

W

Wang, Q., Bing, C., Al-Barazanji, K., Mossakowaska, D.E., Wang, X.M., McBay, D.L., Neville, W.A., Tadayon, M., Pickavance, L., Dryden, S., Thomas, M.E., McHale, M.T., Gloyer, I.S., Wilson, S., Buckingham, R., Arch, J.R., Trayhurn, P., Williams, G., 1997. Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat. *Diabetes* 46, 335-341.

Watson, E.D., Al-Zi'abi, M.O., 2002. Characterization of morphology and angiogenesis in follicles of mares during spring transition and the breeding season. *Reproduction* 124, 227-234.

Watson, E.D., Bae, S.E., Thomassen, R., Thomson, S.R., Woad, K., Armstrong, D.G., 2004. Insulin-like growth factors-I and -II and insulin-like growth factor-binding protein-2 in dominant equine follicles during spring transition and the ovulatory season. *Reproduction* 128, 321-329.

Webel, S.K., Squires, E.L., 1982. Control of the oestrous cycle in mares with altrenogest. *J Reprod Fertil Suppl* 32, 193-198.

Wesson, J.A., Ginther, O.J., 1981. Influence of season and age on reproductive activity in pony mares on the basis of a slaughterhouse survey. *J Anim Sci* 52, 119-129.

Wildt, L., Hausler, A., Marshall, G., Hutchison, J.S., Plant, T.M., Belchetz, P.E., Knobil, E., 1981. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology* 109, 376-385.

Williams, G.L., Amstalden, M., Garcia, M.R., Williams, S.W., Ward, J., Blodgett, G.P., Quirk, K.S., 2000. Control of lactational and idiopathic anovulation in mares with low-dose, native GnRH: Anterior pituitary and ovarian responses to continuous, subcutaneous infusion. *Biol. Reprod.* 62, 226-226.

Wintermantel, T.M., Campbell, R.E., Porteous, R., Bock, D., Grone, H.J., Todman, M.G., Korach, K.S., Greiner, E., Perez, C.A., Schutz, G., Herbison, A.E., 2006. Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 52, 271-280.

Woods, G.L., Ginther, O.J., 1983. Induction of multiple ovulations during the ovulatory season in mares. *Theriogenology* 20, 347-355.

X - Y - Z

Xu, M., Hill, J.W., Levine, J.E., 2000. Attenuation of luteinizing hormone surges in neuropeptide Y knockout mice. *Neuroendocrinology* 72, 263-271.

Yoon, M.J., Boime, I., Colgin, M., Niswender, K.D., King, S.S., Alvarenga, M., Jablonka-Shariff, A., Pearl, C.A., Roser, J.F., 2007. The efficacy of a single chain recombinant equine luteinizing hormone (reLH) in mares: induction of ovulation, hormone profiles, and inter-ovulatory intervals. *Domest Anim Endocrinol* 33, 470-479.

Zalesky, D.D., Nett, T.M., Grotjan, H.E., 1992. Ovine luteinizing hormone: isoforms in the pituitary during the follicular and luteal phases of the estrous cycle and during anestrus. *J Anim Sci* 70, 3851-3856.

Zhang, C., Bosch, M.A., Ronnekleiv, O.K., Kelly, M.J., 2009. Gamma-aminobutyric acid B receptor mediated inhibition of gonadotropin-releasing hormone neurons is suppressed by kisspeptin-G protein-coupled receptor 54 signaling. *Endocrinology* 150, 2388-2394.

Zhang, C., Roepke, T.A., Kelly, M.J., Ronnekleiv, O.K., 2008. Kisspeptin depolarizes gonadotropin-releasing hormone neurons through activation of TRPC-like cationic channels. *J Neurosci* 28, 4423-4434.

Annexes

Annexe 1 : Protocole de dosage de la eLH

Constituants : eLH : NHPP AFP-5130A ; Ac : NHPP #AFP-240580, A F Parlow

Marquage de la eLH à l'iodogène :

Alicot de 5 µg de eLH dans 10µL de tampon phosphate 0,01M

Alicot de 10 µl d'iodogène de Pierce (concentration = 1 µg/µL) (ref 28600)

Iode 10 µl

Temps réaction 6 min, arrêt de la réaction avec 200 µl de tampon phosphate 0,05M

Echantillon : 50 µl de plasma

Gamme : 5*50 µl par point de gamme (gamme réalisée dans le plasma W452 vaccinée anti-GnRH du 30.10.07). Etendue de la gamme : 0,125 à 32 ng/ml.

5*50 µl de plasma W452 dans les LNS et les B0

J1 : Préparation solution 1^{er} anticorps au 1: 200 000^{ème} initial (soit au 1:440 000^{ème} final).

Pour 1000 tubes :

- ✓ 228 µl d'Ac au 1 : 200^{ème}
- ✓ 625 µl de SLN
- ✓ Qsp 250 ml de tampon véronal (0,025M) BSA (3g/l)

Distribution de la solution du 1^{er} anticorps : 250 µl par tube dans tous les tubes sauf les LNS et les TX.

Pour les LNS : distribuer 250 µl par tube de tampon véronal (0,025M) BSA (3g/l)

Incubation 24 h à + 4°C

J2 : Préparation de la solution de eLH* : 30 000 cpm/tube

Pour 1000 tubes : 30 000 000 cpm

- ✓ 250 ml de tampon véronal (0,025M) BSA (3g/l)

Distribution de la solution de eLH* : 250 µl par tube dans tous les tubes

Incubation 24 h à + 4°C dans la chambre froide radioactive

J3 : Préparation de la solution du 2^{ème} anticorps.

Pour 1000 tubes :

- ✓ 15 ml de SMAL
- ✓ 60 g de PEG 4000
- ✓ 100 ml de CaCl₂ (80g/l)
- ✓ Qsp 2 l d'H₂O déminéralisée

Distribution de la solution du 2^{ème} anticorps : 2 ml par tube dans tous les tubes sauf les TX.

Incubation de 24 h à 72 jours à + 4°C en chambre froide radioactive.

J4 : Centrifugations (500 tubes par centri) à 3200 tours/min pendant 30 min, à 4°C.

Retournement des tubes et laisser sécher au minimum 2 heures.

Comptage en cpm sur le compteur Wallac 1420 avec le programme 56

Annexe 2 : Protocole de dosage de la eFSH

Constituants : eFSH : 1368 ; Ac : 803. Yves Combarous (INRA de Nouzilly)

Marquage de la eFSH à l'iodogène :

Alicot de 2,5 µg de eFSH dans 10µL de tampon phosphate 0,01M

Alicot de 10 µl d'iodogène de Pierce (concentration = 1µg/µl) (ref 28600)

Iode 10 µl

Temps réaction 6 min, arrêt de la réaction avec 200 µl de tampon phosphate 0,05M

Echantillons : 100 µl de plasma

Gamme : 5*100 µl par point de gamme (gamme réalisée dans le plasma hypox W368 du 27/11/00). Etendue de la gamme : 0,39 à 200 ng/ml.

5*100µl de plasma hypox W368 dans les LNS et les B0

J1 : Préparation solution 1^{er} anticorps au 1: 80 000^{ème} initial (soit au 1:160 000^{ème} final) :

Pour 1000 tubes :

- ✓ 31,25 µl d'Ac au 1 : 10^{ème}
- ✓ 500 µl de SLN (0,5µl/tube)
- ✓ Qsp 300 ml de tampon véronal (0,025M) BSA (3g/l) tritonX-100 (1 ‰)

Distribution de la solution du 1^{er} anticorps : 300 µl par tube dans tous les tubes sauf les LNS et les TX.

Pour les LNS : distribuer 300 µl par tube de tampon véronal (0,025M) BSA (3g/l) tritonX-100 (1 ‰).

Incubation 24 h à + 4°C

J2 : Préparation de la solution de eFSH* : 25 000 cpm/tube

Pour 1000 tubes : 25 000 000 cpm

- ✓ 200 mL de tampon véronal (0,025M) BSA (3g/l) tritonX-100 (1 ‰)

Distribution de la solution de eFSH* : 200 µl par tube dans tous les tubes

Incubation 48 h à + 4°C dans la chambre froide radioactive

J4 : Préparation de la solution du 2^{ème} anticorps :

Pour 1000 tubes :

- ✓ 15 ml de SMAL
- ✓ 60 g de PEG 4000
- ✓ 100 ml de CaCl₂ (80g/l)
- ✓ Qsp 2 l d'H₂O déminéralisée

Distribution de la solution du 2^{ème} anticorps : 2 ml par tube dans tous les tubes sauf les TX.

Incubation de 8 h à 3 jours à + 4°C en chambre froide radioactive.

J5 : Centrifugations (500 tubes par centri) à 3200 tours/min pendant 30 min, à 4°C.

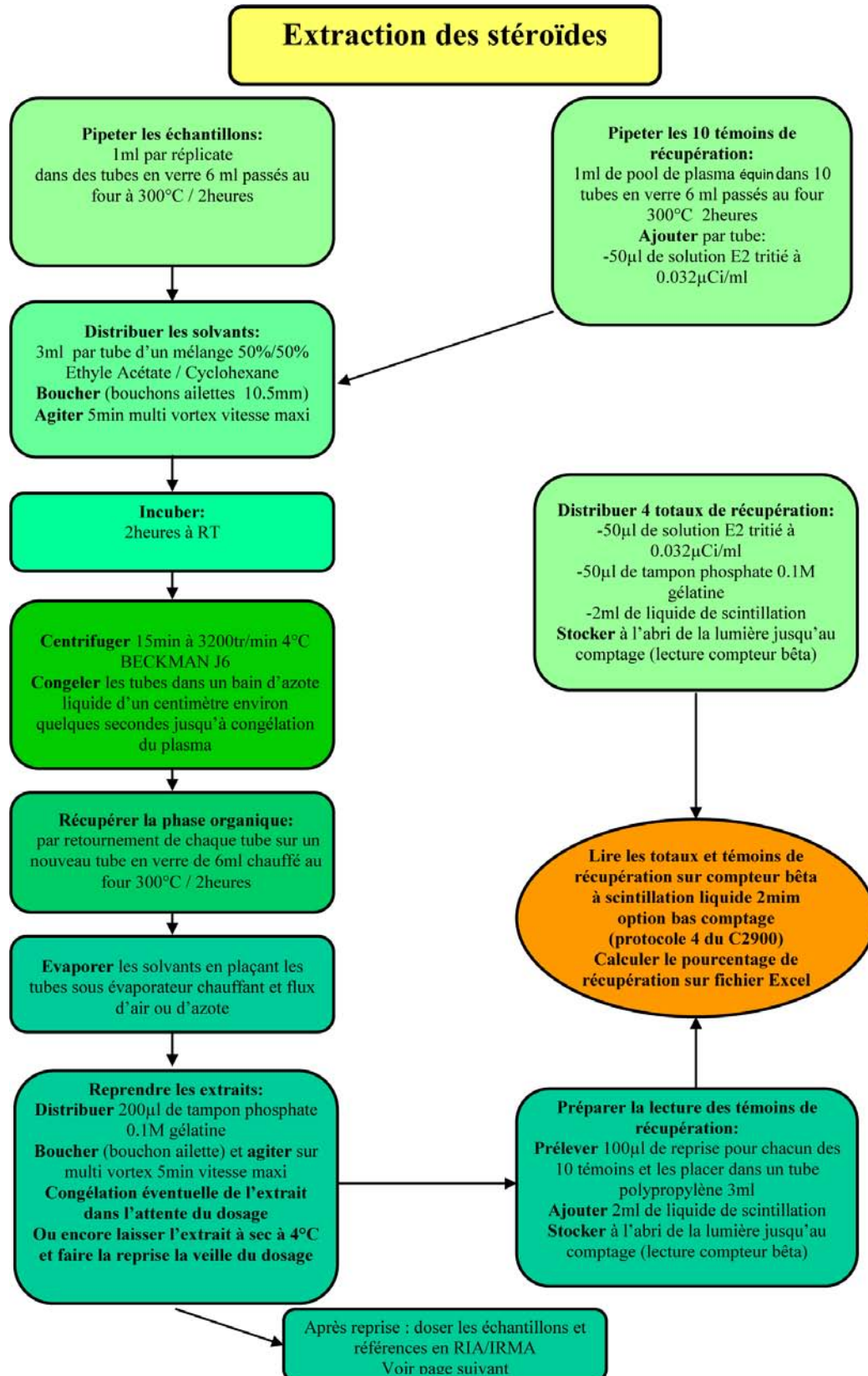
Retournement des tubes et laisser sécher au minimum 2 heures.

Comptage en cpm sur le compteur Wallac 1420 avec le programme 56

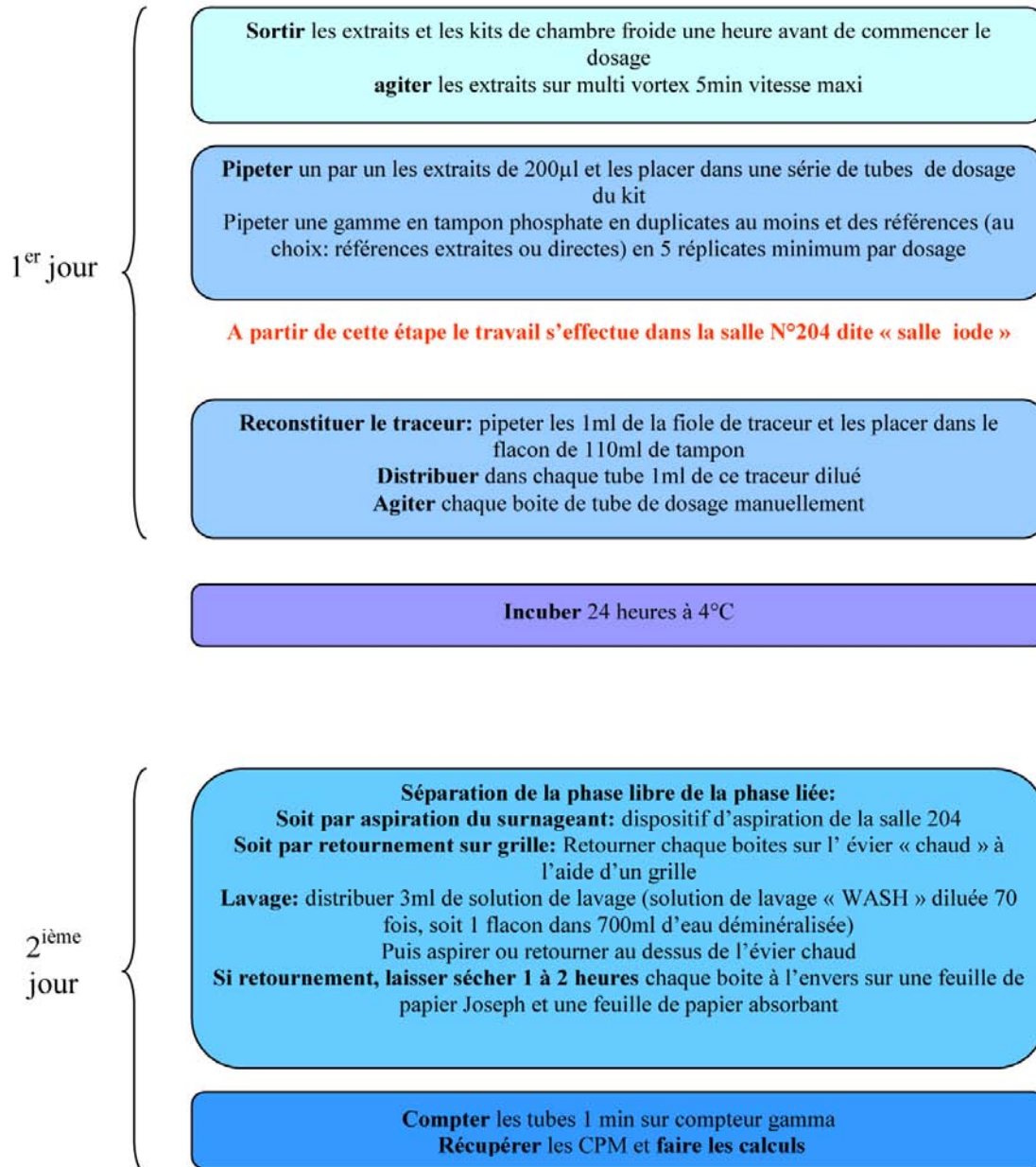
Annexe 3 : Protocole de dosage du 17 β -œstradiol dans le plasma

Constituants : Kit DIASOURCE E2-RIA-CT KIP0629.

D'après le mode opératoire proposé par Lionel Lardic.



Dosage RIA/IRMA compétition



Annexe 4 : Protocole de dosage de la progestérone dans le plasma

Référence : Canépa S., Lainé A-L., Bluteau A, Fagu C, Flon C, Monniaux D, Cahier techniques de l'INRA, (2008), 64, 19-30.

MATERIEL ET REACTIFS :

Plasmas: sang prélevé sur héparine

Plaques coatées stockées à -20°C

- Solution d'anticorps : solution d'anticorps anti-progestérone (Biogenesis, Abys SA), dilué au 1 : 160000^{ème} en tampon Tris 100 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 7,5, BSA 5g/l.
- Progestérone liée à la phosphatase alcaline (Immunometrics, London) diluée au 1 : 60000^{ème} en tampon Tris 100 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2 mM, pH 7,5, BSA 5g/l.
- Tablette de pNpp diluée dans une solution de diéthanolamine 100 mM, MgCl₂ 5mM, pH 9,8.

La solution pour les LNS a la même composition mais ne contient pas d'anticorps.

Gamme Etalon de Progestérone, Steraloid Q2600, de 0,25 à 32 ng/ml, préparées en plasma zéro des différentes espèces animales

DOSAGE :

J1 : Distribuer dans les plaques de 96 puits coatées avec des IgG de chèvre anti-IgG de souris :

10 µl des échantillons (en simple ou en duplicate) ou des contrôles plasmatiques (en duplicate)

140 µl de la solution d'anticorps diluée.

Incubation 1 nuit à 4°C

J2 : Distribuer 50 µl d'une solution de progestérone 11 alpha hemisuccinate, alkaline phosphatase conjugate. Incuber 1 heure à T°C ambiante à l'obscurité.

Distribuer 150 µl d'une solution de pNpp. Incuber 2 h à 37°C.

Lecture au spectrophotomètre à 405 nm.

Annexe 5 : Protocole de dosage du kisspeptide

Echantillon : 100 µl

Gamme : 5*100 µl par point de gamme (gamme réalisée dans du tampon Véronal 0,025 M, BSA 3 g/l, Triton 1 ‰). Etendue de la gamme : 4 à 1000 pg/ml.

5*100µl de tampon dans les LNS et les B0

J1 : Préparation solution 1^{er} anticorps au 1: 40 000^{ème} initial (soit au 1 :120 000^{ème} final).

Pour 1000 tubes :

- ✓ 250 µl d'Ac 564 au 1 : 100^{ème} du 20/10/09 (soit environ 22-25 % de liaison, mettre 28 µl pour atteindre 30 % de liaison)
- ✓ 1000 µl de SLN
- ✓ Qsp 100 ml de tampon véronal (0,025M) BSA (3g/L) SANS TRITON

Distribution de la solution du 1^{er} anticorps : 100 µl par tube dans tous les tubes sauf les LNS et les TX.

Pour les LNS : distribuer 300 µl par tube de tampon véronal (0,025M) BSA (3g/l)

Incubation 24 h à + 4°C

J2 : Préparation de la solution de KP* : 25 000 cpm/tube

Pour 1000 tubes : 25 000 000 cpm

- ✓ 100 mL de tampon véronal (0,025M) BSA (3g/l) SANS TRITON

Distribution de la solution de KP* : 100 µl par tube dans tous les tubes

Incubation 24 h à + 4°C dans la chambre froide radioactive

J3 : Préparation de la solution du 2^{ème} anticorps.

Pour 1000 tubes :

- ✓ 15 ml de SMAL
- ✓ 60 g de PEG 4000
- ✓ 100 ml de CaCl₂ (80g/l)
- ✓ Qsp 2 l d'H₂O déminéralisée

Distribution de la solution du 2^{ème} anticorps : 2 ml par tube dans tous les tubes sauf les TX.

Incubation de 24 h à 72 jours à + 4°C en chambre froide radioactive.

J4 : Centrifugations (500 tubes par centri) à 3200 tours/min pendant 30 min, à 4°C.

Retournement des tubes et laisser sécher au minimum 2 heures.

Comptage en cpm sur le compteur Wallac 1420 avec le programme 56

Le kisspeptide : nouvelle molécule pour la maîtrise du cycle chez la jument ?

Résumé

Les kisspeptides (KP), puissants sécrétagogues de la GnRH, agissent par l'intermédiaire du récepteur couplé aux protéines G, le GPR54. Une perfusion i.v. de KP est non seulement capable de synchroniser les ovulations chez la brebis cyclique, mais également d'induire un cycle chez la brebis en anœstrus. L'objectif de ma thèse a été d'étudier la neuroanatomie du système KP / GnRH, et de définir des applications potentielles du KP dans le contrôle du cycle chez la jument cyclique et en anœstrus.

Nos résultats ont permis de montrer que 1) le KP interagit avec le système GnRH au niveau hypothalamique, 2) une perfusion i.v. de KP en début de phase folliculaire conduit à une stimulation - quoique transitoire - de la sécrétion des gonadotropines, 3) une capacité limitée pour reconstituer le stock en GnRH et / ou LH / FSH pourrait expliquer la nature transitoire de la stimulation par le KP, 4) une perfusion de KP pendant 3 jours, depuis le début de la phase folliculaire, tend à avancer le pic péri-ovulatoire de LH et l'ovulation, 5) une perfusion plus longue (soit plus de 3 jours) de KP, pendant toute la phase folliculaire, n'induit pas une ovulation plus précoce, 6) pendant la saison d'anoestrus, une perfusion de KP pendant 3 jours stimule la sécrétion de LH, avec une intensité néanmoins inférieure à celle observée avec une perfusion de GnRH.

En conclusion, bien que l'utilisation potentielle du KP pour synchroniser ou induire l'ovulation pendant la saison de reproduction semble discutable, sa capacité à induire des cycles durant la période d'anœstrus présente un intérêt et mérite des études plus approfondies.

Mots clés : kisspeptide, jument, gonadotropines, phase folliculaire, anœstrus.

Résumé en anglais

Kisspeptins (KP) are very potent secretagogues of GnRH which act through the G protein-coupled receptor GPR54. An i.v. infusion of KP is not only able to synchronize ovulations of cyclic ewes, but also to induce cycle in anœstrus ewes. The aim of my thesis was to investigate the neuroanatomy of the KP / GnRH system, and define potential applications for KP in the control of the estrus cycle in the cyclic and anœstrus mares.

Our results showed that 1) KP interact with GnRH systems at the hypothalamic level, 2) an i.v. infusion of KP during early follicular phase leads to an enhanced - albeit transient - secretion of gonadotropins, 3) a limited ability to replenish GnRH and/or LH/FSH stores might explain the transient nature of the KP stimulation, 4) an infusion of KP for 3 days, since early follicular phase, modestly advances the periovulatory LH surge and the ovulation, 5) a longer (i.e. more than 3 days) infusion of KP during all the follicular phase does not lead to precocious ovulation, 6) during the anoestrus season, an infusion of KP for 3 days heightens LH secretion, with however a lower intensity to that observed with an infusion of GnRH.

In conclusion, albeit the potential use of KP to synchronize or induce ovulation during the breeding season appears questionable, its ability to induce cycles during the anœstrus period is of interest and warrants further investigation.

Key words: kisspeptin, mare, gonadotropins, follicular phase, anœstrus.