



**HAL**  
open science

# Etude de la sensibilité différentielle de l'hypothalamus à l'oestradiol pour induire le pic préovulatoire de LH et le comportement sexuel : comparaison entre brebis Ile-de-France et Romanov

Samia Ben Said

► **To cite this version:**

Samia Ben Said. Etude de la sensibilité différentielle de l'hypothalamus à l'oestradiol pour induire le pic préovulatoire de LH et le comportement sexuel : comparaison entre brebis Ile-de-France et Romanov. Sciences du Vivant [q-bio]. Université François Rabelais (Tours); Institut National Agronomique de Tunisie, 2009. Français. NNT : . tel-02814410

**HAL Id: tel-02814410**

**<https://hal.inrae.fr/tel-02814410v1>**

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, Technologies*

**Equipe : Contrôle Central de l'Ovulation**

**Physiologie de la Reproduction et des Comportements**

UMR INRA-CNRS-Université de Tours-Haras Nationaux

# THÈSE

présentée par :

**Samia BEN SAID**

soutenue le :20 mars 2009

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la vie

**Etude de la sensibilité différentielle de l'hypothalamus  
à l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH  
et le comportement sexuel : comparaison entre brebis  
Ile-de-France et Romanov**

**THÈSE dirigée par :**

**M. CARATY Alain**  
**M. HADDAD Brahim**

Ingénieur de Recherche, HDR, INRA, Nouzilly  
Professeur, INAT, Tunisie

**RAPPORTEURS :**

**M. BOCQUIER François**  
**M. KHALDI Gley**

Professeur, ENSA-INRA, Montpellier  
Professeur, INAT, Tunisie

**JURY :**

**M. BEN MRAD Moncef**  
**M. BOCQUIER François**  
**M. CARATY Alain**  
**M. CHEMINEAU Philippe**  
**M. HADDAD Brahim**  
**M. KHALDI Gley**

Professeur, INAT, Tunisie  
Professeur, ENSA-INRA, Montpellier  
Ingénieur de Recherche, HDR, INRA, Nouzilly  
Directeur de Recherche, INRA, Nouzilly  
Professeur, INAT, Tunisie  
Professeur, INAT, Tunisie

*A ma mère*

*A mon père*

*A mon frère et mes sœurs*

*A mes grands-parents*

## Remerciements

*A l'issu de cette thèse, j'aimerais remercier tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont participé à sa réalisation.*

*Je remercie l'Institut Français de Coopération et le Département PHASE pour avoir financé ce travail de thèse.*

*Merci à **Philippe Chemineau**, **Danièle MONNIAUX** et **Benoît MAPLAUX** pour leur accueil au sein de l'unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements.*

*Je remercie **Messieurs les membres du jury** pour avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Mes vifs remerciements s'adressent aux **membres de mon comité de thèse** pour avoir suivi ce travail tout au long de ces années.*

*Je ne saurais assez remercier **Alain CARATY**, pour m'avoir encadré pendant ces 4 années de thèse. Il a toujours été disponible pour moi, malgré un emploi du temps assez chargé. Merci Alain pour m'avoir initiée à la recherche scientifique, pour ta disponibilité de tous les instants (même pendant les vacances de Noël !), ta "bonne humeur", ton soutien, ta patience et surtout la rigueur scientifique que tu m'as enseignée. Merci aussi pour notre relation amical et toutes nos conversations! J'ai adoré travailler sur le modèle « mouton ».*

*Je dois aussi beaucoup à **Claude FABRE-NYS**. Je te suis reconnaissante pour ton engagement dans une grande partie de ce travail, pour m'avoir initiée à l'étude du comportement sexuel. Je te remercie pour l'intérêt et l'assiduité dont tu as fait preuve à l'égard de cette thèse. Je te remercie pour toutes les discussions scientifiques et non scientifiques, tes critiques constructives. Merci pour notre relation amicale, les souvenirs de vacances d'hiver, les petites barquettes de pâte de coing...ça va me manquer !*

*Merci à **Brahim HADDAD**, pour avoir accepté d'être le directeur « administratif » de ma thèse. Merci pour m'avoir facilité beaucoup de tâches administratives, parfois un peu trop compliquées !*

Merci à **Didier LOMET**, merci pour ta disponibilité et ton aide. Merci, pour les longues nuits de prélèvements, les milliers de tubes à doser et re-doser, pour avoir supporté mes protocoles qui changeaient tout le temps!

A toute l'équipe **hôpital-abattoir** : Gilles, Jean Paul, Luc, Christian, Jean Philippe et Albert, un grand merci pour votre bonne humeur, votre disponibilité et votre aide.

Je remercie vivement **Juliette Cognié** pour les interventions chirurgicales et nos petites discussions.

A **Francis Dupont, Lionel, Christelle et toute l'équipe de la bergerie**, ce n'était toujours pas facile de me trouver des brebis Romanov « adultes et de même âge »!!! Je garderai un souvenir particulier du dernier lot de brebis Francis!!

Merci à **Yves Tillet** pour sa disponibilité, son hospitalité, toutes les discussions scientifiques enrichissantes, les remarques pertinentes et constructives. Merci Yves de m'avoir initié à la neuro-anatomie.

La sympathie de toute l'équipe « **Contrôle centrale de l'ovulation** » m'a permis de passer des moments très agréables à Nouzilly. Je pense notamment à **Gilles Bruneau** pour sa bonne humeur, sa disponibilité, ses réponses à mes questions interminables ! Pour m'avoir initiée aux techniques de biologie moléculaire... « Tu m'as mis sur la paille ...».

A **Isabelle**, pour notre relation amicale, pour tes conseils. A **Christine Briant** pour toutes les discussions physio (brebis/jument), statistiques ou analyses des résultats.

A **Stéphanie et Marilyne**, pour toute l'aide technique. A **Anne Duittoz**, pour les discussions GnRH et cultures cellulaires. A **Monique Otogalli**, sa présence apaisante, son calme et sa bonne humeur. A **Marie Émilie**, pour ses conseils, son aide lors de la rédaction de ce mémoire. A **Caroline**, pour toutes les discussions, pour les pauses café, pour tous nos nombreux bavardages....

Merci à **Elodie Chaillou** pour sa disponibilité lors des discussions des protocoles d'immunohistochimie, de problèmes techniques et de l'analyse image.

Je remercie sincèrement **Catherine Taragnat et Joël Fontaine** pour leur assistance précieuse lors des expériences de cultures cellulaires.

A mes « coloc » de bureau **Jean Baptiste, Stéphanie, Sevrine et Marie**, c'était un plaisir de partager le même bureau avec vous et de discuter de nos sujets respectifs. Merci pour votre

bonne humeur. Merci pour vos encouragements et votre précieux soutien ! **JB**, tu prendras bien soin du « bébé » et « d'Arthur»!

Merci à **Daniel Guillaume** pour ses conseils en statistiques et les discussions un petit peu « compliquées » parfois!! J'ai enfin révisé mes cours de CM 2, Daniel !

Ce manuscrit est passé dans les mains de nombreuses personnes que je tiens à remercier chaleureusement pour leurs corrections et leurs conseils avisés : merci à **Yves Tillet, Claude Fabre-Nys, Valentin Feussi, Marie et Mathieu Keller**.

Au cours de ces années, de nombreux thésards, post-doc et stagiaires sont passés par là, une pensée à **Abdul, Balé, Xotchil, Sylvain, Guzel, Juan, Alexie...**cela a été un grand plaisir de vous croiser, à un de ces jours !!

Merci à **Audrey, Abdulrahmen et Fernando** pour leur précieux soutien et leurs encouragements. Merci d'avoir toujours trouvé les mots pour redonner le moral. Tous mes encouragements, Audrey c'est bientôt la fin.

Merci à **Marie Laure Touzé, Patricia Volland-Nail** et à **Marie Françoise Pinault** pour tous leurs conseils en bureautique et en recherche bibliographique.

Merci à nos informaticiens **Jean Yves, Julien, Robert**, pour m'avoir secouru maintes fois tout au long de cette thèse. Merci à **Daniel Tangy** (et bonne retraite !) pour toutes les petites astuces de l'analyse d'image.

Une pensée à ceux qui ont fait mon quotidien à la PRC : **Patrick, Barbara, Sophie, Gaël, Dany, Thierry, Maurice, Claudette, Béatrice, Ghislaine**. Merci pour tous les services fournis.

Une pensée à **Yves Cognié** qui m'a fait découvrir le monde de la recherche en m'acceptant en stage de DEA. Merci à **Gérard Baril, Jean Luc Touzé, Nati Poulin, Martine Plat** pour leur sympathie, et leur amitié.

A **Amina, Dorsaf, Iman et Valentin**, merci pour tous les moments passés ensemble, merci d'avoir partagé mes craintes et mes angoisses de thésarde. Merci d'avoir été là à tout moment.

Enfin merci à ceux qui me sont plus que chers : **maman, papa, mon frère, mes sœurs et mes grands parents**, malgré la distance vous m'avez toujours soutenue.

Que tous ceux que j'ai oublié de citer m'excusent !

## Abréviations

ACTH	Hormone Corticotrope (Adreno-Cortico-Tropic Hormone)
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHA	Aire hypothalamique antérieure
APO	Aire préoptique
ARC	Noyau arqué, terme anglo-saxon pour noyau infundibulaire (NI)
ARNm	Acide ribonucléique messager
BnST	Noyau du lit de la Strie Terminale
BSA	Albumine de sérum de bovin
CA	Commissure antérieure
CD	Noyau caudé
CRH	Corticotropine (Corticotrophine releasing hormone)
DA	Dopamine
dBB	Bande diagonale de Broca
DYN	Dynorphine A
EM	Eminence médiane
FSH	Hormone folliculo-stimulante (Folliculo-Stimulating-Hormone)
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
GnRH	Gonadolibérine (Gonadotropin-releasing-hormone)
HDM	Hypothalamus dorsomédian
HMB	Hypothalamus médiobasal
icv	Intra-cerebroventriculaire
IHC	Immuno-histochimique
ir	Immunoréactif(ve)
iv	Intraveineuse
LCR	Liquide céphalorachidien
LH	Hormone lutéinisante (Luteinizing Hormone)
NA	Noradrénaline
NKB	Neurokinine B
NPY	Neuropeptide Y
NSC	Noyau supra-chiasmatique

NSO	Noyau supra-optique
NVM	Noyau ventromedian de l'hypothalamus
OVLT	Organe vasculaire de la lame terminale
PAP	Peroxydase anti-peroxydase
PBS	Tampon Phosphate salé
POE	Peptides opioïdes endogènes
POMC	Proopiomélanocortine
PVN	Noyau paraventriculaire
RE $\beta$	Récepteur bêta à l'œstradiol
RE $\alpha$	Récepteur alpha à l'œstradiol
SEM	Ecart standard à la moyenne
SL	Septum latéral
SMAL	Sérum de mouton anti-immunoglobulines de lapin
SNC	Système nerveux central
TM	Faisceaux mammillo-thalamiques
TO	Tractus optique
TSH	Hormone thyroïdienne (Tyrosine Stimulating Hormone)

## Résumé

Chez la brebis ovariectomisée, la quantité d'œstradiol nécessaire pour induire le pic préovulatoire de GnRH/LH et le comportement sexuel est très inférieure à celle observée en fin de phase folliculaire naturelle. Cette dernière étant fortement liée au nombre d'ovulation, nous avons voulu déterminer si les seuils d'induction du pic préovulatoire de LH et du comportement d'œstrus diffèrent entre des brebis de prolificité différente (Ile de France (IF) vs Romanov (ROM)).

En utilisant un modèle de phase folliculaire artificielle, nous avons montré qu'un signal œstrogénique très faible permet d'induire le comportement sexuel chez la brebis ROM mais pas chez l'IF. A l'inverse, l'induction du pic préovulatoire de LH nécessite des quantités d'œstradiol très supérieures chez la brebis ROM par comparaison à l'IF. La latence d'apparition du comportement sexuel est identique chez les deux génotypes, mais sa durée est toujours supérieure chez la brebis ROM et le pic de LH apparaît plus tard chez cette race.

Nous avons ensuite voulu déterminer à quel niveau se situe la différence de sensibilité à l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH observée entre les deux races. L'exploration expérimentale de la sensibilité hypophysaire et hypothalamique à l'œstradiol, par différentes approches complémentaires, *in vivo* et *in vitro*, a montré que le moment du pic préovulatoire de LH est un évènement essentiellement contrôlé par l'hypothalamus. La latence d'apparition du pic préovulatoire de LH semble liée à une durée du feedback négatif hypothalamique de l'œstradiol plus longue chez la brebis ROM comparée à l'IF.

Nous avons également montré que chez la brebis ROM, des doses modérées d'œstradiol sont capable de stimuler une faible libération de GnRH dans le liquide céphalorachidien (LCR), sans qu'elle ne soit traduite au niveau hypophysaire par une augmentation parallèle de la libération de LH. La GnRH, participerait au contrôle du comportement sexuel induit par l'œstradiol. En effet, le comportement sexuel chute significativement sous l'effet d'un antagoniste de la GnRH administré par voie intra-cérébroventriculaire, au moment de la pleine réceptivité. Par contre, aucun effet de cette molécule n'a été observé sur la latence d'apparition du comportement de réceptivité induite par l'œstradiol.

Enfin, une étude immunohistochimique destinée à identifier le nombre et la distribution des récepteurs à l'œstradiol (RE $\alpha$ ) ainsi que les circuits impliqués dans le contrôle du comportement sexuel, a montré que la distribution des RE $\alpha$  est identique entre les deux races, mais leur nombre est globalement moins important chez la brebis ROM par comparaison à l'IF.

En résumé, nos travaux montrent une grande différence de sensibilité à l'œstradiol entre les deux races étudiées. Cette différence semble être essentiellement liée à un seuil de « lecture » différent du signal œstrogénique pour induire le pic préovulatoire de LH et le comportement sexuel.

## Abstract

The minimum requirement for estradiol (E) (dose and duration) to induce a preovulatory GnRH/LH surge and estrous behaviour was compared between two breeds of ewes having either single (Ile de France= IF) or multiple (Romanov= ROM) ovulations. The ewes were studied during a natural estrous cycle, and then throughout successive induced estrous cycles during which the length and amplitude of the rise in plasma E during the follicular phase was manipulated by means of silastic implants containing E. While a small E signal was sufficient to induce full estrous behaviour, independently of the LH surge in ROM ewes, the same treatment had no effect in IF ewes. In contrast, a much larger amount of E was required to induce the LH surge in ROM compared to IF ewes. Under all experimental conditions tested, the time of the onset of estrous behaviour was similar in both breeds but its duration was longer in ROM. The onset of the LH surge occurred earlier in IF ewes.

We then set out to explain these differences in sensitivity to E with respect to the LH surge, between the two breeds. The sensitivity of the pituitary gland and hypothalamus to E were studied using different *in vivo* and *in vitro* models.

Our results have shown that the latency to the onset of the LH surge was regulated by a negative feedback effect of E in the hypothalamus which took longer in ROM ewes. The timing of the LH surge appears to be controlled by the hypothalamus.

In ROM ewes, we were able to demonstrate that a moderate E signal stimulated slight secretion of GnRH into the cerebrospinal fluid that was not accompanied by a parallel response in the pituitary gland. Furthermore our results have shown that GnRH appears to be involved in the maintenance of estrous behaviour because intra-cerebroventricular infusion of a GnRH antagonist, at the point of the full sexual receptivity, was followed by a significant decrease in estrous behaviour. In contrast, there was no effect of the GnRH antagonist on the latency of estrous behaviour induced by E.

An immuno-histochemical study was carried out to test the hypothesis that the difference in sensitivity to estradiol between the two breeds is caused by alterations in the number and distribution of estradiol receptors (ER) in the hypothalamus. The results show that the distribution of ER was identical between the two breeds and similar to that described for other species. In contrast, the total number of ERs in the mediobasal hypothalamus was lower in ROM than in IF ewes.

In summary our results have shown that there is a difference in sensitivity to E between IF and ROM ewes for the induction of the LH surge and estrous behaviour. This difference is more than likely due to differences in the number of ERs and to different thresholds in the lecture of the E signal in the hypothalamus.

# Table des matières

I.	Activité de reproduction chez la brebis .....	- 1 -
A.	Saisonnalité de la reproduction.....	- 1 -
1.	Le cycle annuel de l'activité ovarienne .....	- 1 -
2.	Le cycle sexuel .....	- 2 -
B.	Contrôle hormonal de l'activité de reproduction.....	- 2 -
1.	Pendant la saison sexuelle .....	- 3 -
2.	Pendant l'ancestrus saisonnier .....	- 3 -
C.	Facteurs environnementaux contrôlant l'activité de reproduction .....	- 4 -
1.	La photopériode.....	- 4 -
2.	L'alimentation .....	- 5 -
3.	L'effet mâle .....	- 6 -
4.	Le stress .....	- 7 -
D.	Proliféricité et régulation du taux d'ovulation.....	- 9 -
1.	Définitions .....	- 9 -
2.	Différences hormonales et comportementales entre les races poly et mono- ouvlantes.....	- 10 -
II.	Régulation hypothalamo-hypophysaire.....	- 12 -
A.	Le système GnRH.....	- 12 -
1.	La GnRH .....	- 12 -
2.	Les neurones à GnRH.....	- 14 -
3.	Les récepteurs à la GnRH.....	- 15 -
4.	Rôle de la GnRH dans la fonction de reproduction.....	- 16 -
B.	Les cellules gonadotropes et les gonadotropines.....	- 16 -
C.	Contrôle de la sécrétion de GnRH et de LH.....	- 17 -
1.	La pulsatilité .....	- 17 -
2.	Pic préovulatoire de GnRH/LH .....	- 19 -
3.	Modèle de phase folliculaire.....	- 23 -
D.	Rôle du SNC dans le contrôle de la sécrétion de GnRH/LH.....	- 24 -
1.	Sites d'action de l'œstradiol .....	- 25 -
2.	Sites d'action de la progestérone et neuromédiateurs impliqués.....	- 30 -
III.	Le comportement sexuel.....	- 33 -
A.	Description .....	- 33 -

B.	Rôles des stéroïdes gonadiques dans le contrôle du comportement sexuel.....	- 34 -
1.	Besoins en progestérone .....	- 35 -
2.	Besoins en œstradiol .....	- 35 -
C.	Mécanismes centraux impliqués dans le contrôle du comportement sexuel.....	- 36 -
1.	Sites d'action des stéroïdes.....	- 36 -
2.	Neuromédiateurs impliqués dans le contrôle du comportement sexuel .....	- 36 -
IV.	Modes d'action de l'œstradiol et de la progestérone.....	- 38 -
A.	Les effets génomiques .....	- 38 -
B.	Les effets non-génomiques.....	- 39 -
1.	Effet de l'œstradiol .....	- 40 -
2.	Effet de la progestérone.....	- 41 -

<i>Objectifs</i> .....	-43-
------------------------	------

<i>Matériels &amp; Méthodes</i> .....	-46-
---------------------------------------	------

I.	Animaux et expérimentation .....	47
II.	Traitements hormonaux et cycle artificiel .....	47
III.	Canulation intracérébrale du 3 <sup>ème</sup> ventricule .....	48
IV.	Prélèvements.....	49
A.	Prélèvement sanguins .....	49
B.	Prélèvements de LCR .....	49
V.	Tests de comportement.....	50
VI.	Dosages hormonaux .....	51
A.	Dosage de la LH .....	51
1.	LH plasmatique .....	51
2.	LH dans les milieux de culture .....	51
B.	Dosage de la GnRH .....	51
1.	Extraction de LCR .....	51
2.	Le dosage .....	52
C.	Dosage d'œstradiol .....	52
1.	Œstradiol plasmatique .....	52
2.	Œstradiol dans le LCR.....	52
D.	Dosage de progestérone.....	53

<i>RESULTATS</i> .....	54
------------------------	----

*Chapitre I : Etude de la sensibilité différentielle à l'œstradiol en termes d'induction du pic préovulatoire de LH et du comportement sexuel : comparaison des brebis Ile-de-France et Romanov*

<i>Partie 1 : Article 1</i> .....	57
-----------------------------------	----

*Partie 2 : Effet du niveau de progestérone pendant la phase lutéale sur la réponse à l'œstradiol en termes de pic préovulatoire de LH et du comportement sexuel chez les brebis des deux races.* .....

I. Introduction .....	65
II. Matériels et Méthodes .....	66
A. Animaux et protocoles expérimentaux .....	66
B. Dosages hormonaux .....	67
C. Evaluation du comportement sexuel.....	67
D. Analyse des données.....	67
E. Analyse statistique.....	67
III. Résultats .....	68
A. Niveaux plasmatiques de progestérone .....	68
B. Effet de la dose de progestérone sur la latence du comportement de réceptivité ..	68
C. Effet de la dose de progestérone sur la fréquence et le délai d'apparition du pic préovulatoire de LH chez les deux races .....	68
IV. Discussion.....	69

*Partie 3 : Comparaison des niveaux d'œstradiol dans le LCR chez les brebis des deux races* .....

I. Introduction .....	75
II. Matériels et méthodes.....	76
A. Animaux et prélèvements de LCR .....	76
B. Dosage d'œstradiol.....	76
C. Analyse de données .....	76

III.	Résultats .....	77
IV.	Discussion.....	77

*Chapitre 2 : Etude de la sensibilité hypophysaire et hypothalamique des brebis IF et ROM  
à l'œstradiol*

<i>Partie 1 : Sensibilité hypophysaire in vitro : effet différentiel de l'œstradiol et de la GnRH sur la libération hypophysaire de LH chez les brebis IF et ROM .....</i>		84
I.	Introduction .....	85
II.	Matériels et méthodes .....	85
A.	Animaux .....	85
B.	Protocole de culture cellulaire .....	86
1.	Dissociation cellulaire .....	86
2.	Mise en culture des cellules hypophysaires.....	87
C.	Protocole expérimental .....	87
1.	Expérience 1 : Effet de la durée de présence et de la concentration d'œstradiol dans le milieu de culture sur la libération de LH par les cellules hypophysaires.....	87
2.	Expérience 2 : Effet de différentes doses de GnRH sur la libération de LH par les cellules hypophysaires .....	87
D.	Analyse des données.....	88
1.	Evolution de la libération de LH .....	88
2.	Analyse statistique.....	88
III.	Résultats .....	88
A.	Expérience 1 : Effet de la durée de présence et de la concentration d'œstradiol dans le milieu de culture sur la libération de LH par les cellules hypophysaires .....	88
1.	Effet de l'œstradiol .....	89
2.	Après stimulation par la GnRH (sécrétion de LH-stimulée).....	89
B.	Expérience 2 : Effet de différentes doses de GnRH sur la libération de LH par les cellules hypophysaires .....	89
IV.	Discussion.....	90
<i>Partie 2 : Article 2.....</i>		64

Chapitre 3 : Rôle de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel chez la brebis

Romanov

I. Introduction .....	103
A. Généralités .....	104
B. Expérience 1 : Identification du rôle de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel chez la brebis ROM.....	104
1. Administration intra-cérébroventriculaire .....	104
2. Procédures expérimentales .....	105
3. Tests de comportement .....	106
4. Analyse statistique .....	106
C. Expérience 2 : Comparaison des profils de la GnRH dans le LCR entre les deux races.....	106
1. Procédure expérimentale .....	106
2. Dosages hormonaux .....	107
3. Analyse des données.....	107
4. Analyse statistique.....	108
III. Résultats .....	108
A. Expérience 1 : Identification du rôle de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel chez la brebis ROM.....	108
1. Première année : Effet de l'administration (icv) de l'antagoniste de la GnRH lors de la pleine réceptivité des animaux (24 h après œstradiol) sur le comportement sexuel.....	108
2. Deuxième année : Effet d'une administration (icv) préalable de l'antagoniste de la GnRH à l'insertion des implants d'œstradiol sur l'expression du comportement sexuel.....	109
B. Expérience 2 : comparaison des profils de GnRH dans le LCR entre les deux races	109
1. Pic préovulatoire de LH.....	110
2. Evolution des niveaux de GnRH dans le LCR .....	110
IV. Discussion.....	111

Chapitre 4 : *Mécanismes neurobiologiques sous-jacents à la différence de sensibilité à l'œstradiol entre les brebis IF et ROM*

I. Introduction .....	119
-----------------------	-----

II.	Matériels et Méthodes .....	120
A.	Animaux et protocoles expérimentaux .....	120
B.	Abattage des animaux.....	121
C.	Perfusion des têtes et prélèvement des cerveaux.....	121
D.	Coupe des cerveaux .....	121
E.	Coloration au violet de Crésyl.....	122
F.	Etude immunohistochimique.....	122
1.	Procédure expérimentale .....	122
2.	Marquage immunohistochimique des récepteurs à l'œstradiol ER.....	123
3.	Marquage immunohistochimique de la protéine FOS.....	124
4.	Analyse des marquages immunohistochimiques.....	125
G.	Dosage de l'œstradiol et de la progestérone.....	126
H.	Analyse statistique.....	126
III.	Résultats .....	126
A.	Niveaux plasmatiques d'œstradiol et de progestérone .....	126
B.	Marquage immunohistochimique des REa .....	127
1.	Distribution des récepteurs à l'œstradiol.....	127
2.	Effet de la race et de l'état hormonal sur le nombre de cellules marquées .....	128
C.	Marquage immuno-histochimique de la protéine FOS .....	129
1.	Distribution du marquage .....	129
2.	Effet de la race et du traitement hormonal sur le nombre de cellules marquées	130
IV.	Discussion.....	131

*Discussion générale et Conclusion* ..... 141

*Annexes*..... **Erreur ! Signet non défini.**

*Bibliographie* ..... **Erreur ! Signet non défini.**

L'objectif de ce travail de thèse étant d'étudier la sensibilité de l'axe hypothalamo-hypophysaire aux stéroïdes gonadiques chez deux races de brebis de prolificité différente, nous commencerons par la description de l'activité de reproduction chez la brebis. Nous ferons ensuite l'état des connaissances sur les facteurs et les mécanismes intervenant dans la régulation de l'activité hypothalamo-hypophysaire et de ceux contrôlant le comportement sexuel. Nous rappellerons plus particulièrement l'action des stéroïdes gonadiques ainsi que le rôle du système nerveux central. Finalement, nous décrirons les mécanismes et les modes d'action des stéroïdes dans le contrôle de la fonction de la reproduction.

## Activité de reproduction chez la brebis

### Saisonnalité de la reproduction

Chez de nombreuses espèces de mammifères, la reproduction est caractérisée par l'alternance d'une période d'activité sexuelle (saison sexuelle) et d'une période de repos sexuel pendant laquelle cette activité diminue fortement ou s'arrête complètement (anœstrus saisonnier).

Chez la plupart des mammifères, cette saisonnalité de la reproduction aboutit généralement à des naissances à la fin de l'hiver et/ou du printemps, offrant ainsi des conditions optimales de nourriture et de température pour la survie des nouveau-nés.

Chez la brebis, l'activité de reproduction est caractérisée par deux grands rythmes :

### Le cycle annuel de l'activité ovarienne

Appelé encore rythme saisonnier : il dépend de la variation de la durée du jour au cours de l'année (la photopériode). La saison sexuelle se manifeste lorsque la durée du jour diminue (jours décroissants ou jours courts). Elle s'arrête lorsque la durée des jours augmente (jours croissants ou jours longs) : c'est l'anœstrus saisonnier. La durée et l'intensité de l'anœstrus varient d'une race à l'autre. Ainsi, certaines races peuvent présenter quelques chaleurs au printemps (Thimonier, 1989). La saisonnalité de la

reproduction, chez le mouton, est plus ou moins marquée selon la latitude. En général, elle est plus marquée quand on se rapproche des pôles, et elle est significativement réduite voire absente quand on se rapproche de l'équateur (pour revue : Malpaux, 2006).

## Le cycle sexuel

C'est le second rythme majeur caractéristique de la reproduction pratiquement chez toutes les femelles. Chez la brebis, pendant la saison de reproduction, l'activité sexuelle se manifeste par le fait que les femelles viennent régulièrement en chaleur, tous les 17 jours en moyenne. L'intervalle entre les chaleurs constitue le cycle sexuel ou cycle œstral. Chaque cycle est caractérisé par l'apparition périodique d'un comportement sexuel, ou œstrus qui s'exprime autour de l'ovulation. Le déroulement du cycle sexuel est sous le contrôle du complexe hypothalamo-hypophysio-gonadique que nous détaillerons en partie dans le chapitre II (pour revue : Goodman et Inskeep, 2006b).

Ce cycle de 17 jours peut être décomposé en deux phases :

- **La phase folliculaire :** elle dure de 2 à 3 jours et correspond à la période de croissance folliculaire terminale s'achevant par l'ovulation.
- **La phase lutéale :** elle dure de 14 à 16 jours et s'étale de l'ovulation jusqu'à la régression du corps jaune. Elle correspond à la phase de préparation de l'utérus en vue de l'implantation de l'embryon. En absence de fécondation, la phase lutéale est interrompue et laisse place à une nouvelle phase folliculaire et donc à un nouveau cycle sexuel (pour revue : Goodman, 1994).

## Contrôle hormonal de l'activité de reproduction

Les variations de sécrétion des hormones gonadotropes, en particulier l'hormone lutéinisante : LH, pour Luteinizing Hormone, sont à l'origine des modifications saisonnières de l'activité sexuelle (Karsch *et al.*, 1984).

La sécrétion de la LH n'est pas un phénomène continu mais plutôt caractérisé par une succession de décharges rapides de l'hormone (ou pulses : terme anglo-saxon). Un "pulse" correspond à une augmentation rapide des concentrations sanguines de l'hormone suivie d'une diminution rapide due à sa courte demi-vie. Ce mode de sécrétion sera détaillé dans le chapitre II.

## Pendant la saison sexuelle

Tout au long de la phase lutéale, la progestérone sécrétée par le corps jaune en croissance inhibe la sécrétion de la LH en réduisant fortement la fréquence des pulses, la limitant à environ 1 pulse/4 heures (Baird et Scaramuzzi, 1976). Pendant cette phase, la libération de l'hormone folliculo-stimulante : FSH pour Folliculo-Stimulating-Hormone présente des fluctuations plus ou moins régulières. Chaque vague de libération de FSH induit une vague de croissance folliculaire au niveau ovarien (pour revue :Driancourt et Levasseur, 2001). A la fin de la phase lutéale (14-16<sup>ème</sup> jour), l'augmentation de la sécrétion de prostaglandine F2 $\alpha$  par l'endomètre induit la régression rapide du corps jaune.

Le rétrocontrôle négatif de la progestérone sur la sécrétion de la LH est alors levé et la fréquence des pulses de LH augmente à environ 1pulse par heure (Figure 1). Ce changement dans le profil de sécrétion de la LH induit les dernières étapes de la folliculogénèse en stimulant la maturation des follicules ainsi que la sécrétion d'œstradiol.

Cette augmentation des quantités d'œstradiol libérées est à l'origine du déclenchement du comportement d'œstrus. Une fois son niveau maximum de sécrétion atteint, l'œstradiol induit par un rétrocontrôle positif sur l'hypothalamus et l'hypophyse le pic préovulatoire de FSH et de LH, induisant l'ovulation dans les 20 heures qui suivent (McNatty *et al.*, 1981; McNeilly *et al.*, 1982). Après l'ovulation, une seconde élévation de FSH est observée : elle correspond à l'entrée en croissance d'une nouvelle vague folliculaire (Figure 1).

## Pendant l'anœstrus saisonnier

Pendant la période de repos sexuel, la fréquence des pulses de LH est très faible. Cette diminution de fréquence des pulses apparaît bien que les niveaux plasmatiques de progestérone soient faibles. Durant cette période, la sécrétion de LH est sous l'effet du rétrocontrôle négatif de l'œstradiol (Legan et Karsch, 1980) et sa faible pulsativité ne permet pas la maturation folliculaire.

Les variations saisonnières de l'activité sexuelle chez la brebis ont pour origine les changements de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire, mais surtout elles traduisent les modifications de la sensibilité de cet axe aux stéroïdes gonadiques. En effet, la capacité de l'œstradiol à inhiber la sécrétion de LH est faible pendant la saison sexuelle, mais elle

augmente à l'approche de la saison de repos sexuel (Karsch *et al.*, 1984; Thiery *et al.*, 2002).

## Facteurs environnementaux contrôlant l'activité de reproduction

### La photopériode

#### Mise en évidence

Dans les zones tempérées, la photopériode joue un rôle prépondérant comme entraîneur de l'activité sexuelle chez de nombreuses espèces y compris les petits ruminants. Deux types d'expérimentations ont permis de mettre en évidence ce rôle. La première série d'expériences consistait au transfert de brebis et de béliers d'un hémisphère à l'autre. Ce transfert provoquait une translation de 6 mois de la saison de reproduction (Marshall, 1937). La seconde série d'expériences utilisant l'inversion artificielle des variations de la photopériode a abouti au même résultat (Yeates, 1949; Thawaites, 1965). Ainsi, le raccourcissement de la durée du jour est toujours associé à l'induction d'une activité sexuelle et inversement son augmentation est liée à son inhibition.

Les travaux de Karsch et ses collaborateurs (Karsch *et al.*, 1984) ont montré que des augmentations ou des diminutions brutales de la photopériode provoquaient les mêmes effets sur la reproduction que des changements progressifs. Ainsi chez la brebis Suffolk soumise alternativement à des jours courts (8 heures de lumière et 16 heures d'obscurité) et à des jours longs (16 heures de lumière et 8 heures d'obscurité) par période de 90 jours, l'activité ovarienne cesse 20 à 30 jours après le passage en jours longs et reprend environ 50 jours après le passage en jours courts. Cette reprise de l'activité ovarienne s'accompagne d'une ovulation qui est toujours silencieuse (non accompagnée du comportement d'œstrus).

Le maintien des animaux dans l'une des deux conditions (jours longs ou jours courts constants) ne permet pas une activité/ inactivité continue "des cellules gonadotropes". Au bout d'un certain temps l'activité des cellules gonadotropes augmente en jours longs ou diminue en jours courts et un état réfractaire à la photopériode se développe (Robinson et Karsch, 1984; Robinson *et al.*, 1985).

## Mécanismes

L'information lumineuse perçue au niveau de la rétine est traduite en un message nerveux qui est véhiculé jusqu'à la glande pinéale. La pinéale traduit le signal nerveux en un signal endocrinien : une libération de mélatonine dans le sang et le liquide céphalo-rachidien (LCR). Cette hormone, une indolamine, synthétisée principalement par la glande pinéale n'est sécrétée que pendant la nuit. La durée de la sécrétion de la mélatonine traduit la durée de la nuit, et c'est cette durée de sécrétion qui permet aux systèmes neuroendocriniens des animaux de mesurer la durée du jour (Karsch *et al.*, 1984). L'information est ensuite transmise au niveau de la région de l'hypothalamus pré-mamillaire (site d'action de la mélatonine) impliqué dans la fonction de reproduction chez les ovins (Malpaux *et al.*, 1998).

Les effets de la photopériode interviennent au travers d'une modification de la rétroaction négative des stéroïdes, en particulier l'œstradiol, sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Le passage de la saison sexuelle à la saison d'anœstrus est une conséquence directe de changement de la fréquence des pulses de LH (comme décrit ci-avant, Karsch *et al.*, 1984). Ce changement traduit l'effet inhibiteur de l'œstradiol, qui fait intervenir pour une part les neurones à dopamine du noyau A15 de l'aire rétro-chiasmatique (Thiery *et al.*, 1995; Thiery *et al.*, 2002). Toutefois, les mécanismes par lesquels la mélatonine modifie la libération de la Gonadolibérine : GnRH pour Gonadotropin-releasing-hormone restent encore mal connus.

## L'alimentation

L'alimentation est l'un des facteurs modulateurs de l'activité sexuelle chez la brebis. Ces effets sont plus remarquables chez les jeunes animaux. Une sous-alimentation capable de retarder la croissance corporelle, diffère l'apparition de la puberté chez l'agnelle, et retarde l'apparition de la première ovulation à la saison sexuelle suivante (Foster et Olster, 1985). Chez la brebis adulte, la sous-alimentation peut provoquer l'entrée en anœstrus. Il est toutefois nécessaire d'appliquer des régimes très sévères pour obtenir de tels résultats (Allen et Lamming, 1961).

Chez la brebis ovariectomisée, une restriction alimentaire qui provoque une perte de poids de l'ordre de 25% n'a pas d'effet significatif sur la sécrétion des gonadotropines (Barker-Gibb et Clarke, 1996). Une restriction plus sévère (perte de poids de 33%) peut entraîner une légère inhibition de la pulsativité de la LH qui affecte la fréquence et l'amplitude des pulses (Thomas *et al.*, 1990; Henry *et al.*, 2000; Henry *et al.*, 2001). Enfin une restriction alimentaire très sévère supprime la sécrétion des gonadotropines chez la brebis ovariectomisée (Gutierrez *et al.*, 1987 ; Tatman *et al.*, 1990), en inhibant la libération de GnRH (Foster et Olster, 1985).

Chez la brebis, l'alimentation modulerait l'effet de la photopériode sur l'activité de reproduction. Les travaux de Forcada et collaborateurs, chez la brebis de race Rosa Aragonesa, ont montré une réduction de la saison d'anœstrus de 2 mois chez des brebis bien nourries (note d'état corporel de 2.9 sur 5) comparées à des brebis sous nourries (note d'état corporel de 2.3 sur 5) (Forcada *et al.*, 1992; Forcada et Abecia, 2006). Des résultats similaires ont été rapportés chez la chèvre (Zarazaga *et al.*, 2005) et la jument (Salazar-Ortis, 2006). Cependant, les mécanismes par lesquels l'alimentation modifie la transmission de l'information photopériodique c'est-à-dire du message mélatoninérgique sont loin d'être identifiés.

Chez les ovins, le comportement sexuel ne semble pas être affecté par la nutrition, sauf dans le cas où elle entraîne des changements extrêmes de poids et de réserves corporelles qui pouvant affecter l'activité motrice des animaux (Martin *et al.*, 2004).

L'effet positif le mieux caractérisé de la nutrition sur la reproduction est observé au niveau ovarien et se traduit par une augmentation du nombre d'ovulations. Ainsi, l'effet "flushing" qui consiste en une augmentation d'apport énergétique et protéique à court terme, utilisé généralement quelques semaines avant la période des saillies, produit une augmentation significative des taux d'ovulation et de la taille de la portée (pour revue : Scaramuzzi *et al.*, 2006).

## L'effet mâle

La mise en contact de mâles avec des femelles en anœstrus (femelles anovulatoires) après quelques semaines d'isolement entraîne l'augmentation quasi immédiate des taux plasmatiques de LH tandis que les niveaux de FSH ne varient pas (Poindron *et al.*, 1980; Martin et Scaramuzzi, 1983). Si le contact avec le mâle est maintenu cette augmentation de LH pourra être suivie d'un pic préovulatoire de LH, ainsi que d'une augmentation du taux de FSH et du déclenchement de l'ovulation dans les 48 heures qui suivent (Oldham et

Martin, 1987). Cette première ovulation, dite silencieuse, est alors suivie par un cycle ovulatoire d'une courte durée (6 jours) ou de durée normale (17 jours). Ce premier cycle est généralement suivi d'une nouvelle ovulation qui conduit à un second cycle ovulatoire de durée normale. La réponse comportementale (œstrus) n'apparaît qu'après un cycle ovulatoire de durée normale. La réponse à l'effet mâle, caractérisée par le pourcentage de femelles ayant ovulé et la fréquence des cycles courts, dépend du moment de l'œstrus. Elle varie aussi fortement en fonction de la race. L'efficacité de la stimulation dépend également de l'activité sexuelle du mâle (Chemineau *et al.*, 2006).

Le rôle des signaux olfactifs est prépondérant dans l'effet mâle. Le mâle actif produit des phéromones qui stimulent, chez la brebis, la sécrétion de la GnRH. Les mécanismes centraux impliqués dans ce processus ne sont pas bien élucidés. Chez la brebis, le système olfactif principal joue le rôle principal tandis que le système olfactif accessoire ainsi que l'amygdale interviennent dans l'intégration du message porté par l'odeur du mâle (Gelez, 2003).

## Le stress

Les effets de nombreux facteurs générateurs de stress tels que l'isolement social, le transport, l'hypoglycémie insulinaire ou l'administration d'endotoxines ont été étudiés chez le mouton (Tilbrook *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003). Ils conduisent tous à une inhibition de la pulsativité de la LH chez la brebis intacte ou ovariectomisée (Rasmussen et Malven, 1983; Adams *et al.*, 1993) et suppriment le pic préovulatoire de LH chez les femelles intactes (Martin *et al.*, 1981).

La plupart des travaux portant sur l'effet de stress ont utilisé l'augmentation des taux circulants de cortisol comme indicateur du degré de stress perçu par l'animal (pour revue : Goodman et Inskeep, 2006). L'équipe de Karsch a montré qu'un traitement au cortisol (à des niveaux similaires à ceux libérés lors d'un état de stress) diminue la fréquence des pulses de LH de 35%, empêche l'augmentation préovulatoire de l'œstradiol et retarde ou bloque le pic préovulatoire de LH et de FSH (Breen *et al.*, 2005). La suppression des pulses de LH reflète une action centrale du cortisol pour inhiber la libération de la GnRH (Karsch et Battaglia, 2002; Breen *et al.*, 2005). Néanmoins, une action directe du cortisol au niveau hypothalamique a également été mise en évidence, chez la brebis (Breen *et al.*, 2008).

L'activation de l'axe corticotrope se traduit par une augmentation de libération de la corticolibérine : CRH pour Corticotrophin-Releasing Hormone, neuropeptide capable de stimuler la synthèse et la sécrétion de l'hormone corticotrope (ACTH) par l'hypophyse qui à son tour stimule celle du cortisol.

Chez les ovins, une augmentation de la libération de CRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire en conditions stressantes a été démontrée (Caraty *et al.*, 1988; Caraty *et al.*, 1990). Une corrélation entre l'augmentation des niveaux de CRH, induisant celle du cortisol, et la diminution de la sécrétion de GnRH a aussi été décrite chez des béliers castrés traités à la testostérone (Papinot *et al.*, 1989).

Toutefois, chez les ovins, les effets du stress ne sont pas systématiquement négatifs sur la reproduction. En effet, l'administration par voie intra-cerebroventriculaire (icv) de la CRH à des brebis ou des béliers gonadectomisés en saison sexuelle ou en anoestrus saisonnier entraîne une augmentation des niveaux plasmatiques de LH (Caraty *et al.*, 1997). Cet effet stimulateur dépendrait de la présence des stéroïdes. Ces résultats sont à l'opposé des effets inhibiteurs observés chez le rat (Petraglia *et al.*, 1987).

Il semble ainsi qu'un stress aigu chez les ovins pourrait stimuler la libération de la LH et donc par conséquent celle de la GnRH, alors qu'un stress chronique serait fortement inhibiteur (Caraty *et al.*, 1997).

Le stress influence également l'expression du comportement sexuel (Ehnert et Moberg, 1991; Maurya *et al.*, 2005). Les études chez la brebis se sont surtout intéressées à regarder l'effet de l'augmentation des niveaux plasmatiques du cortisol sur le moment d'apparition du comportement sexuel (Ehnert et Moberg, 1991). Une étude concernant les différentes étapes du comportement sexuel (ces étapes sont décrites et détaillées dans le chapitre III) a montré que des facteurs psychosociaux de stress (isolement, chien) ont un effet négatif sur les niveaux de proceptivité et d'attractivité de la brebis ovariectomisée traitée aux stéroïdes. En revanche, aucun effet n'a été observé sur la réceptivité (Pierce *et al.*, 2008). Cette étude montre aussi que l'administration du cortisol (à des niveaux similaires à ceux observés en cas de stress) n'a aucun effet sur la proceptivité, l'attractivité et la réceptivité des brebis. Ces données suggèrent que l'effet inhibiteur du stress sur le comportement de réceptivité ne passerait pas par le cortisol. En fait, le stress pourrait modifier l'attention des animaux qui est un facteur important dans l'expression du comportement sexuel.

# Prolificité et régulation du taux d'ovulation

## Définitions

Chez les mammifères, le taux d'ovulation (nombre d'ovulation) varie fortement entre les espèces et parfois même au sein de l'espèce. L'espèce ovine peut être considérée comme une espèce modèle car elle présente une grande variabilité du taux d'ovulation et donc de la prolificité. La variation de la prolificité résulte de celle du nombre d'ovulation qui est sous le contrôle de facteurs génétiques et environnementaux.

Chez la majorité des races ovines, les brebis ont un voire deux agneaux à chaque agnelage mais quelques races ont une portée de trois agneaux et plus. Bindon et Piper (1986a) ont défini la prolificité comme étant le nombre d'agneau par mise bas rapporté au nombre de gestation. Plus récemment, Fahmy (1996) a établi des critères en fonction desquels une race est considérée ou non comme prolifique, à savoir : i) un taux de prolificité moyen supérieur à 1.75 et ii) un potentiel de produire plus de 2 agneaux en moyenne par mise bas. Cet auteur a également classé les races ovines prolifiques en trois classes génétiques :

- **Les races polygéniques** : la prolificité chez ces races résulte de l'interaction entre plusieurs gènes (qui ne sont pas encore identifiés), chacun ayant de lui-même un effet mineur. Ainsi, la transmission du caractère « prolificité » dépend de l'effet additif de ces gènes. L'expression de ces gènes est fortement influencée par les facteurs externes tels que l'environnement et la conduite de l'élevage. Ces races sont aussi appelées "races de prolificité extrême" ou encore "races exotiques" parmi lesquelles on peut citer la Romanov (Devignes, 1971), la Finnoise (Maijala, 1967) et la D'Man (Bouix et Khadiri, 1975).

- **Les races porteuses d'un ou plusieurs gène(s) majeur(s) de prolificité** : La plus ancienne mutation connue est la mutation *Booroola* (mutation autosomal à un locus appelé *Fec B*), qui a été mise en évidence au début des années 1980 (Piper et Bindon, 1982). Depuis, d'autres mutations ayant un effet majeur sur l'ovulation ont été observées chez d'autres races ovines comme la Romney (mutation Hanna et Inverdale, *Fec X* : (Davis *et al.*, 1991), la Lacaune (deux mutations dont l'une autosomique et l'autre liée au sexe (Davis, 2005)) et la Cambrige (pour revue : Montgomery *et al.*, 1992; Fahmy, 1996)

- **Les races synthétiques** : ces races sont obtenues par sélection ou par introgression d'un gène majeur à partir d'une ou plusieurs autres races prolifiques. Ce sont par exemple les

rares comme INRA 401 (croisement entre Romanov et Berrichon du Cher, 1969), Belcare, en 1978, 3 gènes : Fingalway, Highfertility et Hanrahan (pour revue :Fahmy, 1996).

### Différences hormonales et comportementales entre les races poly et mono-ovulantes

Ici, nous n'aborderons pas les mécanismes qui contrôlent la différence de nombre d'ovulation entre les différentes races ovines car cela est en dehors du cadre de notre étude (Bindon et Piper, 1986a; Fahmy, 1996; Baird et Campbell, 1998). Nous allons essentiellement nous intéresser à décrire les différences hormonales observées entre les races prolifiques et non prolifiques.

#### Nombre d'ovulation et niveaux de gonadotropines

De nombreux travaux ont comparé les niveaux plasmatiques des gonadotropines entre des races ovines de forte et de basse prolificité (Bindon *et al.*, 1979; Cahill *et al.*, 1981; Bindon et Piper, 1986a). Certains ont particulièrement lié la variabilité des taux d'ovulation entre ces races aux différences des taux circulants de la FSH. En effet, cette hormone contrôle le recrutement et la sélection des follicules en croissance et donc le taux d'ovulation (Driancourt *et al.*, 1991). Cependant, il semble difficile d'associer la régulation du taux d'ovulation uniquement aux variations de concentrations plasmatiques de FSH. En effet, chez certaines races prolifiques, les concentrations plasmatiques de FSH sont similaires (brebis Ile-de-France vs Romanov, Cahill *et al.*, 1981), voire même plus faibles que celles des races non prolifiques (Finnoise : Adams *et al.*, 1988). Elles sont par contre plus élevées chez d'autres races comme la D'Man (Lahlou-Kassi *et al.*, 1984) ou la Booroola (Henderson *et al.*, 1987).

Selon Scaramuzzi et collaborateurs (1993), chez les races mono-ovulantes, un seul follicule est sélectionné parmi la cohorte de petits follicules, on parle alors de follicule dominant. En se développant, ce follicule acquiert un certain nombre de propriétés telles que les récepteurs à la LH et une activité aromatasase (enzyme permettant la transformation de la testostérone en œstradiol au niveau des cellules de la granulosa). La viabilité des autres follicules qui sont "gonadotropines-dépendants" serait restreinte, du fait de leur besoin en FSH dont la sécrétion est inhibée par les rétroactions négatives de l'œstradiol et de l'inhibine sécrétés par le follicule dominant.

Chez les races à taux d'ovulation élevé, la poly-ovulation résulte i) de l'augmentation de la viabilité des follicules par allongement de la fenêtre de sensibilisation à la FSH (leur permettant ainsi de résister à l'atrésie folliculaire), ii) du recrutement d'un grand nombre de follicules, conséquence d'une folliculogénèse active.

Il semble que chaque race ait développé son propre mécanisme de régulation du taux d'ovulation. Ainsi, dans le cas de la brebis Romanov, le recrutement est très important et la sélection (le fait que les follicules sélectionnés arrêtent leur développement et deviennent atrétiques) est forte ; pour la Finnoise, le recrutement est normal mais la sélection est faible ; quand à la brebis Boorola, le recrutement est très important et la sélection est limitée (Driancourt *et al.*, 1986; Henderson *et al.*, 1987; Scaramuzzi *et al.*, 1993).

#### Différences hormonales et comportementales

Les niveaux plasmatiques d'œstradiol sont généralement plus élevés chez les brebis polyo-vulantes que chez les mono-ovulantes, et l'intervalle entre la lutéolyse et le pic préovulatoire de LH est plus long (Bindon *et al.*, 1979). Les niveaux plasmatiques de LH préovulatoire sont plus faibles chez la Finnoise, et la concentration de LH est plus faible chez la D'Man tout au long du cycle par comparaison aux autres races non prolifiques (Lahlou-Kassi *et al.*, 1984). La brebis Booroola, elle, ne fait pas partie de cette classe. Chez cette race, aucune différence du moment d'apparition du pic préovulatoire de LH n'a été observée entre les femelles porteuses ou non de la mutation *FecB*. De plus, le pic préovulatoire de LH intervient en moyenne 4.5 heures après les chaleurs, un délai comparable à celui observé chez les races non prolifiques comme l'Ile-de-France (Bindon et Piper, 1986a).

La durée du comportement sexuel a été décrite comme étant plus longue chez les races prolifiques comme la Romanov (Bindon *et al.*, 1979; Cahill *et al.*, 1981), la Finnoise (Land, 1970; Land *et al.*, 1972) et la D'Man (Lahlou-Kassi *et al.*, 1984) comparées respectivement à l'Ile de France et à la Blackface. Chez ces races, il a également été rapporté que l'œstrus apparaît plus tôt. Ceci, n'est cependant pas vrai pour la Booroola quand elle est comparée à la Mérinos (Bindon et Piper, 1986a).

Chez les races prolifiques, comme la Romanov et la Finnoise, une corrélation positive entre le taux d'ovulation et les niveaux d'œstradiol a été décrite (Bindon *et al.*,

1979; Cahill *et al.*, 1981). De plus, une relation entre la durée du comportement sexuel et les niveaux plasmatiques d'œstradiol à aussi était démontrée (Scaramuzzi *et al.*, 1971; Fabre-Nys *et al.*, 1993). Cependant aucune évidence directe ne lie la durée d'œstrus au taux de prolificité, et la brebis Booroola en est un bon exemple (Bindon et Piper, 1986a).

Ces différences neuroendocriniennes et comportementales entre les races suggèrent des mécanismes de régulation des deux événements qui seraient très différents en fonction de l'origine de la prolificité. Land (Land, 1970; 1972) a suggéré que chez les races prolifiques comme la Finnoise ou la Romanov, le complexe hypothalamo-hypophysaire serait plus ou moins sensible au rétrocontrôle négatif et positif de l'œstradiol. A ce jour, aucune donnée n'existe concernant ce sujet, bien que cela soit une étape essentielle dans la compréhension des mécanismes de régulation de l'activité de reproduction.

## Régulation hypothalamo-hypophysaire

### A. Le système GnRH

#### La GnRH

La GnRH est un décapeptide hypothalamique qui a été décrit pour la première fois chez les mammifères (Amoss *et al.*, 1971; Matsuo *et al.*, 1971) et désormais identifié chez l'ensemble des vertébrés (Kah *et al.*, 2004).

En 1971, l'équipe de Schally en a donné la séquence peptidique chez le porc. La même année, l'équipe de Guillemin établit la séquence du peptide chez le mouton, qui se montra identique à celle du porc. La séquence peptidique étant la suivante :



Cette première forme, isolée chez le porc et le mouton (Amoss *et al.*, 1971; Schally *et al.*, 1971), fut nommée forme *mammalienne* ou GnRH-I. Elle joue un rôle incontestable dans le contrôle de la fonction de reproduction chez tous les mammifères à l'exception du cochon d'Inde, qui semble avoir sa propre GnRH, substitution des acides aminés 2 et 7 (Jimenez-Linan *et al.*, 1997; Grove-Strawser *et al.*, 2002).

Un autre décapeptide qui diffère de la GnRH-I par 3 acides aminés a été décrit plus récemment chez de nombreux mammifères, c'est le *chicken* GnRH ou cGnRH-II

initialement isolé chez le poulet (Miyamoto *et al.*, 1982). Aujourd'hui, la fonction de cette forme de GnRH reste à établir. Chez certaines espèces, elle pourrait participer au contrôle du comportement sexuel et de la prise alimentaire (Rissman, 1996; Kauffman et Rissman, 2004; Kauffman *et al.*, 2005).

Une troisième forme de GnRH qui pourrait avoir un rôle dans la régulation des gonadotropines est le *lamprey* GnRH ou la lGnRH-III. Ce décapeptide a été identifié dans l'hypothalamus humain en 1988 (Stopa *et al.*, 1988). Il a une distribution similaire à celle de la GnRH-I chez le rat et l'homme (Stopa *et al.*, 1988; Dees *et al.*, 1999). Cette molécule stimulerait de façon préférentielle la sécrétion de la FSH (rôle FSH-RH) chez le rat (Yu *et al.*, 1997) mais pas chez les bovins (Dees *et al.*, 2001). Ainsi, l'existence d'un facteur FSH-RH reste encore très controversée.

A ce jour, 24 formes de GnRH ont été isolées chez les vertébrés et les prochordés (Tableau 1), dont plusieurs chez la même espèce (Kah *et al.*, 2007). Elles ont été nommées en fonction de l'espèce chez laquelle elles ont été premièrement extraites et purifiées (Sherwood *et al.*, 1983; Fernald et White, 1999). L'hypothèse que la plupart des vertébrés exprimeraient deux voire trois formes de GnRH (Yu *et al.*, 1997; Yahalom *et al.*, 1999) est désormais bien acceptée.

Les différentes formes de GnRH sont issues de différents gènes qui résultent probablement de la duplication d'un gène ancestral (Fernald et White, 1999). Le gène qui code le précurseur de la GnRH-I a été cloné chez de nombreuses espèces ; il est formé de 4 exons et 3 introns. Le précurseur de la GnRH-I associe une séquence signal de 23 acides aminés, la séquence de la GnRH et 56 acides aminés qui constituent un peptide associé (GnRH Associated Peptide ou GAP) (Seeburg et Adelman, 1984; Adelman *et al.*, 1986).

Dans les vésicules de sécrétion, la GnRH est présente avec le GAP dont le rôle physiologique est mal connu. Une autre forme moléculaire de la GnRH a été aussi identifiée, il s'agit d'une forme post-traductionnelle de la GnRH (la Hydroxyproline-9-GnRH ou Hyp<sup>9</sup>GnRH) dans laquelle le résidu proline situé en position 9 est hydroxylé et dont le rôle est mal connu.

Dans la suite de ce manuscrit, nous allons principalement nous intéresser à la GnRH-I, que nous appellerons GnRH.

## Les neurones à GnRH

### Nombre

Les neurones à GnRH sont relativement peu nombreux dans le cerveau des mammifères. Les techniques immuno-histochimiques les plus performantes n'ont pu révéler qu'environ 1300 neurones à GnRH chez le rat (Barry *et al.*, 1985; Hoffman *et al.*, 1986), 800 chez la souris (Hoffman *et al.*, 1986), 2400 chez le babouin (Hoffman *et al.*, 1986) et 2500 chez le mouton (Caldani, 1986; Lehman *et al.*, 1986).

### Distribution

Chez la plupart des mammifères, les neurones à GnRH ne forment pas un noyau car ils ne sont pas localisés dans une structure bien définie et limitée (Figure 2). Ils sont principalement dispersés dans le diencephale au sein de l'aire préoptique (APO) et de l'hypothalamus médiobasal (HMB) (Herbison, 2006).

Chez la brebis, la moitié de ces neurones est localisée au niveau de l'APO. Les 50% restant sont distribués entre la bande diagonale de Broca (dBB), l'aire hypothalamique antérieure (AHA) et l'HMB (Lehman *et al.*, 1986; Caldani *et al.*, 1988). Chez la brebis, mais aussi chez la chèvre, quelques corps cellulaires ont été décrits au niveau du noyau arqué (ARC) (Boukhliq *et al.*, 1999). Des neurones à GnRH extra-hypothalamiques ont aussi été décrits au niveau de l'amygdale médiane, de l'aire subcallose et des bulbes olfactifs (Caldani, 1986)(Figure 2).

Les axones des neurones à GnRH se projettent principalement dans la zone externe de l'éminence médiane (EM) où la GnRH est sécrétée dans les capillaires du système porte (Silverman *et al.*, 1987; Caldani *et al.*, 1988). Des terminaisons nerveuses contenant la GnRH sont aussi présentes hors de l'EM, au niveau de l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT) située dans l'APO au contact de la partie antérieure du 3<sup>ème</sup> ventricule (Lehman *et al.*, 1986, Caldani, 1986). Le rôle de ces projections demeure mal connu.

### Les afférences

Les techniques d'immunohistochimie et de radioautographie ont montré la présence, sur les neurones à GnRH, d'afférences d'origine peptidique, monoaminergique et d'afférence contenant des acides aminés (pour revue : Herbison (2006) ; Figure 3). Ces

projections proviennent essentiellement du noyau ARC (Dopamine,  $\beta$ endorphine, Neuropeptide Y, Kisspeptide, Neurokinine B), de l'HVM (Somatostatine) et de l'APO (GABA). Nous décrirons plus en détail ces populations neuronales, qui expriment les récepteurs à l'œstradiol du type  $\alpha$  (RE  $\alpha$ ), dans le paragraphe II-D.

## Les récepteurs à la GnRH

Trois types de récepteurs à la GnRH ont été identifiés chez les oiseaux et les amphibiens (Troskie *et al.*, 1998) tandis que deux types de récepteurs ont été identifiés chez quelques espèces de mammifères (Kah *et al.*, 2007). Cependant, chez les ovins et les bovins un seul type de récepteur (R-GnRH) est exprimé (Morgan *et al.*, 2006).

Le R-GnRH est principalement exprimé au niveau de l'hypophyse mais il est aussi présent au niveau du système nerveux central (SNC), des gonades, du placenta et des tissus tumoraux (Stojilkovic *et al.*, 1994). Si la présence du R-GnRH au niveau hypophysaire est directement liée au contrôle de la fonction de reproduction, son rôle dans les autres sites est mal connu.

Au niveau du SNC, des études de liaison et d'autoradiographie réalisées chez le rat ont montré une densité importante de R-GnRH au niveau de l'amygdale, du cortex entorhinal, de la substance grise centrale et de l'hippocampe (Haour *et al.*, 1987; Jennes *et al.*, 1988; Leblanc *et al.*, 1988). Un marquage moins dense a également été trouvé au niveau du septum et du cortex frontal. Au niveau de l'aire hypothalamique un faible marquage a été décrit au niveau de l'ARC et du noyau ventromédian (NVM). Au niveau hypophysaire, la densité de marquage la plus importante a été trouvée au niveau de l'adénohypophyse. Cette distribution de R-GnRH a ensuite été confirmée par des études d'hybridation *in situ* (Jennes et Conn, 1994), et récemment par immuno-histochimie et par western blot (Albertson *et al.*, 2008).

En plus de ces sites de distribution de R-GnRH décrits précédemment, Albertson et collaborateurs (2008) ont décrit, chez la souris, la présence de R-GnRH au niveau de la couche mitrale du bulbe olfactif accessoire et principal, du cortex cérébral, du cortex piriforme et au niveau de la substance grise centrale du mésencéphale.

Chez le mouton, ces mêmes auteurs ont décrit la présence de neurones exprimant le R-GnRH au niveau de l'hippocampe, du gyrus denté, de la substance grise centrale, de l'organe subfornical, de l'hypothalamus avec un marquage intense au niveau de l'ARC et quelques neurones dispersés au niveau de l'APO. La présence de la GnRH et du R-GnRH

au niveau de la moelle épinière a aussi été décrite chez le mouton (Dolan *et al.*, 2003). Les R-GnRH ont été généralement décrits dans des zones et des aires contenant des fibres à GnRH, exception faite pour l'hippocampe (Haour *et al.*, 1987).

## Rôle de la GnRH dans la fonction de reproduction

Les neurones à GnRH représentent la composante finale d'un réseau neuronal qui intègre toutes les informations provenant du milieu intérieur et extérieur. Sécrétée d'une manière pulsatile au niveau du système porte hypophysaire, la GnRH agit sur les cellules gonadotropes de l'hypophyse antérieure en stimulant à la fois la synthèse et la sécrétion de la LH et de la FSH (Schally *et al.*, 1971; Schally, 1973). Ces deux hormones, libérées dans la circulation périphérique, ont une action directe sur les gonades pour réguler la stéroïdogénèse et la gamétogénèse (Figure 4).

Bien que de nombreuses études montrent que la GnRH agit sur la sécrétion de la LH et de la FSH, il existe un certain nombre de travaux qui suggèrent l'existence d'un facteur FSH-RH, qui serait spécifique de la stimulation de la sécrétion de la FSH (Padmanabhan et McNeilly, 2001; Padmanabhan et Sharma, 2001).

## B. Les cellules gonadotropes et les gonadotropines

Les cellules gonadotropes constituent environ 10 à 15% de la population cellulaire totale de l'hypophyse antérieure et elles sont principalement situées dans la *pars distalis* et la *pars tuberalis*. Elles sécrètent les deux gonadotropines LH et FSH dans la circulation périphérique. Les cellules gonadotropes peuvent être mono ou bihormonale, cependant il est admis que toutes les gonadotropes ont la potentialité de produire les deux hormones (LH et FSH (Taragnat, 2001)

Les gonadotropines font partie de la famille des hormones glycoprotéiques. Les gonadotropines hypophysaires sont des hétérodimères composés de deux sous-unités distinctes  $\alpha$  et  $\beta$ . Dans une espèce donnée, la sous-unité  $\alpha$  est identique pour toutes les hormones glycoprotéiques (LH, FSH et TSH pour Tyrosine Stimulating Hormone) et elle est le produit d'un même gène. A l'opposé, les sous-unités  $\beta$  sont spécifiques de chaque hormone et sont codées par des gènes différents (Combarnous *et al.*, 2001). Les sous-unités  $\beta$  sont responsables de la spécificité biologique et immunologique de l'hormone (Pierce et

Parsons, 1981). La demi-vie des gonadotropines est relativement courte comparée aux autres hormones glycoprotéiques, elle est en effet de l'ordre de 20 minutes pour la LH et 120 minutes pour la FSH.

Les gonadotropines jouent un rôle central dans la régulation de la fonction de reproduction tant chez le mâle que chez la femelle

## Contrôle de la sécrétion de GnRH et de LH

### La pulsatilité

Dans cette section nous décrivons le caractère épisodique dit aussi pulsatile de la sécrétion de la LH et de la GnRH en fonction de la chronologie de leur mise en évidence.

#### Pulses de LH

Jusqu'en 1960, la sécrétion de LH était considérée comme étant une sécrétion continue et monotone interrompue uniquement par une grande décharge préovulatoire. La pulsatilité de la LH a été initialement mise en évidence chez la ratte ovariectomisée (Gay et Midgley, 1969).

Chez la brebis, la pulsatilité de la LH a premièrement été mise en évidence en 1972 chez la brebis ovariectomisée par Butler et collaborateurs. Elle a ensuite été décrite pendant les différentes phases du cycle chez la brebis intacte (Baird et Scaramuzzi, 1976), pendant la période d'anœstrus (Scaramuzzi et Baird, 1977), avant la puberté (Foster *et al.*, 1975) et en anœstrus de lactation (Poindron *et al.*, 1980).

Il s'est avéré ensuite que ce mode de sécrétion pulsatile de la LH était tout particulièrement lié à la libération de la GnRH dans le sang porte hypophysaire.

#### Pulses de GnRH

Grâce au développement de techniques permettant la mesure directe de la GnRH, une étroite relation entre les pulses de GnRH et ceux des gonadotropines a été démontrée (Figure 5A). Ainsi, la pulsatilité de la GnRH a été mise en évidence dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire (rat : Sarkar *et al.* (1976) ; brebis : Clarke et Cummins (1982), Caraty et Locatelli (1988)), dans le liquide extracellulaire au niveau de l'éminence médiane par la méthode de push-pull (rat : Levine et Ramirez (1980) ; mouton : Levine *et*

*al.* (1982) ; singe : Gearing et Terasawa (1988)) ou dans le LCR (singe : Van Vugt *et al.* (1985) ; brebis : Skinner *et al.* (1995) ; vache : Gazal *et al.* (1998)).

Le centre générateur des pulses (centre responsable du mode de sécrétion pulsatile de GnRH) entraîne la libération des décharges intermittentes de GnRH dans le sang porte (Karsch *et al.*, 1984). Ces pulses sont très brefs (4 à 8 min) et séparés par des périodes pendant lesquelles les niveaux de la GnRH sont indétectables (Moenter *et al.*, 1992). Une relation quasi parfaite existe entre le signal hypothalamique (pulses de GnRH), le signal hypophysaire (pulses de LH), et celui constitué par la testostérone chez le bélier (Caraty *et al.*, 1993b, Figure 5B). Il est également intéressant de rappeler que la forme des pulses observés dans le sang porte rappelle les vagues d'activité électrique multi-unitaire (MUA) observées au niveau de l'EM chez le singe (O'Byrne et Knobil, 1993). Le pulse de GnRH représente ainsi la première étape de transition entre le signal nerveux et signal hormonal.

Le changement d'activité des neurones à GnRH, tout au long du cycle, est traduit par des variations de fréquence et d'amplitude des pulses. Ces variations ont été montrées comme étant dépendantes des stéroïdes sexuels notamment l'œstradiol et la progestérone, chez la femelle.

#### Action des stéroïdes

La progestérone joue un rôle majeur dans la détermination du profil de sécrétion de la LH au cours du cycle. Un effet inhibiteur dose-dépendant de cette hormone sur la pulsativité de LH a été largement décrit chez la brebis (Karsch *et al.*, 1977; Karsch *et al.*, 1984).

Pendant la phase lutéale, la progestérone inhibe la sécrétion de LH en réduisant la fréquence des pulses de GnRH (Padmanabhan *et al.*, 1995; Skinner *et al.*, 1998). Les niveaux de LH restent faibles aussi longtemps que les niveaux de progestérone sont élevés. La chute des concentrations plasmatiques de progestérone à la lutéolyse entraîne une augmentation de la fréquence des pulses de la LH. Cet effet est amplifié par l'œstradiol qui agit en réduisant l'amplitude des pulses de GnRH (Evans *et al.*, 1994) et de LH (Goodman et Karsch, 1980; Goodman *et al.*, 1980a; Karsch *et al.*, 1983) et en stimulant leur fréquence. Evans et collaborateurs (1994) ont montré que cette action inhibitrice de l'œstradiol sur la sécrétion de LH, au début de la phase folliculaire se fait de façon dose dépendante.

Néanmoins, au cours de la saison sexuelle, l'œstradiol a un effet inhibiteur mineur sur la sécrétion de LH (Karsch *et al.*, 1977; Legan *et al.*, 1977) mais il amplifie l'effet inhibiteur de la progestérone (Goodman *et al.*, 1980a; Goodman *et al.*, 1981a; Martin *et al.*, 1983; Skinner *et al.*, 1998) en modulant l'expression du nombre de ses récepteurs au niveau hypothalamique (Bayliss et Millhorn, 1991; Bayliss *et al.*, 1991).

## Pic préovulatoire de GnRH/LH

### Mise en évidence

Il a été montré que l'augmentation des niveaux d'œstradiol en fin de phase folliculaire constitue le signal ovarien majeur déclenchant le pic préovulatoire de GnRH/LH chez de nombreuses espèces de mammifères. Sarkar *et al.* (1976) ont été les premiers à décrire un pic de GnRH au moment du pic préovulatoire de LH chez la ratte.

Chez la brebis, la mise au point des techniques de canulation du système porte hypothalamo-hypophysaire (Clarke et Cummins, 1982; Caraty *et al.*, 1989); et de canulation du 3<sup>ème</sup> ventricule (Skinner *et al.*, 1995) ont permis de décrire un pic de GnRH au moment du pic préovulatoire de LH au niveau du sang porte hypothalamo-hypophysaire et du LCR chez cette espèce. Cependant, le rôle du pic de GnRH dans le LCR reste à ce jour à identifier.

### Description

Le profil de sécrétion de la GnRH en fin de phase folliculaire peut être divisé en deux phases (Clarke *et al.*, 1987; Moenter *et al.*, 1990; Moenter *et al.*, 1991). La première correspondant à une diminution de la fréquence des pulses de GnRH traduit le rétrocontrôle négatif de l'œstradiol, la seconde où l'on observe une augmentation importante à la fois de la fréquence et de l'amplitude de ces pulses traduit le rétrocontrôle positif de l'œstradiol.

Alors que la libération de la GnRH est exclusivement pulsatile en phase folliculaire, elle devient continue pendant le pic préovulatoire (Moenter *et al.*, 1992). Cette modification est étroitement liée à l'augmentation des niveaux plasmatiques de l'œstradiol (Evans *et al.*, 1995a). L'équipe d'Evans s'est intéressée à étudier le mode d'action de l'œstradiol sur le profil de sécrétion de la GnRH durant la période préovulatoire. Leurs

travaux ont montré un changement progressif dans le mode de libération de la GnRH (Evans *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1995a; Evans *et al.*, 1995b). En effet, en suivant la libération de la GnRH de minute en minute aux alentours du pic préovulatoire de LH, Evans et ses collaborateurs (1995b) ont montré que l'œstradiol provoquait des changements qualitatifs dans le mode de libération de la GnRH, en modifiant la forme des pulses et en augmentant sa sécrétion entre les pulses. Il se produit alors une augmentation progressive et continue du niveau de sécrétion de GnRH qui vient masquer son caractère épisodique et pulsatile. Il est à noter que ce changement du profil de sécrétion de la GnRH coïncide avec le début du pic préovulatoire de la LH. Ces résultats viennent confirmer ceux de Kaynard *et al.* (1988c), Clarke *et al.* (1989) et Phillips *et al.* (1990) qui ont montré que l'induction d'un pic préovulatoire de LH au niveau hypophysaire nécessite une augmentation brusque de GnRH, supérieure à la fréquence des pulses observée en milieu de la phase folliculaire.

#### Relation entre le pic de GnRH et le pic de LH

Le maintien et la progression du pic de LH dépend étroitement de celui de la GnRH. En effet, l'administration d'un antagoniste de la GnRH (Padmanabhan *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 1996) à n'importe quel moment du pic entraîne une chute des niveaux plasmatiques de LH. Cependant, la fin de la décharge préovulatoire de la LH n'est pas liée à un arrêt de libération de GnRH puisque la durée de ce dernier (24 heures) dépasse de loin celle du pic LH (12 heures). L'arrêt du pic de LH semble être plutôt lié à une désensibilisation de l'hypophyse à la GnRH et/ou à un épuisement des granules de sécrétion (Crowder et Nett, 1984; Nett *et al.*, 2002).

Dans ce contexte, l'équipe de Karsch a posé la question de la quantité de GnRH nécessaire pour induire un pic préovulatoire de LH. En utilisant un modèle de brebis ovariectomisée traitée aux stéroïdes (progestérone et œstradiol), ils ont montré que 26% de la quantité totale de la GnRH sécrétée dans le sang porte était suffisante pour stimuler l'hypophyse et induire un pic préovulatoire de LH (Bowen *et al.*, 1995). Le rôle physiologique de la GnRH sécrétée en excès reste néanmoins à déterminer.

#### Besoin en œstradiol et progestérone pour induire le pic préovulatoire

##### Besoin en œstradiol

Alors qu'il est nécessaire d'avoir une importante augmentation d'œstradiol pour induire le pic de GnRH, la concentration d'œstradiol ne reste pas élevée tout au long de la période du pic. En effet, chez la brebis, les niveaux d'œstradiol chutent rapidement dans les 4 heures qui suivent le début des pics de GnRH et de LH (Karsch *et al.*, 1979; Moenter *et al.*, 1991), et reviennent à un niveau de base dans les 12 heures, alors que le pic de GnRH peut se prolonger jusqu'à 20 heures plus tard (Moenter *et al.*, 1990; Moenter *et al.*, 1991). Le maintien d'une libération prolongée de GnRH ne semble donc pas dépendre de la présence d'œstradiol. En utilisant un modèle d'induction du pic préovulatoire de LH chez la brebis Suffolk, Evans et collaborateurs (1997) ont montré qu'un pic de GnRH se produit de façon similaire que l'œstradiol soit présent jusqu'à la fin du pic ou qu'il soit retiré au moment de son apparition (21 heures). En réduisant la période d'exposition à l'œstradiol à 14 heures, aucun effet n'est observé sur les caractéristiques du pic de GnRH (amplitude et durée). Par contre, si le signal œstrogénique est raccourci à 7 heures, 80% des brebis ne présentent plus de pic. Les 20% restantes manifestent, elles, un pic de GnRH dont l'amplitude et la durée sont comparables à celles observées avec un traitement à l'œstradiol de plus longue durée (21 heures et 14 heures). Ces résultats suggèrent que l'œstradiol n'a besoin d'être présent que pendant une période de temps bien définie et relativement courte située en amont du pic.

Ces observations ont ainsi permis de subdiviser la période qui relie l'augmentation des niveaux d'œstradiol au pic de GnRH en trois phases : i) phase d'initiation : l'effet stimulateur de l'œstradiol est traduit par des neurones capables de lire le message œstrogénique ; ii) phase de transmission du signal : progression et transmission de l'effet stimulateur de l'œstradiol des cellules réceptives aux neurones à GnRH ; iii) phase de libération : libération de la GnRH (Figure 6). Seule la première phase est dépendante de la présence de l'œstradiol (Evans *et al.*, 1997).

Cependant, il est à noter que le raccourcissement de la durée de présence d'œstradiol dans l'étude d'Evans et collaborateurs (7 ou 14 heures) a entraîné une diminution significative de l'amplitude du pic de LH (Evans *et al.*, 1997). Ceci suggère que les besoins en œstradiol de l'hypophyse et de l'hypothalamus sont différents, une longue stimulation par l'œstradiol semble nécessaire pour optimiser la réponse hypophysaire. Il est également important de noter qu'une relation entre la durée d'administration de l'œstradiol et la dose utilisée a été clairement montrée par Caraty et collaborateurs (2002) chez la brebis Ile-de-France ovariectomisée. Si la dose d'œstradiol administrée est faible la durée de présence des implants doit être allongée pour obtenir un

pic de LH. Au contraire, pour des doses d'œstradiol plus élevées la durée de présence des implants peut être raccourcie à 4 heures (Pillon, 2003).

#### Besoin en progestérone

Chez la brebis, la progestérone joue un rôle important dans le contrôle du moment d'induction du pic préovulatoire de LH (Fabre-Nys et Martin, 1991a; Skinner *et al.*, 2000). La progestérone augmente l'amplitude du pic préovulatoire de la GnRH induit par l'œstradiol (Caraty et Skinner, 1999). Elle agirait en augmentant la sensibilité de l'hypothalamus à l'œstradiol. En effet, il a été montré que la progestérone augmente la densité des récepteurs à l'œstradiol (ER $\alpha$ ) au niveau du noyau ventromédian (NVM) premier site d'action de l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH (Blache *et al.*, 1994). Elle doit être présente dans le sang pendant plusieurs jours pour exercer ses effets (Goodman et Karsch, 1980).

Toutefois, la progestérone est capable de bloquer le rétrocontrôle positif de l'œstradiol sur la sécrétion des hormones gonadotropes si elle est administrée conjointement à ce dernier (Pelletier et Signoret, 1969; Kasa-Vubu *et al.*, 1992). De même, un traitement à l'œstradiol est incapable d'induire un pic de GnRH et de LH durant la phase lutéale du cycle (Bolt *et al.*, 1971; Howland *et al.*, 1971) ou chez des brebis ovariectomisées traitées à la progestérone (Scaramuzzi *et al.*, 1971a).

#### Action des peptides gonadiques

Ce sont essentiellement l'inhibine, l'activine et la follistatine. Ces peptides sont formés de deux sous-unités de glycoprotéines associées entre elles par des ponts di sulfures. Ces peptides sont synthétisés au niveau ovarien par les cellules de la granulosa, et se trouvent également dans les extraits ovariens, le liquide folliculaire et le plasma. L'inhibine a un effet inhibiteur sur la sécrétion de la FSH, l'activine stimule la libération de FSH, alors que la follistatine agit en tant qu'inhibiteur de l'activité de l'activine en se liant à cette dernière (Counis *et al.*, 2001).

Ainsi, ces facteurs régulent essentiellement la libération de FSH. Chez la majorité des espèces étudiées, l'administration d'inhibine purifiée ou de liquide folliculaire entraîne une diminution importante des niveaux plasmatiques de FSH. Cette chute des niveaux de

FSH est accompagnée d'une diminution de l'expression des ARNm des sous unités  $\beta$ FSH (McNeilly, 1984; Carroll *et al.*, 1991). L'effet de l'inhibine semble s'exercer directement sur l'hypophyse. Les effets décrits plus haut ont été également décrit chez la brebis immunisée de façon passive contre la GnRH, ou chez la brebis ayant subi une déconnection hypothalamo-hypophysaire (Clarke *et al.*, 1986; Turzillo et Nett, 1997).

L'activine stimule la libération de la FSH d'une façon dose-dépendante. Appliquée sur des cellules hypophysaires ovines en culture, l'activine augmente la libération de FSH basale et stimulée par la GnRH (Muttukrishna et Knight, 1990). Ce peptide augmente aussi le nombre de cellules contenant la FSH (Katayama *et al.*, 1990).

La follistatine ne semble pas avoir un effet direct sur les gonadotropines. Elle agit essentiellement en se liant à l'activine et en bloquant son effet stimulateur (Counis *et al.*, 2001).

Ces trois peptides sont présents dans la circulation sanguine mais le facteur prépondérant semble être l'inhibine, dont les taux plasmatiques s'élèvent pendant la phase folliculaire. Bien que leur effet sur la libération de la FSH soit bien défini, celui sur la LH est beaucoup plus controversé. Chez le mouton, l'activine diminue la libération de LH stimulée par la GnRH *in vitro* (Muttukrishna et Knight, 1990). Par contre l'inhibine la stimule aussi bien *in vitro* que *in vivo* après une injection de liquide folliculaire pendant la phase lutéale (Wallace et McNeilly, 1986). Cet effet semble passer par une régulation des récepteurs à la GnRH. En effet, certaines études ont montré que l'inhibine augmentait le nombre de récepteurs à la GnRH chez la brebis (Laws *et al.*, 1990), mais d'autres n'ont pas démontré une telle régulation (Turzillo et Nett, 1997).

## Modèle de phase folliculaire

Chez la brebis, l'étude des événements et des mécanismes qui mènent à l'ovulation est limitée par la grande variabilité individuelle de l'intervalle entre la lutéolyse et le pic préovulatoire de LH. Afin de s'affranchir de cette grande variabilité, des travaux dans le laboratoire de Karsch ont permis de développer un modèle de cycle artificiel qui reproduit le cycle estrien naturel (Goodman *et al.*, 1981c; Moenter *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1994).

Ce modèle consiste en un traitement par la progestérone de brebis ovariectomisées sensibilisées à l'œstradiol, suivi d'un traitement par l'œstradiol sous forme d'implants sous

cutanés (Figure 7). La quantité d'œstradiol libérée par l'implant (pg/ml) est proportionnelle à la longueur d'implant exprimée en centimètres.

Ce modèle vise à reproduire les variations de sécrétion des stéroïdes ovariens qui se produisent lors du cycle naturel et permet de s'affranchir des variations hormonales individuelles en administrant les mêmes quantités d'hormones à tous les animaux en même temps. Cependant, ce modèle présente un inconvénient puisqu'il ne mime pas la sécrétion pulsatile de l'œstradiol par les follicules (Baird *et al.*, 1981), l'œstradiol est plutôt constant tout au long de la durée de présence de l'implant.

Ce modèle physiologique de la phase folliculaire reproduit les effets de la progestérone et de l'œstradiol sur la libération de GnRH et de LH ainsi que sur l'apparition du comportement d'œstrus. L'œstradiol induit ainsi, par rétrocontrôle négatif, une diminution des niveaux de GnRH dans le sang porte, suivie par un large pic de GnRH et de LH. Cette réponse en terme de pic préovulatoire de GnRH/LH est mieux synchronisée que celle observée chez la brebis cyclique.

## D. Rôle du SNC dans le contrôle de la sécrétion de GnRH/LH

Comme nous l'avons vu précédemment, les stéroïdes sexuels jouent un rôle prépondérant dans le contrôle de la libération de GnRH/LH, cependant les mécanismes par lesquels ils agissent restent à ce jour mal identifiés.

Les neurones à GnRH ne possèdent pas ou très peu de récepteurs aux stéroïdes (Herbison *et al.*, 1993; Lehman *et al.*, 1993), exception faite du le récepteur  $\beta$  de l'œstradiol (RE $\beta$ ). Cependant, ce dernier, exprimé par à peu près 50% des neurones à GnRH chez la brebis (Skinner et Dufourny, 2005) et plus de 70% chez la souris (Legan et Tsai, 2003), ne semble pas avoir de rôle majeur dans le contrôle de la fonction de reproduction, puisque sa délétion (souris Knockout RE $\beta$ ) est sans effet majeur sur la reproduction (Krege *et al.*, 1998). En conséquence, l'action des stéroïdes sur les neurones à GnRH s'exerce vraisemblablement via une ou plusieurs autres populations inter-neuronales permettant de transmettre le message œstrogénique depuis les cellules réceptives jusqu'aux neurones à GnRH.

Dans cette section nous allons présenter les sites d'action de l'œstradiol et de la progestérone impliqués dans le contrôle de la sécrétion de GnRH/LH pendant la saison sexuelle chez la brebis. Nous citerons ensuite les principales populations neuronales

connues pour exprimer les récepteurs à l'œstradiol (RE $\alpha$ ) et à la progestérone (RP) qui participent à l'action stimulatrice et/ou inhibitrice de ces stéroïdes.

## 1. Sites d'action de l'œstradiol

### Pulsatilité

Chez la brebis ovariectomisée, la pose d'implants d'œstradiol au niveau de l'APO médiane ou au niveau du noyau ARC entraîne une diminution de l'amplitude et de la fréquence des pulses de LH (Caraty *et al.*, 1998). Des études de déafférentiations (Jackson *et al.*, 1978; Thiery *et al.*, 1978) ont montré que des lésions au niveau du noyau ARC, mais pas au niveau de l'APO, perturbaient la libération épisodique de LH. A l'opposé, des lésions entre l'AHA et l'ARC réduisent l'amplitude des pulses sans en modifier la fréquence. Des travaux utilisant une technique immuno-histochimique de double marquage de FOS (un marqueur de l'activité cellulaire) et de GnRH suggèrent que, chez la brebis, les neurones à GnRH au niveau du HMB contrôleraient la sécrétion pulsatile de la GnRH (Boukhliq *et al.*, 1999).

### Pic préovulatoire

Il est bien admis que le pic préovulatoire de LH est la résultante d'un rétrocontrôle positif de l'œstradiol à la fois au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse.

#### Au niveau hypothalamique

Chez la brebis, des implants intra-cérébraux d'œstradiol provoquent une augmentation de la sécrétion de LH de type préovulatoire lorsqu'ils sont placés dans l'HMB. En revanche, lorsqu'ils sont placés dans l'APO cet effet n'est pas observé (Blache *et al.*, 1994). Une étude de Caraty et collaborateurs (1998) montre que l'administration d'implants d'œstradiol dans la région ventromédiane de l'hypothalamus provoque un pic de GnRH dans le sang porte, chez la moitié des brebis étudiées. L'intervalle entre l'administration de l'œstradiol et le moment d'apparition du pic est comparable à celui observé chez les brebis traitées à l'œstradiol par voie périphérique mais l'amplitude est plus faible. Ceci suggère que l'œstradiol agit au niveau de l'hypothalamus et plus particulièrement dans la région du noyau ventromédian pour induire le pic préovulatoire de

GnRH. Pendant la période du pic, 40% des neurones à GnRH dans toute l'aire hypothalamique sont activés c'est-à-dire doublement marqués FOS/GnRH, mais aucune régionalisation de cette activation n'a été décrite (Moenter *et al.*, 1993). De plus, une forte expression RE $\alpha$  durant la phase folliculaire et lutéale dans l'HMB a été décrite chez la brebis (Lehman *et al.*, 1993; Blache *et al.*, 1994). Ces données chez la brebis sont différentes de celles obtenues chez le rat, chez qui le rétrocontrôle positif de l'œstradiol semble s'exercer dans la partie rostrale de l'aire pré-optique (Petersen *et al.*, 1989).

#### Au niveau hypophysaire

En plus de ses effets au niveau hypothalamique pour déclencher le pic préovulatoire de la GnRH, l'œstradiol agit au niveau de l'hypophyse pour stimuler la synthèse des récepteurs à la GnRH (Crowder et Nett, 1984; Gregg et Nett, 1989). Cependant, l'œstradiol, même à forte dose, ne semble pas stimuler l'expression de l'ARNm des sous unités LH $\beta$  et FSH $\beta$ . L'effet stimulateur de l'œstradiol sur la sécrétion des gonadotropines ne semble pas s'exercer directement sur la synthèse des gonadotropines, mais passerait plutôt par une modulation de l'expression des récepteurs à la GnRH au niveau hypophysaire (Gregg *et al.*, 1990). Toutefois, un effet de la GnRH dans la régulation de son propre récepteur a également été décrit chez les mammifères (Turzillo *et al.*, 1995).

#### Neuromédiateurs impliqués dans l'action de l'œstradiol

De nombreux neuropeptides et neurotransmetteurs ont été décrits comme étant impliqués dans le contrôle de la libération de la GnRH. Toutefois, chez la brebis, nous ne disposons que de peu de données qui de plus parfois controversées (Goodman et Inskeep, 2006a; Herbison, 2006).

- Les monoamines

**La noradrénaline (NA) :** L'œstradiol stimule les neurones **noradrénergiques** du noyau A1, localisé au niveau du tronc cérébral, et dont les fibres projettent vers l'APO (Tillet *et al.*, 1993; Rawson *et al.*, 2001). Une augmentation extra-cellulaire de la NA dans l'APO a été mise en évidence avant le début du pic préovulatoire de LH (Robinson *et al.*, 1991). L'administration d'un antagoniste  $\alpha$ -adrénergique diminue mais ne bloque pas le pic préovulatoire de LH induit par l'œstradiol chez la brebis ovariectomisée (Jackson, 1977). En revanche, une micro-injection de NA au niveau de l'APO a un effet inhibiteur

(Scott *et al.*, 1992). L'ensemble de ces données suggèrent un rôle permissif de la NA dans le contrôle de la libération de la GnRH.

**La Dopamine (DA) :** L'activité dopaminergique augmente au niveau du NVM au moment du pic préovulatoire de LH, et le blocage de la synthèse de DA retarde le moment d'apparition du pic de LH (Anderson *et al.*, 2001). De plus, l'administration d'un antagoniste de la dopamine bloque le pic de LH (Fabre-Nys *et al.*, 2003), mais l'administration d'un agoniste au niveau du NVM pendant la phase de transmission ne l'avance pas (Fabre-Nys *et al.*, 2003). Un pic de DA au niveau du HVM, au moment du pic préovulatoire de LH a été décrit par Anderson et collaborateurs (2001). Toutefois, le rôle de la DA dans le contrôle du pic préovulatoire de LH reste mal connu. A l'opposé, le rôle de la DA dans le rétrocontrôle négatif de l'œstradiol en anœstrus a lui été clairement démontré (Thiery *et al.*, 1995).

- La somatostatine

Les neurones à **somatostatine** localisés dans le NVM expriment le RE $\alpha$  et projettent dans l'APO (Goubillon *et al.*, 2000). Ces neurones représentent une cible potentielle de l'œstradiol dans son action du rétrocontrôle négatif et positif. Pillon et collaborateurs (2003) ont en effet décrit, chez la brebis ovariectomisée, une augmentation de la quantité des ARNm de la somatostatine dans le HMB dans les 4 heures suivant l'administration de l'œstradiol sous forme d'implants pendant la phase d'activation du pic. Unsworth et Robinson (2002) ont également décrit une augmentation de l'expression de la protéine FOS dans les neurones à somatostatine au niveau du NVM 6 heures après administration d'œstradiol. De plus, l'administration de la somatostatine par voie icv inhibe fortement la pulsativité de la LH (Pillon, 2003). Ces travaux suggèrent donc un rôle du peptide dans le rétrocontrôle négatif de l'œstradiol sur la GnRH.

- La bêndorphine

Une augmentation suivie par une diminution des niveaux de **bêndorphine** pendant la phase folliculaire, juste avant le pic de GnRH a été décrite chez la brebis cyclique par Domanski et collaborateurs (1991). Chez la brebis ovariectomisée, (Pillon *et al.*, 2003a) ont, quant à eux, décrit une diminution de l'ARNm de la bêndorphine dans les 4 heures suivant l'administration d'œstradiol alors qu'aucun effet n'a été observé entre la phase lutéale et la phase folliculaire par walsh et collaborateurs (1998). L'arrêt de l'effet inhibiteur des peptides endogènes opioïdes sur la GnRH serait ainsi un élément majeur dans la genèse des pics préovulatoires de GnRH et de LH.

- Le neuropeptide Y (NPY)

Les données concernant le rôle de ce peptide dans le contrôle de la sécrétion de LH sont très controversées. En effet, l'administration par voie centrale de **NPY** à des brebis peut, selon la zone d'administration, augmenter (Advis *et al.*, 2003), diminuer (Barker-Gibb *et al.*, 1995) ou n'avoir aucun effet sur la sécrétion de LH (Malven *et al.*, 1995; Estrada *et al.*, 2003). Aucune variation des niveaux d'ARNm du NPY n'a de plus été observée 4 heures après administration d'œstradiol (Pillon *et al.*, 2003a). De même aucun changement dans le nombre de cellules NPY/FOS immunoréactives (ir) 6 heures après injection d'œstradiol n'a été observé (Clarke *et al.*, 2001). Par contre, Advis et collaborateurs (1990) ont montré qu'une augmentation de la sécrétion de NPY au niveau de l'EM entraînait un pic de LH chez la brebis. De plus, l'administration d'un anticorps anti-NPY par voie icv retarde ou avance le pic préovulatoire de GnRH/LH (Porter *et al.*, 1993; Malven *et al.*, 1995). L'ensemble de ces résultats suggèrent des effets opposés du NPY selon qu'ils s'exercent au niveau des corps cellulaires ou des terminaisons des neurones à GnRH.

- La Neurokinine B (NKB)

Les neurones à **NKB** présentent la population neuronale la plus abondante de l'ARC. Ces neurones expriment à 95% les RE $\alpha$  et des fibres à NKB ont été décrites à proximité de 40% des neurones à GnRH au niveau de l'APO (Goubillon *et al.*, 2000; Goubillon *et al.*, 2002). Cependant, aucune variation de l'expression de la NKB n'a été observée (4 heures après œstradiol), et l'administration de NKB par voie icv n'a aucun effet sur la pulsativité de la LH chez des brebis ovariectomisées traitées à l'œstradiol (Pillon *et al.*, 2003b). L'administration icv d'un agoniste de la NKB (senktide) à des brebis intactes stimule la sécrétion de la LH pendant la phase folliculaire mais reste sans effet pendant la phase lutéale (McManus *et al.*, 2005). Les données d'une autre étude suggèrent que la NKB agirait au niveau du noyau retro-chiasmatique pour induire le pic de GnRH puisque l'administration du senktide à ce niveau avance le pic de LH pendant la phase folliculaire (Nestor *et al.*, 2008).

- L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique A (GABA)

Cet acide aminé exerce un effet inhibiteur sur la sécrétion de GnRH chez la brebis. Cet effet est essentiellement transmis via les récepteurs de type GABA-A de l'APO et de l'HMB (Robinson *et al.*, 1991; Jackson et Kuehl, 2002). L'infusion d'agonistes comme des

antagonistes du GABA dans l'APO ou le HMB supprime la sécrétion de LH pendant la saison de reproduction (Scott et Clarke, 1993a; 1993b).

Chez la brebis, les neurones à GABA sont localisés au niveau de l'APO et l'AHA et projettent à proximité des neurones à GnRH de l'APO. Une grande proportion (40%) des neurones à GABA de l'APO expriment le RE $\alpha$ . De plus, ces neurones représentent à peu près 30% de la population de neurones exprimant le RE $\alpha$  dans cette zone (Herbison *et al.*, 1993).

- La Galanine (Gal)

L'implication de la **Gal** dans la sécrétion de la LH chez la brebis n'a pas été mise en évidence. Chez la brebis, les neurones à Gal sont rencontrés au niveau de l'APO, l'ARC et le Bnst. La moitié des neurones à Gal de l'APO exprime le RE $\alpha$ , tandis que cette co-localisation n'est observée que dans une faible proportion des neurones au niveau du noyau ARC (Tourlet *et al.*, 2005). La mise en évidence de contacts entre les fibres à Gal et les corps cellulaires de neurones à GnRH au niveau de l'APO suggère un contrôle direct de l'activité des neurones à GnRH par ce neuropeptide. De plus, le nombre de contacts semble augmenter sous l'effet de l'œstradiol (Tourlet et Tillet, communication personnelle).

- Le Kisspeptide

La découverte récente du **kisspeptide** (et de son récepteur GPR54) et de sa forte implication dans la régulation de la fonction de reproduction, laisse penser que l'élément majeur de cette régulation a pendant longtemps été ignoré.

Il a été montré que le kisspeptide induit la sécrétion des gonadotropines chez la brebis, le rat, le singe et l'homme via une stimulation des neurones à GnRH qui expriment le GPR54 (Popa *et al.*, 2008; Smith, 2008a). Chez la brebis, il a été montré que le kisspeptide stimule les gonadotropines principalement en stimulant la libération de GnRH (Messenger *et al.*, 2005). Chez la brebis, les neurones à Kisspeptide ont été essentiellement localisés dans l'ARC mais aussi dans l'APO, deux zones de l'hypothalamus connues pour intervenir dans le contrôle de la sécrétion de la GnRH (Smith, 2008a). Des contacts synaptiques à kisspeptide sur des neurones à GnRH au niveau de l'APO, l'AHA et l'HMB ont récemment été décrits chez la brebis (Smith *et al.*, 2008b). Il est intéressant de noter que le nombre de ces contacts augmente fortement au niveau de l'HMB pendant la saison sexuelle.

La quasi totalité des neurones à Kisspeptide de l'ARC et environ 50 % de ceux de l'APO expriment le RE $\alpha$  (Franceschini *et al.*, 2006). De plus, l'expression du Kisspeptide au niveau de l'ARC varie fortement sous l'action des stéroïdes et de la photopériode (Smith *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2008b). Chez la brebis, l'expression du Kisspeptide au niveau de l'ARC augmente fortement après ovariectomie (Smith *et al.*, 2007) tandis que l'administration de l'œstradiol abolit cet effet aussi bien en saison sexuelle qu'en anœstrus (Smith *et al.*, 2008b). Cependant, une augmentation de l'expression du Kisspeptide au niveau de la partie caudale de l'ARC a été observée au moment du pic préovulatoire de LH lorsque la sécrétion d'œstradiol est élevée (Smith, 2008a). Cette contradiction suggère que deux populations de neurones à Kisspeptide seraient présentes au niveau de l'ARC, et participeraient au rétrocontrôle négatif et positif de l'œstradiol. Enfin, une augmentation de l'expression du Kisspeptide au niveau de l'APO sous l'effet de l'œstradiol, indépendamment de la saison a été récemment décrite (Smith *et al.*, 2008b). Un éventuel rôle de cette population de neurones à Kisspeptide de l'APO dans la rétroaction positive de l'œstradiol reste possible.

## 2. Sites d'action de la progestérone et neuromédiateurs impliqués

Il existe peu de données concernant les mécanismes d'action de la progestérone sur la libération de la GnRH.

### a. Sites d'action de la progestérone

#### Au niveau de l'hypothalamus

La progestérone inhibe la sécrétion de LH en agissant au niveau central pour bloquer celle de la GnRH (Kasa-Vubu *et al.*, 1992). Il a également été montré que la progestérone bloque le pic préovulatoire de LH en perturbant la lecture et la transmission du signal œstrogénique. En effet, un traitement à la progestérone pendant la phase d'activation (Richter *et al.*, 2002) ou pendant la phase de transmission (Harris *et al.*, 1999) bloque l'activation de la protéine FOS dans les neurones à GnRH. En revanche, elle n'empêche pas cette activation dans d'autres populations neuronales de l'APO qui restent néanmoins à identifier.

En plaçant des implants de progestérone dans le cerveau, Blache et ses collaborateurs (1996) ont également suggéré une action de la progestérone au niveau du NVM pour bloquer le pic préovulatoire de LH. Chez la brebis, des études de

déafférentation supportent cette hypothèse et montrent aussi que le HMB est la cible la plus importante de la progestérone pour bloquer le pic préovulatoire de LH (Goodman, 1996).

Il a été démontré que l'effet inhibiteur de la progestérone sur la libération de GnRH est transmis via son récepteur nucléaire « classique » (Skinner *et al.*, 1999). En effet, l'administration par voie icv de la progestérone à des brebis ovariectomisées bloque la sécrétion de LH, tandis que l'administration d'un de ses métabolites le 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ THP, neurostéroïde, à forte action barbiturique qui agissant via les récepteurs GABA<sub>A</sub>) n'a aucun effet sur la fréquence de la sécrétion de LH (Skinner *et al.*, 1998). L'administration par voie icv (Skinner *et al.*, 1998) ou par voie intraveineuse (iv) (Skinner *et al.*, 1999) d'un antagoniste du récepteur de la progestérone (RU 486) bloque l'effet inhibiteur de la progestérone sur la sécrétion de GnRH et par suite celle de la LH (Skinner *et al.*, 1999). Toutes ces données suggèrent donc une action de la progestérone via son récepteur nucléaire classique et non pas via l'activation du récepteur GABA<sub>A</sub> comme cela avait été suggéré quelques années plutôt (Brann *et al.*, 1990).

#### Au niveau hypophysaire

Chez la brebis, l'effet inhibiteur majeur de la progestérone sur la sécrétion de LH passe par le niveau central, une action directe du stéroïde sur l'hypophyse semble quant à elle improbable. En effet, les travaux de Clarke (1984) utilisant un modèle de brebis dont l'hypophyse a été chirurgicalement déconnectée de l'hypothalamus (brebis HPD) n'ont montré aucun effet de ce stéroïde sur la libération des gonadotropines. De plus, la capacité de l'hypophyse de brebis maintenues sous progestérone à répondre à une stimulation exogène de GnRH conforte ces observations (Kaynard *et al.*, 1988a; Kaynard et Karsch, 1988b).

#### Neuromédiateurs impliqués

De nombreux travaux ont décrit un rôle possible des **peptides opioïdes endogènes (POE)** comme médiateurs de l'effet inhibiteur de la progestérone sur la libération de GnRH. Les agonistes des POE agissent au niveau du cerveau pour inhiber la sécrétion de LH (Horton *et al.*, 1989), et inversement l'administration des antagonistes comme le naloxone stimulent la sécrétion de GnRH chez le bélier et la brebis en phase lutéale ou traitée à la progestérone (Caraty *et al.*, 1987; Horton *et al.*, 1987). De plus, le blocage des

récepteurs aux POE entraîne une activation (expression de la protéine FOS) des neurones à GnRH au niveau du HMB mais pas de ceux de l'APO (Goodman, 1996).

**La Dynorphine A (DYN) et la  $\beta$ endorphine**, deux peptides de la famille des opiacés, ont été décrits comme pouvant jouer un rôle dans le rétrocontrôle négatif de la progestérone sur la pulsativité de la LH.

Un nombre important de neurones à DYN se trouve au niveau de l'ARC. Ces neurones expriment à la fois la NKB (Foradori *et al.*, 2006) et le récepteur à la progestérone (Dufourny *et al.*, 2005). Il a été montré que des fibres à DYN et à NKB présentent des contacts avec les neurones à GnRH au niveau de l'APO. Récemment la localisation du **Kisspeptide** dans cette population de neurones de l'ARC exprimant la DYN serait en faveur d'une action de ce peptide dans l'effet inhibiteur de la progestérone sur la libération de la GnRH.

Les neurones à  **$\beta$ endorphine** de l'ARC expriment le récepteur à la progestérone et se projettent au niveau de l'APO (Dufourny *et al.*, 2005). Parallèlement, Taylor et collaborateurs (2007) ont montré une augmentation du contenu cellulaire du précurseur de la  $\beta$ endorphine (Proopiomélanocortine, POMC) au niveau de l'ARC suite à l'augmentation des niveaux plasmatiques de progestérone. Cette augmentation des taux de POMC est limitée aux neurones à  $\beta$ endorphine exprimant les récepteurs aux stéroïdes. La  $\beta$ endorphine serait ainsi impliquée dans l'effet inhibiteur de la progestérone sur la sécrétion de GnRH.

Toutes ces données suggèrent que la progestérone agit sur les neurones à DYN et à  $\beta$ endorphine au niveau de l'ARC pour stimuler la sécrétion de ces POE, qui vont ensuite agir directement sur les neurones à GnRH du HMB pour inhiber la sécrétion pulsatile de la GnRH (Goodman et Inskeep, 2006a).

A côté de son effet inhibiteur, la progestérone aurait aussi un effet amplificateur sur la libération de GnRH (Skinner et Caraty, 1999). Il a été suggéré que l'accumulation du peptide dans les terminaisons nerveuses pendant la phase lutéale participerait au phénomène d'amplification du pic préovulatoire de GnRH induit par l'œstradiol (Skinner et Caraty, 1999). Cet effet de la progestérone ne semble pas être lié à une augmentation du nombre de neurones à GnRH activés (activation de la protéine FOS) par l'œstradiol au moment du pic, mais plutôt à une activation d'autre population neuronale de l'APO qui reste à identifier (Richter *et al.*, 2001). De plus, l'effet amplificateur de la progestérone sur

la libération de GnRH pourrait être lié au recrutement des RE par la progestérone puisqu'il a été montré que ce stéroïde augmente le nombre de RE $\alpha$  au niveau du NVM (Blache *et al.* 1996).

## Le comportement sexuel

Le comportement sexuel chez les mâles et les femelles peut être divisé en 3 phases (Beach, 1976) :

- une phase d'attraction des partenaires
- une phase pré-copulatoire dite aussi appétitive
- une phase consommatoire constituée par la copulation elle-même.

Ces étapes, initialement décrites chez le rat et le chien, ont été adaptées et appliquées à d'autres espèces. Ici nous allons essentiellement nous intéresser à la description et à l'étude du comportement sexuel chez la brebis.

### A. Description

Les différentes phases du comportement sexuel chez la brebis sont les suivantes (Fabre-Nys, 1983; Tilbrook *et al.*, 1990; Fabre-Nys et Gelez, 2007) :

- **Phase d'attraction (attractivité)** : durant cette phase la femelle est soumise à différents changements à la fois morphologiques et physiologiques. Ces changements tels que l'émission d'odeurs caractéristiques ou la coloration de la région ano-génitale attirent l'attention du bélier et stimulent son comportement sexuel.
- **Phase pré-copulatoire (appétitive ou proceptivité)** : elle correspond à l'expression de la motivation sexuelle, traduite généralement par une augmentation de l'activité motrice, accompagnée d'un mouvement de détournement de la tête vers le bélier et d'un frétillement de la queue.
- **L'accouplement (réceptivité)** : la brebis accepte les chevauchements et adopte une posture permettant l'accouplement avec le mâle. En général, lorsqu'elle est réceptive, la brebis s'immobilise suite aux approches latérales du bélier, tête baissée. Un frétillement de la queue est souvent observé (Figure 8A).

Chez la brebis, le comportement d'œstrus dure généralement de 24 à 36 heures mais cette durée varie en fonction des races. En effet, elle est généralement deux fois plus longue chez les races poly-ovulantes comme la Romanov et la Finnoise que chez les mono-ovulantes comme l'Ile de France et la Blackface. De plus, cette durée est influencée par les phéromones et l'activité du bélier puisque la présence continue du bélier la raccourcit (Bindon *et al.*, 1979; Quirke *et al.*, 1979).

Le moment d'apparition du comportement sexuel est généralement couplé avec celui du pic préovulatoire de LH (Figure 8B). Toutefois, chez quelques races poly-ovulantes, comme décrit dans le chapitre I, le pic de LH intervient 8 à 12 h après le début de l'œstrus (Goodman, 1994). L'ovulation quant à elle apparaît en moyenne 24 à 30 heures après le début des chaleurs (Robertson, 1969).

## B. Rôles des stéroïdes gonadiques dans le contrôle du comportement sexuel

Il est bien admis chez la brebis, comme chez d'autres espèces de mammifères, que les stéroïdes gonadiques sont nécessaires pour induire le comportement sexuel. Les femelles ovariectomisées ne manifestent en effet pas de comportement d'œstrus.

Chez les ovins, l'importance de la progestérone et de l'œstradiol dans le contrôle du comportement sexuel est observée lors des périodes de transition de saison en contre-saison et vice versa. La première ovulation au début de la saison sexuelle n'est pas accompagnée de chaleur ; on parle alors d'ovulation silencieuse. Ceci est dû à un manque d'imprégnation à la progestérone. De même, à la fin de la saison sexuelle, le comportement sexuel n'apparaît pas après la lutéolyse à cause des faibles niveaux d'œstradiol.

Le besoin en œstradiol et en progestérone pour induire le comportement d'œstrus ainsi que leur mode d'action séquentiel diffèrent d'une espèce à l'autre (Morali et Beyer, 1979). En effet, chez la brebis, la progestérone doit être présente avant l'œstradiol pour que le comportement sexuel se manifeste (Robinson, 1954; 1955; Fabre-Nys et Martin, 1991a) tandis que chez les rongeurs, ces deux rôles sont inversés (Burley *et al.*, 1983).

Chez la brebis, les androgènes sont aussi capables d'induire le comportement sexuel mais ils n'ont pas un rôle physiologique très important (Martensz et Scaramuzzi, 1979).

## 1. Besoins en progestérone

Chez la brebis, bien que l'œstradiol seul puisse induire le comportement sexuel, des doses pharmacologiques du stéroïde sont nécessaires en absence d'un traitement d'imprégnation à la progestérone (Robinson, 1954a; Karsch *et al.*, 1980).

Un rôle facilitateur de la progestérone sur le comportement sexuel chez cette espèce a été largement décrit (Robinson, 1954a; Karsch *et al.*, 1980; Skinner *et al.*, 2000). Une imprégnation par la progestérone de 5 jours est suffisante pour induire le comportement d'œstrus chez les brebis (Goodman *et al.*, 1981c). Ce traitement augmente le nombre de femelles réceptives après traitement avec l'œstradiol et réduit l'intervalle entre l'administration de l'œstradiol et l'apparition de l'œstrus (Robinson, 1954a; Binet *et al.*, 1956). Il augmente aussi l'intensité de la réceptivité (Fabre-Nys et Martin, 1991a). L'effet facilitateur de la progestérone perdure dans le temps, il est observé même une semaine après le traitement (Fabre-Nys et Martin, 1991a). A l'opposé, lorsqu'elle est administrée en même temps que l'œstradiol, la progestérone bloque le comportement sexuel, comme nous l'avons décrit précédemment pour l'induction du pic préovulatoire de LH (Karsch *et al.*, 1980; Skinner *et al.*, 2000).

## 2. Besoins en œstradiol

Chez la brebis, l'augmentation des niveaux plasmatiques d'œstradiol qui dure en moyenne de 12 à 24 heures en fonction des races, entraîne à la fois le comportement sexuel et le pic préovulatoire de LH. Toutefois, les quantités d'œstradiol requises pour induire le comportement d'œstrus sont inférieures à celles nécessaires pour induire le pic préovulatoire de LH (Fabre-Nys *et al.*, 1993; Caraty *et al.*, 2002).

Chez la brebis ovariectomisée, l'augmentation de la dose d'œstradiol diminue la latence d'apparition du comportement sexuel et augmente l'activité de recherche du mâle par la brebis. Toutefois, cette latence d'apparition de la réceptivité qui diminue avec la

dose d'œstradiol dépend étroitement du moment de la chute des niveaux plasmatiques de progestérone (Fabre-Nys et Martin, 1991a). En effet, l'œstradiol n'est efficace que s'il est administré un à deux jours après le retrait de la progestérone (Karsch *et al.*, 1980; Fabre-Nys et Martin, 1991a). De plus, la durée de l'œstrus dépend à la fois de la dose et de la durée d'exposition à l'œstradiol comme cela a été démontré chez la brebis ovariectomisée (Scaramuzzi *et al.*, 1971; Scaramuzzi *et al.*, 1971a; Fabre-Nys *et al.*, 1993; Caraty *et al.*, 2002).

## C. Mécanismes centraux impliqués dans le contrôle du comportement sexuel

Contrairement aux nombreuses données concernant le contrôle hormonal et le besoin en stéroïdes pour induire le comportement sexuel chez la brebis, les **mécanismes neuroendocriniens** impliqués restent mal connus. Différentes composantes tels que le site d'action des stéroïdes, le rôle des monoamines et de la GnRH ont cependant été identifiés et sont présentés ci-après.

### 1. Sites d'action des stéroïdes

Des études de déafférentation ont montré que des lésions effectuées au niveau du NVM bloquaient l'effet positif de l'œstradiol dans l'induction du comportement sexuel (Thiery *et al.*, 1977). De plus, la pause d'implants d'œstradiol au niveau de ce noyau induit le comportement sexuel chez des brebis ovariectomisées prétraitées à la progestérone (Blache *et al.*, 1991; Caraty *et al.*, 1998). Des implants de progestérone bloquent l'effet stimulateur de l'œstradiol lorsqu'ils sont placés aussi bien au niveau du NVM que de l'APO (Blache *et al.*, 1996). Il a également été rapporté que la progestérone augmente le nombre de récepteurs à l'œstradiol au niveau du NVM, ce qui explique en partie l'effet facilitateur de la progestérone sur le comportement sexuel (Blache *et al.*, 1994).

### 2. Neuromédiateurs impliqués dans le contrôle du comportement sexuel

Certains neuromédiateurs seraient impliqués dans la modulation de l'action des stéroïdes sur le comportement sexuel mais les données les concernant sont très limitées et parfois contradictoires.

## Les monoamines

Les monoamines ont été impliquées pour la première fois dans le contrôle du comportement sexuel dans les années 1960. En utilisant la technique de microdialyse intracrânienne, Fabre-Nys et ses collaborateurs (1994) ont montré que l'action de la progestérone et de l'œstradiol au niveau de l'HMB pour induire le comportement sexuel est liée à un changement des niveaux de DA et de NA.

La libération de DA au niveau du NVM est d'abord stimulée par l'exposition prolongée à la progestérone puis voit sa concentration doubler après la chute des niveaux de progestérone. Elle chute ensuite rapidement après administration d'œstradiol (Fabre-Nys *et al.*, 1994). L'administration d'un agoniste du récepteur D2 de la DA augmente l'intensité du comportement d'œstrus quand il est administré au niveau du NVM avant traitement à l'œstradiol. En revanche, le même traitement entraîne une diminution de l'œstrus quand il est donné après traitement à l'œstradiol (Fabre-Nys *et al.*, 2003). Ces traitements n'ont cependant aucun effet sur la durée et la latence d'apparition du comportement sexuel.

Contrairement à la DA, aucun changement significatif de la NA n'a été observé pendant l'œstrus. Toutefois, une augmentation des niveaux extracellulaires de NA après interaction de la brebis avec le mâle a été décrite au niveau de l'HMB en période d'œstrus (Fabre-Nys *et al.*, 1994). Ces résultats concordent avec les données obtenues chez la ratte (Ilona Vathy, 1989), cependant, la libération de NA chez la ratte n'a lieu qu'après intromission (copulation) alors que chez la brebis elle est indépendante de l'intromission. Il semble donc que des signaux provenant du mâle autres que la stimulation vagino-cervicale soient importants chez la brebis. Des données ont décrit par exemple une augmentation des niveaux extra-cellulaire de NA, au niveau de l'HMB, après exposition des brebis à une image ou à l'odeur d'un bélier (Fabre-Nys *et al.*, 1997). Malgré tout, un contact avec le mâle (apprentissage) apparaît nécessaire pour que cette augmentation de la NA ait lieu puisque des brebis « naïves » ne la présentent pas (Gelez *et al.*, 2004).

## La GnRH

Le rôle de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel a été démontré chez plusieurs espèces de mammifères : rat (Moss et Dudley, 1989), hamster (Pffaf *et al.*, 1994), singe (Kendrick et Dixson, 1995). La GnRH ne semble pas être impliquée dans cette régulation chez la vache (Allirich *et al.*, 1989) ou le porc (Dial *et al.*, 1984)). Chez la

brebis cyclique et ovariectomisée traitée à l'œstradiol, la durée du pic préovulatoire de la GnRH se prolonge bien après la fin du pic de LH (Moenter, Caraty *et al.* 1991) et cette durée correspond à peu près à celle du comportement sexuel (Fabre-Nys *et al.*, 1993). De plus, une libération importante de GnRH dans le LCR a été décrite pendant cette période (Skinner *et al.*, 1995). En utilisant un modèle de brebis ovariectomisée traitée à la progestérone et à l'œstradiol, Caraty et ses collaborateurs (2002) ont montré que l'administration d'un antagoniste de la GnRH par voie icv entraîne une diminution très significative de la réceptivité des brebis après retrait de l'œstradiol. Par contre cet effet n'est pas observé en présence de l'œstradiol.

Parmi les différentes formes de GnRH (voir chapitre II) la GnRH-II pourrait avoir un rôle dans le contrôle du comportement sexuel (Rissman, 1996; Kauffman et Rissman, 2004), cependant, la présence de cette forme n'a pas été mise en évidence chez le mouton (Caraty et Locatteli, résultats non publiés).

#### L'ocytocine

Chez la plupart des mammifères, une augmentation de la sécrétion de l'ocytocine pendant la période d'œstrus a été rapportée. Kendrick et collaborateurs (1993) ont montré une augmentation significative des niveaux d'ocytocine au niveau du HMB chez des brebis réceptives traitées à la progestérone et à l'œstradiol après intromission ou stimulation vagino-cervicale. Cependant, des stimulations vagino-cervicales ou des copulations avec intromission répétées résultent en un raccourcissement de la durée de l'œstrus (Fletcher et Lindsay, 1971). Enfin, chez la brebis, une infusion d'ocytocine au niveau de l'HMB diminue de manière significative la réceptivité des brebis (Kendrick *et al.*, 1993), ces données suggèrent un rôle plutôt inhibiteur de l'ocytocine chez la brebis.

## Modes d'action de l'œstradiol et de la progestérone

Les mécanismes par lesquels les stéroïdes agissent sur les cellules cibles sont divisés en deux classes : des effets génomiques et des effets non génomiques.

### Les effets génomiques

Ce sont les effets les plus classiques et les mieux connus de toutes les hormones stéroïdiennes. Ils résultent de la fixation des stéroïdes sur des récepteurs spécifiques.

Grâce à leur caractère hydrophobe, ces hormones traversent la membrane plasmique par simple diffusion et se fixent sur leurs récepteurs spécifiques dont la répartition est nucléocytoplasmique. La liaison de l'hormone à son récepteur se fait en présence de co-activateurs et de co-répresseurs. Les récepteurs aux stéroïdes agissent comme des facteurs de transcription intracellulaires et exercent des effets positifs ou négatifs sur l'expression de gènes cibles. Ces effets sont caractérisés par un certain **délai d'action** généralement de quelques heures (Falkenstein *et al.*, 2000).

Dans l'hypothalamus, cette voie d'action classique de l'œstradiol et de la progestérone dans le contrôle du comportement sexuel et le pic préovulatoire de GnRH/LH est la seule voie bien caractérisée (voie d'action décrite dans les chapitres II et III).

## Les effets non-génomiques

En plus de leur action génomique bien connue, les stéroïdes, tant *in vivo* qu'*in vitro* stimulent **rapidement** toute une série de seconds messagers (calcium, AMP cycliques, activation de kinases et de phosphatase (Kelly et Wagner, 1999). Beaucoup de ces signaux résultent d'une activation de protéines G et concourent à l'action hormonale au niveau du génome.

La notion d'une action rapide de l'œstradiol remonte à 1967 quand Szego et David ont décrit, pour la première fois, chez la souris, une augmentation de l'AMP cyclique au niveau de l'utérus dans les 15 minutes qui suivaient l'administration d'œstradiol (Szego et Davis, 1967). Pietras et Szego (1977) ont ensuite suggéré l'existence d'un site de liaison de l'œstradiol au niveau de la membrane plasmique des cellules utérines.

En 1998, une classification nommée « classification de Mannheim » (Falkenstein et Wehling, 2000) a été établie. Selon cette dernière, il est considéré comme non génomique tout effet induit par :

- la fixation du stéroïde sur des récepteurs intracellulaires classiques qui sont exposés à la surface membranaire, ou sur d'autres récepteurs spécifiques ou non.
- la modulation par le stéroïde du fonctionnement d'autres récepteurs, par exemple cas de la progestérone et du récepteur utérin à l'ocytocine.
- la modification par les stéroïdes des propriétés de la membrane plasmique telle que sa fluidité (pour revue : Falkenstein 2000).

L'effet non génomique des stéroïdes est, de plus, caractérisé par un **délai d'action très court**, de l'ordre de quelques minutes voire de la seconde. Ces effets sont considérés comme étant très rapides pour être liés à une transcription de gène (Revelli *et al.*, 1998).

Les études des effets non génomiques de l'œstradiol et de la progestérone sont récentes, et loin d'être parfaitement bien connues.

### Effet de l'œstradiol

L'œstradiol exerce ses effets non génomiques dans de nombreux tissus dont le cerveau. La nature des récepteurs membranaires impliqués est depuis longtemps discutée et de nombreux éléments font penser qu'il s'agit essentiellement de récepteurs nucléaires classiques. Cependant, d'autres données sont en faveur de la présence des récepteurs membranaires dont la forme pharmacologique serait distincte de celle des récepteurs nucléaires. Il a été proposé que le récepteur orphelin GPR30 pourrait être le récepteur membranaire de l'œstradiol (Filardo *et al.*, 2000) mais la capacité de liaison de ce récepteur apparaît très faible et son rôle reste controversé (Prossnitz *et al.*, 2008).

Au niveau central, l'œstradiol modifie rapidement l'excitabilité de neurones à GnRH, à POMC, à la DA et au GABA. Par exemple, sur des tranches d'hypothalamus de cochon d'inde, l'œstradiol induit rapidement une hyperpolarisation des neurones à GnRH et à POMC en modifiant l'activité des canaux potassiques (Kelly *et al.*, 2002). De plus, une injection d'œstradiol à des souris entraîne au bout de 15 minutes la phosphorylation de la protéine CREB au niveau de l'APO, du septum médian et du NVM (Abraham *et al.*, 2004). Une augmentation similaire de l'immunoréactivité CREB au niveau de l'APO a également été décrite 15 minutes après injection d'œstradiol chez le rat (Zhou *et al.*, 1996). Au niveau de l'hypothalamus, l'effet non génomique de l'œstradiol le plus caractérisé est celui décrit par Lagrange et collaborateurs, chez le cochon d'Inde, montrant que des faibles doses d'œstradiol réduisent rapidement l'efficacité de liaison des agonistes des récepteurs  $\mu$ -opioïdes et GABAergiques au niveau de neurones de l'HMB (Lagrange *et al.*, 1994; 1997). L'œstradiol exerce aussi ses effets non génomiques sur la plasticité des fibres de neurones hypothalamiques comme cela a été largement décrit chez le rat (Prevot, 2002).

Les données concernant ce type d'action de l'œstradiol sur les cellules du système nerveux sont très limitées chez les mammifères en général, et les ovins en particulier. Chez

la brebis, des données d'études *in vitro* et *in vivo* de l'équipe de Nett ont montré un effet non génomique de l'œstradiol sur la sécrétion de la LH au niveau hypophysaire (Arreguin-Arevalo et Nett, 2005; 2006). En effet, en utilisant des cultures primaires de cellules hypophysaires, ces auteurs montrent que l'incubation des cellules hypophysaires avec **l'œstradiol 17 $\beta$** , ou **l'œstradiol 17 $\beta$  lié à la BSA** ou à **une autre protéine** pendant 15 minutes empêche la libération de la LH induite par la GnRH. Ce résultat est spécifique à l'œstradiol, puisque l'incubation des cellules avec la testostérone, l'hydrocortisone ou l'œstradiol 17 $\alpha$ , n'empêche pas la libération de la LH à la suite de la stimulation GnRH. De plus, le fait que l'œstradiol lié à la BSA ou une autre protéine mime l'action de l'œstradiol suggère fortement une action liée à un récepteur membranaire.

La même expérience a été reproduite *in vivo* chez des brebis ovariectomisées. Une infusion de 4 heures avec l'œstradiol 17 $\beta$  ou l'œstradiol 17 $\beta$  lié à la BSA ou à une autre protéine, aboutissait, dans les 20 minutes suivant l'infusion, à la suppression de la sécrétion de LH, chez ces brebis. En revanche, seul l'œstradiol 17 $\beta$  induisait un pic préovulatoire de LH dans les 20 heures post-infusion. Ces données suggèrent ainsi une action non génomique de l'œstradiol sur les cellules hypophysaires pour inhiber la sécrétion de LH juste après administration du stéroïde. En revanche, l'induction du pic préovulatoire passe par un effet génomique classique. A ce jour, le récepteur impliqué dans l'action membranaire reste à identifier.

### Effet de la progestérone

La première évidence d'un effet non génomique de la progestérone remonte à 1942, lorsque Hans Selye (pour revue : Stormshak et Bishop, 2008) ait observé, chez des rats, un effet anesthésique quasiment immédiat suite à l'administration rapide d'une forte dose de progestérone. Plus tard, d'autres travaux ont montré que la progestérone était rapidement métabolisée au niveau du cerveau et que ses métabolites, tels que l'allopregnolone pouvaient transmettre l'effet rapide de la progestérone dans le cerveau et stimuler un effet inhibiteur de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique via le récepteur GABA<sub>A</sub> (Brann *et al.*, 1990). Néanmoins, chez la brebis, l'effet inhibiteur de la progestérone sur la libération de GnRH est essentiellement transmis via son récepteur nucléaire classique (Skinner *et al.*, 1998; Skinner *et al.*, 1999). Chez cette espèce, bien que la progestérone bloque rapidement le rétrocontrôle positif de l'œstradiol sur la LH, un mécanisme d'action du type non génomique n'est pas clairement mis en évidence.



## **OBJECTIFS**

Chez la brebis, comme c'est le cas chez de nombreuses espèces de mammifères, l'augmentation des niveaux circulants d'œstradiol à la fin de la phase folliculaire induit le comportement sexuel et la décharge préovulatoire de GnRH/LH et par conséquent l'ovulation. Ces niveaux d'œstradiol, fortement corrélés au nombre de follicules ovulatoires, sont différents entre les races prolifiques (comme la Romanov : ROM) et les races non prolifiques (comme l'Ile-de-France : IF). La durée d'œstrus ainsi que l'intervalle entre la lutéolyse et le pic préovulatoire ont été décrits comme étant plus longs chez les brebis prolifiques. Il a également été rapporté que le comportement d'œstrus apparaît plus tôt chez les races prolifiques. Par ailleurs, chez la brebis IF ovariectomisée, des études ont montré que la durée et l'intensité du comportement sexuel augmente avec la dose d'œstradiol administrée. De plus, des études récentes effectuées chez la même race, ont montré que la quantité d'œstradiol nécessaire pour induire le comportement sexuel est inférieure à celle requise pour induire le pic préovulatoire de LH et que ces niveaux sont inférieurs à ceux observés en phase folliculaire. Il semble aussi que, chez la brebis

ovariectomisée, les niveaux d'œstradiol nécessaire pour induire le pic préovulatoire de LH diffèrent entre les races (exemple la Suffolk et l'IF). Il existe donc une fenêtre de temps nécessaire à l'œstradiol pour qu'il puisse activer d'une part, les circuits mis en jeu pour induire le pic préovulatoire de LH et, d'autre part, ceux permettant l'expression du comportement, et ces fenêtres de temps pourraient être différentes selon les races.

Tenant compte de toutes ces données, l'objectif de notre travail de thèse a été **d'étudier la sensibilité différentielle de l'hypothalamus à l'œstradiol pour induire le comportement sexuel et le pic préovulatoire de LH chez deux races de brebis de prolificité différente.**

Pour cela nous avons cherché à :

- Déterminer si le **seuil de sensibilité à l'œstradiol** pour induire le pic préovulatoire et le comportement sexuel est différent entre les deux races. Ces résultats sont présentés dans le Chapitre 1 des Résultats.
  
- Identifier à **quel niveau (hypophysaire et/ou hypothalamique)** se situe la **différence de sensibilité à l'œstradiol** observée entre les deux races pour induire le pic préovulatoire de LH. La « sensibilité hypophysaire » a été testée par trois approches complémentaires (*in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*). Quant à la sensibilité hypothalamique, elle a été étudiée *in vivo*. L'ensemble de ces résultats est présenté dans le Chapitre 2 des Résultats.
  
- Etudier **l'effet de doses modérées** (physiologiques) **d'œstradiol** sur la libération de **GnRH dans le LCR** et par conséquent, **le rôle de la GnRH** dans le **contrôle du comportement sexuel** chez la brebis **ROM**. Ces travaux font l'objet du Chapitre 3 des Résultats.
  
- Etudier **la distribution et le nombre des récepteurs à l'œstradiol** du type  $\alpha$  (**ER $\alpha$** ) dans différents noyaux de **l'hypothalamus** entre les deux races. Regarder, à l'aide d'un marqueur d'activité cellulaire (protéine FOS), **l'activation préférentielle, par l'œstradiol, de populations neuronales de l'hypothalamus**, pouvant être **impliquées dans le contrôle du comportement sexuel ou le pic** préovulatoire de LH. L'ensemble de ces résultats est présenté dans le Chapitre 4 des Résultats.



## **Matériels & Méthodes**

Nous présentons brièvement dans cette partie les méthodes et le matériel utilisés au cours de notre travail de thèse, les protocoles sont détaillés dans les différents chapitres relatifs de la partie Résultats.

## Animaux et expérimentation

Les expérimentations présentées dans ce manuscrit ont été effectuées chez des brebis de race Ile de France et Romanov, âgées de 2 à 3 ans, appartenant au troupeau de l'I.N.R.A. de Nouzilly, France. Les expériences ont été effectuées pendant la saison de reproduction entre septembre et mi-janvier. Les brebis étaient maintenues sous des conditions d'éclairage naturel, avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. Les protocoles expérimentaux ont été réalisés conformément aux autorisations n° 37-801 et 37-023 du Ministère de l'Agriculture.

## Traitements hormonaux et cycle artificiel

A l'exception d'une expérience réalisée au début de nos travaux chez des brebis intactes, toutes les autres expérimentations ont été réalisées chez des animaux ovariectomisés des deux races, en utilisant un modèle de phase folliculaire établi par l'équipe de Karsch (Goodman *et al.*, 1981c; Moenter *et al.*, 1990). Après ovariectomie, les brebis reçoivent un implant sous-cutané de 1 cm contenant de l'œstradiol (17 $\beta$ -œstradiol, Sigma Chemical CO., L'Isle d'Abeau Chesnes, France). Cet implant permet de maintenir un niveau plasmatique faible mais constant empêchant ainsi toute désensibilisation de l'organisme au stéroïde après ovariectomie.

Lors des cycles sexuels artificiels, les brebis sont traitées par de la progestérone pendant une période de 12 à 14 jours. L'hormone est administrée sous forme d'implants intra-vaginaux poreux (CIDR, Inter AG, Hamilton, New Zealand). La lutéolyse est mimée par le retrait de ces implants. Entre 20 et 24 heures après le retrait des CIDR, des implants additionnels d'œstradiol sont insérés sous la peau pour simuler l'augmentation des concentrations plasmatiques du stéroïde observée lors d'une phase folliculaire. Les différents traitements œstrogéniques utilisés sont présentés dans les protocoles de la partie

Résultats. Toutefois, il est intéressant de signaler que la concentration dans le sang de l'œstradiol est environ proportionnelle à la longueur d'implant exprimée en centimètres (cm). Ainsi 1 cm d'implant permet d'augmenter les concentrations plasmatiques d'œstradiol entre 1 et 1.5 pg/ml.

Ce modèle de phase folliculaire est connu pour induire le comportement sexuel et le pic préovulatoire de GnRH et de LH. En effet, si la quantité d'œstradiol administrée est suffisante, ce dernier intervient entre 15 à 20 heures plus tard (Monter *et al.*, 1990 ; Evans *et al.*, 1994).

A partir de ce modèle initial, et afin de définir une quantité minimale d'œstradiol (concentration et durée de présence) permettant de déclencher le pic préovulatoire de LH et le comportement sexuel chez les brebis des deux races, différentes doses (concentrations traduites par la longueur d'implants) et durées de présence d'œstradiol ont été testées lors de cycles artificiels successifs (voir Chapitre 1 : article 1). Les résultats de cette première partie nous ont ainsi permis de définir les modèles que nous avons utilisés par la suite pour tester nos différentes hypothèses.

## Canulation intracérébrale du 3<sup>ème</sup> ventricule

Les brebis sont implantées avec une canule placée à demeure dans le 3<sup>ème</sup> ventricule. Cette canule permet, d'une part, de prélever des échantillons de liquide céphalo rachidien (LCR) dans lesquels on peut mesurer la GnRH et, d'autre part, d'administrer des molécules à tester dans le système ventriculaire (voie icv).

La technique d'implantation intracérébrale repose sur l'utilisation de repères stéréotaxiques adaptés au mouton (Atlas de Richard, 1967) et de radiographies aux rayons X sur le plan frontal et sagittal. Les brebis, mises à jeun la veille, sont anesthésiées par une injection intraveineuse de Sulfate d'Atropine (20 mg, Lavoisier, Paris, France) et de Thiopental (1g Nesdonal, Merial, Paris, France). Elles sont ensuite intubées endotrachialement pour inhaler un mélange gazeux à base d'oxygène et d'isoflurane qui permet de maintenir l'anesthésie. La tête de l'animal est alors placée dans un cadre stéréotaxique (Figure 9) et 1 ml de liquide radio-opaque (Omnipaque, Nycomed Ingenon, France) est injecté au moyen d'une canule placée dans le ventricule latéral.

Des radiographies frontales et latérales sont effectuées afin de calculer les coordonnées dans l'espace correspondant à l'emplacement final de l'extrémité de la

canule. La masse thalamique, le *foramen de Monroe*, les *recessus* supra-optique et infundibulaire du troisième ventricule sont utilisés comme repères pour l'orientation antéro-postérieure, latérale et la profondeur de la canule (Figure 10A).

Les canules (55 mm de long, diamètre externe : 1.20 mm, diamètre interne : 0.86 mm) sont placées à demeure dans le troisième ventricule. L'extrémité de la canule est implantée à 1.5- 2 mm au dessus du plancher du troisième ventricule. Lorsqu'elle est placée au milieu du troisième ventricule, le LCR remonte de lui-même dans le tube (Figure 10B). La canule est alors bouchée avec une tige en inox à tête en plastique (un mandrin). L'ensemble est fixé dans le crâne avec du ciment acrylique dentaire (Meliodent, Hanau, Allemagne) et protégé par un cylindre en Teflon fixé au crâne par des vis en inox et du ciment dentaire (Figure 10B). Après l'opération, les animaux reçoivent une injection journalière d'antibiotique (5 ml de Clamoxyl, Centravet, Plancoet, France) pendant 5 jours et d'un anti-inflammatoire et de diurétique (5 ml de Diurizone, Vétoquinol, Lure, France) pendant 3 jours.

## Prélèvements

### Prélèvement sanguins

Les prises de sang ont été effectuées pour mesurer les concentrations plasmatiques de LH, d'œstradiol et de progestérone. Les prélèvements ont été réalisés soit avec des tubes Vacutainers® héparinés de 5ml, soit à l'aide d'un cathéter en polyéthylène inséré dans l'une des veines jugulaires de la brebis, dans le cas de prises de sang très fréquentes. Dans ce dernier cas, le sang (environ 2.5ml) prélevé à la seringue est récupéré dans des tubes contenant 50 µl d'héparine (5000 UI/ml, Sanofi-Aventis, France) dilué au 1/2 dans du sérum physiologique.

Les prélèvements de sang sont centrifugés à 3200 tours/min pendant 30 minutes et à 4°C. Les plasmas sont ensuite récupérés et stockés dans des tubes et congelés à -20°C jusqu'au moment du dosage.

### Prélèvements de LCR

Le LCR a été prélevé au niveau du 3<sup>ème</sup> ventricule grâce à un cathéter, placé le jour de l'expérience, dans la canule-guide dont la mise en place a été décrite ci-avant. Ce cathéter est relié à une pompe péristaltique Minipulse II (Gilson, Villiers-le-bel, France), permettant de prélever le LCR selon un débit de 250 µl/10 min soit 1.5 ml/h. Le LCR est récupéré dans des tubes de 5ml en cristal contenant 50µl/ml de la Bacitracine (Sigma, France) à une concentration de 10<sup>-3</sup> M. Après chaque prélèvement (généralement toutes les 2 heures), 500 µl de LCR sont pipetés et déposés dans des tubes de 3ml pour extraction et dosage de GnRH. Les échantillons sont ensuite congelés à -20°C.

## Tests de comportement

Le comportement de réceptivité a été quantifié selon la méthode établie par Fabre-Nys et Venier (1987).

Le comportement de réceptivité est mesuré grâce à l'introduction d'un bélier dans un espace de quelques mètres carrés où se trouve la brebis à tester. Suite aux approches latérales du mâle, la femelle s'immobilise pour accepter le chevauchement si elle est réceptive, ou fuit le bélier si elle ne l'est pas. Un index de réceptivité est déterminé. C'est le rapport (exprimé en %) entre le nombre d'immobilisations de la brebis en réponse aux approches latérales du mâle sur le nombre total des approches latérales du bélier pendant un temps de 2 minutes. Il faut compter un minimum de 10 interactions en 2 minutes. Si ce nombre n'est pas atteint, le test est prolongé, avec la plupart du temps un changement de bélier. Une brebis est considérée comme étant réceptive quand son index de réceptivité (IR) est supérieur ou égal à 80%.

La latence de l'œstrus est calculée comme étant le moment du début du comportement sexuel (IR ≥ 80%) moins la moitié de l'intervalle de temps avec le test précédant. La fin du comportement est définie de la même façon (moment où IR < 80% plus la moitié de l'intervalle avec le test suivant). La durée de réceptivité étant été calculée comme l'intervalle entre ces deux moments.

Dans les différentes expérimentations, nous nous sommes exclusivement intéressés au comportement de réceptivité que nous désignerons comme comportement sexuel ou comportement d'œstrus.

# Dosages hormonaux

## Dosage de la LH

### LH plasmatique

Les dosages sont réalisés selon la méthode radio-immunologique (RIA) utilisant un traceur marqué à l'Iode 125. La LH est dosée en double dans des aliquots de 100µl de plasma selon la méthode de Pelletier *et al.* (1968) modifiée par Montgomery *et al.* (1985). Les coefficients de variation intra et inter-dosages ont été calculés à partir de deux échantillons contrôles (références) répétés tout les 100 tubes dans l'ensemble des dosages effectués. Les valeurs des coefficients de variations intra-dosage et inter-dosage sont respectivement de 8.5% et 9.5%. La concentration de LH a été établie par rapport au standard LH CY-1051. Le seuil de détection du dosage est de 0.1 ng/ml.

### LH dans les milieux de culture

Elle a été dosée selon la même procédure que celle décrite pour le plasma, mais les standards et les échantillons (surnageant de cultures cellulaires) sont dilués dans du tampon véronal (0.025M). Les coefficients de variation intra et inter dosages sont respectivement de 8.1% et 9.6 %. Le seuil de détection du dosage est de 0.1 ng/ml.

## Dosage de la GnRH

### Extraction de LCR

Les échantillons de LCR (500 µl) sont rapidement décongelés dans de l'eau à 37°C, 2 ml de méthanol sont ensuite ajoutés (sous la hotte), l'ensemble est mélangé à l'aide d'un vortex puis centrifugé pendant 35 min à 3200 tours/min à 4°C. Les surnageants sont ensuite décantés dans des tubes en verre puis placés, toute la nuit, dans un "Speed-vac" pour concentration et séchage des surnageants. Les extraits secs sont ensuite repris dans du tampon PBS-gélatine (1g/litre) pour dosage. Le rendement de l'extraction calculé à partir de concentrations connues de GnRH est de l'ordre de 80%.

## Le dosage

Les concentrations de GnRH ont été estimées dans les extraits de LCR en utilisant la méthode RIA établie par Caraty *et al.* (1980; 1987). La GnRH utilisée pour préparer l'hormone radioactive ainsi que pour préparer les points de la courbe d'étalonnage provient d'UCB-Bioproducts (Bruxelles, Belgique). Le coefficient de variabilité intra-dosage et la limite de détection du dosage sont respectivement de 14% et de 2.5 pg/ml.

## Dosage d'œstradiol

Le dosage d'œstradiol, dans le plasma et le LCR, a été réalisé par dosage RIA, en utilisant le kit « I<sup>125</sup> E2 Diasorin RIA » (P2210, Sorin Diagnostic, Antony, France) dont le protocole a été adapté à la mesure de l'œstradiol dans le plasma des ovins (Ben Saïd *et al.*, 2007).

## Œstradiol plasmatique

Des aliquots de 200 µl de plasma ont été extraits, dans 3 ml d'un mélange de cyclohexane et d'éthyle (v/v), pendant 2 heures à température ambiante. Les échantillons ont ensuite été congelés dans de l'azote liquide pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. Cette dernière a ensuite été décantée, transférée dans les tubes de verre et évaporée sous azote. Les standards et les échantillons ont été repris dans 150 µl de tampon CAYMAN (tampon PBS 0.1M contenant 0.1 BSA, 0.4 M NaCl, 1mM EDTA et 0.01 M azide de sodium). Le rendement d'extraction est de 90.5%.

L'activité hétérospécifique du dosage est inférieure à 0.5% pour l'œstrone et l'œstriol, et en dessous de 0.1% pour le glucuronide d'éthinylestradiol, la progestérone, la testostérone, l'androstènediol, l'œstradiol-3-glucuronide et l'œstradiol-17 $\alpha$ . La sensibilité du dosage est de 0.78 pg/ml. Les coefficients de variation intra-dosage ainsi que la limite de détection sont respectivement de 9.2% et 0.8 pg/ml.

## Œstradiol dans le LCR

Dans le LCR, l'œstradiol a été dosé directement dans les échantillons, c'est-à-dire sans extraction. Les échantillons sont dilués au tiers dans du PBS (0.1 M, pH 7.4) contenant 1g/litre de gélatine. Après dilution, le dosage est effectué en double dans des aliquots 100µl d'échantillon. La limite de détection est de 0.78 pg/ml.

## Dosage de progestérone

Le dosage a été réalisé selon la méthode immuno-enzymatique (ELISA) par le laboratoire de dosages hormonaux de l'INRA de Nouzilly selon la méthode décrite par Canépa *et al.* (2008). Les coefficients de variabilité intra et inter-dosage sont de 13.8% et 4.3%. Le seuil de détection est de 0.4 ng/ml.

## **RESULTATS**

### **Chapitre I :**

Etude de la sensibilité différentielle à l'œstradiol en termes d'induction du pic préovulatoire de LH et du comportement sexuel : comparaison des brebis Ile de France (IF) et Romanov (ROM)

## **Introduction**

Chez la brebis, l'œstradiol et la progestérone agissent d'une façon séquentielle pour induire le comportement sexuel et le pic préovulatoire de GnRH et de LH. Leurs taux plasmatiques sont étroitement liés au nombre de follicules ovulatoires et de corps jaunes. En effet, les niveaux plasmatiques d'œstradiol sont plus élevés chez les races prolifiques. L'intervalle entre la lutéolyse et le pic préovulatoire de LH ainsi que la durée d'œstrus ont été décrits comme étant plus longs chez ces races par comparaison aux races non prolifiques. Une relation entre la durée de l'œstrus et la quantité d'œstradiol a été décrite chez la brebis ovariectomisée avec une durée d'œstrus qui augmente en fonction de la dose et la durée de présence de l'œstradiol (Scaramuzzi *et al.*, 1971; Fabre-Nys *et al.*, 1993). Chez la brebis ovariectomisée, il a également été montré que la quantité d'œstradiol nécessaire pour induire le comportement sexuel est inférieure à celle requise pour induire le pic préovulatoire de LH (Caraty *et al.*, 2002). Enfin, un traitement d'imprégnation par la progestérone, avant application d'œstradiol, joue un rôle facilitateur sur l'expression de ces

deux événements (Fabre-Nys et Martin, 1991a). **Toutefois, aucune étude n'a comparé la quantité minimale ou les « besoins » en œstradiol pour induire ces deux événements chez des brebis de prolificité différente.**

Dans ce chapitre, nous proposons donc d'étudier la sensibilité à l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH et le comportement de réceptivité des brebis IF (mono-ovulante) et ROM (poly-ovulante). Dans un premier temps, les niveaux plasmatiques d'œstradiol, de LH et la latence d'apparition du comportement sexuel ainsi que sa durée ont été comparés chez des femelles des deux génotypes lors d'un cycle naturel puis lors de cycles artificiels successifs pendant lesquels les animaux ont reçu différents traitements d'œstradiol (Partie 1). Dans un deuxième temps, l'influence de la progestérone sur la « lecture » de ce signal œstrogénique a été étudiée (Partie 2). Enfin, dans le but de rechercher une éventuelle différence de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique au passage des stéroïdes entre les deux génotypes qui pourrait être un des éléments responsable des différences de sensibilité observées, les niveaux d'œstradiol dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ont également été comparés (Partie3).

**Partie 1**  
**Article 1**



## Partie 2

# **Effet du niveau de progestérone pendant la phase lutéale sur la réponse à l'œstradiol en termes de pic préovulatoire de LH et de comportement sexuel chez les brebis des deux races**

## **Introduction**

Chez la brebis, la progestérone joue un rôle dans la détermination du moment d'induction du pic préovulatoire de LH et du comportement sexuel. Cette hormone diminue la latence d'apparition du comportement sexuel induit par l'œstradiol chez la brebis ovariectomisée alors qu'elle augmente celle du pic préovulatoire de LH (Fabre-Nys et Martin, 1991a; Van Cleeff *et al.*, 1998; Skinner *et al.*, 2000). La progestérone doit être présente dans le sang pendant plusieurs jours pour exercer ses effets (Robinson, 1954a; Goodman et Karsch, 1980). Chez la brebis ovariectomisée, un traitement d'imprégnation par la progestérone est indispensable pour l'expression du comportement sexuel (Robinson, 1954a; Karsch *et al.*, 1980; Fabre-Nys et Martin, 1991a). La progestérone permet de réduire la quantité d'œstradiol nécessaire pour induire le comportement d'œstrus et le pic préovulatoire de LH (Robinson, 1955; Fabre-Nys et Martin, 1991a) et elle amplifie l'amplitude du pic préovulatoire de GnRH induit par l'œstradiol (Caraty et Skinner, 1999). Enfin, la progestérone bloque le pic préovulatoire de LH et le comportement d'œstrus, si elle est administrée en même temps que l'œstradiol (Robinson, 1954; Scaramuzzi *et al.*, 1971a; Richter *et al.*, 2001).

Nos premiers résultats (Ben Saïd *et al.*, 2007, Partie 1) montrent que les brebis ROM sont moins sensibles à l'œstradiol, en terme d'induction du pic préovulatoire de LH, que les brebis IF. En effet, l'induction du pic préovulatoire de LH nécessite des doses et des durées d'œstradiol supérieures chez la brebis ROM que chez la brebis IF (12 cm pendant 24 heures vs 6 cm pendant 12 heures). Cette faible sensibilité des brebis ROM à l'œstradiol pour induire le pic de préovulatoire de LH pourrait être liée aux faibles niveaux de progestérone délivrés par les CIDR (en moyenne 1.5 à 2 ng/ml). Ces niveaux sont légèrement inférieurs à ceux des brebis IF (de 2 à 2.5 ng/ml) et largement en dessous de ceux observés chez les brebis ROM (de 3.5 à 4 ng/ml) lors d'une phase lutéale naturelle (Cahill *et al.*, 1981).

L'objectif de l'expérimentation décrite dans cette partie a été de tester si des niveaux plus élevés de progestérone pendant la phase lutéale artificielle permettraient d'augmenter la proportion des brebis ROM présentant un pic préovulatoire de LH en réponse à une dose liminaire d'œstradiol. Par ailleurs, comme la progestérone détermine la latence du pic de LH et du comportement sexuel chez la brebis, nous avons regardé si l'élévation des niveaux de progestérone modifierait ces paramètres chez les femelles des deux génotypes.

## Matériels et Méthodes

### Animaux et protocoles expérimentaux

Des brebis ovariectomisées des deux génotypes (n=9), ont été réparties en deux groupes qui ont été soumis à deux cycles artificiels successifs selon un protocole en schéma croisé (chaque brebis recevant les deux traitements lors des deux cycles successifs, Figure 11).

Brièvement, lors du cycle artificiel, les brebis reçoivent la progestérone sous forme d'implants intra-vaginaux (CIDR) pendant 12 jours :

- lot 1 : 1 CIDR
- lot 2 : 2 CIDR

Afin de maintenir des niveaux de progestérone quasi constants tout au long de la phase lutéale artificielle, tous les CIDR ont été remplacés au bout de 5 jours. Ceci permet d'éviter la baisse progressive des niveaux plasmatiques du stéroïde inhérente à ce type de dispositif. La lutéolyse a été mimée par retrait des CIDR. Vingt quatre heures après le retrait de la progestérone, des implants d'œstradiol 2x3 cm ont été placés en sous-cutanés (sc) et laissés en place pendant 12 heures. La dose d'œstradiol utilisée ici a été choisie en se basant sur nos premiers résultats (Ben Saïd *et al.*, 2007, Partie 1). Elle permet d'induire le comportement sexuel chez toutes les brebis des deux génotypes et un pic préovulatoire chez la totalité des brebis IF. Par contre un pic préovulatoire de LH n'est observé que chez environ 20% des brebis ROM, dose que nous considérons comme liminaire pour ce génotype.

Les niveaux de progestérone ont été évalués par des prises de sang journalières effectuées durant toute la durée de la phase lutéale artificielle à la même heure (entre 9 et 10 heures du matin). L'évolution des niveaux sanguins de LH chez les 18 brebis a été déterminée sur des prélèvements de sang effectués toutes les deux heures, pendant une période de 24 heures commençant une demi-heure avant l'administration de l'œstradiol. Le moment d'apparition du comportement sexuel a été déterminé par des tests de réceptivité effectués toutes les 4 heures comme illustré par la Figure 11.

## Dosages hormonaux

Les dosages de la LH plasmatique et de la progestérone ont été réalisés comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes.

## Evaluation du comportement sexuel

Les tests de réceptivité ont été réalisés lors des deux cycles selon la méthode de Fabre-Nys et Venier (1987) décrite dans le chapitre Matériels et Méthodes.

## Analyse des données

Pour chaque brebis, le niveau plasmatique de la progestérone est défini par la moyenne des niveaux plasmatiques journaliers.

Un pic de LH est défini lorsqu'au moins un point de mesure est supérieur à 10 ng/ml. Le début du pic est défini comme étant le moment où les niveaux plasmatiques de LH augmentent de deux fois par rapport au niveau de base (niveau qui précède l'administration d'œstradiol).

La latence d'apparition du comportement sexuel a été calculée selon la méthode de Fabre-Nys et Venier (1987). Elle est définie comme étant le moment du premier test où l'IR  $\geq 80\%$  auquel on soustrait la moitié de l'intervalle de temps avec le test précédent.

## Analyse statistique

Pour chacun des cycles, tous les paramètres observés, à savoir les niveaux plasmatiques de progestérone, le moment d'apparition du pic préovulatoire de LH, l'amplitude du pic ainsi que la latence d'apparition du comportement sexuel ont été soumis à une analyse de variance à trois facteurs (race, traitement et cycle). Elle a été effectuée en utilisant la procédure "General Linear Model : GLM" du logiciel SAS (SAS, Institut, Inc),

suivie d'une comparaison des moyennes inter et intra-races utilisant la procédure "Least Squares Means : LSMEAN" du même logiciel. Le degré de signification est fixé à 5%.

## Résultats

### Niveaux plasmatiques de progestérone

Chez les deux races, les niveaux de progestérone observés après insertion de deux CIDR sont environ deux fois plus élevés qu'avec un seul CIDR, tout au long de la phase lutéale artificielle (Tableau 2). Aucune différence des niveaux plasmatiques de progestérone n'a été observée entre les deux races quelle que soit la dose de progestérone utilisée (Tableau 2, Figure 12 A et B).

### Effet de la dose de progestérone sur la latence du comportement de réceptivité

Toutes les femelles ont présenté un comportement de réceptivité en réponse à la dose d'œstradiol utilisée (6 cm pendant 12 heures). Vingt quatre heures après l'administration d'œstradiol, toutes les brebis étaient à plus de 80% de réceptivité (pleine réceptivité).

Pour les deux doses de progestérone utilisées, aucune différence dans la latence d'apparition du comportement de réceptivité n'a été observée entre les deux races ni à l'intérieur d'une même race (Figure 13 ; Tableau 2). Néanmoins, il existe une tendance ( $P=0.058$ ) pour un comportement de réceptivité plus précoce chez les brebis IF recevant 2 CIDR que chez celles qui ne reçoivent qu'un seul CIDR (Tableau 2).

### Effet de la dose de progestérone sur la fréquence et le délai d'apparition du pic préovulatoire de LH chez les deux races

**Sept** brebis **IF** et **six** brebis **ROM du lot 1** (1 CIDR) ont présenté un pic de LH en réponse à la dose d'œstradiol administrée. Le pic apparaît plus tard chez les brebis ROM que chez les brebis IF ( $P<0.05$  ; Tableau 2 ; Figure 14). Pour le **lot 2** (2 CIDR), **Sept** brebis

**IF** et **deux** brebis **ROM** ont présenté un pic de LH. Là encore, le pic de LH est observé plus tard chez les 2 brebis ROM.

Pour les deux doses de progestérone utilisées, aucune différence dans le délai d'apparition du pic préovulatoire de LH n'a été observée chez les brebis IF. Pour les brebis ROM, le nombre inégal d'observations (6 brebis pour le lot 1 vs 2 brebis pour le lot 2) ne nous permet pas d'effectuer une comparaison statistique. Toutefois, chez les deux brebis ROM du lot 2, le pic de LH semble plus tardif que chez les IF puisqu'il apparaît entre 19 et 21 heures après l'administration d'œstradiol (Tableau 2).

L'analyse statistique a montré "un effet cycle", avec une meilleure réponse des brebis ROM à l'administration d'œstradiol, en termes de nombre de pics préovulatoires de LH : **5** brebis sur **9** pour le **premier cycle** comparé à **3** brebis sur **9** le **second cycle**. Cet "effet cycle" a été également observé sur la latence d'apparition du comportement de réceptivité, avec un comportement de réceptivité qui apparaît plus tôt chez les brebis ROM traitées avec 2 CIDR, comparé à celles qui reçoivent 1 CIDR lors du second cycle. Toutefois ? vu le petit nombre de brebis par lot (4 vs 5) nous ne pouvons pas dégager de conclusions définitives de ces observations.

## Discussion

Les résultats de cette expérimentation montrent que des niveaux de progestérone plus élevés, pendant la phase lutéale artificielle, n'ont pas modifié la réponse endocrinienne et comportementale des brebis ROM et IF à la dose d'œstradiol appliquée. En effet, la proportion de brebis ROM présentant un pic de LH suite à l'insertion d'implants d'œstradiol (6 cm pendant 12 heures) n'est pas augmentée. De plus, aucun effet net de l'augmentation des niveaux de progestérone sur la latence d'apparition du comportement de réceptivité n'a été observé.

Lors des expérimentations précédentes, nous avons utilisé un modèle de brebis ovariectomisée chez qui les niveaux de progestérone étaient standardisés en utilisant 1 CIDR. Ce dernier délivre des niveaux plasmatiques de progestérone voisin de 1 à 2 ng/ml. Notre objectif ici était d'étudier si la « sensibilité » des brebis ROM à l'œstradiol, plus particulièrement en termes de pic préovulatoire de LH, augmenterait en utilisant des

concentrations de progestérone plus élevées et donc plus proches de celles observées lors de leur phase lutéale naturelle.

A l'opposé de cette hypothèse, le nombre de brebis ROM qui ont présenté un pic de LH, en réponse à la dose d'œstradiol appliquée, était plus important après un traitement par 1 CIDR que par 2 CIDR. Ce résultat est assez surprenant puisque nous avons précédemment montré que 6 cm d'œstradiol appliqués pendant 12 heures n'induisaient un pic préovulatoire de LH que chez 20% des brebis de cette race.

L'analyse statistique a montré « un effet cycle », avec un nombre de pics plus important chez les brebis ROM observé lors du premier cycle comparé au second (**5/9 vs 3/9**). Nous n'avons pas d'explication à cet effet sachant que les deux cycles étaient espacés de 15 jours et que le protocole expérimental était identique. Tout d'abord, il est à noter que ces expériences sont réalisées sur de petits effectifs. De plus, puisque la dose d'œstradiol utilisée ici est considérée, comme nous l'avons évoqué plus haut, comme une dose liminaire chez les brebis de ce génotype, ce résultat pourrait être expliqué par la grande variabilité intra-race de la réponse à l'œstradiol en termes de pic de LH et de comportement sexuel. Une grande variabilité individuelle de réponse à l'œstradiol a été décrite chez la brebis par de nombreux auteurs (Fabre-Nys et Martin, 1991a; Skinner *et al.*, 2000). De plus, au cours de l'ensemble de nos travaux de thèse, nous avons pu remarquer la grande différence de sensibilité des brebis à une même dose d'œstradiol d'un cycle à l'autre et d'une année à l'autre. Cette sensibilité semble être influencée par l'âge, le stade physiologique (exemple : délai après ovariectomie), et le moment d'application du stéroïde. Caraty et collaborateurs (2002) ont par exemple montré qu'une dose d'œstradiol de 6 cm pendant 6 heures était capable d'induire des pics de LH chez la totalité des brebis IF utilisées. Dans notre étude (voir article 1), seulement 30% des brebis IF répondaient à ce traitement et il a fallu 12 heures de présence du stéroïde pour induire le pic chez la totalité des brebis IF.

La variabilité dans la proportion des brebis ROM à présenter un pic de LH en réponse à la même dose d'œstradiol pourrait être expliquée par le fait que l'œstradiol délivré par l'implant sous cutané (1cm), présent constamment chez l'animal à partir de l'ovariectomie, serait insuffisant chez quelques individus, pour sensibiliser l'hypophyse. En effet, un rôle facilitateur du niveau basal d'œstradiol dans la détermination et la synchronisation du moment du pic préovulatoire de LH et du comportement sexuel, a été décrit chez la brebis (Martin *et al.*, 1988; Fabre-Nys et Martin, 1991a). Chez la brebis

ovariectomisée (avec un implant de 1 ou 2 cm), Fabre-Nys et Martin (1991a) ont montré que la dose additionnelle d'œstradiol appliquée pour mimer l'augmentation des niveaux du stéroïde lors de la phase folliculaire, joue un rôle mineur dans la détermination du moment des événements endocriniens et comportementaux. Dans ce modèle, l'effet majeur est attribué au niveau de base d'œstradiol dans les 24 heures qui suivent le retrait de la progestérone. Au-delà de ces 24 heures c'est la quantité d'œstradiol administrée qui devient déterminante. Ainsi, une injection massive d'œstradiol (50 µg) peut induire un pic de LH chez la brebis ovariectomisée en saison de reproduction (Scaramuzzi *et al.*, 1971a) comme durant l'anœstrus saisonnier (Clarke, 1988).

Chez la brebis IF ovariectomisée, aucune différence de l'effet de sensibilisation par 1 ou 2 cm d'œstradiol, sur la latence d'apparition du pic préovulatoire de LH et du comportement de réceptivité n'a été décrit (Fabre-Nys *et al.*, 1993). Toutefois, quand la dose additionnelle d'œstradiol appliquée est faible (par exemple 2 cm), la latence d'apparition du pic préovulatoire de LH est plus courte suite à une sensibilisation par 2 que par 1cm d'œstradiol (Fabre-Nys et Martin, 1991a et Fabre-Nys *et al.*, 1993). En conséquence, nous pouvons émettre comme hypothèse que la moindre « sensibilité » des brebis ROM à l'œstradiol pour l'induction du pic de LH pourrait être liée au besoin d'une « imprégnation basale » plus forte par ce stéroïde. Il serait intéressant de tester l'effet d'une sensibilisation différentielle entre 1 et 2cm d'œstradiol chez la brebis ROM pendant la saison de reproduction, des essais effectués durant l'anœstrus saisonnier ne nous ayant pas permis de répondre à cette question (voir Annexe I-1 et I-2).

Dans cette étude, aucun effet des niveaux plasmatiques de progestérone n'a été observé sur le moment d'apparition du pic préovulatoire de LH chez les brebis IF. Ce résultat est surprenant puisque chez la brebis intacte, de race Suffolk, Van cleef et collaborateurs (1998) ont montré que le pic préovulatoire de LH intervient plus tard suite à un traitement de synchronisation par 2 CIDR que par 1 seul CIDR. Chez la brebis ovariectomisée, Skinner et collaborateurs (2000) ont également rapporté que l'augmentation des niveaux plasmatiques de la progestérone, comme sa durée de présence pendant la phase lutéale artificielle retarde le moment d'apparition du pic préovulatoire de LH. Dans cette dernière étude, les auteurs ont comparé des brebis traitées avec 0, 1/2, 1 et 2 CIDR, l'effet le plus net a été observé entre 0 et 1 CIDR et 0 et 2 CIDR. Leurs données montrent néanmoins quelques brebis présentant des pics de LH précoces après traitement par les doses de progestérone les plus fortes (1 et 2 CIDR par exemple). L'effet majeur de

la progestérone serait principalement lié à un phénomène de « tout ou rien » (présence ou absence). En d'autres termes, le niveau absolu du stéroïde n'aurait qu'un rôle mineur, ce qui est conforté par le fait que nous n'ayons pas observé de différences entre les deux lots en termes de nombre de pic préovulatoires de LH.

Les résultats de cette étude montrent également que des niveaux de progestérone n'ont pas d'effet net sur la latence d'apparition du comportement de réceptivité chez les brebis ROM. En effet, le comportement de réceptivité apparaît toujours en même temps chez les deux races quelle que soit la dose de progestérone utilisée. Il existe néanmoins une tendance d'un comportement de réceptivité plus précoce chez les brebis traitées avec 2 CIDR (IF lors des 2 cycles et ROM lors du second cycle). Cet effet, bien que non significatif dans notre expérimentation est à rapprocher d'autres travaux qui ont décrit un effet facilitateur de la progestérone sur l'expression du comportement sexuel (Binet *et al.*, 1956; Fabre-Nys et Martin, 1991a).

Dans cette étude, nous n'avons pas étudié l'effet de la dose de progestérone sur la durée du comportement de réceptivité chez les brebis des deux races. Cet effet semble être mineur pour cette espèce. Chez la chèvre, contrairement à la brebis, un traitement d'imprégnation par la progestérone n'est pas nécessaire pour l'expression du comportement sexuel. Néanmoins, chez cette espèce, il raccourcit la latence d'apparition du comportement sexuel sans en augmenter la durée (Sutherland, 1988; Sutherland et Lindsay, 1991). L'effet des stéroïdes gonadiques le plus clair sur la durée de l'œstrus, chez la brebis comme chez la chèvre, est celui attribué à l'œstradiol. En effet, une relation entre la quantité d'œstradiol appliquée et la durée du comportement sexuel a été largement décrite chez les races ovines (Scaramuzzi *et al.*, 1971; Fabre-Nys *et al.*, 1993) et caprines (Sutherland et Lindsay, 1991).

L'effet facilitateur de la progestérone sur l'expression des événements endocriniens et comportementaux est principalement de type "tout ou rien". Quels peuvent être les mécanismes impliqués ? La progestérone semble agir au niveau du SNC en stimulant la synthèse et le recrutement des récepteurs à l'œstradiol (RE $\alpha$ , Blache *et al.*, 1994). Ce résultat est à relier à son effet sur l'amplitude du pic préovulatoire de GnRH (Caraty et Skinner, 1999) qui pourrait avoir un rôle dans le contrôle du comportement sexuel (Caraty *et al.*, 2002). Enfin, un traitement d'imprégnation par la progestérone chez la brebis permet de réduire la dose d'œstradiol nécessaire pour déclencher le pic préovulatoire de LH, et de

répondre à des applications répétées du stéroïde (Robinson, 1954a; Scaramuzzi *et al.*, 1972).

Dans notre étude, la réponse des brebis ROM à l'œstradiol en termes d'induction du pic préovulatoire de LH n'a pas été modifiée par l'utilisation de niveaux plus différents de progestérone. Par conséquent, les faibles niveaux de progestérone appliqués lors de nos expérimentations précédentes, n'expliquent pas, à eux seuls, les différences de réponse à l'œstradiol (en termes de nombre de femelles présentant un pic de LH et de latence d'apparition du pic préovulatoire de LH) observées, entre les IF et les ROM. Cette différence entre ces deux races doit vraisemblablement plus refléter une différence liée à la lecture et/ou à la transmission du signal œstrogénique entre les deux génotypes. Cette action pourrait s'exercer soit au niveau central soit au niveau hypophysaire. Enfin, concernant le niveau hypophysaire, l'hypothèse de l'intervention d'autres facteurs d'origine ovarienne n'est pas exclue mais reste à vérifier.

## **Partie 3**

# Comparaison des niveaux d'œstradiol dans le LCR chez les brebis des deux races

## Introduction

L'accès du cerveau à différentes substances telles que les hormones et les protéines est limitée par la barrière hémato-encéphalique qui constitue un filtre spécifique. Cette pénétration de substance, lorsqu'elle existe, n'est pas constante car elle peut être modulée par des changements de perméabilité de cette barrière sous l'action de changements physiologiques. Ainsi, la pénétration de quelques substances peptidiques telles que la leptine, quelques cytokines ou des anticorps, a été mise en évidence chez la souris en relation respectivement avec le métabolisme, la nutrition et la vieillesse (McLay *et al.*, 2000; Banks *et al.*, 2001a; Banks *et al.*, 2001b; Kastin et Akerstrom, 2001). Chez la brebis, une modification de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique vis-à-vis de la progestérone et en relation avec la photopériode a été décrite par Thiéry et collaborateurs. (2003). Ces auteurs ont observé qu'en dépit de niveaux comparables de cette hormone dans la circulation sanguine, les concentrations de progestérone dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) étaient deux fois et demi plus élevées pendant les jours longs que les jours courts.

Plus récemment, chez cette espèce, une augmentation des concentrations d'œstradiol dans le LCR en jours longs, par comparaison aux jours courts, a été décrite (Thiéry et al. 2006). De plus, les niveaux d'œstradiol dans le LCR sont 3 à 5 fois plus élevés que les niveaux plasmatiques.

Nous avons posé comme hypothèse dans les parties précédentes de ce Chapitre que la différence de sensibilité à l'œstradiol entre les brebis ROM et IF pourrait être le reflet d'une différence liée à la lecture et/ou à la transmission du signal œstrogénique entre les deux génotypes. Dans ce cadre, une différence de perméabilité de la barrière hémato-encéphalique entre les deux génotypes pourrait être l'un des éléments participant à la lecture différentielle du message œstrogénique. Dans le but de confirmer ou de rejeter cette hypothèse, nous avons réalisé une étude comparative des concentrations d'œstradiol dans le LCR chez des brebis IF et ROM traitées avec un niveau basal d'œstradiol (1cm) ou

après l'insertion d'implants supplémentaires conduisant à l'induction d'un pic préovulatoire de LH.

Nous tenons tout de même à signaler que les échantillons de LCR utilisés pour cette étude proviennent de l'expérience 2 décrite en détail dans le Chapitre 3.

## II. Matériels et méthodes

### Animaux et prélèvements de LCR

Les échantillons de LCR, prélevés au niveau du 3<sup>ème</sup> ventricule provenaient de brebis ROM (n= 6) et IF (n= 7). Ces brebis avaient été ovariectomisées et soumises à un cycle artificiel durant lequel elles recevaient de la progestérone pendant 12 jours, suivie 24 heures après son retrait par l'administration d'œstradiol sous forme d'implants sous cutanés (**6 cm pendant 12 heures**). Le niveau basal d'œstradiol dans le LCR a été déterminé sur deux prélèvements, juste avant l'insertion des implants d'œstradiol, à **t<sub>0</sub>**, et **t<sub>2</sub>**. Ensuite, l'évolution des niveaux du stéroïde a été déterminée sur des prélèvements effectués à **t<sub>2</sub>**, **t<sub>6</sub>**, **t<sub>12</sub>**, **t<sub>14</sub>** et **t<sub>44</sub>** après l'administration d'œstradiol.

Étant donné que la cinétique d'augmentation ainsi que les niveaux plasmatiques d'œstradiol obtenus avec ce modèle (6cm pendant 12 heures) ont été bien établis à travers plusieurs expériences, l'œstradiol plasmatique n'a pas été mesuré lors de cette expérience.

### Dosage d'œstradiol

L'œstradiol a été mesuré par dosage direct des échantillons de LCR selon la méthode validée dans le travail de Thiéry et collaborateurs (2006) et décrite dans le chapitre Matériels et Méthodes.

### Analyse de données

Pour simplifier l'analyse statistique des données, l'évolution des niveaux d'œstradiol dans le LCR a été divisée en 3 périodes : avant œstradiol (niveau basal : correspond au niveau moyen entre -4 et -2 heures), sous œstradiol (niveau moyen entre 2 et 12 heures) et après œstradiol (niveau moyen entre 14 et 44 heures), t<sub>0</sub> étant le moment de la pose des implants d'œstradiol. Les niveaux d'œstradiol relatifs à chacune de ces périodes et pour les deux races ont été soumis à une analyse de variance, à mesures répétées

utilisant le logiciel SAS (SAS, Institut, Inc), suivie d'une comparaison des moyennes intra et inter-race, en utilisant la procédure Lsmeans du même logiciel. Nous avons considéré pour cette analyse les facteurs : brebis, race, période (temps) et l'interaction entre la race et la période. Le seuil de signification est fixé à 5%.

### III. Résultats

L'analyse statistique a montré un effet temps/période significatif à l'intérieur des deux races. En d'autres termes pour les deux génotypes, les niveaux d'œstradiol dans le LCR chutent significativement ( $p < 0.05$ ) après l'insertion des implants d'œstradiol (Figure 15A). Malgré cette diminution des niveaux d'œstradiol observée chez les deux races suite à l'insertion des implants d'œstradiol, aucune différence des niveaux d'œstradiol mesurés dans le LCR avant (niveau basal) comme après la pose des implants d'œstradiol n'a été notée entre les deux génotypes (c'est-à-dire aucun effet race n'a été observé). Toutefois l'analyse statistique a montré « un effet brebis » hautement significatif ( $p < 0.01$ ) (Figure 15B).

### IV. Discussion

Nous montrons que les niveaux d'œstradiol dans le LCR ne diffèrent pas entre les brebis ROM et IF ovariectomisées qui portent un implant périphérique de 1cm d'œstradiol. De plus, pour les deux génotypes, nous n'observons pas d'augmentation mais plutôt une diminution de ces concentrations dans les heures qui suivent l'insertion d'implants additionnels d'œstradiol (6 cm), traitement capable d'induire un pic préovulatoire de LH. Par conséquent, ces résultats suggèrent qu'une différence de passage du stéroïde à travers la barrière hémato-encéphalique n'est pas un des éléments qui participe aux différences de sensibilité à l'œstradiol en termes d'induction du pic préovulatoire de LH et du comportement sexuel entre les deux génotypes.

Chez la brebis, une modification de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique vis-à-vis de la progestérone en relation avec la photopériode a été décrite par Thiéry *et al.* (2003). Ces auteurs ont observé des niveaux de progestérone plus élevés dans le LCR et dans le tissu cérébral de brebis en jours longs par comparaison à des brebis placées en jours courts. Ce résultat indique bien une différence de perméabilité au stéroïde

puisque lors de cette expérience les niveaux plasmatiques de cette hormone étaient identiques chez les deux groupes (brebis ovariectomisées porteuses d'un implant de progestérone). Plus récemment, une évolution similaire des concentrations d'œstradiol dans le LCR a été décrite (Thiery *et al.*, 2006). Ainsi, dans le LCR, les concentrations d'œstradiol sont plus élevées en jours longs comparé aux jours courts. Par ailleurs ces concentrations sont de 3 à 5 fois plus élevés dans le LCR que dans le plasma.

Dans le travail présenté ici, l'œstradiol plasmatique n'a pas été mesuré mais nous avons observé, lors de la première expérimentation (cf d'article 1), que la présence constante d'un implant de 1cm permet de maintenir une concentration de l'ordre de 1.5 à 2 pg/ml chez la brebis ovariectomisée. Les concentrations d'œstradiol observées dans le LCR chez les brebis ROM et IF sont de l'ordre de 6 à 7 pg/ml, elles sont donc environ 3 fois plus élevées que dans le plasma. Un résultat similaire a été déjà rapporté par Thiéry *et al.* (2006). L'addition d'implants d'œstradiol supplémentaires (6 cm) entraîne une diminution des concentrations du stéroïde dans le LCR chez les deux races. Dans le plasma, nous avons précédemment montré que ce traitement induit plutôt une augmentation rapide (en moins d'une heure) et constante des niveaux d'œstradiol (Ben Saïd *et al.*, 2007). Ils sont alors voisins de 7 à 9 pg/ml, ce qui représente une augmentation de l'ordre de 4 à 5 fois par rapport au niveau basal. Il n'existe donc aucune évolution parallèle des niveaux de stéroïde entre le LCR et le plasma chez les brebis IF ou ROM. Toutefois, il est à rappeler que notre étude a été réalisée pendant la saison de reproduction. Des résultats non publiés (Thiéry, communication personnelle) montrent que cette évolution est différente lorsque l'on applique ce même traitement chez des brebis en jours longs. Dans ce cas, on observe une augmentation modeste de l'ordre de 2 fois des niveaux d'œstradiol dans le LCR entre 1 à 2 jours après l'insertion des implants d'œstradiol.

La diminution des niveaux d'œstradiol dans le LCR qui suit l'insertion d'implants d'œstradiol chez les deux races est intéressante sur le plan des régulations. Des niveaux relativement élevés (6 à 7 pg/ml) de stéroïde dans le LCR avant l'insertion des implants d'œstradiol (par comparaison aux niveaux périphériques 1.5 à 2 pg/ml) peuvent traduire une activité de synthèse locale au niveau du système nerveux central. L'hypothèse d'un mécanisme de concentration du stéroïde dans le LCR n'est toutefois pas complètement exclue. L'application du stéroïde par voie périphérique aurait comme conséquence de bloquer cette activité de synthèse locale d'œstradiol. Cet effet inhibiteur semble perdurer dans le temps puisque les niveaux d'œstradiol demeurent très bas 32 heures après le retrait

des implants. Ce résultat est difficile à interpréter mais pourrait traduire une rémanence de l'action du stéroïde. Chez la souris, une synthèse active de l'œstradiol au niveau de l'hippocampe a été mise en évidence. De plus, l'injection d'œstradiol à des souris ovariectomisées cause une diminution de l'expression de la Cytochrome P450 (codant pour l'aromatase) et l'expression des ARNm des RE dans cette zone (Iivonen *et al.*, 2006). De plus, il a été rapporté que des neurones « adultes » d'hippocampe ont la capacité de synthétiser l'œstradiol *in vitro*, et que cette activité est fortement inhibée suite à l'inactivation de l'aromatase (Prange-Kiel *et al.*, 2003). Ainsi, chez la souris, l'œstradiol périphérique affecte la synthèse de l'œstradiol au niveau central en régulant l'expression de la P450 et également l'expression des gènes des RE $\alpha$ . Nous pouvons imaginer le même mécanisme d'action chez la brebis, néanmoins, les aires cérébrales responsables de cette activité de synthèse ainsi que les mécanismes exacts restent à identifier chez cette dernière. Des travaux sont en cours de réalisation pour éclaircir ce point.

Compte tenu des effets rapides des stéroïdes sur la libération des hormones gonadotropes, l'ensemble de ces données pose le problème de la signification physiologique des variations de concentrations de ces hormones dans le LCR. Les stéroïdes étant de nature hydrophobe, il est vraisemblable que le LCR ne représente pas un milieu idéal pour véhiculer ces molécules dans le système nerveux central. L'hypothèse la plus probable est que des variations de concentrations beaucoup plus rapides de ces hormones existent dans les tissus et interviennent en réponse à l'évolution de leurs concentrations plasmatiques. Ce point reste à vérifier, mais l'absence de différences de concentration d'œstradiol dans le LCR entre les brebis ROM et IF n'est guère en faveur d'un passage différentiel au travers la barrière hémato-encéphalique entre les deux génotypes. Il semble beaucoup plus probable que les mécanismes responsables de la différence de sensibilité à ce stéroïde pour induire le pic de LH et le comportement sexuel entre les deux génotypes se situent en aval du message œstrogénique. Ils pourraient concerner plus particulièrement la lecture de ce message (récepteurs) et/ou sa transmission au travers de circuits neuronaux.

En résumé, les résultats de ce premier Chapitre indiquent qu'il existe un seuil de réponse à l'œstradiol très différent entre les deux génotypes selon que l'on s'intéresse aux aspects endocriniens ou comportementaux. Plus d'œstradiol est nécessaire pour induire le pic préovulatoire de LH chez la brebis ROM en comparaison à la brebis IF alors que le

comportement sexuel lui est induit avec un signal œstrogénique plus faible. Les niveaux de progestérone durant la phase lutéale artificielle ne semblent pas jouer un rôle majeur dans l'orientation de ces différences, cette hormone ayant plus un rôle de « tout ou rien », en particulier dans le contrôle du comportement sexuel. Enfin, on peut proposer comme hypothèse qu'il existe un seuil de "lecture" différent du signal œstrogénique pour induire le comportement sexuel et le pic préovulatoire de LH qui, lui-même, diffère entre les races. Dans la suite de ce travail, nous essayerons d'identifier à quel niveau se situe cette différence de sensibilité à l'œstradiol pour induire le pic de LH entre les deux génotypes : au niveau hypophysaire et/ou hypothalamique ?

**Chapitre 2**  
**Etude de la sensibilité hypophysaire et hypothalamique des brebis IF et ROM à l'œstradiol**

## Introduction

L'induction du pic préovulatoire de LH résulte d'une augmentation sous l'effet de l'œstradiol à la fois de la libération de la GnRH (Clarke *et al.*, 1987; Moenter *et al.*, 1991) et de la réponse hypophysaire à ce peptide (Kaynard *et al.*, 1988c). Toutefois, les besoins temporels en œstradiol pour agir sur l'hypothalamus et l'hypophyse sont différents (Evans *et al.*, 1997). En cycle naturel, les niveaux plasmatiques d'œstradiol chutent rapidement après le début du pic préovulatoire de GnRH (au bout de 4 heures, Monter *et al.*, 1991). Chez la brebis ovariectomisée, traitée selon le modèle de phase folliculaire, Evans et collaborateurs (1997) ont montré qu'il n'est pas nécessaire de maintenir des concentrations plasmatiques élevées d'œstradiol pendant toute la période menant au pic préovulatoire de GnRH. Une fenêtre de temps d'exposition à l'œstradiol entre 14 et 21 heures est largement suffisante pour stimuler une libération préovulatoire de GnRH et, par la suite, de LH. Si cette durée d'exposition à l'œstradiol est raccourcie (réduite à 7 heures), une faible proportion des brebis présente un pic de GnRH (20%), d'amplitude et de durée "normales". En revanche, dans ce cas, comme pour une durée d'exposition au stéroïde de 14 heures, l'amplitude du pic de LH est significativement réduite. Ainsi, une stimulation longue par l'œstradiol apparaît nécessaire pour obtenir une réponse hypophysaire optimale.

Nos travaux (Ben Saïd *et al.*, 2007) comme d'autres (Caraty *et al.*, 2002; Pillon, 2003) indiquent que, pour une même race, il existe une relation entre la dose et la durée d'administration des implants d'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH. Par ailleurs, nous avons observé qu'il existe une différence d'efficacité d'un même signal œstrogénique pour induire le pic préovulatoire de LH chez des races différentes. En effet, nous avons précédemment montré que l'œstradiol devait être présent en concentrations plus importantes et pendant des durées plus longues pour induire le pic préovulatoire de LH chez la brebis ROM par comparaison à l'IF. Cette différence des quantités d'œstradiol (doses et durées) nécessaires pour induire le pic préovulatoire de LH entre les deux races peut traduire une différence d'action du stéroïde au niveau hypophysaire et/ou hypothalamique entre les deux génotypes. Les expérimentations présentées dans ce second Chapitre visent à vérifier ces hypothèses.

**a- La "sensibilité hypophysaire"** à l'œstradiol et à la GnRH a été testée par trois approches complémentaires : i) *in vitro*, en utilisant un modèle de cultures primaires de

cellules hypophysaires présenté dans la Partie 1 ; ii) *ex-vivo en* utilisant un modèle de tranches hypophysaires et iii) *in vivo*, en utilisant un modèle de brebis dont l'hypophyse a été chirurgicalement déconnectée de l'hypothalamus (brebis HPD). Ces deux dernières approches sont présentées ci-après dans l'article 2 (pour soumission à *Journal of Neuroendocrinology*).

**b-** "*La sensibilité hypothalamique*" a été étudiée *in vivo* en utilisant un modèle établi et décrit dans le Chapitre 1. Les résultats de cette expérimentation sont également présentés dans l'article 2.

**Partie 1**  
**Sensibilité hypophysaire *in vitro* : effet différentiel de l'œstradiol et de la GnRH sur la libération hypophysaire de LH chez les deux races de brebis**

# Sensibilité hypophysaire *in vitro* : effet différentiel de l'œstradiol et de la GnRH sur la libération hypophysaire de LH chez les brebis IF et ROM

## Introduction

*In vivo*, nous avons précédemment montré qu'il fallait augmenter à la fois la dose et la durée de présence de l'œstradiol pour induire un pic préovulatoire de LH chez la brebis ROM par comparaison à l'IF (respectivement 12cm/24 heures vs 6cm/12 heures). De plus, nous avons montré que des implants d'œstradiol de 6 cm (dose liminaire) laissés en place pendant 24 heures étaient capables d'induire des pics de LH chez 70% des brebis ROM. Par contre, ces pics étaient de faible amplitude comparés à ceux induits par un traitement à l'œstradiol de 12 cm/24 heures. Ce résultat suggère que l'hypophyse, chez la ROM a besoin d'une longue phase de sensibilisation par l'œstradiol pour que sa capacité de réponse au signal hypothalamique augmente. En utilisant un modèle de cultures primaires de cellules hypophysaires, notre objectif dans cette première partie a été de comparer la sensibilité des cellules hypophysaires des deux génotypes à i) **différentes doses et durées de présence d'œstradiol**, en présence comme en absence de la GnRH (**expérience 1**), ii) **différentes doses de GnRH**, en absence d'œstradiol (**expérience 2**).

## Matériels et méthodes

### Animaux

Les cycles sexuels de 8 brebis de chaque génotype ont été synchronisés par des implants vaginaux de progestérone (CIDR) pendant 12 jours. Les brebis ont été sacrifiées 24 heures après le retrait de la progestérone. Les abattages ont été réalisés à l'abattoir de la station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements de l'INRA de Nouzilly par un boucher agréementé (Agrément Européen en 1997, N° C37-175-2). Les hypophyses ont été récupérées juste après l'abattage et soumises à un protocole de culture cellulaire décrit ci-dessous.

## Protocole de culture cellulaire

### Dissociation cellulaire

Une fois prélevées, les hypophyses ont été immédiatement débarrassées de la post-hypophyse et rincées dans du sérum physiologique maintenu sur de la glace. Toutes les manipulations suivantes ont été réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire.

La dissociation des cellules hypophysaires a été réalisée par des traitements successifs du tissu hypophysaire avec de la Collagénase (0.4 mg/ml, Roche diagnostic, Ltd Meylan, France) et de la DNase (0.25 mg/ml, Roche diagnostic, Ltd Meylan, France), diluées dans un milieu de culture F12 (Nutrient mixture F-12 Ham, Sigma, Saint Louis, MO, USA) tamponné et supplémenté avec un antifongique (3 µg/ml de Gentamicine), un antibactérien (2 µg/ml de Nystatine) et 5% du sérum fœtal de veau.

La Collagénase détruit le collagène qui maintient les cellules entre elles et la DNase digère l'ADN libéré par les cellules mortes. Afin de faciliter et d'optimiser l'action des enzymes, les hypophyses sont coupées en petits dés d'environ 1mm<sup>3</sup>, qui sont incubés à 37°C pendant 15 min dans la solution de Collagénase/DNase. Le surnageant est retiré et remplacé par 15 à 20 ml de la solution de Collagénase/DNase, puis l'ensemble est incubé à 37°C sous agitation pendant 1 heure. Ce traitement permet de récupérer un surnageant contenant les cellules dissociées et un culot de fragments d'hypophyses non digérés. La dissociation enzymatique est suivie d'une dissociation mécanique par un passage du culot et du surnageant à travers des aiguilles de diamètres décroissants. Le surnageant est centrifugé pendant 10 minutes à 100 g afin de récupérer les cellules. Les fragments d'hypophyse non digérés sont remis en incubation avec la solution de collagénase/DNase pendant 30 minutes. Une seconde série de dissociations mécaniques et de centrifugations est alors effectuée. Les différents culots de cellules obtenus après centrifugation sont alors réunis, rincés deux fois dans du milieu F12, et repris dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) supplémenté avec 3 µg/ml de Gentamicine, 2 µg/ml de Nystatine, 5 µg/ml de transferrine, 100 µM/l d'acide ascorbique et 5% de sérum de veau fœtal. Ce dernier milieu, appelé DMEM complet est utilisé pour la mise en culture des cellules.

## Mise en culture des cellules hypophysaires

Pour chaque hypophyse (c'est-à-dire pour brebis), les cellules hypophysaires récupérées sont mises en culture dans des boîtes de 48 puits. Dans chaque puits, 200 000 cellules sont déposées dans un volume total de 500µl de DMEM complet. Les boîtes sont alors placées dans un incubateur à 37°C, à 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub> pendant 48 heures, période nécessaire à l'adhésion des cellules au fond de la boîte. A la fin de ces 48 heures, le milieu est remplacé par du DMEM contenant 0.1% de BSA (Albumine Bovine Sérique, Sigma, France) pour les puits contrôles ou du DMEM-0.1% BSA supplémenté des molécules à tester, qui pour nous sont l'œstradiol et/ou la GnRH (Figure 16).

## Protocole expérimental

### Expérience 1 : Effet de la durée de présence et de la concentration d'œstradiol dans le milieu de culture sur la libération de LH par les cellules hypophysaires

Différentes doses d'œstradiol 17β (0, 10<sup>-12</sup>, 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-10</sup> et 10<sup>-9</sup>M) ont été introduites dans le milieu de culture (DMEM- 0.1% BSA). La libération de LH a été mesurée après incubation des cellules avec ces doses d'œstradiol pendant 12 et 24 heures dans un incubateur à 37°C, 95% d'air et 5% CO<sub>2</sub>. Lors des 3 dernières heures de culture (c'est-à-dire à partir de 9 heures et de 21 heures respectivement pour les durées de culture de 12 et 24 heures), les cellules ont été stimulées ou non (sécrétion basale) par de la GnRH (10<sup>-8</sup>M ; Stimu-LH, Ferring, Gentilly; Figure 16). Les concentrations de LH présentes dans le surnageant ont été déterminées au bout de 12 ou 24 heures de culture.

### Expérience 2 : Effet de différentes doses de GnRH sur la libération de LH par les cellules hypophysaires

Des cellules provenant des mêmes brebis ont été traitées comme décrit plus haut, avec différentes doses de GnRH (10<sup>-12</sup>, 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup> et 10<sup>-8</sup>M) pendant 3 heures. La libération de LH a été analysée dans le surnageant à la fin de l'incubation.

Chaque expérience a été répétée 4 fois (4 cultures) et tous les traitements, c'est-à-dire les doses d'hormones (œstradiol et GnRH) et la durée de présence ont été testés en triple (3 puits).

## Analyse des données

### Evolution de la libération de LH

Pour chaque hypophyse, c'est-à-dire pour chaque brebis, et pour chaque traitement (dose, durée d'œstradiol ou de GnRH) utilisé, les niveaux de LH calculés correspondent à la moyenne de 3 puits. Pour chaque race, les niveaux de LH libérés correspondent à la moyenne de huit hypophyses par race (n=8 brebis) et de trois puits /traitement/ hypophyse.

Afin de s'affranchir en partie de l'importante variabilité des niveaux de LH secrétés par les cellules hypophysaires dans les différentes cultures, les niveaux de LH ont été également exprimés en pourcentage de stimulation par rapport au niveau basal de LH (données corrigées).

### Analyse statistique

Les données brutes correspondant aux concentrations de la LH libérée dans le milieu de culture ont été soumises à une analyse de variance à plusieurs facteurs utilisant la procédure GLM du logiciel SAS, après une transformation log.

La comparaison des niveaux moyens de LH par race et par traitement a été réalisée par la procédure Least Square Means (Lsmeans) du même logiciel. Lors de cette analyse, nous avons considéré les facteurs race, dose d'œstradiol, durée de présence de l'œstradiol, stimulation à la GnRH (ou sans) et culture pour la première expérience. Pour l'expérience 2, les facteurs race, dose de GnRH et culture ont été exploités. Les interactions entre ces différents facteurs ont également été testées pour chacune des deux expérimentations. Le seuil de signification est fixé à 5%.

## Résultats

### Expérience 1 : Effet de la durée de présence et de la concentration d'œstradiol dans le milieu de culture sur la libération de LH par les cellules hypophysaires

En absence de toute stimulation par œstradiol et/ou la GnRH, aucune différence du niveau basal de LH n'a été observée entre les deux races.

Dans la suite, on appellera **sécrétion basale de LH**, la sécrétion de LH dans le milieu de culture en absence de stimulation par la GnRH.

### Effet de l'œstradiol

Chez les deux races, aucune différence entre les niveaux de LH libérés n'a été observée quelle que soit **la dose d'œstradiol** utilisée (Figure 17.A et 18A).

L'allongement du **temps de présence de l'œstradiol** dans le milieu de culture de 12 à 24 heures entraîne une augmentation de la sécrétion basale de LH chez la brebis ROM mais pas chez la brebis IF ( $P < 0.05$  ; Figure 17A et 18A). Cet effet est observé quelle que soit la dose d'œstradiol utilisée.

### Après stimulation par la GnRH (sécrétion de LH-stimulée)

Au bout de 3 heures de stimulation par la GnRH ( $10^{-8}$  M), les niveaux de LH libérés dans le milieu de culture sont augmentés de 2 à 4 fois par comparaison au niveau basal. Cette augmentation est observée chez les deux races quelles que soient la dose d'œstradiol et la durée de la stimulation (12 ou 24 heures ; Figure 17B et 18B). En revanche, aucune différence entre les niveaux de LH stimulés par la GnRH à 12 et 24 heures n'a été notée à l'intérieur de la même race comme entre les deux races. En d'autres termes aucune interaction entre la GnRH et la durée de présence d'œstradiol n'a été observée, en effet, l'addition de la GnRH au milieu n'amplifie pas l'effet de la durée de présence d'œstradiol. Toutefois une tendance est observée chez les ROM (Figure 17B et 18B).

En absence d'œstradiol, la réponse à la stimulation GnRH ( $10^{-8}$ M) a été plus importante chez la brebis IF que chez la ROM.

## Expérience 2 : Effet de différentes doses de GnRH sur la libération de LH par les cellules hypophysaires

Pour les deux races, les niveaux de LH mesurés augmentent d'une façon significativement plus importante avec les doses de GnRH les plus élevées ( $10^{-9}$  et  $10^{-8}$ ; Figure 19A). Une meilleure réponse à la stimulation par la GnRH des cellules hypophysaires des brebis IF par comparaison aux brebis ROM a été notée. En effet, pour toutes les doses de GnRH utilisées, la libération de LH induite (en données brutes comme

en données corrigées) est plus importante chez la brebis IF comparée à la ROM (par exemple  $499.3 \pm 138.5\%$  vs  $152.8 \pm 17.5\%$  pour  $10^{-10}$  M, et  $510.6 \pm 152.7\%$  vs  $235.3 \pm 49.6\%$  pour  $10^{-9}$  M, Figure 19B et C).

## Discussion

Les résultats de cette étude *in vitro* montrent, d'une part, que l'allongement de la durée de présence de l'œstradiol dans le milieu de culture, augmente la capacité de l'hypophyse à sécréter de la LH chez la brebis ROM par comparaison à l'IF. Cet effet du stéroïde est plus net en absence de la GnRH. D'autre part, en absence d'œstradiol dans le milieu de culture, les hypophyses des brebis IF sont capables de libérer la LH sous l'action de concentrations plus faibles de GnRH que celles des brebis ROM.

*In vivo*, nous avons précédemment montré qu'il faut globalement plus d'œstradiol (concentration et durée de présence) pour induire un pic préovulatoire de LH chez la brebis ROM que chez la brebis IF. Néanmoins, un traitement par des implants d'œstradiol de 6 cm (dose liminaire) pendant 24 heures induit des pics de LH chez 70% des brebis ROM. Par contre, l'amplitude des pics obtenus est faible en comparaison à ceux obtenus avec une dose plus élevée (12 cm/24 heures). Ce résultat suggère que l'hypophyse chez, cette race, a besoin d'une phase de sensibilisation plus longue par le stéroïde que chez la brebis IF avant de pouvoir répondre efficacement à l'action de la GnRH. Toutefois, il est difficile de séparer chez l'animal *in vivo* une action directe de l'œstradiol au niveau hypophysaire de son action indirecte qui passe par l'hypothalamus. Les résultats présentés ici confirment clairement l'hypothèse d'un effet hypophysaire. Ils montrent que l'allongement de la durée de présence d'œstradiol de 12 à 24 heures entraîne une nette augmentation de la quantité de LH libérée par les cellules hypophysaires chez la brebis ROM. Par contre, chez l'IF, le maximum de sécrétion est obtenu plus tôt, dès 12 heures de stimulation par l'œstradiol. Cette différence dans la vitesse de sensibilisation des cellules hypophysaires entre les deux génotypes est à mettre en parallèle avec la dynamique d'évolution des niveaux plasmatiques d'œstradiol observée lors de leur cycle naturel. On observe en effet, durant la phase folliculaire, une libération beaucoup plus prolongée d'œstradiol chez la brebis ROM que chez la brebis IF ; 20 heures vs 10-12 heures respectivement (Cahill *et al.*, 1981; Ben Saïd *et al.*, 2007).

Chez la brebis, un effet des stéroïdes sexuels sur la libération des gonadotrophines indépendamment de l'action de la GnRH a été mis en évidence. L'œstradiol augmente légèrement la sécrétion basale de LH des cellules hypophysaires en culture. La cinétique d'évolution est similaire à celle observée sous l'action de la GnRH, mais les niveaux d'hormone atteints en fin d'incubation sont plus faibles (Laws *et al.*, 1990). Il est aussi à noter qu'une stimulation de 24 heures par l'œstradiol de cultures primaires d'hypophyses modifie de façon inverse les libérations de LH et de FSH. La sécrétion basale de LH est augmentée (d'un facteur 3 environ) alors que celle de FSH est inhibée d'environ 60% (Di Gregorio et Nett, 1995). Compte tenu du fait qu'une partie des cellules gonadotropes exprime le RE (Tobin *et al.*, 2001), l'augmentation des niveaux de LH sous l'action de l'œstradiol n'est pas surprenante. De plus, chez le rat, la présence d'un élément de réponse à l'œstradiol (ou ERE) au niveau de la région non codante du gène de la sous unité LH $\beta$  a été rapportée (Shupnik et Rosenzweig, 1991). L'interaction de l'œstradiol avec son récepteur à ce niveau (ERE) permet donc d'activer la transcription du gène (régulation positive) conduisant à stimuler la libération de LH. Toutefois, dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de différence de niveaux de LH entre les différentes doses de stéroïde utilisées. Comme, l'augmentation des niveaux d'œstradiol ne semble pas modifier la proportion de cellules gonadotropes exprimant le RE $\alpha$  (Tobin *et al.*, 2001), il est probable que cette dernière était déjà maximum avec les concentrations d'œstradiol utilisées dans notre expérience.

Une stimulation de 3 heures par la GnRH ( $10^{-8}$ M) entraîne une augmentation significative des niveaux de LH, chez les deux races quelles que soient les doses et durées de présence de l'œstradiol. L'effet de la GnRH observé est en accord avec les travaux de Gregg *et al.* (1990) montrant que la libération de LH-stimulée par la GnRH double au bout de 9 à 15 heures de traitement à l'œstradiol. Par contre, dans notre étude, il n'existe aucune différence des niveaux de LH-stimulée en fonction de la dose ou la durée de présence d'œstradiol chez une race comme entre les deux génotypes. Ainsi, la dose d'œstradiol comme sa durée de présence ne semble pas amplifier l'action de la GnRH.

Une explication serait que 24 heures de présence d'œstradiol dans le milieu de culture entraînent une diminution du contenu cellulaire en LH. Les granules de sécrétion s'étant partiellement vidées, la stimulation durant les 3 dernières heures de la culture par de la GnRH entraînerait une libération de LH moindre. Des études suggèrent que l'effet de l'œstradiol sur les cellules hypophysaires est plus probablement exercé sur la libération des

gonadotrophines que sur une nouvelle synthèse de LH et FSH (Huang et Miller, 1980). Par contre, d'autres études proposent que l'oestradiol stimulerait une certaine activité de synthèse, puisque l'addition d'un inhibiteur de transcription dans le milieu de culture empêche l'augmentation du nombre de R-GnRH (Gregg *et al.*, 1990). Dans notre étude, nous utilisons un modèle de cultures « statiques » au cours du temps, il est donc difficile d'identifier la cinétique exacte d'évolution des niveaux de LH et ne nous sommes pas en mesure de déterminer de quel type d'action il s'agit. La LH libérée traduit une libération spontanée, ou bien est-ce le résultat d'une activité de synthèse ?

Des travaux ont suggéré que l'effet stimulateur de l'œstradiol sur la sécrétion des gonadotropines impliquerait une modulation du couple GnRH-Récepteur (R-GnRH). Un effet du stéroïde sur la synthèse des récepteurs à la GnRH a été décrit aussi bien *in vivo* (Clarke *et al.*, 1988) qu'*in vitro* (Gregg et Nett, 1989). Chez la brebis, l'œstradiol à la dose de 10 nM double la capacité de liaison d'analogues de la GnRH aux cellules hypophysaires au bout de 10 heures de traitement (Laws *et al.*, 1990). Cette augmentation de la capacité de liaison traduit une augmentation du nombre de récepteurs à la GnRH, en moyenne de 4 fois au bout de 12 heures de stimulation par l'œstradiol (Gregg et Nett, 1989; Gregg *et al.*, 1990). La libération de LH augmente parallèlement. Le nombre de R-GnRH continue d'augmenter jusqu'à 24 heures de présence d'œstradiol alors que les niveaux de LH libérés restent constants. Le nombre de R-GnRH semble augmenter avec la dose d'œstradiol. Dans notre étude, toutefois, aucune différence des niveaux de LH-stimulée par la GnRH n'a été observée entre les différentes doses d'œstradiol. Nous pouvons donc imaginer que le nombre de R-GnRH recrutés au bout de 12 ou 24 heures de stimulation œstradiol est identique dans une même race.

Nos résultats montrent également « un effet race » quant à la sensibilité des cellules hypophysaires à la GnRH. En effet, les cellules gonadotropes des brebis IF répondent mieux à la stimulation par la GnRH en termes de libération de LH par comparaison aux cellules des brebis ROM. Cette observation n'est vraie qu'en l'absence totale d'œstradiol, et bien qu'une tendance similaire existe en sa présence, ceci reste à confirmer sur un nombre plus élevé de culture.

La faible sensibilité de l'hypophyse des brebis ROM à la stimulation GnRH pourrait être liée à la présence d'un nombre réduit de ses récepteurs, puisque leur densité détermine la capacité de réponse des cellules gonadotropes (Wise *et al.*, 1984). La GnRH

étant capable de moduler l'expression de son propre récepteur (Turzillo et Nett, 1999), nous pouvons imaginer que cet effet est moins efficace chez la ROM.

Par ailleurs, on ne peut pas exclure un certain nombre de considérations techniques pouvant rendre compte de cette différence intrinsèque de sensibilité à la GnRH. La technique de dissociation appliquée dans notre expérimentation pourrait entraîner une réduction ou une absence de réponse à des sécrétagogues. Un tel effet semble commun à ce type de dissociation enzymatique qui peut endommager les récepteurs (Amsterdam et Jamieson, 1974). Des mécanismes de signalisation paracrines nécessitant l'intégrité du tissu hypophysaire (Counis *et al.*, 2001) et intervenant dans les mécanismes de réponse au sécrétagogues seraient ainsi perturbés, cet effet, serait plus marqué chez les brebis ROM.

En résumé, les résultats de ces expérimentations montrent que l'allongement de la durée de présence de l'œstradiol stimule la libération de LH basale. Cette addition de GnRH permet d'augmenter fortement la libération de LH mais conduit à niveler l'effet de la durée de présence de l'œstradiol. Il n'y a pas, dans nos conditions, d'effet additif des deux traitements. De plus en l'absence d'œstradiol, l'hypophyse de la brebis ROM semble être moins sensible à la GnRH par comparaison à l'IF. Comme la modulation de l'expression du R-GnRH constitue un des mécanismes impliqués dans l'effet stimulateur de la GnRH sur la sécrétion des gonadotrophines, nous pensons qu'une partie de la différence observée entre les deux génotypes serait liée à une expression plus tardive des R-GnRH chez la brebis ROM, cette hypothèse reste néanmoins à confirmer.

Dans le but de mieux préciser l'importance du facteur hypophysaire dans les mécanismes qui déterminent la latence d'apparition du pic préovulatoire de LH d'autres expérimentations utilisant un modèle *in vivo* et *ex vivo* ont été entreprises. Ces expériences sont décrites dans la partie suivante (Partie 2) présentée sous forme d'article.

**Partie 2**  
**Article HPD**

**Chapitre 3**  
**Rôle de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel**  
**chez la brebis Romanov**

## Introduction

Un rôle de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel a été décrit chez la brebis IF (Caraty *et al.*, 2002). Ces auteurs suggèrent que la libération prolongée de GnRH observée au moment du pic préovulatoire de LH qui coïncide avec la durée de l'œstrus, permet de prolonger et de maintenir le comportement sexuel après la chute des concentrations plasmatiques d'œstradiol. La durée du comportement de réceptivité, plus longue chez la brebis ROM comparée à l'IF, pourrait donc être liée à une sécrétion prolongée de GnRH. En utilisant une faible dose d'œstradiol (3cm pendant 6 heures, article 1), nous avons montré que le comportement de réceptivité peut être induit sans qu'il ne soit accompagné d'un pic préovulatoire de LH, chez la brebis ROM. Par ailleurs, l'intensité et la durée du comportement sexuel induit par ce faible signal œstrogénique est tout à fait comparable à celui induit par des quantités plus importantes d'œstradiol ou durant un cycle naturel chez la brebis ROM. L'ensemble de ces arguments nous a incité à essayer de mieux préciser le rôle de la GnRH dans la régulation du comportement d'œstrus chez la ROM. Nous proposons comme hypothèse que de faibles doses d'œstradiol seraient capables de stimuler une libération de GnRH. Cette dernière participerait au contrôle du comportement sexuel mais serait insuffisante pour stimuler l'hypophyse et déclencher un pic préovulatoire de LH.

Afin de tester cette hypothèse, une série d'expérimentations a été réalisée en utilisant un modèle de brebis ovariectomisée présentant un comportement d'œstrus induit par une faible dose d'œstradiol, et dont le système GnRH a été manipulé par administration icv d'un antagoniste de la GnRH (Expérience 1). Parallèlement, nous avons i) comparé les profils de libération de la GnRH entre les brebis des deux races et ii) recherché l'existence d'une augmentation des niveaux de la GnRH dans le LCR en réponse à l'administration de doses modérées d'œstradiol comme 6 cm pendant 12 heures, c'est-à-dire qui n'induisent que peu ou pas de pics de LH (Expérience 2).

## I. Matériels et méthodes

### Généralités

Les expériences et les résultats présentés dans ce chapitre portent sur deux saisons de reproduction successives (2006-2007). Les données sont traitées séparément pour chacune des expérimentations.

Les expérimentations ont été réalisées en utilisant des brebis IF et ROM âgées de 2 à 3 ans ovariectomisées et implantées avec une canule placée au niveau du 3<sup>ème</sup> ventricule. La procédure d'implantation a été effectuée comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes.

### Expérience 1 : Identification du rôle de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel chez la brebis ROM

#### Administration intra-cérébroventriculaire

**L'antagoniste de la GnRH** (Teverelix, Genecust, Evry, France; **0.4 mg/ml**) ou le **solvant** (eau stérilisée, Aguetant, Lyon, France) ont été administrés par voie icv grâce à un cathéter (cathéter en polyéthylène, Biotrol, Paris, France) placé au moment de l'expérimentation dans la canule. Ce cathéter est relié à une seringue dont le débit est maintenu constant (**3 µl/min**) grâce à une pompe à seringue portable (Grasebey Medical, Walford, Hertfordshire, UK) placée dans un boîtier ; l'ensemble étant fixé sur le dos de l'animal par une ceinture (Figure 20). Les ceintures et les boîtiers sont placés sur les dos des femelles environ 1 à 2 heures avant le début de l'expérimentation afin que les brebis s'habituent à leur présence.

La dose d'antagoniste de la GnRH administrée (0.4 mg/ml) a été déterminée en se basant sur les travaux de Caraty et collaborateurs (2002). Une étude préliminaire d'une relation dose/réponse de l'antagoniste de la GnRH n'était pas envisageable vue la lourdeur de l'expérience (protocole d'intervention chirurgical, coût et disponibilité des animaux).

## Procédures expérimentales

Première année : Effet de l'administration (icv) de l'antagoniste de la GnRH lors de la pleine réceptivité des animaux (24 h après œstradiol) sur le comportement sexuel.

Dix brebis ROM ovariectomisées et implantées au niveau du 3<sup>ème</sup> ventricule ont été utilisées lors de deux cycles artificiels successifs (en schéma croisé) séparés de 15 jours. Les brebis ont reçu de la progestérone sous forme de CIDR pendant 12 jours. Vingt quatre heures après le retrait de la progestérone, les brebis ont reçu un implant d'œstradiol de 3 cm pendant 6 heures, dose connue pour induire le comportement de réceptivité sans induire une augmentation significative de LH chez cette race (cf article1). Au moment de la pleine réceptivité (24 heures après la pose d'implant œstradiol) l'antagoniste de la GnRH ou le solvant ont été administrés par voie icv pendant 12 heures (Figure 21A). Cette durée a été choisie en se basant sur les résultats des travaux de Caraty *et al.* (2002) chez l'IF, montrant une chute significative du comportement de réceptivité induit par l'œstradiol au bout de 12 heures d'infusion icv de l'antagoniste de la GnRH.

Afin de suivre l'évolution du comportement sexuel, des tests de réceptivité ont été effectués après retrait des CIDR ainsi qu'entre 12 et 54 heures après administration d'œstradiol (Figure 21A).

Deuxième année : Effet d'une administration (icv) préalable de l'antagoniste de la GnRH à l'insertion des implants d'œstradiol sur l'expression du comportement sexuel.

Les résultats de la première année ont montré que l'infusion d'antagoniste de la GnRH au moment de la pleine réceptivité entraînait une chute significative du comportement sexuel au bout de 12 heures. Nous nous sommes posé la question du rôle potentiel de la GnRH dans l'initiation même du comportement sexuel.

Quatorze brebis ROM, ovariectomisées et implantées au niveau du 3<sup>ème</sup> ventricule, ont été utilisées lors d'un cycle artificiel. Les brebis ont reçu de la progestérone sous forme de CIDR pendant 12 jours, suivi, 24 après le retrait des CIDR, par la pose d'implant d'œstradiol (3 cm pendant 6 heures). Six heures avant l'administration de l'œstradiol, les brebis ont été soumises à une infusion icv de l'antagoniste de la GnRH (n= 8) ou du solvant (n= 7) pendant 30 heures (Figure 21B).

Afin de suivre l'évolution du comportement sexuel, des tests de réceptivité ont été effectués après retrait des CIDR ainsi qu'entre 6 et 32 heures après administration d'œstradiol comme illustré dans la Figure 21B.

Environ un mois avant le début des expérimentations (années 1 et 2), toutes les brebis ont été soumises à un premier cycle artificiel, afin de s'assurer qu'un traitement de **6 heures par 3 cm** d'œstradiol déclenchait un comportement sexuel d'intensité et de durée normales chez la totalité des brebis.

### Tests de comportement

Pour l'expérience 1, les tests de réceptivité ont été réalisés selon la méthode de Fabre-Nys et Venier (1987) décrite dans le chapitre Matériels et Méthodes.

### Analyse statistique

La réceptivité à un instant t entre les brebis contrôles et les brebis traitées à l'antagoniste de la GnRH a été comparée en utilisant le test de Mann Whitney.

## Expérience 2 : Comparaison des profils de la GnRH dans le LCR entre les deux races

### Procédure expérimentale

Neuf brebis IF et 8 brebis ROM **la première année** (automne 2006) et 10 ROM et 2 IF lors de **la deuxième année** (automne 2007), ovariectomisées et canulées au niveau du 3<sup>ème</sup> ventricule, ont été utilisées lors de cycles artificiels successifs.

Brièvement, les brebis ont été traitées pendant 12 jours par de la progestérone sous forme de CIDR, suivi, 24 heures après son retrait, par l'insertion d'implants d'œstradiol de **6 cm pendant 12 heures**, dose considérée comme liminaire pour induire le pic préovulatoire de LH chez la brebis ROM (voir Chapitre 1).

L'évolution des niveaux de GnRH dans le LCR a été déterminée sur des échantillons de LCR prélevés au niveau du 3<sup>ème</sup> ventricule (cf chapitre Matériels et Méthodes ; Figure 22) toutes les deux heures pendant 50 heures, commençant 4 heures avant la pose d'implants d'œstradiol. De même, l'évolution des niveaux plasmatiques de LH a été déterminée sur des échantillons de sang au niveau de la jugulaire effectuées toutes les deux heures pendant 36 heures commençant juste avant l'administration de l'œstradiol.

Avant le début de chacune de ces deux expérimentations, les brebis des deux races ont été soumises à un premier cycle artificiel afin de vérifier que la dose d'œstradiol utilisée (6 cm pendant 12 heures) induisait des pics de LH chez la totalité de brebis IF et seulement chez une faible proportion des brebis ROM.

### Dosages hormonaux

Les dosages de la LH plasmatique et de la GnRH dans le LCR ont été réalisés comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes.

### Analyse des données

Un pic de LH est défini lorsqu'au moins un point de mesure est supérieur à 10 ng/ml. Le début du pic est défini comme étant le moment où les niveaux plasmatiques de LH augmentent de deux fois par rapport au niveau de base (concentration de LH précédant l'administration d'œstradiol).

Les niveaux de GnRH mesurés dans le LCR étaient faibles et très variables notamment chez la brebis ROM. Ceci s'explique par le fait que la dose d'œstradiol utilisée est considérée comme liminaire pour cette race, et que les niveaux mesurés sont proches du seuil de détection du dosage. Afin de réduire cette grande variabilité observée, nous avons :

- i) calculé, pour chaque brebis, le niveau moyen de GnRH libéré sur les intervalles de temps suivants : [-4-0], [0-6], [6-12], [12-18], [18-24], [24-30], [30-36], [36-42] et [42-50],  $t_0$  étant le moment d'administration des implants d'œstradiol.
- ii) identifié, par la suite, 4 périodes en fonction de l'évolution des niveaux de GnRH :
  - [-4-0] : le niveau basal de GnRH avant la pose d'implants d'œstradiol.
  - [0-18] : les niveaux de GnRH restent constants après insertion d'implants d'œstradiol.
  - [18-36] : phase de libération du peptide « pic théorique ».
  - [36-52] : les niveaux de GnRH chutent de nouveau.

La même démarche d'analyse a été utilisée pour les brebis IF. Toutefois pour cette race, les 4 périodes sont légèrement décalées puisque chez cette race le pic de LH apparaît plutôt. Ces périodes sont les suivantes : [-4-0], [0-12], [12-24] et de [24-52].

### Analyse statistique

Pour les deux races, les niveaux de GnRH relatifs aux 4 périodes, décrites plus haut, ont été soumis à une analyse de variance avec des mesures répétées utilisant le logiciel SAS (SAS, Institut, Inc). Nous avons considéré pour cette analyse les facteurs brebis, période (temps) et année.

Pour chaque race, les niveaux moyens de GnRH par période ont été comparés en utilisant la procédure Lsmmeans du même logiciel. Le seuil de signification est fixé à 5%.

La durée de l'augmentation des niveaux de GnRH a été considérée comme étant la période pendant laquelle les niveaux du peptide mesurés sont significativement différents du niveau de base.

## Résultats

### Expérience 1 : Identification du rôle de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel chez la brebis ROM

Première année : Effet de l'administration (icv) de l'antagoniste de la GnRH lors de la pleine réceptivité des animaux (24 h après œstradiol) sur le comportement sexuel.

Toutes les brebis ROM ont présenté un comportement sexuel en réponse à la dose d'œstradiol appliquée. L'index de réceptivité était de 100 % chez tous les animaux 24 heures après la pose des implants d'œstradiol (Figure 23).

Au bout de 12 heures d'administration de l'antagoniste de la GnRH, le comportement sexuel diminue significativement comparé au lot contrôle ( $P < 0.05$  ; Figure 23). A l'opposé, 12 heures après l'arrêt de l'infusion de l'antagoniste de la GnRH, l'index de réceptivité ré-augmente significativement ( $p < 0.05$ ), il n'est alors pas différent de celui du lot contrôle.

## Deuxième année : Effet d'une administration (icv) préalable de l'antagoniste de la GnRH à l'insertion des implants d'œstradiol sur l'expression du comportement sexuel.

Quatre brebis du lot recevant l'antagoniste de la GnRH et 2 brebis du lot contrôles n'ont pas manifesté de comportement de réceptivité en réponse à la dose d'œstradiol appliquée (Figures 24 B et C).

Pour les femelles qui ont présenté un comportement d'œstrus, aucune différence dans la latence d'apparition du comportement sexuel n'a été observée entre les brebis traitées par l'antagoniste et les brebis contrôles (respectivement  $10.25 \pm 1.2$  heures et  $11 \pm 1.1$  heures après la pose des implants d'œstradiol, Figure 24 A).

Parmi les 4 brebis traitées avec l'antagoniste de la GnRH, et qui ont présenté un comportement d'œstrus, 3 brebis (48531-48519-48003) étaient en pleine réceptivité, avec un IR de 80% 24 heures après la pose des implants d'œstradiol. La quatrième brebis (48040), elle, a présenté un comportement sexuel très raccourci (Figure 24 B)

En ce qui concerne le lot des brebis contrôles, à l'exception des 2 brebis qui n'ont pas « répondu » au traitement œstrogénique, tous les animaux étaient en pleine réceptivité, avec un  $IR \geq 80\%$ , 24 heures après l'insertion des implants d'œstradiol (Figure 24 C).

Il est à noter que la durée moyenne du comportement de réceptivité a été plus courte chez les femelles traitées par l'antagoniste de la GnRH que chez les femelles contrôles. Cette durée était en moyenne de 14 heures chez le lot antagoniste. Par contre, cette durée était supérieure à 22 heures chez le lot contrôle puisque, jusqu'au dernier test effectué, les brebis (ayant présenté un comportement sexuel) étaient encore réceptives. ( $P < 0.05$  ; Figure 24 A).

## Expérience 2 : comparaison des profils de GnRH dans le LCR entre les deux races

Pour cette expérience, notre objectif étant de regarder si **une dose modérée d'œstradiol** (6 cm/12 heures) **stimule une libération de GnRH dans le LCR**, chez la brebis **ROM**, toutes les brebis ROM qui ont présenté un pic de LH ont été exclues de notre analyse.

Lors de cette expérience, le LCR n'a pu être prélevé, durant toute l'expérimentation, que chez **7** des 9 brebis **IF** et **5** des 8 brebis **ROM** la première année, et **1** des 2 brebis **IF** et **8** des 10 brebis **ROM** la deuxième année.

### Pic préovulatoire de LH

Six brebis IF sur 7 et 2 brebis ROM sur 5, la première année, ont présenté un pic de LH en réponse à la dose d'œstradiol appliquée (6 cm pendant 12 heures). La latence d'apparition du pic préovulatoire de LH, exprimée par rapport au moment d'administration d'œstradiol, était respectivement de  $15.7 \pm 0.4$  heures et de  $20 \pm 0.9$  heures respectivement chez les brebis IF et ROM.

Lors de la deuxième année, la seule brebis IF utilisée a répondu au traitement et a présenté un pic préovulatoire de LH, 16 heures après l'insertion des implants d'œstradiol. Deux brebis ROM ont également présenté un pic préovulatoire de LH, 22 heures après la pose des implants d'œstradiol.

### Evolution des niveaux de GnRH dans le LCR

Un pic de GnRH dans le LCR a été observé chez la quasi totalité des brebis qui ont présenté un pic de LH dans le plasma et ce pour les deux années.

**Chez les brebis ROM**, les profils de GnRH obtenus présentent une grande variabilité en termes de concentrations d'une brebis à l'autre ainsi qu'au cours du temps chez le même animal. Néanmoins, l'analyse statistique, sur les périodes de temps définies, montre une **augmentation significative ( $p < 0.05$ ) des niveaux de GnRH** autour du moment théorique du pic de LH (entre 18 et 20 heures après l'administration d'œstradiol) par comparaison au niveau basal ([-4- 0] heures) ou avec celui qui le précède ([0-18] heures) **chez les brebis ne présentant pas de pic de LH**. Cette évolution est observée lors des deux années consécutives (Figures 25 et 26 A). Les **niveaux de GnRH** demeurent par la suite **significativement élevés entre 18 et 36 heures**. La durée moyenne de cette augmentation est de l'ordre de 18 heures.

**Chez les brebis IF**, une nette augmentation des niveaux de GnRH dans le LCR a été observée entre 12 et 30 heures après œstradiol. Cette augmentation coïncide avec le moment du pic préovulatoire de LH et elle intervient plus tôt par comparaison à celle observée chez la brebis ROM. La durée de cette augmentation est également de l'ordre de 18 heures chez l'IF (Figures 25 et 26 B).

Lors de ces expériences, quelques profils individuels de GnRH sont particulièrement intéressants (Figure 27). Par exemple, chez la brebis ROM n°48021 (première année) on observe la présence d'un pic de GnRH au niveau du LCR qui n'est associé à aucune augmentation des niveaux de LH dans la circulation générale. De même, les brebis 2 et 3 (deuxième année) présentent des pics de GnRH dans le LCR, sans réponse hypophysaire très claire.

## Discussion

Ces expérimentations nous ont permis de montrer que i) le comportement sexuel chute fortement sous l'effet de l'administration d'un antagoniste de la GnRH, au moment de la pleine réceptivité, ii) l'administration de l'antagoniste de la GnRH avant le traitement œstrogénique ne semble pas bloquer l'induction du comportement sexuel et, iii) chez la brebis ROM, des faibles doses d'œstradiol sont capables de stimuler une libération de GnRH dans le LCR sans augmentation nette de la sécrétion de LH dans la circulation générale.

La GnRH peut jouer le rôle d'un neurotransmetteur dans le cerveau. Ce rôle a été bien mis en évidence chez les amphibiens (Jan et Jan, 1983), par contre, il est beaucoup moins bien défini dans le cerveau des mammifères. La seule fonction identifiée de ce peptide dans le système nerveux central est en effet le contrôle du comportement sexuel (Sakuma, 2002). Ce rôle a été démontré chez de nombreuses espèces comme le rat (Moss et McCann, 1973; Pfaff, 1973), le singe (Kendrick et Dixson, 1985), les oiseaux (Cheng, 1977; Bentley *et al.*, 2006). Chez la brebis IF ovariectomisée et traitée selon le modèle d'induction du pic préovulatoire de GnRH/LH, l'administration dans le LCR d'antagoniste de la GnRH entraîne une diminution significative de la réceptivité après le retrait de l'œstradiol (Caraty *et al.*, 2002). Par contre aucun effet de l'antagoniste sur le comportement de réceptivité n'a été observé en présence de l'œstradiol. Ces auteurs concluent qu'il existe une action séquentielle de l'œstradiol et de la GnRH dans le contrôle du comportement de réceptivité chez la brebis. Les travaux rapportés dans ce Chapitre sont en complet accord avec cette conclusion. Ils montrent une implication de la GnRH dans la régulation de la réceptivité chez la brebis ROM.

Ainsi, lorsque l'antagoniste de la GnRH est administré au moment de la pleine réceptivité, on observe une diminution très nette du comportement sexuel. Chez cette race, l'induction du comportement sexuel peut être totalement dissociée de celle du pic préovulatoire de LH. En conséquence, nos résultats suggèrent que pour la dose d'œstradiol appliquée, malgré l'absence de pic de LH, il existe une stimulation de la libération de GnRH qui intervient dans les mécanismes de régulation du comportement sexuel. Il est également intéressant de noter que 12 heures après l'arrêt de l'infusion de l'antagoniste de la GnRH, l'index de réceptivité des brebis traitées retourne à un niveau comparable à celui des brebis contrôles. Cette ré-augmentation de l'index de réceptivité, bien que transitoire, puisque proche de la fin du comportement sexuel, conforte cette hypothèse d'un rôle de la GnRH endogène dans le maintien du comportement de réceptivité.

La latence nécessaire (environ 12 heures) pour observer l'effet inhibiteur de l'antagoniste de la GnRH sur le comportement sexuel est assez surprenante en regard des effets rapides observés avec ce type de molécule sur la libération *in vivo* ou *in vitro* de la sécrétion de LH (Ferland *et al.*, 1976; Deghenghi *et al.*, 1993). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées. Premièrement il est possible que la dose administrée soit faible (débit de l'infusion, concentration du peptide) et qu'une concentration progressive de cette molécule dans le LCR soit nécessaire pour atteindre le seuil critique à un effet de cette molécule. Malheureusement, aucune étude préalable de type « dose/réponse » n'a été réalisée pour des problèmes de coût et de difficulté de réalisation. Deuxièmement on ne peut exclure qu'il faille un certain délai pour que la molécule puisse pénétrer dans le tissu et atteindre ses sites d'action (récepteurs). Différents auteurs ont mis en évidence un passage rapide de la majorité des molécules de petites tailles véhiculées par le LCR telles que le sucrose, les acides aminées ou encore la mélatonine (Fenstermacher et Kaye, 1988; Proescholdt *et al.*, 2000; Legros, 2007). Il est à noter cependant que la distance de diffusion à partir des ventricules est très variable en fonction des molécules. Selon Fenstermacher et Kaye (1988), plus une molécule est efficace et interagit avec les structures cérébrales moins sa distance de pénétration dans le cerveau sera grande. Néanmoins, ceci dépend de la molécule, de l'abondance et la distribution de ses récepteurs au niveau du système nerveux (par exemple sucrose, médicaments...). Des études plus poussées pour identifier les cibles et la distance de diffusion de l'antagoniste de la GnRH sont désormais nécessaires pour éclaircir ce point. En effet, les cellules qui portent des récepteurs à la GnRH sont localisées dans diverses régions de l'encéphale qui sont par

ailleurs plus ou moins éloignées du système ventriculaire (APO, ARC, HVM, hippocampe, amygdale, substance grise mésencéphalique).

Nos données (année 1) suggèrent également une latence de 12 heures, après l'arrêt de l'administration de l'antagoniste, pour voir ses effets inhibiteurs sur la réceptivité disparaître. Cette latence correspond en réalité à l'intervalle entre deux tests comportementaux effectués. Il est vraisemblable, qu'elle soit plus courte (de l'ordre de 4 à 6 heures peut être), mais ceci reste à confirmer. Ce délai met néanmoins en question la durée de vie ainsi que l'affinité de l'antagoniste aux récepteurs centraux de la GnRH. Chez le rat, cette dernière semble être légèrement inférieure à celle des récepteurs hypophysaires (Jennes *et al.*, 1988). Chez le mouton, aucune donnée n'est disponible sur ce sujet. Des études de liaison utilisant des analogues radioactifs et des techniques d'autoradiographie permettraient de les déterminer.

Dans ce travail, nous avons également essayé de mieux préciser la part respective de l'œstradiol et de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel. En d'autres termes : est ce que l'œstradiol et la GnRH agissent en synergie ou indépendamment l'un de l'autre pour induire le comportement d'œstrus chez les brebis ROM ? Parmi les 8 brebis (Expérience 1, année 2), recevant l'antagoniste de la GnRH avant l'administration des implants d'œstradiol, seulement 4 brebis ont présenté un comportement sexuel. Vingt quatre heures après l'insertion des implants d'œstradiol, leur niveau de réceptivité était supérieur ou égale à 80 %, et la latence du comportement sexuel était comparable à celle observée lors des expérimentations précédentes (article 1). Ceci suggère fortement que l'œstradiol induit le comportement d'œstrus indépendamment de l'activation des neurones à GnRH. Il faut néanmoins remarquer que la moitié des brebis n'ont pas exprimé un comportement de réceptivité en réponse à l'insertion d'œstradiol et ceci est également le cas chez deux brebis contrôles. Il est difficile de relier cette absence de comportement sexuel à un effet de l'antagoniste. Ce résultat est surprenant puisque toutes les brebis avaient manifesté un comportement de réceptivité « normal », en réponse à la même dose d'œstradiol lors du cycle artificiel contrôle. Il faut toutefois signaler, qu'à la suite de la canulation du 3<sup>ème</sup> ventricule, nous nous sommes trouvés confrontés à des problèmes sanitaires qui nous conduits à mettre les brebis sous traitement d'antibiotiques deux semaines avant le début de l'expérience. Le signal œstrogénique appliqué étant liminaire pour déclencher le comportement sexuel, il est possible que ces molécules aient interféré

dans la lecture du signal œstrogénique chez quelques brebis (réduction de la synthèse des récepteurs...). En conséquence, et compte tenu du faible effectif de notre expérience, il n'est pas possible de conclure de façon certaine quant à l'absence d'un rôle de la GnRH dans l'initiation du comportement sexuel chez la brebis, bien que cette éventualité soit peu probable. Il est donc essentiel de répéter cette expérience avec un effectif plus important d'animaux.

Dans notre étude, l'infusion d'antagoniste de la GnRH ne semble pas empêcher l'expression du comportement de réceptivité induit par l'œstradiol chez la brebis ROM mais entraîne un raccourcissement de sa durée. Ce résultat confirme l'action séquentielle de ces deux hormones dans le contrôle du comportement sexuel chez cette race, comme déjà observé chez la brebis IF (Caraty *et al.* 2002). Chez de nombreuses espèces, le comportement sexuel peut être induit à la suite à une administration centrale de GnRH. Cet effet facilitateur de la GnRH a également été décrit chez la brebis IF ovariectomisée et traitée avec un faible signal œstrogénique (3cm pendant 3 heures). Néanmoins, le comportement de réceptivité induit était faible. Par ailleurs, aucun effet de l'antagoniste de la GnRH sur la réceptivité des brebis n'a été observé en présence d'œstradiol (Caraty *et al.*, 2002). Enfin, les souris hpg (souris dépourvues de GnRH) traitées par l'œstradiol et la progestérone présente un comportement sexuel normal (Ward et Charlton, 1981). L'ensemble de ces résultats démontre que la GnRH n'est pas indispensable pour l'expression du comportement sexuel.

Nos résultats de dosage de la GnRH dans le LCR montrent que toutes les brebis qui ont présenté un pic préovulatoire de LH, ont présenté un pic de GnRH dans le LCR. Chez les brebis ROM, la majorité des brebis n'a pas présenté de pic préovulatoire de LH. Ceci est en accord avec nos résultats antérieurs obtenus, chez cette race, avec cette même dose liminaire d'œstradiol (cf article 1). Une grande variabilité des niveaux de GnRH a été notée entre les brebis (avec des niveaux de base parfois élevés). Néanmoins, l'analyse par période de temps, nous a permis d'identifier une nette augmentation des niveaux de GnRH, 18 heures en moyenne après la pose des implants d'œstradiol. Cette augmentation, chez la brebis ROM, est faible et décalée dans le temps par comparaison à celle observée chez les IF (Figure 25). Une brebis (48021) avait un pic de GnRH dans le LCR qui n'est pas associé à un pic de LH dans le sang jugulaire. La présence d'un pic de GnRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire qui n'est pas accompagné d'un pic LH dans le sang jugulaire

avaient été aussi observée chez une ou deux brebis de la race Suffolk par Evans *et al.* (1997). Ces observations indiquent clairement que l'œstradiol est capable de stimuler une libération de GnRH indépendamment de celle de la LH. Ce résultat confirme donc l'existence d'une différence de sensibilité à l'œstradiol entre l'hypophyse et l'hypothalamus entre les brebis.

Concernant ces résultats de mesure de la GnRH, quelques points techniques doivent être abordés. Il convient en effet de signaler que nous avons eu beaucoup de difficultés pour prélever le LCR au niveau du 3<sup>ème</sup> ventricule chez les brebis ROM la première comme la deuxième année. Tout d'abord, la mise en place chirurgicale de la canule, elle-même a été plus difficile à réaliser chez cette race. Ceci étant lié en grande partie à l'absence de « remontée » de LCR dans la canule chez les brebis ROM. Cette observation semble vraisemblablement indiquer une pression intra-ventriculaire du LCR plus faible chez ce génotype (la ROM). D'autre part, à plusieurs reprises nous avons été contraints d'arrêter les prélèvements de LCR en plein milieu des expérimentations, faute de présence de LCR dans la canule. Nous formulons comme hypothèse que la pression mais également le taux de renouvellement du LCR dans les ventricules doit être largement inférieur chez la brebis ROM que chez la brebis IF. En conséquence la vitesse d'aspiration de la pompe utilisée, qui ne posait aucun problème chez la brebis IF devait être supérieure aux taux de renouvellement du LCR chez certaines brebis ROM. Enfin les faibles concentrations de GnRH dans le LCR, souvent voisines du seuil de sensibilité de la méthode de dosage, ne permettent pas chez certains animaux d'observer une évolution très claire de sa libération. Des prélèvements de LCR plus rapprochés, toutes les 30 min par exemple, auraient permis de mieux préciser les profils de sécrétion de la GnRH. Toutefois, dans ce cas, l'aspect limitant des petits volumes de LCR récupérés n'aurait pas permis de réaliser plusieurs dosages sur le même échantillon. Il faut rappeler que les concentrations de GnRH dans le LCR sont très variables et dépendent pour une grande part de la place de la canule dans le système ventriculaire. Ainsi, plus l'extrémité de la canule est proche du *recessus* infundibulaire, plus les concentrations de GnRH présentes dans le LCR sont importantes (Caraty et Skinner, 2008).

Un rôle de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel semble maintenant bien établi chez beaucoup d'espèces mais la forme du peptide impliquée dans ce mécanisme reste controversée, comme mentionné dans l'Introduction. La présence d'autres formes de GnRH (*chicken*-GnRH appelée GnRH-II, *lamprey*-GnRH appelée IGnRH-III et

*salmon*-GnRH appelée sGnRH) a été décrite chez les mammifères (Rissman *et al.*, 1995; Kah *et al.*, 2007). Par ailleurs, un rôle facilitateur de la GnRH-II dans le contrôle du comportement sexuel a été décrit chez la musaraigne (Kauffman et Rissman, 2004; Kauffman *et al.*, 2005), et le singe (Barnett *et al.*, 2006). La présence de ces formes, GnRH-II et lGnRH-III, a également été décrite chez l'Homme, le rat et les bovins (Yahalom *et al.*, 1999). Un travail entrepris dans notre laboratoire n'a pas mis en évidence ces différentes formes dans le cerveau des ovins (Caraty et Locatelli, données personnelles). Par ailleurs, une analyse biochimique plus récente montre que la GnRH-II n'est pas, non plus présente dans le cerveau de rat (Gautron *et al.*, 2005). L'existence de cette forme, décrite précédemment, pourrait être la conséquence d'artéfact de purification.

Une autre forme de GnRH existe dans le cerveau de nombreuses espèces, c'est l'Hydroxyproline<sup>9</sup>GnRH (Gautron *et al.*, 1992). Cette molécule qui résulte d'une modification post-traductionnelle de la GnRH, présente des sites de liaison spécifique de son fragment c-terminal dans l'hippocampe et le bulbe olfactif chez le rat (Gautron *et al.*, 1993). La présence de cette molécule a été démontrée dans le sang porte hypophysaire (Caraty *et al.*, 1993a) comme dans le LCR (Caraty, données non publiées). Elle reste un candidat potentiel dans le contrôle du comportement sexuel. Concernant la GnRH, seul le fragment correspondant aux 6 derniers acides aminés (Ac-LH-RH<sup>5-10</sup>) est actif, il induit le comportement de lordose (réceptivité) chez des rattes ovariectomisée et traitées aux stéroïdes gonadiques (Dudley et Moss, 1987; 1991). Il serait intéressant de tester l'action de ce fragment chez la brebis. De plus, il a été suggéré que le LCR serait une voie de communication (non synaptique), qui permettrait à la GnRH comme aux molécules apparentées (fragments, Hydroxyproline<sup>9</sup>GnRH) d'atteindre, diverse régions cérébrales, y compris celles contrôlant le comportement sexuel (NVM, ARC...). Les récepteurs à la GnRH ont été localisés dans de nombreuses aires cérébrales (voir Introduction) telles que l'hippocampe ou la substance grise mésencéphalique, impliquées dans la génération du comportement chez les rongeurs (Jennes et Conn, 1994; Segrillo *et al.*, 1996). Récemment, la présence des récepteurs à la GnRH dans la substance grise mésencéphalique a été montrée chez la brebis (Albertson *et al.*, 2008). Comme il n'existe aucune innervation directe de cette zone et de l'hippocampe par les fibres à GnRH, le LCR pourrait ainsi représenté être la voie d'accès du peptide à ces structures.

L'origine de la GnRH dans le LCR reste à ce jour mal connue. Récemment, Caraty et Skinner (2008) ont montré que la majorité de la GnRH du LCR provient du *recessus* infundibulaire situé au voisinage de l'éminence médiane. Cependant, quelques neurones à

GnRH ne projettent pas à ce niveau (Lehman *et al.*, 1986; Silverman *et al.*, 1987; Caldani *et al.*, 1988) et de nombreuses fibres à GnRH sont observées dans différentes aires cérébrales (Caldani, 1986). En conséquence, les taux de GnRH mesurés dans le LCR ne reflètent vraisemblablement pas les niveaux réels du peptide dans le cerveau. En d'autres termes on peut émettre l'hypothèse que sous l'action de l'œstradiol, la GnRH libérée par les fibres stimule certaines structures du cerveau impliquées dans le contrôle du comportement sexuel. Cette action ne serait pas nécessairement associée à une augmentation notable du peptide dans le LCR.

En résumé, ces expériences effectuées principalement chez la brebis ROM, indiquent qu'un faible signal œstrogénique est capable de stimuler une libération de GnRH dans le LCR sans être associée à une libération préovulatoire de LH dans le sang jugulaire. Cette activation des neurones à GnRH par l'œstradiol semble participer au maintien du comportement sexuel induit par le stéroïde. Néanmoins, il paraît évident que la grande sensibilité à l'œstradiol des brebis ROM dans l'induction du comportement sexuel apparaît essentiellement liée à un seuil de réponse au stéroïde qui est très bas.

## **Chapitre 4**

### **Mécanismes neurobiologiques sous jacent à la différence de sensibilité à l'œstradiol entre les brebis IF et ROM**

# Introduction

Chez la brebis, le comportement sexuel et le pic préovulatoire sont deux événements étroitement liés dans le temps. Chez cette espèce, une action séquentielle de la progestérone et de l'œstradiol est essentielle pour induire et déterminer le moment où ces deux événements apparaissent. L'effet de ces deux stéroïdes pour induire le pic de LH et le comportement sexuel s'exerce principalement au travers d'une action au niveau du système nerveux central résultant de leur liaison à des récepteurs nucléaires. Un changement de la densité des récepteurs à l'œstradiol (RE), dans différentes régions de l'encéphale, au cours du cycle œstral et en fonction de l'état physiologique, a été décrit chez la brebis (Blache *et al.*, 1994; Meurisse *et al.*, 2005), la ratte (cas des récepteurs à la progestérone : Blaustein et Olster, 1989). Chez la brebis, l'HMB est un site majeur d'action de l'œstradiol, pour induire le pic préovulatoire de LH et le comportement sexuel (Blache *et al.*, 1991; Caraty *et al.*, 1998). Cependant, il est admis que l'HMB représente un seul des sites contenant les RE qui régulent ces deux événements. Par ailleurs, chez la brebis comme chez la ratte, les structures qui participent à l'induction du comportement sexuel ne sont pas forcément les mêmes que celles nécessaires pour le pic préovulatoire de LH (Pfaff, 1980).

Précédemment (Chapitres 1 et 3), nous avons montré qu'un signal œstrogénique de faible intensité (3 cm pendant 6 heures) est capable d'induire le comportement sexuel, en l'absence de pic préovulatoire de LH, chez les brebis ROM, alors qu'aucune réponse à ce traitement n'était observée chez les brebis IF. Nous posons l'hypothèse que cette forte sensibilité des brebis ROM à l'œstradiol pour induire le comportement sexuel, en comparaison des brebis IF, résulterait d'une différence du nombre ou de la densité des récepteurs à l'œstradiol dans certaines structures du système nerveux central. En utilisant des techniques d'immunohistochimie, notre objectif, dans ce dernier Chapitre, a été d'aborder, par une étude comparative entre IF et ROM, les mécanismes neurobiologiques sous-jacents à la différence de sensibilité à l'œstradiol observée entre les brebis des deux races. Nous avons d'abord comparé le nombre et la distribution des récepteurs à l'œstradiol du type  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) présents dans l'APO et l'HMB, chez les brebis IF et ROM ; et ceci à deux stades physiologiques différents : sous œstradiol et sous progestérone. De plus, la

dissociation de l'induction du pic préovulatoire de LH et du comportement sexuel observée chez la brebis ROM, avec un faible signal œstrogénique (3 cm/6 heures) suggère que les seuils d'activation des circuits mis en jeu sont également très différents entre les deux races de brebis. Ainsi, nous avons tenté, dans un second temps, d'identifier les centres activés dans le contrôle du comportement d'œstrus, en utilisant la protéine FOS comme marqueur de l'activité cellulaire. Il s'agit d'un proto-oncogène ubiquitaire qui régule la transcription, et qui s'exprime sous l'influence de signaux extracellulaires : dans notre cas l'œstradiol et la progestérone).

## Matériels et Méthodes

### Animaux et protocoles expérimentaux

Des brebis IF et ROM (n= 12, de chaque race) ont été ovariectomisées et soumises à deux cycles artificiels successifs séparés de 15 jours.

Lors du premier cycle, les brebis ont reçu de la progestérone sous forme de CIDR pendant 12 jours suivi 24 heures après son retrait, par l'insertion sc d'implants d'œstradiol: 3 cm pendant 6 heures. Lors de ce premier cycle, le comportement de réceptivité des brebis a été testé après le retrait de la progestérone, 6 et 24 heures après l'insertion des implants d'œstradiol, afin de vérifier que ce traitement induisait bien le comportement sexuel chez toutes les brebis ROM et non chez les brebis IF.

A la fin de ce premier cycle, les brebis des deux races ont été réparties de façon randomisée en deux lots

- Lot œstradiol: 6 IF et 6 ROM.
- Lot progestérone: 6 IF et 6 ROM.

Les brebis des deux lots ont ensuite été soumises à un second cycle artificiel comme suit :

**Lot œstradiol** : 12 jours de progestérone (1 CIDR) suivis, 24 heures après son retrait par l'administration d'œstradiol sous forme d'implant sc : 3 cm pendant 6 heures. Afin que tous les animaux soient abattus dans les mêmes conditions de traitement, la pose des implants d'œstradiol a été décalée d'une demi-heure par paire d'animaux. Les traitements hormonaux ont été effectués sur deux jours : 12 brebis par jour, 6 brebis de chaque lot dont 3 de chaque race).

**Lot progestérone** : 1 CIDR a été appliqué à chaque brebis pendant 13 jours. Afin de maintenir un niveau de progestérone de l'ordre de 2ng/ml, il a été changé deux jours avant l'abattage.

Des prises de sang pour doser l'œstradiol et la progestérone ont été effectuées chez les brebis des 2 lots juste avant l'abattage.

## Abattage des animaux

Les animaux ont reçu une injection de 20 ml d'anesthésique (Barbiturique : 1g de Nesdonal dans 20 ml d'eau distillée) et une injection de 5 ml d'héparine. Alternativement (toutes les demi-heures) deux brebis du lot œstradiol et deux du lot progestérone ont été décapitées. Les abattages se sont déroulés sur deux jours, à la même heure. Les brebis n'ont été isolées à aucun moment pour éviter tout stress. Les abattages ont été réalisés à l'abattoir de la station de Physiologie de la Reproduction et des Comportements de l'INRA de Nouzilly par un boucher agréementé (Agrément Européen en 1997 N° agrément C37-175-2).

## Perfusion des têtes et prélèvement des cerveaux

Juste après décapitation, les têtes ont été perfusées via les deux carotides avec 2 litres de Nitrite de Sodium (0,1% à 37°C) suivi de 4 litres de para-formaldéhyde 4% dans du tampon phosphate 0.1M, pH 7.4 (froid, 6-8°C).

Après ouverture de la boîte crânienne, les cerveaux ont été post-fixés durant 24 heures dans le même fixateur. Ils ont ensuite été transférés dans une solution composée de 15% de saccharose et 0.1% d'Azoture de Sodium dans du tampon phosphate 0.1 M, pH 7.4 à 4°C.

## Coupe des cerveaux

Les cerveaux ont été découpés dans le plan frontal, entre le chiasma optique et les corps mamillaires, en plusieurs blocs de 15 mm d'épaisseur. Le bloc de tissu contenant l'hypothalamus (Figure 28) a été fixé sur la platine d'un microtome à congélation, puis congelé en le couvrant de neige carbonique. La température de coupe est comprise entre -20°C et -25°C. Des coupes frontales, flottantes, sériées de 40 µm d'épaisseur ont été récupérées dans des boîtes à 24 puits. Chaque coupe a été placée dans 1 ml de tampon PBS

0.1M, pH 7.4, contenant 0.1% d'Azoture de Sodium, (PBS-A), et conservées à 4°C.

## Coloration au violet de Crésyl

Pour une identification plus aisée des structures neuro-anatomique, une série de coupes a été colorée au violet de Crésyl. Ce dernier est un colorant qui se fixe sur les acides nucléiques, ce qui permet de colorer intensément les noyaux et moins fortement le cytoplasme.

Pour chaque brebis, une coupe sur 10 a été étalée sur une lame de verre gélatinée, puis séchée à l'étuve à 37 °C. Ces coupes ont été par la suite colorées dans une solution de violet de Crésyl. Pour obtenir cette coloration les coupes sont successivement incubées dans:

- Un mélange de 50% de chloroforme et 50% d'alcool 100° pendant 30 minutes. Cette étape facilite la pénétration du colorant dans les cellules, suivi d'un bain d'eau distillée pendant 1 minute qui permet de réhydrater les coupes.
- Un bain de violet de Crésyl (1g/l) contenant 3ml/l d'acide acétique (à 10%) pendant 5 à 15 minutes, en fonction de l'intensité de coloration souhaitée.
- Trois bains d'alcool à 95° et trois bains d'alcool à 100° pour différencier la coloration et déshydrater la coupe. L'alcool permet de retirer le colorant des structures pour lesquelles il a peu d'affinité (différenciation). La durée de passage dans ces différents bains n'est pas fixe ; elle dépend de l'intensité de la coloration souhaitée.
- Trois bains de toluène de 5 minutes, pour éliminer l'alcool, éclaircir et augmenter le contraste de la coloration. Après le dernier bain de toluène, les coupes sont recouvertes de Depex® et d'une lamelle de verre.

## Etude immunohistochimique

### Procédure expérimentale

Etant donné que des variations dans l'intensité des réactions immunohistochimiques (IHC) peuvent exister même si les conditions d'incubation sont rigoureusement contrôlées; nous avons utilisé un protocole en série, pour effectuer les traitements IHC. Les 24 brebis ont donc été réparties en 4 séries :

**Série 1** : toutes les coupes (4 niveaux de coupes, Planche 1), provenant de toutes les femelles (12 IF et 12 ROM) et contenant l'APO, le noyau supra-optique (NSO), le noyau

supra-chiasmatique (NSC) et le septum latéral (SL).

**Séries 2, 3 et 4 :** vu le grand nombre de coupes par brebis et le nombre relativement important de brebis (24 brebis), il était difficile de traiter toutes les coupes contenant l'HMB lors d'une seule série de marquage immunohistochimique. Nous avons ainsi choisi de les diviser en 3 séries. Ainsi, pour chacune de ces 3 séries, toutes les coupes (10 niveaux de coupes) contenant l'HMB (de l'AHA jusqu'au hypothalamus dorsomédian (HDM. Planche 2), provenant de 2 brebis de chaque race (IF et ROM) et de chaque lot (œstradiol et progestérone) ont été traitées simultanément.

Pour les 4 séries de marquage, des coupes adjacentes à celles colorées au violet de Crésyl ont été utilisées pour les marquages des RE $\alpha$  et de la protéine FOS.

### Marquage immunohistochimique des récepteurs à l'œstradiol ER

Les RE $\alpha$  ont été détectés en utilisant un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la partie N-terminale du récepteur à l'œstradiol humain (ID5, fourni par G. Delsol, Toulouse, France). La spécificité de cet anticorps a déjà été décrite chez le mouton (Goubillon *et al.*, 1999)

Le traitement immunohistochimique a été réalisé sur des coupes sériées (une coupe sur 10). Les coupes ont été mises en présence de protéines sériques de mouton pendant 30 min (sérum de mouton dilué au 1/15<sup>ème</sup> dans du PBS- 0.3 % Triton X-100 et 0.1 % d'azoture de sodium : PBS-TA) à 4°C. Ce traitement permet de saturer les sites de liaison non spécifiques et aussi de diminuer le bruit de fond. Les coupes ont ensuite été incubées pendant 2 heures dans de l'eau oxygénée (1% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans du PBS-A) à 4°C. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permet d'éliminer les peroxydases endogènes et de réduire ainsi le bruit de fond. Les coupes ont ensuite été rincées dans 3 bains de PBS de 15 min à 4°C et placées pendant 4 jours à 4°C dans une solution contenant l'anticorps primaire : anti-ER $\alpha$  (ID5), dilué au 1/20 dans du PBS-TA à 1% de BSA. A la fin de cette étape, les coupes ont été rincées dans 3 bains de PBS de 2 heures chacun, puis elles ont été incubées, pendant une nuit, dans une solution contenant un anticorps anti-souris couplé à la peroxydase diluée au 1/1000 dans du PBS. Les coupes ont ensuite été rincées dans 3 bains de PBS successifs, suivi de deux bains de Tris-HCl (50mM, pH 7.6). La révélation a été réalisée en utilisant une solution contenant 10 mg de Diaminobenzidine (DAB, Sigma), 300 mg de sulfate double d'ammonium de Nickel et 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La réaction de révélation dure environ 10 à 20

min, elle est suivie au microscope. Après révélation, les coupes ont été rincées dans 3 bains successifs de Tris-HCl de 10 minutes chacun, puis étalées sur des lames dégraissées et gélatinées, séchées à l'étuve (1 nuit), déshydratées dans des bains d'alcool et de toluène puis montées sous lamelle avec du Depex®.

## Marquage immunohistochimique de la protéine FOS

Le marquage de la protéine FOS a été réalisé sur des coupes sériées adjacentes à celles utilisées pour le marquage des RE (voir paragraphe précédent).

Pour la détection immuno-histochimique de la protéine FOS, les coupes ont été incubées dans du PBS-TA contenant du sérum normal de mouton (1/15<sup>ème</sup>) pendant 30 minutes, à température ambiante. Elles ont été ensuite placées dans une solution PBS-A à 1 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 2 heures à 4°C. Après 3 bains de rinçage, elles ont été incubées pendant 3 nuits à 4°C avec l'anticorps primaire : anticorps Polyclonal lapin anti-fos (PC38, Oncogene Science, Calbiochem, USA) dilué au 1/50 000 dans du PBS-TA, 2% BSA. Les coupes ont ensuite été rincées dans 3 bains de PBS de 30 minutes puis incubées pendant 3 heures avec le second anticorps SMAL (Sérum Mouton Anti-Lapin dilué au 1/1000, à 4°C). Elles ont été rincées de nouveau avec du PBS puis incubées, une nuit, à 4°C, dans une solution de PAP (Peroxydase anti-Peroxydase, DAKO, USA), dilué au 1/80 000 dans du PBS- 2% BSA. A la dernière étape, les coupes ont été rincées dans du PBS (3 bains de 15 minutes) puis dans du Tris-HCl 0.05M, pH 7.6 (15 minutes à 4°C) sous agitation. La réaction enzymatique de la peroxydase a été révélée dans du Tris-HCl (0.05M, pH 7.6) contenant 0.3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 mg de DAB et 0.5% de Sulfate double d'ammonium et de Nickel. Le précipité obtenu est de couleur noir. L'évolution de la réaction a été suivie sous le microscope. Les coupes ont ensuite été étalées sur des lames gélatinées, séchées à l'étuve (1 nuit à 37°C), déshydratées puis montées sous lamelle avec du Depex®.

L'anticorps primaire utilisé (PC38, Oncogene Scienc) est dirigé contre la partie N-terminale (acide aminés 4-17) du gène *c-fos*. La spécificité de l'anticorps a été testée sur des coupes adjacentes avec 1ml d'anti-fos (dilué au 1/50 000) saturé avec 1, 5, 10, et 50 ng/ml de peptide FOS (PP10, Oncogene Science, USA) pendant une nuit à +4°C.

## Analyse des marquages immunohistochimiques

### Choix des structures à analyser

Pour tous les animaux, après coloration au violet de Crésyl, toutes les coupes ont été alignées les unes par rapport aux autres, en utilisant des repères anatomiques facilement identifiables comme le chiasma optique, le fornix, le faisceau mamillo-thalamique. Cette étape nous a permis d'établir un tableau récapitulant les limites anatomiques des structures à étudier.

Nous nous sommes intéressés essentiellement aux structures antérieures de l'encéphale (partie caudale du SL, APO, NSO, NSC), ainsi que quelques noyaux de l'hypothalamus, qui jouent un rôle important dans le contrôle de la fonction de reproduction : l'AHA, le NVM, l'ARC et l'HDM.

Ces différentes structures ont été identifiées en utilisant l'Atlas de Richard (1967), les coupes colorées au violet de Crésyl, ainsi que des données neuro-anatomiques présentées dans divers travaux (Caldani, 1986; Chaillou, 2000).

Les limites de l'APO médian ont été définies en se basant sur des données anatomiques. La limite supérieure est la base de la commissure antérieure, la limite inférieure est la base du NSC, les limites latérales sont le bord du 3<sup>ème</sup> ventricule et la base du NSO. L'AHA : en largeur, il est compris entre le bord du 3<sup>ème</sup> ventricule et la base du tractus optique. Les limites du NSC, NSO, PVN, NVM, SL et l'ARC ont été définies par superposition d'une coupe adjacente colorée au violet de Crésyl, et en se basant aussi sur le marquage des RE $\alpha$ , étant donné que ce marquage délimite bien quelques régions auxquelles nous nous sommes intéressés.

### Analyse des coupes et comptage des cellules RE $\alpha$ et FOS immuno-positives

Au niveau des différentes structures, les cellules ER-ir et FOS-ir ont été comptées bilatéralement. Les cellules ER $\alpha$ -ir et FOS-ir ont été dénombrées par un système d'analyse d'image comprenant un microscope (Zeiss, Allemagne) équipé d'une platine motorisée et relié à une caméra. L'image est visualisée sur un ordinateur équipé de logiciel d'analyse d'image Mercator (Explora Nova). Ce système permet de cartographier la distribution des

cellules-ir pour chaque niveau de coupe étudié. Ainsi, pour chaque coupe analysée, on obtient une "maquette" sur laquelle sont tracés des repères anatomiques faciles à identifier (fornix, 3<sup>ème</sup> ventricule, chiasma optique ...).

Le comptage a été effectué au grossissement 20 de façon semi-automatique, après avoir défini un seuil de détection, correspondant à un niveau de gris, Figure 29). Pour chacun des deux marquages, ce seuil a été défini après une série d'essais sur plusieurs coupes provenant de différentes structures et de différentes brebis. Une fois défini, ce seuil est enregistré et utilisé à chaque comptage. Une lame servant d'étalon a été utilisée avant chaque comptage pour vérifier les réglages des différents paramètres de mesure.

Le dénombrement des cellules FOS-ir et ER-ir a été réalisé sur quatre niveaux de coupe au niveau de l'APO et dix niveaux de coupe au niveau de HMB (cf planche 1 et 2).

## Dosage de l'œstradiol et de la progestérone

L'œstradiol et la progestérone ont été dosés par RIA comme décrit dans le chapitre Matériels et Méthodes.

## Analyse statistique

Le nombre de cellules RE $\alpha$ -ir et FOS-ir par structure a été soumis à une analyse de variance à plusieurs facteurs en utilisant le logiciel SAS (SAS, Institut, Inc) suivie d'une comparaison des moyennes utilisant la procédure Lsmmeans de ce même logiciel. Nous avons tenu compte des facteurs race, traitement hormonal, jour d'abattage et série de marquage immunohistochimique.

# Résultats

## Niveaux plasmatiques d'œstradiol et de progestérone

Pour le lot œstradiol, les niveaux plasmatiques d'œstradiol, 6 heures après l'insertion d'implants de 3 cm, étaient légèrement mais significativement supérieurs chez les brebis ROM par comparaison aux brebis IF, respectivement  $5.5 \pm 0.36$  pg/ml vs  $3.7 \pm 0.3$  pg/ml, ( $P < 0.05$ ).

Pour le lot progestérone, les niveaux de progestérone n'étaient pas différents entre les brebis ROM et IF, respectivement  $2.5 \pm 0.2$  ng/ml et  $2.7 \pm 0.3$  ng/ml ( $P > 0.05$ ).

## Marquage immunohistochimique des RE $\alpha$

C'est un marquage principalement nucléaire, avec parfois une coloration du cytoplasme et des prolongements cytoplasmiques. Le marquage nucléaire est très intense : les noyaux sont noirs foncés. Cette distribution du marquage intra et extra-nucléaire (cytoplasmique) a été observée chez les deux races et ce pour les 2 types de traitement hormonal (Figure 30).

### Distribution des récepteurs à l'œstradiol

La distribution des récepteurs à l'œstradiol observée est similaire chez les deux génotypes. Les cellules RE $\alpha$ -ir sont réparties dans les zones suivantes (selon un plan rostrau-caudal ; Figure 31) :

**L'OVLT** : les cellules sont réparties dans l'ensemble de la structure (Figure 31 a).

**Le SL** : les cellules positives RE $\alpha$  sont essentiellement localisées au niveau de la partie basale du SL, à côté du ventricule latéral (Figure 31 b).

**Le BnST** : les cellules positives RE $\alpha$  sont essentiellement localisées au niveau de la partie basale du BnST, le plus souvent adjacentes à la commissure antérieure (Figure 31 c).

**L'APO** : c'est la zone de l'hypothalamus où l'on observe la densité la plus importante des RE $\alpha$ . A un niveau de coupe très rostral, les cellules RE $\alpha$ -ir se trouvent en avant du 3<sup>ème</sup> ventricule, puis elles sont distribuées de part et d'autre du 3<sup>ème</sup> ventricule tout au long de cette structure (Figure 31 d).

**Le NSO** : la forme des cellules RE $\alpha$ -ir de ce noyau est particulière ; on observe de grosses cellules rondes qui appartiennent au système magnocellulaire. Le marquage est dense, le bruit de fond dans cette zone est très important (Figure 31 e).

**Le NPV** : contient un nombre faible de cellules immuno-réactives RE $\alpha$ . Deux populations de cellules sont observées dans ce noyau. Des cellules qui rappellent celles observées au niveau du NSO (système magnocellulaire) et d'autres appartenant au système parvocellulaire. Dans cette structure le marquage est essentiellement nucléaire (Figure 31 f).

**Le NSC** : des cellules de petite taille, réparties à l'intérieur de toute la structure.

**L'AHA** : quelques cellules-ir ont été rencontrées dans cette aire de l'hypothalamus. Les cellules RE $\alpha$ -ir, dans cette structure, sont le plus souvent distribuées au bord du 3<sup>ème</sup> ventricule.

**Le NVM** : ce noyau est facilement identifiable à l'œil nu avec ce type de marquage. Les cellules ER $\alpha$ -ir sont essentiellement localisées dans la partie ventrale et latérale de ce noyau. Elles forment un croissant partant du dessous du fornix et allant jusqu'au noyau ARC. Une fine ligne (visible à l'œil) sépare le NVM de l'ARC (Figure 31 g). Quelques cellules marquées sont localisées à proximité du 3<sup>ème</sup> ventricule.

**L'ARC** : cette structure présente un nombre très important de cellules ER $\alpha$ -ir, qui y sont réparties d'une façon uniforme et homogène. Elles sont généralement rondes (Figure 31 h).

**Le HDM** : quelques cellules sont réparties tout au long du 3<sup>ème</sup> ventricule et en dessous du récessus supra-mamillaire.

### Effet de la race et de l'état hormonal sur le nombre de cellules marquées

La distribution et le nombre de cellules positives RE $\alpha$  ont été étudiés au niveau du **SL**, de **l'APO**, du **NVM** et de **l'ARC**. Ces zones ont été choisies en raison du rôle important qu'elles exercent dans le contrôle du comportement sexuel et du pic préovulatoire de LH.

**Au niveau de l'APO** : c'est dans cette structure que l'on observe le nombre le plus élevé de cellules RE $\alpha$ -ir positives chez les deux races. Aucune différence dans le nombre total de cellules marquées n'a été trouvée entre les races comme entre les traitements (sous P ou E) (Figure 32).

**Au niveau du NVM** : le nombre de cellules RE $\alpha$ -ir varie en fonction de la race (analyse globale  $P < 0.01$ ). Il est plus élevé chez les brebis IF que chez les ROM quel que soit le traitement hormonal (Figure 33A). En revanche, pour chacune des deux races, il n'existe aucune variation du nombre de cellules RE-ir en fonction du traitement (P ou E). Néanmoins une tendance d'un nombre plus élevé de cellules marquées est observée sous traitement progestérone chez les IF par comparaison aux animaux du groupe œstradiol, mais la différence n'atteint pas le seuil de signification. A l'intérieur de cette structure le nombre de cellules RE-ir le plus élevé est observé au niveau de la partie ventro-latérale. Une analyse par niveau de coupe (rostro-caudale) montre que le plus grand nombre de RE

est localisé au niveau des coupes médianes (niveau de coupe 4 et 5, Figure 33B). Là encore il n'existe aucune différence entre les deux traitements hormonaux.

**Au niveau de l'ARC** : un grand nombre de cellules positives RE $\alpha$  est dénombré chez les deux races. Toutefois, ce nombre est plus élevé chez l'IF que chez les ROM ( $P < 0.05$  ; Figure 34A) quel que soit le traitement hormonal. A l'intérieur de chaque race, le nombre de cellules RE $\alpha$ -ir est plus élevé pour le groupe progestérone que pour le groupe œstradiol, et ceci pour tous les niveaux de coupes étudiés ( $P < 0.05$  ; Figure 34B).

**Au niveau du SL** : cette structure présente un nombre de cellules RE $\alpha$  faible comparé aux structures citées plus haut. Dans cette structure, une tendance d'un nombre plus élevé de cellules RE $\alpha$ -ir chez les IF par comparaison aux brebis ROM a été observé ( $P=0.05$ ). Chez les brebis ROM, le nombre de cellules positives au RE $\alpha$  est plus important sous progestérone que sous œstradiol ( $p < 0.05$ ) alors qu'il n'est pas différent chez les brebis IF.

## Marquage immuno-histochimique de la protéine FOS

La protéine FOS est une protéine nucléaire qui joue le rôle d'un facteur de transcription dans la cellule. Le marquage observé sur les coupes est un marquage nucléaire qui apparaît comme un point arrondi dont la taille est variable en fonction de celle de la cellule. Par ailleurs, le marquage FOS présente une large gamme de coloration allant du gris clair au noir (Figure 35).

La spécificité de l'anticorps a été testée dans les conditions d'utilisation et les tests d'inhibition ont confirmé la spécificité du marquage (Figure 36).

### Distribution du marquage

L'observation des coupes au microscope montre que le marquage Fos n'est pas toujours homogène au sein d'un même lot, certaines femelles ont un marquage intense et d'autres très peu de marquage.

**Au niveau de l'APO** : les cellules marquées FOS sont essentiellement regroupées autour du 3<sup>ème</sup> ventricule. Au niveau du SL, lorsqu'elles sont présentes, elles sont localisées dans la partie basale limitée en bas par la commissure antérieure et latéralement par les ventricules latéraux.

**Au niveau du NVM** : elles ont une distribution essentiellement interne, du côté du 3<sup>ème</sup> ventricule, c'est à dire à l'opposé de celui observé pour les cellules RE $\alpha$ -ir.

**Au niveau de l'ARC** : les cellules FOS-ir sont réparties dans l'ensemble de cette structure.

Un nombre faible de cellules IR FOS a été observé au niveau du **NPV**, de l'**AHA**, du **HDM**. Aucun marquage n'a été détecté au niveau du **NSO**.

**Au niveau du NSC** : dans ce noyau, les cellules immuno-réactives FOS sont de petites tailles et réparties à l'intérieur de toute la structure. Cette structure, impliquée dans les rythmes endogènes, a été choisi comme une structure témoin, pour vérifier les protocoles expérimentaux (notamment par rapport au moment de l'abattage).

### Effet de la race et du traitement hormonal sur le nombre de cellules marquées

**Au niveau de l'APO** : la comparaison de l'expression de la protéine FOS dans cette structure ne montre pas de différence entre les deux races quel que soit le traitement hormonal. Une tendance d'un nombre de cellules Fos positives plus élevé chez les IF que chez les ROM a été notée ( $p = 0.08$ )

Chez les brebis IF le nombre de cellules positives FOS est plus élevé dans le lot œstradiol par comparaison au lot progestérone ( $p < 0.05$ ). Aucune différence du nombre de cellules FOS immuno-réactives, entre les deux traitements hormonaux, n'a été notée chez les brebis ROM (Figure 37).

**Au niveau du NVM** : La comparaison de l'expression de la protéine FOS dans le NVM montre « un effet race » significatif ( $P < 0.05$ ). Après 6 heures de traitement par l'œstradiol, le nombre de cellules FOS-ir est plus important chez les brebis IF que chez les ROM (Figure 38 A). Aucune différence du nombre de cellules FOS-ir n'a été observée entre les brebis des deux races traitées à la progestérone.

Chez les brebis IF le nombre de cellules positives FOS est plus élevé dans le lot œstradiol par comparaison au lot progestérone ( $p < 0.05$ ) quel que soit le niveau de coupe. Aucune différence entre les deux traitements hormonaux n'a été notée chez les brebis ROM (Figure 38 B).

**Au niveau du noyau ARC** : l'analyse statistique globale à l'intérieur de ce noyau a montré un effet race significatif ( $p < 0.05$ ). Sur tous les niveaux de coupes analysés, le nombre de cellules FOS-ir est plus important chez les brebis IF en comparaison aux brebis ROM quel que soit le traitement hormonal utilisé ( $p < 0.05$  ; Figure 39 A).

Chez les brebis IF, le nombre de cellules activées (FOS positives) est plus élevé chez le lot œstradiol par comparaison au lot progestérone ( $P = 0.01$ ) quel que soit le niveau de coupe (Figure 39 B).

Aucune différence entre les deux lots n'est observée chez les brebis ROM. La distribution des cellules FOS-ir est très homogène à l'intérieur de cette structure, chez les deux races et pour les deux traitements hormonaux (c'est-à-dire qu'on n'observe pas de différence du nombre de cellules positives en fonction du niveau de coupe).

**Au niveau du SL** : aucune différence du nombre de cellules activées n'est observée au niveau de cette structure entre les différents lots quelle que soit la race ou le traitement hormonal administré.

**Au niveau du NSC (zone témoin)** : aucune différence n'est observée au niveau de ce noyau quelle que soit la race ou le traitement hormonal appliqué.

## Discussion

Les résultats de cette étude immunohistochimique montrent i) Une distribution des RE $\alpha$  similaire entre les deux races et identique à celle décrite précédemment par d'autres auteurs. ii) Un nombre de RE $\alpha$  plus élevé chez les brebis IF que chez les brebis ROM au niveau de la majorité des structures analysées qui sont impliquées dans le contrôle de la fonction de reproduction chez la brebis : ARC, NVM, SL. Cette différence est observée quel que soit le traitement hormonal utilisé (œstradiol ou progestérone), iii) On relève aussi un nombre plus élevé de cellules RE $\alpha$ -ir chez les brebis des deux races sous progestérone par comparaison aux animaux recevant un traitement d'œstradiol, dans la plupart des zones étudiées.

En ce qui concerne l'étude de la protéine FOS, nos résultats montrent i) Une expression très variable de la protéine FOS à l'intérieur des différentes structures étudiées, quel que soit le traitement hormonal utilisé ou la race. ii) Une augmentation du nombre de cellules FOS-ir dans la majorité des structures étudiées chez les brebis IF sous œstradiol

par comparaison aux animaux sous progestérone. Cette évolution n'est pas observée chez les brebis ROM.

### **Les récepteurs à l'œstradiol**

Il est désormais bien établi que l'œstradiol agit au niveau de l'HMB pour induire le comportement sexuel et le pic préovulatoire de LH (Blache *et al.*, 1991; Caraty *et al.*, 1998). Ce stéroïde agit au niveau central via ses récepteurs nucléaires. Deux isoformes du récepteur nucléaire à l'œstradiol ont été à ce jour identifiées, ce sont le RE $\alpha$  et le RE $\beta$ . Le contrôle de la fonction de reproduction semble principalement dépendre de régulations s'exerçant via le récepteur de type  $\alpha$ . En effet, les souris dont le gène codant pour le RE $\beta$  a été invalidé (KO pour Knockout) sont fertiles et manifestent un comportement sexuel normal (Krege *et al.*, 1998). En revanche, les souris RE $\alpha$  KO ovariectomisées n'expriment aucun comportement de lordose en réponse à l'administration d'œstradiol seul ou d'œstradiol plus de la progestérone (Rissman *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 1998). Chez la brebis, les neurones à GnRH n'expriment pas les RE $\alpha$  alors que 50% de ces neurones expriment le RE $\beta$  chez cette espèce (Skinner et Dufourny, 2005). Chez la ratte c'est plus de 70% des neurones à GnRH qui expriment le RE $\beta$  (Legan et Tsai, 2003), cependant son rôle reste à déterminer.

Dans le travail présenté ici, nous nous sommes intéressés à la distribution ainsi qu'aux changements du nombre des RE $\alpha$ , en fonction du traitement hormonal, chez les brebis des deux races. La distribution des RE $\alpha$  que nous observons est similaire entre les deux génotypes. Par ailleurs, elle est comparable à celle rapportée par d'autres auteurs utilisant soit le même anticorps : l'ID5 (Goubillon *et al.*, 1999; Meurisse *et al.*, 2005), soit un autre anticorps : le H222 (Herbison *et al.*, 1993; Lehman et Karsch, 1993; Blache *et al.*, 1994). Néanmoins, contrairement à Blache (1991) et Lehman et collaborateurs. (1993), nous avons observé des cellules RE-ir au niveau de l'AHA. Cette distribution des RE $\alpha$  est également comparable à celles décrites chez d'autres espèces, révélée par immunohistochimie, autoradiographie et hybridation *in situ* (Pfaff et Keiner, 1973; Simerly *et al.*, 1990; DonCarlos *et al.*, 1991).

Dans nos études, la différence de sensibilité à l'œstradiol, très différente entre les deux races pour induire le pic préovulatoire de LH et le comportement sexuel, pourrait être en partie expliquée par une différence du nombre de récepteurs affectant certaines aires hypothalamiques. Des travaux chez les ovins suggèrent que les variations de sensibilité à l'œstradiol sont liées à une variation de nombre de sites de liaison de l'hormone. En effet,

mesurés par dosage dans des extraits cellulaires, les RE de l'hypothalamus augmentent en jours longs en comparaison aux jours courts, alors que ceux de l'hypophyse ou de la glande pinéale ne changent pas (Clarke *et al.*, 1981). D'autres auteurs ont également montré une augmentation de la concentration des RE dans l'hypophyse et l'hypothalamus 22 jours après la mise bas c'est-à-dire quelques jours avant la reprise de l'activité ovarienne (Wise *et al.*, 1986). Par immunohistochimie, Skinner et Herbison (1997) ont décrit une augmentation de l'ordre de 20% du nombre de RE au niveau de l'APO en jours longs par comparaison aux jours courts. Aucune différence dans les autres aires hypothalamique n'a été décrite dans cette dernière étude. Concernant le comportement sexuel chez le mâle, la performance sexuelle apparaît reliée au nombre de RE occupés par l'hormone au niveau de l'APO (rat : Clark *et al.* (1985) ; le bélier : Alexander *et al.* (1993)). Ainsi chez le rat, Clark *et al.* (1985) ont montré que des mâles ne montrant pas de comportement sexuel ont moins de RE occupés au niveau de l'APO par comparaison aux mâles qui sont sexuellement actifs (copulant au moins une fois). De plus, chez les rongeurs, une forte corrélation entre l'apparition de la lordose et le nombre des récepteurs à la progestérone (RP) synthétisés sous l'action de l'œstradiol a été mise en évidence (Parsons *et al.*, 1980). L'hypothèse d'un nombre minimal de RE occupés pour déclencher un événement endocrinien et/ou comportemental est plausible mais, à notre connaissance, aucune étude n'a clairement démontré ce point chez la brebis.

Chez la brebis ROM comme chez la brebis IF, quel que soit le traitement hormonal utilisé, le plus grand nombre de RE $\alpha$  est observé au niveau de l'APO et de l'HMB. Ces deux régions sont bien connues pour être impliquées dans le contrôle de la fonction de reproduction : le pic préovulatoire de GnRH/LH et le comportement sexuel (Blache *et al.*, 1991; Caraty *et al.*, 1998) ainsi que le comportement maternel (Numan, 1994; Meurisse *et al.*, 2005). Par ailleurs, on observe un nombre de RE $\alpha$  plus élevé chez les brebis IF que chez les brebis ROM, dans la quasi totalité des structures étudiées et quel que soit le traitement hormonal utilisé. Seules les populations de l'APO ne sont pas différentes en nombre entre les deux génotypes bien qu'une tendance soit observée.

Lors de cette étude, réalisée sur « des cycles artificiels », nous avons essayé de contrôler et standardiser les niveaux de stéroïdes au maximum. Toutefois, les niveaux plasmatiques d'œstradiol mesurés à postériori, ont été trouvés légèrement plus élevés chez les brebis ROM que chez les IF, ceux de la progestérone étant par contre identiques. Cette faible différence de niveau d'œstradiol ne permet vraisemblablement pas d'expliquer la

différence du nombre des RE $\alpha$ , globalement plus élevé chez l'IF. L'origine de cette différence entre les deux races reste à déterminer, mais pourrait être essentiellement d'origine génétique. Il serait néanmoins intéressant de confirmer ces données dans d'autres conditions physiologiques, notamment chez des femelles intactes en cycle naturel (phase lutéale et folliculaire).

Nos données indiquent également que le nombre de récepteurs à l'œstradiol à l'intérieur des deux races varie sous l'effet du traitement hormonal utilisé. Le nombre de RE compté sous progestérone est globalement plus élevé que celui observé sous œstradiol, chez les deux races et dans la majorité des structures étudiées. Une variation de l'expression des RE dans de nombreux tissus (utérus, ovaire, cerveau, hypophyse) en relation avec le stade physiologique a été décrite chez différentes espèces (rat, cochon d'Inde : Blaustein et Olster (1989)). Chez la brebis un changement de nombre de RE $\alpha$  pendant l'œstrus, la gestation, la parturition ainsi qu'une variation en relation avec l'expérience maternelle ont également été décrits (Meurisse *et al.*, 2005). Blache et collaborateurs (1994) se sont intéressés à étudier la densité de distribution des RE $\alpha$  chez la brebis au cours du cycle œstral. Ces auteurs ont décrit une augmentation des RE $\alpha$  au niveau du NVM de brebis sous progestérone ou juste après son retrait par comparaison à des brebis en œstrus ou ovariectomisées. Par contre, ils n'observent aucune différence au niveau des autres structures: APO, AHA, ARC. Dans notre étude, au niveau du NVM, le nombre de cellules RE $\alpha$ -ir est légèrement plus élevé chez les brebis IF sous progestérone par comparaison à celles traitées à l'œstradiol ( $P=0.056$ ), mais aucune différence n'est observée entre les deux traitements chez la brebis ROM. On peut envisager comme hypothèse que les niveaux de progestérone délivrés par 1 CIDR ne sont pas suffisants pour activer une synthèse de récepteurs dans cette région du cerveau chez cette race. Celle-ci est cependant peu vraisemblable puisque nos premiers résultats (cf Chapitre1, Partie 1) montrent que des niveaux de progestérone plus élevés pendant la phase lutéale artificielle ne modifient en rien la latence des événements endocriniens ou comportementaux. Seule une tendance d'une diminution de la latence de réceptivité suite à un traitement d'imprégnation par 2 CIDR a été notée. Une seconde hypothèse serait que chez la brebis ROM la synthèse des RE est indépendante des niveaux de progestérone, ce point reste cependant à vérifier. Dans ce cas, la brebis ROM se comporterait comme la chèvre : chez cette dernière espèce, un traitement d'imprégnation à la progestérone n'est pas

indispensable pour l'expression de la réceptivité. Toutefois, à notre connaissance, aucune action de la progestérone sur la synthèse des RE n'a pas été décrite chez cette espèce.

Dans notre étude, la différence la plus nette quant à l'effet des deux traitements hormonaux sur le nombre de RE $\alpha$  a été observée au niveau du noyau ARC, et ceci chez les deux races. Pour tous les niveaux de coupes étudiés, la densité des cellules positives au RE $\alpha$  est plus élevée chez les brebis traitées à la progestérone. Blache et collaborateurs (1994) avaient également décrit une forte densité de RE $\alpha$  au niveau de ce noyau mais sans différence nette entre les stades physiologiques. Toutefois, aucune implication de cette structure hypothalamique dans le contrôle du comportement sexuel n'a été décrite chez la brebis ou chez les rongeurs. Ainsi, la différence de nombre de RE $\alpha$  observée entre les traitements dans notre étude serait plutôt en rapport avec la génération du pic préovulatoire de LH.

Chez la brebis ROM, mais pas chez la brebis IF, un nombre plus important de RE $\alpha$  sous progestérone au niveau du SL a été noté par comparaison à celui observé sous œstradiol. La signification physiologique de cette évolution reste cependant à déterminer. En effet, peu de travaux se sont intéressés à cette structure et à son rôle potentiel dans la fonction de reproduction, bien que des projections du SL vers l'APO soient mises en évidence. Un rôle inhibiteur de la progestérone sur le SL dans le contrôle du comportement sexuel a été décrit chez le rat (Kondo *et al.*, 1990; Yamanouchi et Arai, 1990). Chez la brebis, une activation cellulaire (protéine FOS) dans ce noyau a été récemment décrite 20 heures après administration d'œstradiol, c'est à dire au moment de l'induction du comportement sexuel et du pic préovulatoire de LH (Richter *et al.*, 2005).

Au niveau de l'APO, aucune différence du nombre de RE $\alpha$  entre les deux races, n'a été relevée. Néanmoins, une tendance d'un nombre légèrement supérieur chez les IF sous œstradiol par comparaison aux autres animaux (IF sous progestérone et les deux lots de ROM) a été notée. Un rôle de cette région dans le contrôle du comportement sexuel n'est pas clairement défini chez la brebis. Il a été rapporté que la pose d'implants de progestérone à ce niveau bloquait l'expression du comportement de réceptivité (Blache 1991, Blache *et al.*, 1996), alors que l'insertion d'implants d'œstradiol inhibe la pulsativité de LH mais n'affectent pas le comportement sexuel (Blache *et al.*, 1991; Caraty *et al.*, 1998).

Un point intéressant ressortant de cette comparaison de structures chez la brebis ROM concerne les variations du nombre de récepteurs entre traitements. Ces variations

affectent certaines zones (ARC, SL) mais ne sont pas observées pour d'autres (NVM, APO). Nous n'avons pas d'explication claire pour cette dissociation dans l'évolution du nombre de récepteurs, toutefois, on peut se demander si des niveaux de progestérone supérieurs, plus proches de ceux d'une brebis ROM en phase lutéale, n'auraient pas conduit à des résultats différents ?

Quelques points méritent d'être évoqués pour expliquer les différences observées entre notre étude et celle de Blache *et al.* (1994). Premièrement, les anticorps utilisés, il est à noter que notre étude et celle de Blache ont été réalisées en effectuant le marquage immunohistochimique avec deux anticorps différents. L'anticorps (H222) utilisé par Blache et collaborateurs ne reconnaît pas le récepteur lié à l'hormone alors que l'anticorps utilisé dans notre étude (l'ID5) reconnaît un épitope éloigné du site de fixation, qui permet de marquer le récepteur quel que soit son état. Deuxièmement, on doit également tenir compte de la différence des protocoles expérimentaux, notamment des traitements hormonaux utilisés (injection d'œstradiol vs implants) et surtout du moment d'abattage après l'administration de l'œstradiol. Enfin, il existe une différence majeure dans la méthode d'analyse des données. Notre étude repose sur le comptage du nombre de cellules positives au RE par structure, alors que Blache et collaborateurs (1994) ont étudié la densité et la distribution des RE à l'intérieur des différentes structures. En d'autres termes, dans notre étude, les résultats sont exprimés en terme de nombre de cellules immuno-réactives, alors que Blache et collaborateurs avaient exprimé leurs données par unité de surface.

Nos résultats ne mettent pas en évidence de différence majeure du nombre de récepteurs entre les différentes structures hypothalamiques des deux génotypes. La forte sensibilité des brebis ROM à l'œstradiol pour induire le comportement sexuel ne paraît donc pas liée à un nombre plus élevé de RE $\alpha$  dans une région particulière comme nous l'avions pensé. A l'inverse, un nombre inférieur de récepteurs chez la brebis ROM associé à des niveaux d'œstradiol plus élevés pourrait conduire à une occupation plus rapide du nombre minimum de récepteurs permettant d'induire le comportement sexuel. Ceci expliquerait en partie la courte latence du comportement de réceptivité par comparaison à celle du pic préovulatoire de LH chez cette race. Le recrutement d'un nombre plus important de RE $\alpha$  serait nécessaire pour induire le pic préovulatoire de GnRH et éventuellement pour maintenir le comportement de réceptivité. Chez le rat et le cochon

d'Inde par exemple une corrélation entre le comportement de réceptivité et la concentration en récepteurs aux stéroïdes dans des zones bien spécifique du cerveau, comme le NVM, a été notée (Blaustein et Olster, 1989). Chez ces espèces le comportement de lordose peut être prolongé en appliquant des niveaux forts d'œstradiol ou de progestérone. Chez la brebis IF ovariectomisée, le même phénomène a été décrit. la durée de réceptivité augmente avec la durée de présence et la dose d'œstradiol (Fabre-Nys *et al.*, 1993). Toutefois, nos résultats (Chapitres 1 et 3) montrent que, chez la brebis ROM contrairement à l'IF, la durée de la réceptivité n'est pas liée à la dose et la durée de présence de l'œstradiol. Le seuil de sensibilité à l'œstradiol pour induire le comportement d'œstrus est très élevé chez la brebis ROM ; mais les mécanismes impliqués restent à identifier. Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'occupation des RE par l'œstradiol chez la brebis ROM entraîne un changement et une activation plus rapide des circuits par comparaison à l'IF. De plus, chez cette race, le comportement sexuel apparaît plus comme un phénomène de tout ou rien et non dose dépendant comme chez la brebis IF. Il reste cependant à vérifier l'effet de signaux œstrogéniques bien supérieurs sur la durée de réceptivité chez la brebis ROM.

### **La protéine FOS**

Dans la seconde partie de notre étude immunohistochimique, notre objectif était de déterminer les cibles de l'œstradiol pour induire le comportement sexuel chez la brebis. Chez la brebis ROM, une faible dose d'œstradiol active l'expression du comportement sexuel indépendamment de l'activation du pic de LH. Peut-on mettre en évidence avec cette dose discriminante de stéroïde une activation cellulaire régionalisée? Dans ce cas, elle ciblerait préférentiellement les cellules qui constituent un relais à l'action comportementale de l'œstradiol. Une seconde étape serait bien sûr de déterminer le phénotype de ces cellules activées.

Tout d'abord, nos résultats montrent une expression de la protéine FOS très variable d'une brebis à l'autre et entre les deux races. De plus, aucune augmentation du nombre de cellules activées (FOS) suite au traitement à l'œstradiol, n'a été observé chez les brebis ROM quelle que soit la région hypothalamique. A l'opposé, une augmentation du nombre de cellules positives FOS a été observée chez l'IF dans toutes les structures analysées, au bout de 6 heures de traitement avec l'œstradiol. Ce résultat est assez surprenant puisqu'il va dans le sens opposé de l'effet attendu.

L'absence d'activation cellulaire FOS, suite au traitement à l'œstradiol chez les brebis ROM, pose le problème des mécanismes et des circuits impliqués dans l'expression du comportement. Tout d'abord il faut signaler que peu d'études se sont intéressées à l'étude de la protéine FOS en relation avec l'expression du comportement sexuel, chez la brebis. Ohkura et collaborateurs (1997), en examinant différentes structures cérébrales (limbiques, corticales et hypothalamiques) par hybridation *in situ*, ont rapporté que l'induction de l'œstrus suite à l'injection d'œstradiol seul n'avait pas d'effet significatif sur l'expression des ARNm du *c-fos*. A l'opposé, l'exposition des brebis en œstrus (mais pas celles en phase lutéale ou en anœstrus) aux mâles pendant 5 minutes est suffisante pour provoquer une augmentation très significative du nombre de cellules qui expriment le *c-fos* dans ces mêmes structures cérébrales. Il est à noter cependant, que la quasi-totalité des études comportementales utilisant la protéine FOS comme marqueur d'activité ont généralement associé un traitement hormonal (œstradiol ou progestérone) et l'interaction avec le mâle (le congénère), ou des stimuli sensoriels (contact, vu, odeur...). En conséquence, l'activation cellulaire résulte plus vraisemblablement d'une réponse à l'association du traitement hormonal et de la stimulation sensorielle (Ohkura *et al.*, 1997).

Chez la brebis, la majorité des travaux utilisant la protéine FOS se sont généralement beaucoup plus intéressés à l'étude des mécanismes cellulaires en relation avec le pic préovulatoire de GnRH/LH (Moenter *et al.*, 1993; Boukhliq *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2001; Richter *et al.*, 2005). Dans ce cas, le marquage est souvent examiné au moment du pic préovulatoire de LH, c'est à dire entre 16 et 20 heures après œstradiol. Peu d'études ont analysé l'expression de cette protéine pendant la phase d'activation, c'est-à-dire les premières heures suivant l'application du stéroïde (Unsworth et Robinson, 2002; Richter *et al.*, 2005).

D'autres études avaient décrit une activation cellulaire rapide dans l'HMB suite à l'administration d'œstradiol (Cattaneo et Maggi, 1990; Insel, 1990; Jennes *et al.*, 1992). Toutefois, lors de ces travaux, comme d'autres (Boukhliq *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2001; Estrada *et al.*, 2003) le comportement sexuel et/ou le pic préovulatoire de LH est induit à la suite d'injections im d'œstradiol (doses variant de 40 à 100 µg). Les niveaux plasmatiques d'œstradiol après ces injections atteignent des concentrations pharmacologiques de l'ordre de 20 à 50 fois plus élevés que lors d'une phase folliculaire (Meikle *et al.*, 2001). De même, au laboratoire, il a été montré que l'injection im de 50 µg d'œstradiol chez la brebis ovariectomisée activait les neurones à Tyrosine Hydroxylase (TH) de l'ARC en entraînant une augmentation du nombre de neurones FOS positifs de ce noyau, alors que

l'administration du stéroïde sous forme d'implants (12 cm) est sans effet (Ziyazetdinova, 2007). Au vu de ces résultats, il est donc possible que l'augmentation des niveaux plasmatiques d'œstradiol, relativement faibles après insertion des implants (3cm pendant 6 heures) dans notre expérience, ne soit pas suffisante pour provoquer une augmentation significative du nombre de cellules exprimant la protéine FOS chez la brebis ROM. Toutefois, cette dose d'œstradiol est physiologiquement efficace. Par conséquent, ces données suggèrent qu'un rôle de la protéine FOS au niveau hypothalamique pour induire le comportement de réceptivité semble être mineur, chez la brebis ROM.

En effet, il ne faut pas oublier que la protéine FOS ne représente que l'un parmi les nombreux facteurs de transcription. En se fixant à leurs récepteurs, les stéroïdes gonadiques modulent l'expression des gènes ainsi que la synthèse des protéines dans les tissus et les cellules cibles, cependant, la nature exacte des protéines modulant le comportement de réceptivité reste mal définie.

Un certain nombre d'autres points doivent être soulignés concernant ce résultat chez la brebis ROM. D'une part, il est possible que le moment de sacrifice des animaux ne soit pas optimal si l'activation transitoire et modérée de la protéine FOS intervient rapidement à la suite de l'administration du stéroïde. En effet, la protéine Fos apparaît autour de 30 à 45 minutes après l'application du stimulus et sa synthèse est maximale entre 60 et 90 minutes et persiste entre 2 à 5 heures après la stimulation (Morgan *et al.*, 1987; Hoffman *et al.*, 1993). D'autre part, il serait également intéressant de regarder s'il existe une activation cellulaire dans d'autres structures cérébrales. En effet, le tronc cérébral, l'amygdale et l'hippocampe sont des zones décrites comme étant impliquées dans le contrôle du comportement d'œstrus chez le rat. Elles pourraient éventuellement jouer un rôle similaire chez la brebis.

L'augmentation du nombre de cellules positives FOS observée chez l'IF au bout de 6 heures de traitement par l'œstradiol est un résultat surprenant, et qui est complètement à l'opposé de celui attendu. Cette activation n'est pas régionalisée mais concerne toutes les structures étudiées. Chez cette race le traitement œstrogénique utilisé ici ne permet d'induire ni le comportement d'œstrus ni le pic préovulatoire de LH chez la majorité des brebis (Caraty *et al.*, 2002; Ben Saïd *et al.*, 2007). Il faut néanmoins se rappeler que le pic préovulatoire de LH est induit par des concentrations moindres et des durées de présence d'œstradiol plus courtes chez la brebis IF que chez la brebis ROM. Comme nos résultats indiquent que la libération préovulatoire de GnRH ne semble pas être un phénomène de

« tout ou rien » mais augmente progressivement en fonction de l'intensité du signal œstrogénique (cf Chapitre 1) il est possible que l'activation cellulaire observée chez la brebis IF représente le début de l'activation des circuits impliqués dans la genèse de cet évènement. Il serait intéressant à l'avenir d'étudier l'effet de ce faible signal œstrogénique sur la libération du peptide chez cette race.

En résumé, notre étude ne montre pas de différences majeures de répartition des RE $\alpha$  entre les différentes structures cérébrales des deux races. Néanmoins, un nombre globalement inférieur de récepteurs chez la brebis ROM permettrait d'atteindre plus rapidement le seuil critique nécessaire pour un déclenchement plus précoce du comportement sexuel chez cette race. L'étude de la protéine FOS n'a pas permis d'identifier une population cellulaire hypothalamique particulière qui serait impliquée dans la régulation du comportement d'œstrus. Par conséquent, l'activation du comportement sexuel ne semble pas impliquer cette protéine dans les structures étudiées.

Ce modèle de brebis ROM traitées avec 6cm d'œstradiol pendant 3 heures reste néanmoins intéressant. En effet, il permet de séparer les deux évènements : le comportement sexuel et le pic préovulatoire de LH. Il devrait être appliqué à l'étude d'autres gènes d'activation et d'autres structures cérébrales.

## **Discussion générale et Conclusion**

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que les **seuils de sensibilité à l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH et le comportement sexuel sont très différents entre les brebis IF et ROM, deux races de brebis différant par leur taux d'ovulation**. Bien que d'anciens travaux aient mis en évidence une différence de réponse à l'œstradiol entre différents génotypes, nous montrons, pour la première fois, que les réponses (seuils de sensibilité) à l'œstradiol, pour induire le pic de LH et le comportement sexuel sont inversées, entre les deux races. Nous montrons (Chapitre 1) **qu'un signal œstrogénique très faible permet d'induire le comportement d'œstrus chez la brebis ROM mais pas chez la brebis IF**. L'induction **du pic préovulatoire de GnRH/LH** quant à elle **nécessite des quantités** (doses et durées de présence) **d'œstradiol très supérieures chez la ROM** par comparaison à l'IF.

Ces résultats ont été obtenus en utilisant un modèle de phase folliculaire artificiel (brebis ovariectomisée traitée aux stéroïdes gonadiques, voir Introduction). Les variations de concentrations des stéroïdes gonadiques appliquées dans ce modèle ne reproduisent pas leur évolution lors d'un cycle naturel ; et l'intervention d'autres facteurs gonadiques n'est pas à exclure de ces régulations. Néanmoins, nos résultats mettent l'accent sur **une différence potentielle de lecture du signal œstrogénique** entre deux génotypes de prolificités différentes pour activer les mécanismes endocriniens ou comportementaux de la période péri-ovulatoire.

Au cours de nos travaux, nous avons cherché en quoi **la manipulation des niveaux de progestérone** durant la phase lutéale artificielle **pouvait modifier ces différences de réponse à l'œstradiol observées entre** les deux races.

Concernant le comportement sexuel, l'élévation des niveaux de progestérone n'a aucun effet sur la latence d'apparition de la réceptivité, que ce soit entre les deux races ou au sein d'une même race.

Concernant le pic préovulatoire de LH, l'élévation des niveaux de progestérone ne modifie ni la proportion de femelles ROM présentant un pic, ni le délai d'apparition de ce pic préovulatoire de LH chez les deux génotypes. Par conséquent, **l'action de la progestérone apparaît comme un effet de « tout ou rien »**. Une conclusion similaire, du moins pour la LH, se dégage des travaux de Skinner et collaborateurs (2000). Ces auteurs n'observent un effet du stéroïde sur la latence des pics de LH qu'entre des brebis traitées

avec 0 et 1 ou 0 et 2 CIDR. Aucun effet différentiel n'a été noté pour les autres traitements à la progestérone (Skinner *et al.*, 2000). Le rôle de la progestérone serait donc majoritairement amplificateur de l'action de l'œstradiol notamment en stimulant la synthèse de ses récepteurs et en «freinant» le système GnRH pour mieux le désinhiber plus tard. Ces effets observés chez la brebis ne sont pas observés chez toutes les espèces. Par exemple chez la chèvre, une phase d'imprégnation par la progestérone ne semble pas nécessaire pour l'expression du comportement sexuel. Ce traitement permet néanmoins de raccourcir la latence du comportement d'œstrus mais ne prolonge pas sa durée (Sutherland, 1988; Sutherland et Lindsay, 1991).

### **Le pic préovulatoire de GnRH/LH**

Dans ce travail de thèse, nous avons essayé de déterminer **à quel niveau** (hypophysaire et/ou hypothalamique) **se situait la différence de sensibilité à l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH** entre les deux génotypes? Etudier la composante hypophysaire indépendamment de l'influence hypothalamique est assez difficile, et nous avons donc abordé la notion de « sensibilité hypophysaire » à l'œstradiol en utilisant différentes approches.

Premièrement *in vitro* : en utilisant des cultures primaires de cellules hypophysaires ; deuxièmement *ex vivo* : en stimulant par la GnRH, des tranches hypophysaires de brebis préalablement traitées à l'œstradiol ; enfin, *in vivo* : en travaillant sur un modèle de brebis HPD. Les résultats de ces différentes expériences ont été parfois contradictoires sans que l'on sache vraiment comment interpréter les différences. En particulier la plus grande « sensibilité » à la GnRH des cellules hypophysaires des brebis IF, comparée au ROM, s'oppose à l'ensemble des autres résultats qui indiquent une capacité supérieure de l'hypophyse de la brebis ROM à sécréter la LH.

Néanmoins, en dépit de ces divergences de résultats, nos données suggèrent que **le rôle de l'hypophyse dans la détermination du moment de la décharge préovulatoire de LH est mineur**. Nous montrons clairement qu'en présence d'un signal hypothalamique standardisé, **les hypophyses des deux génotypes répondent de façon simultanée et surtout précoce par rapport au délai normalement observé entre le moment d'application du signal œstrogénique et le pic de LH pour les deux génotypes** (article 2). Il n'existe donc pas, dans l'hypophyse, de mécanisme(s) permettant de bloquer l'augmentation de la réponse hypophysaire à la GnRH et de la synchroniser avec le

moment de la libération massive du peptide comme cela a été suggéré (Clarke 1985). La différence de « timing » du pic préovulatoire de LH entre les deux races résulterait plutôt d'une différence de **sensibilité hypothalamique à l'œstradiol**. Cette dernière se traduirait par une durée plus longue du rétrocontrôle négatif de l'œstradiol sur la libération de la GnRH. Ainsi, nos données (article 2) concourent à l'hypothèse que c'est **l'hypothalamus qui détermine le moment de la décharge préovulatoire de GnRH/ LH, et lui seul**.

Un certain nombre de points, qui peuvent moduler cette notion de l'hypothalamus « chef d'orchestre » du contrôle de l'ovulation, doivent néanmoins être signalés.

Premièrement, pour toutes ces expériences (cultures primaires, tranches, brebis HPD), la stimulation de GnRH appliquée ne traduisait pas l'évolution du peptide lors d'un cycle naturel, notamment en terme de fréquence. En cycle naturel en effet, la dynamique de libération de la GnRH est un paramètre important, qui au niveau hypophysaire agit pour stimuler la synthèse de ses propres récepteurs, stimuler la libération des gonadotropines donc la folliculogénèse et par suite la libération de l'œstradiol qui, à son tour, agira sur la synthèse des R-GnRH, et amplifiera la réponse de l'hypophyse à la GnRH. En standardisant donc la dose et le mode de stimulation (fréquence de la GnRH), nous avons probablement altéré certains mécanismes qui devraient intervenir dans le « timing » de l'augmentation de sensibilité hypophysaire des deux races.

D'autres difficultés rencontrées lors de ce travail de thèse doivent être soulignées. Une grande variabilité individuelle de réponse aux traitements (plus particulièrement la réponse des brebis ROM à la dose liminaire d'œstradiol) entre les individus a été largement observée au cours de nos études. Le coût, la lourdeur des interventions chirurgicales et le nombre limité de brebis expérimentales ne permettent pas de réaliser des expériences préliminaires pour tester différentes doses et différents traitements. De plus, comme signalé plus haut, le modèle de brebis ovariectomisée traitée aux stéroïdes gonadiques, bien qu'il offre l'avantage de maîtriser les différents événements hormonaux et comportementaux, ne prend pas en compte le rôle des facteurs d'origine ovarienne (inhibine, activine...) dans la régulation du pic préovulatoire de LH. Ces facteurs agissent au niveau hypophysaire principalement au travers d'effets « paracrines ». Même si leur action est mineure, il faut se souvenir que l'on compare deux races qui diffèrent notablement par leur taux d'ovulation.

Enfin, en standardisant nos paramètres dans le modèle de phase folliculaire, en particulier le niveau basal d'œstradiol (implant sous cutané de 1cm), nous ne pouvons exclure avoir « défavorisé » la race ROM. En effet, en regard d'un niveau basal

d'œstradiol identique, les niveaux plasmatiques de LH (niveau basal) pour ce génotype étaient toujours plus élevés que ceux observés chez l'IF.

### **Relation dose/durée et mécanisme d'action de l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH**

Nos travaux mettent en évidence l'importance de la relation « compensatrice » qui existe entre la dose et la durée de présence de l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH chez les deux races de brebis. Il s'agit en particulier de la forte dose mais surtout de la longue durée de présence du stéroïde, nécessaire à la brebis ROM pour exprimer un pic préovulatoire de LH. Sont elles liées au recrutement d'un nombre minimum de RE ou bien au temps nécessaire à l'activation et au maintien de mécanismes impliqués, à la fois au niveau hypophysaire et hypothalamique ? Dans les deux cas, la question d'un nombre minimal de récepteurs recrutés suffisant pour déclencher ces mécanismes se pose.

La réponse induite suite à l'application d'une longue durée de présence de l'œstradiol traduirait peut être un effet cumulatif : le recrutement au cours du temps de récepteurs à l'œstradiol à la fois au niveau hypophysaire comme hypothalamique. En revanche, l'application de fortes doses, pendant des courtes durées, déclencherait des réponses pharmacologiques, et activerait des mécanismes non génomiques qui, à leur tour, stimuleraient les mécanismes génomiques normalement impliqués.

Cette relation « compensatrice » entre la forte dose et la longue durée d'œstradiol est probablement à mettre en relation avec des « besoins » hypophysaires et/ou hypothalamiques différents aussi bien chez une race qu'entre races. C'est du moins le cas, pour l'hypophyse comme le montrent nos données *in vivo* (cf article 1) et *in vitro* (Chapitre 2). Enfin, l'hypothèse d'Evans et collaborateurs (1997) selon laquelle les besoins en œstradiol de l'hypophyse et de l'hypothalamus diffèrent, est clairement étayée par notre travail, et ceci plus particulièrement chez la brebis ROM.

Dans notre étude, l'augmentation de la dose ou la durée de présence de l'œstradiol ne semble pas raccourcir le délai d'action de l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH, chez les deux génotypes. Cette fenêtre d'action de l'œstradiol est en moyenne de 15 et de 20 heures respectivement chez les brebis IF et les brebis ROM. Nos données sont ainsi en accord avec le concept que l'œstradiol déclenche une cascade d'évènements neuronaux. En effet, cette cascade d'évènements nécessite un temps bien défini pour être lue et transmise aux neurones à GnRH, localisés majoritairement au niveau de l'APO.

Quels sont les mécanismes par lesquels l'œstradiol inhibe puis stimule la libération de GnRH ? Bien que la réponse ne soit pas bien établie chez la brebis, il est intéressant de noter que comme chez le rat, les neurones à GnRH expriment peu ou pas les RE $\alpha$ . En conséquence, l'action de l'œstradiol ne peut s'exercer sur ces neurones qu'à travers des relais d'une ou plusieurs populations neuronales. Chez le rat, deux centres contrôlent la libération de la GnRH : le noyau ARC contrôle la fréquence et l'amplitude des pulses de GnRH (le centre générateur des pulses), et la partie rostrale de l'APO (l'AVPV) agit pour induire le pic (le centre qui contrôle le pic). Chez la brebis, le noyau ARC a été identifié comme le site de transmission des effets négatifs de l'œstradiol, et l'HMB comme le premier site d'action de l'œstradiol pour induire la décharge préovulatoire de LH a été suggéré (Blache *et al.*, 1991; Caraty *et al.*, 1998). Par ailleurs, plusieurs acteurs de régulation (NA, NPY, glutamate, GABA...) interviennent pour réguler et moduler positivement ou négativement la libération de la GnRH, bien que l'on ne puisse pas relier calirement leur action avec les sites d'action connus de l'œstradiol. Récemment, ces schémas hypothétiques de régulation des rétrocontrôles négatif et positif du stéroïde ont été complètement bouleversés par la découverte d'un nouveau peptide : le Kisspeptide. Le rôle majeur de cette molécule, sur la libération de la GnRH, a été mis en évidence, chez de nombreuses espèces (singe, rat, mouton, Homme...). Par ailleurs, ce peptide apparaît être le lien manquant entre l'œstradiol et les neurones à GnRH puisque les deux populations hypothalamiques où il se trouve localisé expriment le ER $\alpha$ . Chez le rat, le rôle des différentes populations neuronales à Kisspeptide dans le contrôle du feedback négatif de l'œstradiol et la décharge ovulante de GnRH sont désormais bien établis (Ohkura *et al.*). Chez la brebis, les schémas sont loin d'être aussi bien établis. Deux populations de neurones à Kisspeptide ont été mises en évidence chez cette espèce: l'une au niveau de l'APO et l'autre au niveau du noyau ARC. Les neurones à Kisspeptide du noyau ARC expriment en totalité les RE $\alpha$  alors que ceux de l'APO l'expriment dans une plus faible proportion (50%) (Franceschini *et al.*, 2006).

Chez la brebis, l'expression du Kisspeptide dans le noyau ARC diminue sous l'effet de l'œstradiol et augmente fortement au moment du pic préovulatoire de GnRH (Smith, 2008a). Par ailleurs, de nombreuses projections neuronales du noyau ARC ont été mises en évidence au niveau de l'APO, à proximité des neurones à GnRH, (Goubillon *et al.*, 2002). Ces arguments ont conduit à formuler comme hypothèse que deux populations distinctes de neurones à Kisspeptide de l'ARC seraient impliquées dans les rétrocontrôles négatif et positif de l'œstradiol chez cette espèce (Smith 2008). Néanmoins des données non publiées

suggèrent que l'action des neurones à Kisspeptide de l'ARC dans la génération du pic préovulatoire de LH pourrait être indirecte via un relai par la population des neurones à Kisspeptide localisée au niveau de l'APO (Hoffamn *et al.*, en préparation). Enfin, une action directe du peptide au niveau de l'EM n'est pas exclue vu le nombre important de fibres observées à ce niveau en contact avec les fibres à GnRH. Ces schémas de régulation restent à confirmer, mais ces données mettent l'accent sur le rôle essentiel de ce peptide dans la régulation préovulatoire de la GnRH. Il pourrait en conséquence être une des clefs sur les quelles l'œstradiol agit pour réguler de façon différentielle le moment du pic de LH entre les brebis ROM et IF. Cette hypothèse pourrait être soutenue par la différence du nombre des RE $\alpha$  observé au niveau de l'ARC entre les deux races (Chapitre 4). Dans le futur, il serait intéressant de comparer l'évolution temporelle d'expression de ce neuropeptide en relation avec l'expression du rétrocontrôle positif de l'œstradiol dans cette structure hypothalamique, pour ces deux génotypes.

Enfin, la latence de la rétroaction positive de l'œstradiol (15 à 20 heures) est difficile à expliquer seulement par la simple succession d'activation de plusieurs relais neuronaux. Il semble également qu'une ré-organisation et une synchronisation entre les neurones à GnRH participe à ce « timing » du pic. De nombreux exemples indiquent que des phénomènes de plasticité interviennent durant cette période. Le nombre de corps cellulaires des neurones à GnRH, « les clusters » associés en paires ou en triplets, est beaucoup plus important au moment du pic préovulatoire de LH en comparaison aux autres périodes du cycle œstral (Batallier *et al.* 2004). Des études utilisant un marqueur de plasticité cellulaire (la PSA-NCAM) montrent un fort degré de recouvrement de PSA-NCAM (60%) autour des corps cellulaires et des fibres à GnRH au niveau de l'APO, au moment du pic préovulatoire comparé à la phase lutéale, chez la brebis IF (Franceschini *et al.*, 2007). Par ailleurs, il est également vraisemblable que des phénomènes de plasticité en relation avec les terminaisons nerveuses des neurones à GnRH ou les cellules gliales existent chez la brebis, comme ceux décrits chez le rat (Prevot *et al.*, 1999; Prevot, 2002). Bien que ces études soient techniquement difficiles à réaliser, il serait intéressant d'étudier en quoi la mise en place de ces éléments de plasticité intervient dans la différence de « timing » du pic de LH entre les deux génotypes.

Cependant, il semble que le déclenchement de ces mécanismes est relativement rapide et n'expliquerait pas à lui seul la latence du pic préovulatoire. Notre hypothèse est

qu'à dose efficace, l'œstradiol stimulerait d'une part toute la cascade d'évènements neuronaux, qui mènent à la génération du pic, mais bloquerait, d'autre part, leur expression immédiate, par un mécanisme différent qui reste à identifier. Ce « frein » imposé par l'œstradiol, qui serait traduit par le rétrocontrôle négatif du stéroïde, aurait pour rôle de synchroniser tous les acteurs de la régulation : hypothalamus, hypophyse et ovaire. Dans le cas de la brebis ROM, cette longue durée du rétrocontrôle négatif de l'œstradiol serait par ailleurs un mécanisme pour augmenter la fenêtre de temps nécessaire au recrutement et à la sélection des follicules ovulatoires.

### **Le comportement sexuel**

Nous avons pu démontrer lors de la première partie de notre travail (article1) **une forte sensibilité des brebis ROM à l'œstradiol pour induire le comportement d'œstrus**. Ce constat nous a permis de déterminer une dose seuil/liminaire qui stimule l'expression du comportement sexuel sans provoquer l'apparition d'un pic préovulatoire de LH associé. En utilisant ce modèle (brebis ROM traitées avec des doses liminaires d'œstradiol) nous avons essayé d'aborder, par différentes approches, différents points de régulation du comportement sexuel chez cette race.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés au rôle de la GnRH dans la régulation du comportement sexuel. Bien que nous ayons rencontré de nombreuses difficultés techniques, les résultats sont très clairs (Chapitre 3, cf expérience 2). Nous avons montré qu'un **faible signal œstrogénique (6 cm/12 heures) stimule une libération de GnRH dans le LCR sans que cette dernière ne soit associée à une libération préovulatoire de LH dans le sang jugulaire**. Cette libération du peptide dans le LCR n'est probablement qu'un reflet de l'activation des neurones à GnRH et d'une libération du peptide dans certaines aires du cerveau, qui participerait au contrôle du comportement sexuel. Il serait intéressant à l'avenir de confirmer ce point, en mesurant la libération du peptide *in situ*, par micro-dialyse par exemple. Enfin, existe-t-il une population de neurones à GnRH plus particulièrement activée pour ce rôle « comportemental » ? Ceci reste à déterminer.

L'hypothèse d'un rôle de la GnRH dans le comportement d'œstrus est confortée par l'effet très net de l'antagoniste de la GnRH sur la réceptivité. En effet, nous montrons que **le comportement sexuel chute significativement sous l'effet d'administration icv d'antagoniste de la GnRH au moment de la pleine réceptivité. Par contre**

**l'antagoniste de la GnRH ne bloque pas l'initiation du comportement d'œstrus induit par l'œstradiol.** Ainsi, nous confirmons le **rôle séquentiel de l'œstradiol et de la GnRH dans le contrôle du comportement de réceptivité**, décrit précédemment par Caraty et collaborateurs (2002). Néanmoins, le rôle de la GnRH dans le contrôle du comportement sexuel chez cette espèce semble être mineur par rapport à celui de l'œstradiol et de plusieurs données appuient cette conclusion (Voir Chapitre 3).

L'origine de la longue durée du comportement sexuel chez la brebis ROM demeure à ce jour mystérieuse. Est-elle liée à une action de l'œstradiol qui perdure dans le temps ou à une action combinée avec la GnRH ? De plus, pour ce génotype, la durée de réceptivité ne semble pas varier en fonction de la dose d'œstradiol. Néanmoins, les doses utilisées lors de nos travaux demeurent des doses « physiologiques ». Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse que des niveaux plus élevés d'œstradiol auraient peut être induit une durée plus longue de réceptivité chez cette race. Cet « effet dose » de l'œstradiol sur la durée du comportement sexuel est un phénomène largement décrit chez de nombreuses espèces, y compris chez la brebis (Scaramuzzi *et al.*, 1971; Fabre-Nys *et al.*, 1993), la chèvre (Sutherland et Lindsay, 1991), rat (Blaustein et Olster, 1989).

#### **Par quel(s) mécanisme(s) la brebis ROM pourrait-elle être plus sensible à l'action de l'œstradiol ?**

Peu de données sont disponibles quant aux mécanismes d'action de l'œstradiol dans le contrôle du comportement sexuel chez la brebis et les ongulés en général. Chez les rongeurs, les rôles des deux stéroïdes gonadiques, dans l'induction du comportement sexuel sont inversés par comparaison à la brebis. En effet, chez ces espèces, l'œstradiol agit au niveau du cerveau pour stimuler la synthèse des récepteurs à la progestérone. De plus, la durée de réceptivité est liée au temps d'occupation de la progestérone à ses récepteurs nucléaires. Toutefois, le comportement de réceptivité peut être induit par administration d'œstradiol seul. Dans ce cas de fortes doses sont alors nécessaires. Chez la brebis, c'est la progestérone qui stimule la synthèse des récepteurs à l'œstradiol au niveau central. La latence, l'intensité et la durée de la réceptivité dépendraient donc des RE $\alpha$  (nombre, densité et distribution). Toutefois, en dépit de la forte sensibilité des brebis ROM à l'œstradiol pour exprimer le comportement sexuel, **aucune différence de répartition des RE $\alpha$  entre les différentes structures cérébrales entre ces brebis et les brebis IF n'a été observée** (Chapitre 4). Ainsi, **une hypothèse serait que le seuil de réponse à**

**l'œstradiol est plus bas chez la brebis ROM.** Au niveau de l'hypothalamus, un nombre de RE $\alpha$  globalement inférieur, associé à des niveaux d'œstradiol circulant légèrement plus élevés chez la brebis ROM, permettraient néanmoins une occupation plus rapide des récepteurs et donc le déclenchement du comportement sexuel chez cette race.

Toutefois, il semble que l'augmentation du nombre de RE n'expliquerait pas à elle seule l'augmentation de la réponse comportementale. Chez le rat et le cochon d'Inde, plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le besoin en œstradiol pour induire la réceptivité. La première est celle d'un effet déclencheur « *the trigger hypothesis* », selon laquelle une injection unique d'œstradiol (stimulation rapide) serait capable de déclencher toute la chaîne d'évènements conduisant à l'expression de la réceptivité. Cette hypothèse a rapidement été abandonnée pour laisser la place à l'hypothèse d'une action de maintenance « *the maintenance hypothesis* » (Pfaff *et al.*, 1994a). Cette dernière suggère que l'œstradiol doit être présent en continu et durant toute la période s'étalant entre l'application du stéroïde et les moments des tests comportementaux. Néanmoins, des travaux chez le rat ont montré que l'œstradiol était efficace quand il était donné sous forme de 2 petits pulses séparés, sur une période de 4 à 12 heures (Parsons *et al.*, 1982). Ainsi, le comportement sexuel serait vraisemblablement déclenché suite à l'occupation par l'œstradiol de ses récepteurs la présence continue du stéroïde ne serait donc pas nécessaire. Par contre, l'œstradiol devrait être présent, et les RE devraient être occupés durant une période critique : "période d'activation" se trouvant dans l'intervalle qui s'étend du début du traitement au début des tests de comportement. Cette période serait nécessaire pour activer la cascade d'évènements impliqués, d'où la nomination de cette nouvelle hypothèse de « cascade » (Pfaff *et al.*, 1994a). Cette notion rappelle celle décrite pour l'induction du pic préovulatoire de LH chez la brebis par Evans et collaborateurs (1997). On retrouve ainsi la fameuse notion de fenêtre d'action de l'œstradiol.

La réponse comportementale observée chez la brebis ROM dans notre étude répond parfaitement à cette hypothèse « de cascade ». Puisque une faible dose d'œstradiol, laissée pendant une fenêtre de temps de l'ordre de 6 heures, est capable d'induire un comportement d'œstrus qui dure 24 heures et plus. De plus, dans notre étude, la fenêtre d'action de l'œstradiol, traduite par la latence d'apparition du comportement sexuel, est identique chez les deux races, aussi bien en cycles naturels qu'artificiels. Ce résultat est néanmoins différent de ce qui a été précédemment décrit chez les races prolifiques, qui expriment le comportement très tôt après la lutéolyse (Land, 1970; Bindon *et al.*, 1979;

Cahill *et al.*, 1981). Nous pensons que cette différence est principalement liée aux méthodes d'étude du comportement sexuel, complètement différentes. Nous rappelons, toutefois, que nous avons utilisé un modèle assez standardisé « bien contrôlé », et que même en cycle naturel, les brebis étaient synchronisées à la progestérone (la même dose).

**La forte sensibilité de la brebis ROM à l'œstradiol** est également traduite par le fait qu'une **dose minimale de stéroïde** provoque une **durée d'œstrus équivalente à celle d'une brebis cyclique** (Chapitre 1). Cette observation conduit à proposer l'hypothèse que le comportement sexuel chez cette race serait un mécanisme de tout ou rien ? Néanmoins, cette hypothèse est peu probable. Il est en effet plus vraisemblable que le déclenchement du comportement sexuel résulte de l'intervention de différentes composantes nerveuses et autres et qui semblent fonctionner en synergie (intégration des stimuli sensoriels, hormonaux, environnementaux...).

Chez les rongeurs, des études ont suggéré un effet des neurotransmetteurs dans la modulation de l'expression des RE et du comportement de réceptivité (Blaustein *et al.*, 1993). Chez la ratte, la dopamine augmente la capacité de liaison de l'œstradiol de 60%, au niveau du HVM, et a un petit effet sur sa capacité de liaison au niveau de l'APO. Aucun effet n'a été par contre observé chez le rat mâle (Woolley *et al.*, 1994). De plus, de nombreuses cellules RE-ir se trouvent entourées par des terminaisons à NA, suggérant que la NA modulerait le nombre de cellules exprimant les RE (Montemayor *et al.*, 1990; Blaustein *et al.*, 1993). Ainsi, le changement de libération de neurotransmetteurs (dans le cerveau), en plus de leurs effets sur les récepteurs aux stéroïdes, aurait un rôle important dans l'expression du comportement d'œstrus et éventuellement sa durée. Dans notre étude, une hypothèse serait que chez la brebis ROM, en dépit de la faible dose d'œstradiol appliquée, une libération de la NA participerait à l'amplification de la réponse à l'œstradiol en agissant peut être sur les RE (amplification du seuil de sensibilité à l'œstradiol). Une seconde alternative serait que la NA modifierait la réponse comportementale en augmentant l'attention de la brebis aux stimulations sensorielles, particulièrement celles provenant du bélier. En effet, le comportement sexuel étant un dialogue entre le mâle et la femelle, si l'attention de la femelle pour le mâle est augmentée, il semble évident qu'elle répondra mieux aux signaux perçus. Chez la brebis, l'administration de la NA au niveau de l'HMB entraîne une augmentation de la proceptivité chez toutes les femelles, et de la réceptivité chez quelques unes (Fabre-Nys, données personnelles). Nous pouvons imaginer que les brebis ROM ont un système noradrénergique plus actif ; elles seraient donc plus

attentives (et c'est le cas !) et par suite plus sensibles aux mâles, ce qui expliquerait leur réponse plus importante.

Nous proposons, toutefois, de tester l'effet de la NA chez cette race, en bloquant par exemple son effet facilitateur par une administration centrale d'antagoniste à la NA.

De plus, au niveau de l'hypothalamus ventromédian, la densité des épines dendritiques fluctue au cours du cycle œstral chez la ratte. Elle est réduite après ovariectomie et restaurée si ces femelles sont traitées par de l'œstradiol et de la progestérone (Frankfurt, 1994). Ces changements ne sont pas observés chez le mâle. Il a été suggéré que les variations de densité des épines dendritiques résultent d'une neurotransmission active et pourrait être un mécanisme via lequel l'œstradiol stimule le comportement sexuel chez la femelle. Des mécanismes de plasticité similaires en relation avec le comportement sexuel pourraient exister chez la brebis. Ainsi, une longue activité de neurotransmission expliquerait peut être la longue durée du comportement d'œstrus chez les brebis prolifiques. Toutefois, des études d'électrophysiologie (mesure d'activité électrique des neurones) sont néanmoins nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Nous pouvons conclure de nos travaux que plusieurs composantes semblent intervenir dans le(s) mécanisme(s) d'induction et de maintien du comportement de réceptivité chez la brebis, avec l'œstradiol comme facteur « déclencheur » ; mais aussi avec une cascade d'évènements et des circuits neuronaux impliqués restant à établir.

En conclusion, nous pouvons dire que l'exploration expérimentale de la sensibilité différentielle à l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH et le comportement sexuel, entre les brebis IF et ROM a permis de mettre en évidence des seuils de réponse différents chez une race comme entre les deux races.

Chez la brebis ROM, la longue durée du rétrocontrôle négatif de l'œstradiol est, sans aucun doute, un des mécanismes qui permet d'augmenter la fenêtre de temps nécessaire au recrutement et à la sélection des follicules ovulatoires. Cet intervalle, avant l'ovulation, augmente les chances de fécondation puisqu'il est associé à une longue durée de réceptivité. Toutes ces régulations trouvent leur origine dans la différence de sensibilité à l'œstradiol au niveau central. Il serait intéressant d'élargir cette étude à d'autres races prolifiques, notamment celles qui ont un mécanisme de poly-ovulation différent de celui de la ROM, comme par exemple la brebis la Booroola.

Les résultats obtenus et présentés dans ce travail de thèse ouvrent des pistes de recherche notamment en ce qui concerne les mécanismes d'action des stéroïdes gonadiques, en particulier de l'œstradiol. La longue latence d'apparition du pic préovulatoire de LH chez la brebis ROM pourrait être exploitée pour mettre en évidence et identifier des mécanismes de plasticité impliqués dans la génération du pic de GnRH. De plus, la possibilité de dissocier le pic préovulatoire et le comportement sexuel chez cette race demeure un atout dans le but d'établir le schéma de régulation du comportement sexuel avec les centres et les circuits impliqués.

- Abraham, I. M., Todman, M. G., Korach, K. S., Herbison, A. E., 2004. Critical in vivo roles for classical estrogen receptors in rapid estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain. *Endocrinology*. 145, 3055-61.
- Adams, N. R., Atkinson, S., Martin, G. B., Briegel, J. R., Boukhliq, R., Sanders, M. R., 1993. Frequent blood sampling changes the plasma concentration of LH and FSH and the ovulation rate in Merino ewes. *J Reprod Fertil*. 99, 689-94.
- Adams, T. E., Quirke, J. F., Hanrahan, J. P., Adams, B. M., Watson, J. G., 1988. Gonadotrophin secretion during the periovulatory period in Galway and Finnish Landrace ewes and Finnish Landrace ewes selected for high ovulation rate. *J Reprod Fertil*. 83, 575-84.
- Adelman, J. P., Mason, A. J., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., 1986. Isolation of the gene and hypothalamic cDNA for the common precursor of gonadotropin-releasing hormone and prolactin release-inhibiting factor in human and rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83, 179-83.
- Advis, J. P., Conover, C. D., McDonald, J. K., Kuljis, R. O., 1990. Neuropeptide Y regulation of LHRH release in ewe median eminence: immunocytochemistry tissue content and in vivo analysis. *Ann.NY.Acad.Sci*. 611, 468-470.
- 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, 246-57.
- Albertson, A. J., Navratil, A., Mignot, M., Dufourny, L., Cherrington, B., Skinner, D. C., 2008. Immunoreactive GnRH type I receptors in the mouse and sheep brain. *J Chem Neuroanat*. 35, 326-33.
- Alexander, B. M., Perkins, A., Van Kirk, E. A., Moss, G. E., Fitzgerald, J. A., 1993. Hypothalamic and hypophyseal receptors for estradiol in high and low sexually performing rams. *Horm Behav*. 27, 296-307.
- Allen, D. M., Lamming, G. E., 1961. Nutrition and reproduction in ewe. *J.Agric.Sci., Cambr*. 56, 67-69.
- Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R., Guillemin, R., 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem Biophys Res Commun*. 44, 205-10.

- Amsterdam, A., Jamieson, J. D., 1974. Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. II. Functional characteristics of separated cells. *J Cell Biol.* 63, 1057-73.
- Anderson, S. T., Walsh, J. P., Tillet, Y., Clarke, I. J., Curlewis, J. D., 2001. Dopaminergic input to the ventromedial hypothalamus facilitates the oestrogen-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Neuroendocrinology.* 73, 91-101.
- Arreguin-Arevalo, J. A., Nett, T. M., 2005. A nongenomic action of 17beta-estradiol as the mechanism underlying the acute suppression of secretion of luteinizing hormone. *Biol Reprod.* 73, 115-22.
- Arreguin-Arevalo, J. A., Nett, T. M., 2006. A nongenomic action of estradiol as the mechanism underlying the acute suppression of secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes. *Biol Reprod.* 74, 202-8.
- Baird, D. T., Campbell, B. K., 1998. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate. *Mol Cell Endocrinol.* 145, 89-95.
- Baird, D. T., Scaramuzzi, R. J., 1976. Changes in the secretion of ovarian steroid and pituitary luteinizing hormone in the peri-ovulatory period in the ewe: the effect of progesterone. *J Endocrinol.* 70, 237-45.
- Baird, D. T., Swanston, I. A., McNeilly, A. S., 1981. Relationship between LH, FSH, and prolactin concentration and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicle in the ewe. *Biol Reprod.* 24, 1013-25.
- Banks, W. A., McMillian, C. L., Iyengar, S., 2001a. Saturable transport of the neurokinin-1 non-peptide antagonist LY303870 across the rat blood-brain barrier after intravenous administration. *Life Sci.* 69, 1683-9.
- Banks, W. A., Moinuddin, A., Morley, J. E., 2001b. Regional transport of TNF-alpha across the blood-brain barrier in young ICR and young and aged SAMP8 mice. *Neurobiol Aging.* 22, 671-6.
- Barker-Gibb, M. L., Clarke, I. J., 1996. Increased galanin and neuropeptide-Y immunoreactivity within the hypothalamus of ovariectomised ewes following a prolonged period of reduced body weight is associated with changes in plasma growth hormone but not gonadotropin levels. *Neuroendocrinology.* 64, 194-207.
- Barker-Gibb, M. L., Scott, C. J., Boublik, J. H., Clarke, I. J., 1995. The role of neuropeptide Y (NPY) in the control of LH secretion in the ewe with respect to season, NPY receptor subtype and the site of action in the hypothalamus. *J Endocrinol.* 147, 565-79.

- Barnett, D. K., Bunnell, T. M., Millar, R. P., Abbott, D. H., 2006. Gonadotropin-releasing hormone II stimulates female sexual behavior in marmoset monkeys. *Endocrinology*. 147, 615-23.
- Barry, J., Hoffman, G. E., Wray, S., LH-RH containing systems. In: Bjokklund A & Hokfelt T, (Ed.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy Amsterdam - New York - Oxford*, 1985, pp. 166-215.
- Bayliss, D. A., Millhorn, D. E., 1991. Chronic estrogen exposure maintains elevated levels of progesterone receptor mRNA in guinea pig hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*. 10, 167-72.
- Bayliss, D. A., Seroogy, K. B., Millhorn, D. E., 1991. Distribution and regulation by estrogen of progesterone receptor in the hypothalamus of the cat. *Endocrinology*. 128, 2610-7.
- Beach, F. A., 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav*. 7, 105-38.
- Ben Saïd, S., Lomet, D., Chesneau, D., Lardic, L., Canepa, S., Guillaume, D., Briant, C., Fabre-Nys, C., Caraty, A., 2007. Differential estradiol requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. *Biol Reprod*. 76, 673-80.
- Bentley, G. E., Jensen, J. P., Kaur, G. J., Wacker, D. W., Tsutsui, K., Wingfield, J. C., 2006. Rapid inhibition of female sexual behavior by gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *Horm Behav*. 49, 550-5.
- Bindon, B. M., Blanc, M. R., Pelletier, J., Terqui, M., Thimonier, J., 1979. Periovarian gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. *J Reprod Fertil*. 55, 15-25.
- Bindon, B. M., Piper, L. R., 1986a. The reproductive biology of prolific sheep breeds. *Oxf Rev Reprod Biol*. 8, 414-51.
- Binet, F. E., Moore, N. W., Robinson, T. J., 1956. The effect of the duration of progesterone pretreatment on the response of the spayed ewe to oestrogen. *J Endocrinol*. 14, 1-7.
- Blache, D., 1991. Etude neurobiologique du comportement sexuel femelle et de la sécrétion d'hormone Lutéinisante chez la brebis ovariectomisée. Thèse de doctorat.
- Blache, D., Batailler, M., Fabre-Nys, C., 1994. Oestrogen receptors in the preoptico-hypothalamic continuum: immunohistochemical study of the distribution and cell density during induced oestrous cycle in ovariectomized ewe. *J Neuroendocrinol*. 6, 329-39.

- Blache, D., Fabre-Nys, C., Venier, G., 1996. Inhibition of sexual behaviour and the luteinizing hormone surge by intracerebral progesterone implants in the female sheep. *Brain Res.* 741, 117-22.
- Blache, D., Fabre-Nys, C. J., Venier, G., 1991. Ventromedial hypothalamus as a target for oestradiol action on proceptivity, receptivity and luteinizing hormone surge of the ewe. *Brain Res.* 546, 241-9.
- Blaustein, J. D., Olster, D. H., Gonadal Steroid Hormone Receptors and Social Behaviors. In: J. Balthazart, (Ed.), *Comparative Environmental Physiology* Springer-Verlag, 1989, pp. 31-87.
- Blaustein, J. D., Olster, D. H., Tetel, M. J., 1993. Heterogeneous regulation of steroid hormone receptors in the brain. *American Zoologist.* 33, 219-228.
- Bolt, D. J., Kelley, H. E., Hawk, H. W., 1971. Release of LH by estradiol in cycling ewes. *Biol Reprod.* 4, 35-40.
- Bouix, J., Khadiri, M., 1975. Un des éléments majeurs de la mise en valeur des palmerais: la race ovine D'Man. *Option Méditerran.* 26, 87-93.
- Boukhliq, R., Goodman, R. L., Berriman, S. J., Adrian, B., Lehman, M. N., 1999. A subset of gonadotropin-releasing hormone neurons in the ovine medial basal hypothalamus is activated during increased pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.* 140, 5929-36.
- Bowen, J., Dahl, G. E., Evans, N. P., Thrun, L. A., Karsch, F. J., 1995. Does the GnRH surge amplitude exceed that required for production of the LH surge? *J reprod Fertil Abstract Series.* 15, 39.
- Brann, D. W., Putnam, C. D., Mahesh, V. B., 1990. Gamma-aminobutyric acidA receptors mediate 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one-induced gonadotropin secretion. *Endocrinology.* 126, 1854-9.
- Breen, K. M., Billings, H. J., Wagenmaker, E. R., Wessinger, E. W., Karsch, F. J., 2005. Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events. *Endocrinology.* 146, 2107-15.
- Breen, K. M., Davis, T. L., Doro, L. C., Nett, T. M., Oakley, A. E., Padmanabhan, V., Rispoli, L. A., Wagenmaker, E. R., Karsch, F. J., 2008. Insight into the neuroendocrine site and cellular mechanism by which cortisol suppresses pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* 149, 767-73.

- Burley, R. A., Holman, S. D., Hutchison, J. B., 1983. The regulation of precopulatory behavior by ovarian hormones in the female Mongolian gerbil. *Horm Behav.* 17, 374-87.
- Cahill, L. P., Saumande, J., Ravault, J. P., Blanc, M., Thimonier, J., Mariana, J. C., Mauleon, P., 1981. Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fertil.* 62, 141-50.
- Caldani, M., 1986. Mise en évidence immunohistochimique des neurones à LHRH du mouton (*Ovis aries*): Systématisation et ontogenèse. Thèse de Doctorat.
- Caldani, M., Batailler, M., Thiery, J. C., Dubois, M. P., 1988. LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry.* 89, 129-39.
- Canépa, S., Lainé, A. L., Bluteau, A., Fagu, C., Flon, C., Monniaux, D., 2008. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cah.Techn.Inra.* 64, 19-30.
- Caraty, A., Antoine, C., Delaleu, B., Locatelli, A., Gautron, J. P., Bouchard, P., Nature of GnRH secreted into hypophyseal portal blood during the estrogen induced-GnRH surge in the ewe. The Endocrine Society 75th Annual Meeting, Abstract 1812 1993a.
- Caraty, A., Bouchard, P., Blanc, M. R., Studies of LHRH Secretion into the Hypophyseal Portal Blood of the Ram: Gonadal Regulation of LH secretion is Exerted Mainly at the Hypothalamic Level. 1993b.
- Caraty, A., de Reviers, M. M., Pelletier, J., Dubois, M. P., 1980. Reassessment of LRF radioimmunoassay in the plasma and hypothalamic extracts of rats and rams. *Reprod Nutr Dev.* 20, 1489-501.
- Caraty, A., Delaleu, B., Chesneau, D., Fabre-Nys, C., 2002. Sequential role of e2 and GnRH for the expression of estrous behavior in ewes. *Endocrinology.* 143, 139-45.
- 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, 1752-60.
- Caraty, A., Grino, M., Locatelli, A., Guillaume, V., Boudouresque, F., Conte-Devolx, B., Oliver, C., 1990. Insulin-induced hypoglycemia stimulates corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. *J Clin Invest.* 85, 1716-21.

- Caraty, A., Grino, M., Locatelli, A., Oliver, C., 1988. Secretion of corticotropin releasing factor (CRF) and vasopressin (AVP) into the hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. *Biochem Biophys Res Commun.* 155, 841-9.
- Caraty, A., Locatelli, A., 1988. Effect of time after castration on secretion of LHRH and LH in the ram. *J Reprod Fertil.* 82, 263-9.
- Caraty, A., Locatelli, A., Martin, G. B., 1989. Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. *J Endocrinol.* 123, 375-82.
- Caraty, A., Locatelli, A., Schanbacher, B., 1987. [Augmentation, by naloxone, of the frequency and amplitude of LH-RH pulses in hypothalamo-hypophyseal portal blood in the castrated ram]. *C R Acad Sci III.* 305, 369-74.
- Caraty, A., Miller, D. W., Delaleu, B., Martin, G. B., 1997. Stimulation of LH secretion in sheep by central administration of corticotrophin-releasing hormone. *J Reprod Fertil.* 111, 249-57.
- Caraty, A., Skinner, D. C., 1999. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology.* 140, 165-70.
- Caraty, A., Skinner, D. C., 2008. Gonadotropin-Releasing Hormone in Third Ventricular Cerebrospinal Fluid: Endogenous Distribution and Exogenous Uptake. *Endocrinology.*
- Carroll, R. S., Kowash, P. M., Lofgren, J. A., Schwall, R. H., Chin, W. W., 1991. In vivo regulation of FSH synthesis by inhibin and activin. *Endocrinology.* 129, 3299-304.
- Cattaneo, E., Maggi, A., 1990. c-fos induction by estrogen in specific rat brain areas. *Eur J Pharmacol.* 188, 153-9.
- Chaillou, E., 2000. Influence de l'état nutritionnel sur l'expression de Neuropeptides Hypothalamiques potentiellement impliqués dans l'interaction entre la nutrition et la reproduction. Etude immunohistochimique. *Biologie et Agronomie. These en Science Agronomique.*
- Chemineau, P., Pellicer-Rubio, M. T., Lassoued, N., Khaldi, G., Monniaux, D., 2006. Male-induced short oestrous and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod Nutr Dev.* 46, 417-29.
- Cheng, M. F., 1977. Role of gonadotrophin releasing hormones in the reproductive behaviour of female ring doves (*Streptopelia risoria*). *J Endocrinol.* 74, 37-45.

- Clark, A. S., Davis, L. A., Roy, E. J., 1985. A possible physiological basis for the dud-stud phenomenon. *Horm Behav.* 19, 227-30.
- Clarke, I. J., 1988. Gonadotrophin-releasing hormone secretion (GnRH) in anoestrous ewes and the induction of GnRH surges by oestrogen. *J Endocrinol.* 117, 355-60.
- Clarke, I. J., Burman, K., Funder, J. W., Findlay, J. K., 1981. Estrogen receptors in the neuroendocrine tissues of the ewe in relation to breed, season, and stage of the estrous cycle. *Biol Reprod.* 24, 323-31.
- Clarke, I. J., Burman, K. J., Doughton, B. W., Cummins, J. T., 1986. Effects of constant infusion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes with hypothalamo-pituitary disconnection: further evidence for differential control of LH and FSH secretion and the lack of a priming effect. *J Endocrinol.* 111, 43-9.
- Clarke, I. J., Cummins, J. T., 1982. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology.* 111, 1737-9.
- Clarke, I. J., Cummins, J. T., Crowder, M. E., Nett, T. M., 1988. Pituitary receptors for gonadotropin-releasing hormone in relation to changes in pituitary and plasma gonadotropins in ovariectomized hypothalamo/pituitary-disconnected ewes. II. A marked rise in receptor number during the acute feedback effects of estradiol. *Biol Reprod.* 39, 349-54.
- Clarke, I. J., Cummins, J. T., Crowder, M. E., Nett, T. M., 1989. Long-term negative feedback effects of oestrogen and progesterone on the pituitary gland of the long-term ovariectomized ewe. *J Endocrinol.* 120, 207-14.
- 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. *J Neuroendocrinol.* 13, 934-41.
- Clarke, I. J., Thomas, G. B., Yao, B., Cummins, J. T., 1987. GnRH secretion throughout the ovine estrous cycle. *Neuroendocrinology.* 46, 82-8.
- Combarous, Y., Colette, G., Crépieux, P., Chopineau, M., Counis, R., Les gonadotropines: Structure, fonction, mécanismes d'action. In: M. L. C.Thibaut, (Ed.), *La reproduction chez les Mammifères et l'Homme* Ellipses INRA, Paris, 2001, pp. 108-121.

- Counis, R., Combarrous, Y., Chabot, V., Taragnat, C., Régulation de la synthèse et de la libération des gonadotropines hypophysaires In: I. Ellipses, (Ed.), *Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*, 2001, pp. 65-84.
- Crowder, M. E., Nett, T. M., 1984. Pituitary content of gonadotropins and receptors for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic content of GnRH during the periovulatory period of the ewe. *Endocrinology*. 114, 234-9.
- Davis, G. H., 2005. Major genes affecting ovulation rate in sheep. *Genet Sel Evol.* 37 Suppl 1, S11-23.
- Davis, G. H., McEwan, J. C., Fennessy, P. F., Dodds, K. G., Farquhar, P. A., 1991. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. *Biol Reprod.* 44, 620-4.
- Dees, W. L., Dearth, R. K., Hooper, R. N., Brinsko, S. P., Romano, J. E., Rahe, H., Yu, W. H., McCann, S. M., 2001. Lamprey gonadotropin-releasing hormone-III selectively releases follicle stimulating hormone in the bovine. *Domest Anim Endocrinol.* 20, 279-88.
- Dees, W. L., Hiney, J. K., Sower, S. A., Yu, W. H., McCann, S. M., 1999. Localization of immunoreactive lamprey gonadotropin-releasing hormone in the rat brain. *Peptides.* 20, 1503-11.
- Deghenghi, R., Boutignon, F., Wuthrich, P., Lenaerts, V., 1993. Antarelix (EP 24332) a novel water soluble LHRH antagonist. *Biomed Pharmacother.* 47, 107-10.
- Devignes, A., 1971. La race ovine Romanov. *Anns. Zootech.* 20, 353- 370.
- Di Gregorio, G. B., Nett, T. M., 1995. Estradiol and progesterone influence the synthesis of gonadotropins in the absence of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biol Reprod.* 53, 166-72.
- Dolan, S., Evans, N. P., Richter, T. A., Nolan, A. M., 2003. Expression of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptor in sheep spinal cord. *Neurosci Lett.* 346, 120-2.
- DonCarlos, L. L., Monroy, E., Morrell, J. I., 1991. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the forebrain of the female guinea pig. *J Comp Neurol.* 305, 591-612.
- Driancourt, M. A., Gauld, I. K., Terqui, M., Webb, R., 1986. Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J Reprod Fertil.* 78, 565-75.

- Driancourt, M. A., Gougeon, A., Monniaux, D., Royère, D., Thibault, C., Folliculogenèse et ovulation. In: I. Ellipses, (Ed.), *Reproduction chez les Mammifères et l'Homme*, PARIS, 1991, pp. 316-347.
- Driancourt, M. A., Levasseur, M. C., Cycle estriens et cycles menstruels. In: M. L. C. Thibault, (Ed.), *La reproduction chez les Mammifères et l'Homme*, PARIS, 2001, pp. 680-696.
- Dudley, C. A., Moss, R. L., 1987. Effects of a behaviorally active LHRH fragment and septal area stimulation on the activity of mediobasal hypothalamic neurons. *Synapse*. 1, 240-7.
- Dudley, C. A., Moss, R. L., 1991. Facilitation of sexual receptivity in the female rat by C-terminal fragments of LHRH. *Physiol Behav*. 50, 1205-8.
- Dufourny, L., Caraty, A., Clarke, I. J., Robinson, J. E., Skinner, D. C., 2005. Progesterone-receptive beta-endorphin and dynorphin B neurons in the arcuate nucleus project to regions of high gonadotropin-releasing hormone neuron density in the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology*. 81, 139-49.
- Ehnert, K., Moberg, G. P., 1991. Disruption of estrous behavior in ewes by dexamethasone or management-related stress. *J Anim Sci*. 69, 2988-94.
- Estrada, K. M., Pompolo, S., Morris, M. J., Tilbrook, A. J., Clarke, I. J., 2003. Neuropeptide Y (NPY) delays the oestrogen-induced luteinizing hormone (LH) surge in the ovariectomized ewe: further evidence that NPY has a predominant negative effect on LH secretion in the ewe. *J Neuroendocrinol*. 15, 1011-20.
- Evans, N. P., Dahl, G. E., Caraty, A., Padmanabhan, V., Thrun, L. A., Karsch, F. J., 1996. How much of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge is required for generation of the luteinizing hormone surge in the ewe? Duration of the endogenous GnRH signal. *Endocrinology*. 137, 4730-7.
- Evans, N. P., Dahl, G. E., Glover, B. H., Karsch, F. J., 1994. Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology*. 134, 1806-11.
- Evans, N. P., Dahl, G. E., Mauger, D., Karsch, F. J., 1995a. Estradiol induces both qualitative and quantitative changes in the pattern of gonadotropin-releasing hormone secretion during the presurge period in the ewe. *Endocrinology*. 136, 1603-9.
- Evans, N. P., Dahl, G. E., Mauger, D. T., Padmanabhan, V., Thrun, L. A., Karsch, F. J., 1995b. Does estradiol induce the preovulatory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system. *Endocrinology*. 136, 5511-9.

- 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, 5408-14.
- Fabre-Nys, C., 1983. [Hormonal control of male and female sexual behavior in ewes: role of interactions between progesterone and estradiol]. *C R Seances Acad Sci III*. 296, 961-4.
- Fabre-Nys, C., Blache, D., Hinton, M. R., Goode, J. A., Kendrick, K. M., 1994. Microdialysis measurement of neurochemical changes in the mediobasal hypothalamus of ovariectomized ewes during oestrus. *Brain Res*. 649, 282-96.
- Fabre-Nys, C., Chesneau, D., de la Riva, C., Hinton, M. R., Locatelli, A., Ohkura, S., Kendrick, K. M., 2003. Biphasic role of dopamine on female sexual behaviour via D2 receptors in the mediobasal hypothalamus. *Neuropharmacology*. 44, 354-66.
- Fabre-Nys, C., Gelez, H., 2007. Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Horm Behav*. 52, 18-25.
- Fabre-Nys, C., Martin, G. B., 1991a. Roles of progesterone and oestradiol in determining the temporal sequence and quantitative expression of sexual receptivity and the preovulatory LH surge in the ewe. *J Endocrinol*. 130, 367-79.
- Fabre-Nys, C., Martin, G. B., Venier, G., 1993. Analysis of the hormonal control of female sexual behavior and the preovulatory LH surge in the ewe: roles of quantity of estradiol and duration of its presence. *Horm Behav*. 27, 108-21.
- Fabre-Nys, C., Ohkura, S., Kendrick, K. M., 1997. Male faces and odours evoke differential patterns of neurochemical release in the mediobasal hypothalamus of the ewe during oestrus: an insight into sexual motivation? *Eur J Neurosci*. 9, 1666-77.
- Fabre-Nys, C., Venier, G., 1987. Development and use of method for quantifying sexual behaviour in ewes. *App. Anim. Behave. Sci*. 17, 289-304.
- Fahmy, M. H., 1996. *Prolific Sheep*. Quebec Canada.
- Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., Wehling, M., 2000. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*. 52, 513-56.
- Falkenstein, E., Wehling, M., 2000. Nongenomically initiated steroid actions. *Eur J Clin Invest*. 30 Suppl 3, 51-4.
- Fenstermacher, J., Kaye, T., 1988. Drug "diffusion" within the brain. *Ann N Y Acad Sci*. 531, 29-39.

- Ferland, L., Labrie, F., Savary, M., Beaulieu, M., Coy, D. H., Coy, E. J., Schally, A. V., 1976. Inhibitory activity of analogues of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in vitro and in vivo. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 5 Suppl, 279S-289S.
- Fernald, R. D., White, R. B., 1999. Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front Neuroendocrinol*. 20, 224-40.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., Frackelton, A. R., Jr., 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*. 14, 1649-60.
- Foradori, C. D., Amstalden, M., Goodman, R. L., Lehman, M. N., 2006. Colocalisation of dynorphin a and neurokinin B immunoreactivity in the arcuate nucleus and median eminence of the sheep. *J Neuroendocrinol*. 18, 534-41.
- Forcada, F., Abecia, J. A., 2006. The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes. *Reprod Nutr Dev*. 46, 355-65.
- Forcada, F., Abecia, J. A., Sierra, I., 1992. Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Ruminant Research*. 8, 313-324.
- Foster, D. L., Jaffe, R. B., Niswender, G. D., 1975. Sequential patterns of circulating LH and FSH in female sheep during the early postnatal period: effect of gonadectomy. *Endocrinology*. 96, 15-22.
- Foster, D. L., Olster, D. H., 1985. Effect of restricted nutrition on puberty in the lamb: patterns of tonic luteinizing hormone (LH) secretion and competency of the LH surge system. *Endocrinology*. 116, 375-81.
- Franceschini, I., D., L., Cognie, J., Fabre-Nys, C., Tanguy, D., Tillet, Y., Duittoz, A., Rougon, G., Caraty, A., 2007. Un rôle pour la forme polysialisée de NCAM (PSA-NCAM) dans la genèse du pic préovulatoire de GnRH. . 34ème Congrès de la Société de Neuroendocrinologie. . Poster P-22, p:51.
- 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, 225-30.
- Frankfurt, M., 1994. Gonadal steroids and neuronal plasticity. Studies in the adult rat hypothalamus. *Ann N Y Acad Sci*. 743, 45-59; discussion 59-60.

- Gautron, J. P., Gras, C., Enjalbert, A., 2005. Molecular polymorphism of native gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is restricted to mammalian GnRH and [hydroxyproline<sup>9</sup>] GnRH in the developing rat brain. *Neuroendocrinology*. 81, 69-86.
- Gautron, J. P., Leblanc, P., Bluet-Pajot, M. T., Pattou, E., L'Heritier, A., Mounier, F., Ponce, G., Audinot, V., Rasolonjanahary, R., Kordon, C., 1992. A second endogenous molecular form of mammalian hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), (hydroxyproline<sup>9</sup>)LHRH, releases luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in vitro and in vivo. *Mol Cell Endocrinol*. 85, 99-107.
- Gautron, J. P., Pattou, E., Leblanc, P., L'Heritier, A., Kordon, C., 1993. Preferential distribution of C-terminal fragments of [hydroxyproline<sup>9</sup>]LHRH in the rat hippocampus and olfactory bulb. *Neuroendocrinology*. 58, 240-50.
- Gay, V. L., Midgley, A. R., Jr., 1969. Response of the adult rat to orchidectomy and ovariectomy as determined by LH radioimmunoassay. *Endocrinology*. 84, 1359-64.
- Gazal, O. S., Leshin, L. S., Stanko, R. L., Thomas, M. G., Keisler, D. H., Anderson, L. L., Williams, G. L., 1998. Gonadotropin-releasing hormone secretion into third-ventricle cerebrospinal fluid of cattle: correspondence with the tonic and surge release of luteinizing hormone and its tonic inhibition by suckling and neuropeptide Y. *Biol Reprod*. 59, 676-83.
- Gearing, M., Terasawa, E., 1988. Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuroterminals mapped using the push-pull perfusion method in the rhesus monkey. *Brain Res Bull*. 21, 117-21.
- Gelez, H., 2003. Etude des mécanismes centraux impliqués dans l'effet du mâle ou de son odeur sur la brebis en anoestrus Thèse de Doctorat. Thèse de Doctorat
- Gelez, H., Archer, E., Chesneau, D., Lindsay, D., Fabre-Nys, C., 2004. Role of experience in the neuroendocrine control of ewes' sexual behavior. *Horm Behav*. 45, 190-200.
- Goodman, R. L., Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle. In: N. J. Knobil E, (Ed.), *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, 1994, pp. 659-709.
- Goodman, R. L., 1996. Neural systems mediating the negative feedback actions of estradiol and progesterone in the ewe. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 56, 727-41.
- Goodman, R. L., Bittman, E. L., Foster, D. L., Karsch, F. J., 1981a. The endocrine basis of the synergistic suppression of luteinizing hormone by estradiol and progesterone. *Endocrinology*. 109, 1414-7.

- Goodman, R. L., Inskeep, E. K., Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Sheep. In: J. D. Neill, (Ed.), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, 2006a, pp. 2389-2447.
- Goodman, R. L., Inskeep, E. K., Neuroendocrine Control of The Ovarian Cycle of the Sheep. In: E. Jimmy D. Neill, (Ed.), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 2006b.
- Goodman, R. L., Karsch, F. J., 1980. Pulsatile secretion of luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. *Endocrinology*. 107, 1286-90.
- Goodman, R. L., Legan, S. J., Ryan, K. D., Foster, D. L., Karsch, F. J., 1980a. Two effects of estradiol that normally contribute to the control of tonic LH secretion in the ewe. *Biol Reprod*. 23, 415-22.
- Goodman, R. L., Legan, S. J., Ryan, K. D., Foster, D. L., Karsch, F. J., 1981c. Importance of variations in behavioural and feedback actions of oestradiol to the control of seasonal breeding in the ewe. *J Endocrinol*. 89, 229-40.
- Goubillon, M., Delaleu, B., Tillet, Y., Caraty, A., Herbison, A. E., 1999. Localization of estrogen-receptive neurons projecting to the GnRH neuron-containing rostral preoptic area of the ewe. *Neuroendocrinology*. 70, 228-36.
- Goubillon, M. L., Caraty, A., Herbison, A. E., 2002. Evidence in favour of a direct input from the ventromedial nucleus to gonadotropin-releasing hormone neurones in the ewe: an anterograde tracing study. *J Neuroendocrinol*. 14, 95-100.
- Goubillon, M. L., Forsdike, R. A., Robinson, J. E., Ciofi, P., Caraty, A., Herbison, A. E., 2000. Identification of neurokinin B-expressing neurons as an highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology*. 141, 4218-25.
- Gregg, D. W., Allen, M. C., Nett, T. M., 1990. Estradiol-induced increase in number of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured ovine pituitary cells. *Biol Reprod*. 43, 1032-6.
- Gregg, D. W., Nett, T. M., 1989. Direct effects of estradiol-17 beta on the number of gonadotropin-releasing hormone receptors in the ovine pituitary. *Biol Reprod*. 40, 288-93.
- Grove-Strawser, D., Sower, S. A., Ronsheim, P. M., Connolly, J. B., Bourn, C. G., Rubin, B. S., 2002. Guinea pig GnRH: localization and physiological activity reveal that it, not mammalian GnRH, is the major neuroendocrine form in guinea pigs. *Endocrinology*. 143, 1602-12.

- Haour, F., Dussailant, M., Leblanc, P., Rostene, W., 1987. [Demonstration and topographical distribution of LHRH receptors in the central nervous system in the normal and castrated male rat]. *C R Acad Sci III*. 305, 41-4.
- Harris, T. G., Dye, S., Robinson, J. E., Skinner, D. C., Evans, N. P., 1999. Progesterone can block transmission of the estradiol-induced signal for luteinizing hormone surge generation during a specific period of time immediately after activation of the gonadotropin-releasing hormone surge-generating system. *Endocrinology*. 140, 827-34.
- Henderson, K. M., McNatty, K. P., O'Keeffe, L. E., Lun, S., Heath, D. A., Prisk, M. D., 1987. Differences in gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production by granulosa cells from booroola x merino ewes which were homozygous, heterozygous or non-carriers of a fecundity gene influencing their ovulation rate. *J Reprod Fertil*. 81, 395-402.
- Henry, B. A., Goding, J. W., Tilbrook, A. J., Dunshea, F. R., Clarke, I. J., 2001. Intracerebroventricular infusion of leptin elevates the secretion of luteinising hormone without affecting food intake in long-term food-restricted sheep, but increases growth hormone irrespective of bodyweight. *J Endocrinol*. 168, 67-77.
- Henry, B. A., Tilbrook, A. J., Dunshea, F. R., Rao, A., Blache, D., Martin, G. B., Clarke, I. J., 2000. Long-term alterations in adiposity affect the expression of melanin-concentrating hormone and enkephalin but not proopiomelanocortin in the hypothalamus of ovariectomized ewes. *Endocrinology*. 141, 1506-14.
- Herbison, A., Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone Neural Network. In: E. Jimmy D. Neill, (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 2006, pp. 1415-1482.
- Herbison, A. E., Robinson, J. E., Skinner, D. C., 1993. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology*. 57, 751-9.
- Hoffman, G. E., Phelps, C. J., Khachaturian, H., Sladek, J. R., Neuroendocrine Projections to the median Eminence In: Ganten D & Pffaf D, (Ed.), *Morphomogy of Hypothalamus and its connections*, Berlin - Heidelberg - New York - London - Paris - Tokyo, 1986, pp. 161-196.
- Hoffman, G. E., Smith, M. S., Verbalis, J. G., 1993. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 14, 173-213.

- Horton, R. J., Cummins, J. T., Clarke, I. J., 1987. Naloxone evokes large-amplitude GnRH pulses in luteal-phase ewes. *J Reprod Fertil.* 81, 277-86.
- Horton, R. J., Francis, H., Clarke, I. J., 1989. Seasonal and steroid-dependent effects on the modulation of LH secretion in the ewe by intracerebroventricularly administered beta-endorphin or naloxone. *J Endocrinol.* 122, 509-17.
- Howland, B. E., Akbar, A. M., Stormshak, F., 1971. Serum LH levels and luteal weight in ewes following a single injection of estradiol. *Biol Reprod.* 5, 25-9.
- Huang, E. S., Miller, W. L., 1980. Effects of estradiol-17 beta on basal and luteinizing hormone releasing hormone-induced secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone by ovine pituitary cell culture. *Biol Reprod.* 23, 124-34.
- Iivonen, S., Heikkinen, T., Puolivali, J., Helisalmi, S., Hiltunen, M., Soininen, H., Tanila, H., 2006. Effects of estradiol on spatial learning, hippocampal cytochrome P450 19, and estrogen alpha and beta mRNA levels in ovariectomized female mice. *Neuroscience.* 137, 1143-52.
- Ilona Vathy, A. M. E., 1989. Hormonal Activation of Female Sexual Behavior is Accompanied by Hypothalamic Norepinephrine Release. *Journal of Neuroendocrinology.* 1, 383-388.
- Insel, T. R., 1990. Regional induction of c-fos-like protein in rat brain after estradiol administration. *Endocrinology.* 126, 1849-53.
- Jackson, G. L., 1977. Effect of adrenergic blocking drugs on secretion of luteinizing hormone in the ovariectomized ewe. *Biol Reprod.* 16, 543-8.
- Jackson, G. L., Kuehl, D., 2002. Gamma-aminobutyric acid (GABA) regulation of GnRH secretion in sheep. *Reprod Suppl.* 59, 15-24.
- Jackson, G. L., Kuehl, D., McDowell, K., Zaleski, A., 1978. Effect of hypothalamic deafferentation on secretion of luteinizing hormone in the ewe. *Biol Reprod.* 18, 808-19.
- Jan, Y. N., Jan, L. Y., 1983. A LHRH-like peptidergic neurotransmitter capable of [ $\gamma$ ]action at a distance' in autonomic ganglia. *Trends in Neurosciences.* 6, 320-325.
- Jennes, L., Conn, P. M., 1994. Gonadotropin-releasing hormone and its receptors in rat brain. *Front Neuroendocrinol.* 15, 51-77.
- Jennes, L., Dalati, B., Conn, P. M., 1988. Distribution of gonadotropin releasing hormone agonist binding sites in the rat central nervous system. *Brain Res.* 452, 156-64.

- Jennes, L., Jennes, M. E., Purvis, C., Nees, M., 1992. c-fos expression in noradrenergic A2 neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments. *Brain Res.* 586, 171-5.
- Jimenez-Linan, M., Rubin, B. S., King, J. C., 1997. Examination of guinea pig luteinizing hormone-releasing hormone gene reveals a unique decapeptide and existence of two transcripts in the brain. *Endocrinology.* 138, 4123-30.
- Kah, O., Lethimonier, C., Lareyre, J. J., 2004. [Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) in the animal kingdom]. *J Soc Biol.* 198, 53-60.
- Kah, O., Lethimonier, C., Somoza, G., Guilgur, L. G., Vaillant, C., Lareyre, J. J., 2007. GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen Comp Endocrinol.* 153, 346-64.
- Karsch, F. J., Battaglia, D. F., 2002. Mechanisms for endotoxin-induced disruption of ovarian cyclicity: observations in sheep. *Reprod Suppl.* 59, 101-13.
- Karsch, F. J., Bittman, E. L., Foster, D. L., Goodman, R. L., Legan, S. J., Robinson, J. E., 1984. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res.* 40, 185-232.
- Karsch, F. J., Foster, D. L., Bittman, E. L., Goodman, R. L., 1983. A role for estradiol in enhancing luteinizing hormone pulse frequency during the follicular phase of the estrous cycle of sheep. *Endocrinology.* 113, 1333-9.
- Karsch, F. J., Foster, D. L., Legan, S. J., Ryan, K. D., Peter, G. K., 1979. Control of the preovulatory endocrine events in the ewe: interrelationship of estradiol, progesterone, and luteinizing hormone. *Endocrinology.* 105, 421-6.
- Karsch, F. J., Legan, S. J., Hauger, R. L., Foster, D. L., 1977. Negative feedback action of progesterone on tonic luteinizing hormone secretion in the ewe: dependence on the ovaries. *Endocrinology.* 101, 800-6.
- Karsch, F. J., Legan, S. J., Ryan, K. D., Foster, D. L., 1980. Importance of estradiol and progesterone in regulating LH secretion and estrous behavior during the sheep estrous cycle. *Biol Reprod.* 23, 404-13.
- Kasa-Vubu, J. Z., Dahl, G. E., Evans, N. P., Thrun, L. A., Moenter, S. M., Padmanabhan, V., Karsch, F. J., 1992. Progesterone blocks the estradiol-induced gonadotropin discharge in the ewe by inhibiting the surge of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* 131, 208-12.

- Kastin, A. J., Akerstrom, V., 2001. Glucose and insulin increase the transport of leptin through the blood-brain barrier in normal mice but not in streptozotocin-diabetic mice. *Neuroendocrinology*. 73, 237-42.
- Katayama, T., Shiota, K., Takahashi, M., 1990. Activin A increases the number of follicle-stimulating hormone cells in anterior pituitary cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 69, 179-185.
- Kauffman, A. S., Rissman, E. F., 2004. A critical role for the evolutionarily conserved gonadotropin-releasing hormone II: mediation of energy status and female sexual behavior. *Endocrinology*. 145, 3639-46.
- Kauffman, A. S., Wills, A., Millar, R. P., Rissman, E. F., 2005. Evidence that the type-2 gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) receptor mediates the behavioural effects of GnRH-II on feeding and reproduction in musk shrews. *J Neuroendocrinol*. 17, 489-97.
- Kaynard, A. H., Follett, B. K., Karsch, F. J., 1988a. Feedback regulation of pulsatile LH secretion in the ewe: stimulation of frequency by estradiol. *Neuroendocrinology*. 48, 81-6.
- Kaynard, A. H., Karsch, F. J., 1988b. Hypophyseal actions of pulsatile gonadotropin-releasing hormone in the ewe: development and application of a new experimental model. *Neuroendocrinology*. 48, 287-95.
- Kaynard, A. H., Malpoux, B., Robinson, J. E., Wayne, N. L., Karsch, F. J., 1988c. Importance of pituitary and neural actions of estradiol in induction of the luteinizing hormone surge in the ewe. *Neuroendocrinology*. 48, 296-303.
- Kelly, M. J., Ronnekleiv, O. K., Ibrahim, N., Lagrange, A. H., Wagner, E. J., 2002. Estrogen modulation of K(+) channel activity in hypothalamic neurons involved in the control of the reproductive axis. *Steroids*. 67, 447-56.
- Kelly, M. J., Wagner, E. J., 1999. Estrogen Modulation of G-protein-coupled Receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 10, 369-374.
- Kendrick, K. M., Dixson, A. F., 1985. Luteinizing hormone releasing hormone enhances proceptivity in a primate. *Neuroendocrinology*. 41, 449-53.
- Kendrick, K. M., Fabre-Nys, C., Blache, D., Goode, J. A., Broad, K. D., 1993. The role of oxytocin release in the mediobasal hypothalamus of the sheep in relation to female sexual receptivity. *J Neuroendocrinol*. 5, 13-21.

- Kondo, Y., Shinoda, A., Yamanouchi, K., Arai, Y., 1990. Role of septum and preoptic area in regulating masculine and feminine sexual behavior in male rats. *Horm Behav.* 24, 421-34.
- Krege, J. H., Hodgin, 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, 15677-82.
- Lagrange, A. H., Ronnekleiv, O. K., Kelly, M. J., 1994. The potency of mu-opioid hyperpolarization of hypothalamic arcuate neurons is rapidly attenuated by 17 beta-estradiol. *J Neurosci.* 14, 6196-204.
- Lagrange, A. H., Ronnekleiv, O. K., Kelly, M. J., 1997. Modulation of G protein-coupled receptors by an estrogen receptor that activates protein kinase A. *Mol Pharmacol.* 51, 605-12.
- Lahlou-Kassi, A., Schams, D., Glatzel, P., 1984. Plasma gonadotrophin concentrations during the oestrous cycle and after ovariectomy in two breeds of sheep with low and high fecundity. *J Reprod Fertil.* 70, 165-73.
- Land, R. B., 1970. A relationship between the duration of oestrus, ovulation rate and litter size of sheep. *J Reprod Fertil.* 23, 49-53.
- Land, R. B., Thompson, R., Baird, D. T., 1972. The duration of oestrus in ovariectomized Finnish Landrace and Scottish Blackface ewes following progesterone and oestrogen treatment. *J Reprod Fertil.* 30, 39-44.
- Laws, S. C., Webster, J. C., Miller, W. L., 1990. Estradiol alters the effectiveness of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in ovine pituitary cultures: GnRH receptors versus responsiveness to GnRH. *Endocrinology.* 127, 381-6.
- Leblanc, P., Crumeyrolle, M., Latouche, J., Jordan, D., Fillion, G., L'Heritier, A., Kordon, C., Dussailant, M., Rostene, W., Haour, F., 1988. Characterization and distribution of receptors for gonadotropin-releasing hormone in the rat hippocampus. *Neuroendocrinology.* 48, 482-8.
- Legan, S. J., Karsch, F. J., 1980. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod.* 23, 1061-8.
- Legan, S. J., Karsch, F. J., Foster, D. L., 1977. The endocrin control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.* 101, 818-24.

- Legan, S. J., Tsai, H. W., 2003. Oestrogen receptor-alpha and -beta immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone neurones after ovariectomy and chronic exposure to oestradiol. *J Neuroendocrinol.* 15, 1164-70.
- Legros, C., 2007. Mode d'action de la Mélatonine sur le Système Nerveux Central: Distribution par le Liquide Cérébrospinal et Caractérisation d'un nouveau site de liaison Mélatoninergique exprimé dans les régions périventriculaires. *Science de la Vie. Thèse de Doctorat.*
- Lehman, M. N., Ebling, F. J., Moenter, S. M., Karsch, F. J., 1993. Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the sheep brain. *Endocrinology.* 133, 876-86.
- Lehman, M. N., Karsch, F. J., 1993. Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology.* 133, 887-95.
- Lehman, M. N., Robinson, J. E., Karsch, F. J., Silverman, A. J., 1986. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *J Comp Neurol.* 244, 19-35.
- Levine, J. E., Pau, K. Y., Ramirez, V. D., Jackson, G. L., 1982. Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology.* 111, 1449-55.
- Levine, J. E., Ramirez, V. D., 1980. In vivo release of luteinizing hormone-releasing hormone estimated with push-pull cannulae from the mediobasal hypothalami of ovariectomized, steroid-primed rats. *Endocrinology.* 107, 1782-90.
- Maijala, K., 1967. Causes of variation in litter size in Finn-sheep ewes. *Suom maata. seur. Julk.* 109, 136-143.
- Malpoux, B., Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals. In: E. Jimmy D. Neill, (Ed.), *Knobil and Neil's Physiology of Reproduction*, 2006, pp. 2231-2281.
- Malpoux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G., Chemineau, P., 1998. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology.* 139, 1508-16.

- Malven, P. V., Haglof, S. A., Jiang, H., 1995. Serum concentrations of luteinizing hormone, growth hormone, and prolactin in untreated and estradiol-treated ovariectomized ewes after immunoneutralization of hypothalamic neuropeptide Y. *J Anim Sci.* 73, 2105-12.
- Marshall, F., 1937. On the change over in the oestrus cycle in animals after transference across the Equator, with further observation on the incidence of the breeding season and the factors controlling sexual periodicity. *Proc, R Soc Lond.* 122, 413-428.
- Martensz, N. D., Scaramuzzi, R. J., 1979. Plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and progesterone during the breeding season in ewes immunized against androstenedione or testosterone. *J Endocrinol.* 81, 249-59.
- Martin, G. B., Oldham, C. M., Lindsay, D. R., 1981. Effect of stress due to laparoscopy on plasma cortisol levels, the preovulatory surge of LH, and ovulation in the ewe. *Theriogenology.* 16, 39-44.
- Martin, G. B., Price, C. A., Thiery, J. C., Webb, R., 1988. Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J Reprod Fertil.* 82, 319-28.
- Martin, G. B., Rodger, J., Blache, D., 2004. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod Fertil Dev.* 16, 491-501.
- Martin, G. B., Scaramuzzi, R. J., 1983. The induction of oestrus and ovulation in seasonally anovular ewes by exposure to rams. *J Steroid Biochem.* 19, 869-75.
- Martin, G. B., Scaramuzzi, R. J., Henstridge, J. D., 1983. Effects of oestradiol, progesterone and androstenedione on the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes during spring and autumn. *J Endocrinol.* 96, 181-93.
- Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R. M., Arimura, A., Schally, A. V., 1971. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun.* 43, 1334-9.
- Maurya, V. P., Naqvi, S. M. K., Gulyani, R., A., J., 2005. Effect of thermal stress on sexual behaviour of superovulated Bharat Merino ewes. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 18, 1403-1406.
- McLay, R. N., Kastin, A. J., Zadina, J. E., 2000. Passage of interleukin-1-beta across the blood-brain barrier is reduced in aged mice: a possible mechanism for diminished fever in aging. *Neuroimmunomodulation.* 8, 148-53.
- McManus, C. J., Valent, M., Connors, J. M., Lehman, M. N., Goodman, R., A NEUROKININ-B Agonist stimulates LH secretion in follicular, but not luteal phase ewes. Society for Neuroscience, Washington, 2005.

- McNatty, K. P., Gibb, M., Dobson, C., Thurley, D. C., 1981. Evidence that changes in luteinizing hormone secretion regulate the growth of the preovulatory follicle in the ewe. *J Endocrinol.* 90, 375-89.
- McNeilly, A. S., 1984. Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during the delay in oestrus induced by treatment of ewes with bovine follicular fluid. *J Reprod Fertil.* 72, 165-72.
- McNeilly, A. S., O'Connell, M., Baird, D. T., 1982. Induction of ovulation and normal luteal function by pulsed injections of luteinizing hormone in anestrus ewes. *Endocrinology.* 110, 1292-9.
- Meikle, A., Forsberg, M., Garofalo, E. G., Carlsson, M. A., Lundeheim, N., Rubianes, E., 2001. Circulating gonadotrophins and follicular dynamics in anestrus ewes after treatment with estradiol-17beta. *Anim Reprod Sci.* 67, 79-90.
- Meurisse, M., Gonzalez, A., Delsol, G., Caba, M., Levy, F., Poindron, P., 2005. Estradiol receptor-alpha expression in hypothalamic and limbic regions of ewes is influenced by physiological state and maternal experience. *Horm Behav.* 48, 34-43.
- Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Minegishi, T., Nomura, M., Takahashi, Y., Igarashi, M., Kangawa, K., Matsuo, H., 1982. Isolation and characterization of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun.* 107, 820-7.
- Moenter, S. M., Brand, R. M., Midgley, A. R., Karsch, F. J., 1992. Dynamics of gonadotropin-releasing hormone release during a pulse. *Endocrinology.* 130, 503-10.
- Moenter, S. M., Caraty, A., Karsch, F. J., 1990. The estradiol-induced surge of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Endocrinology.* 127, 1375-84.
- Moenter, S. M., Caraty, A., Locatelli, A., Karsch, F. J., 1991. Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: existence of a preovulatory GnRH surge. *Endocrinology.* 129, 1175-82.
- Moenter, S. M., Karsch, F. J., Lehman, M. N., 1993. Fos expression during the estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge of the ewe: induction in GnRH and other neurons. *Endocrinology.* 133, 896-903.
- Montemayor, M. E., Clark, A. S., Lynn, D. M., Roy, E. J., 1990. Modulation by norepinephrine of neural responses to estradiol. *Neuroendocrinology.* 52, 473-80.
- Montgomery, G. W., Martin, G. B., Pelletier, J., 1985. Changes in pulsatile LH secretion after ovariectomy in Ile-de-France ewes in two seasons. *J Reprod Fertil.* 73, 173-83.

- Montgomery, G. W., McNatty, K. P., Davis, G. H., 1992. Physiology and molecular genetics of mutations that increase ovulation rate in sheep. *Endocr Rev.* 13, 309-28.
- Morali, G., Beyer, C., Neuroendocrine control of mamalian estrous behaviour.N. In: C. Beyer, (Ed.), *Endocrine control of sexual behaviour.* Raven Press, New York, 1979, pp. 33-75.
- Morgan, J. I., Cohen, D. R., Hempstead, J. L., Curran, T., 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science.* 237, 192-7.
- Morgan, K., Sellar, R., Pawson, A. J., Lu, Z. L., Millar, R. P., 2006. Bovine and ovine gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-II ligand precursors and type II GnRH receptor genes are functionally inactivated. *Endocrinology.* 147, 5041-51.
- Moss, R. L., McCann, S. M., 1973. Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing factor. *Science.* 181, 177-9.
- Muttukrishna, S., Knight, P. G., 1990. Effects of crude and highly purified bovine inhibin (Mr 32,000 form) on gonadotrophin production by ovine pituitary cells in vitro: inhibin enhances gonadotrophin-releasing hormone-induced release of LH. *J Endocrinol.* 127, 149-59.
- Nestor, N., Holaskova, I., Goodman, R., Billings, H. J., 2008. Surge-Like release of LH following administration of a Neurokinin-3 receptor agonist to the Retrochiasmatic area of early follicular phase ewes. *Society for tne Study of Reproduction, 41st Annual Meeting.* 239.
- Nett, T. M., Turzillo, A. M., Baratta, M., Rispoli, L. A., 2002. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domest Anim Endocrinol.* 23, 33-42.
- Numan, M., Maternal Behavior. In: N. J. Knobil E, (Ed.), *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York, 1994, pp. 221-302.
- O'Byrne, K. T., Knobil, E., 1993. Electrophysiological approaches to gonadotrophin releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey. *Hum Reprod.* 8 Suppl 2, 37-40.
- Ogawa, S., Eng, V., Taylor, J., Lubahn, D. B., Korach, K. S., Pfaff, D. W., 1998. Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology.* 139, 5070-81.
- Ohkura, S., Fabre-Nys, C., Broad, K. D., Kendrick, K. M., 1997. Sex hormones enhance the impact of male sensory cues on both primary and association cortical components of

- visual and olfactory processing pathways as well as in limbic and hypothalamic regions in female sheep. *Neuroscience*. 80, 285-97.
- Ohkura, S., Uenoyama, Y., Yamada, S., Homma, T., Takase, K., Inoue, N., Maeda, K.-i., Tsukamura, H., Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats. *Peptides*. In Press, Corrected Proof.
- Oldham, C. M., Martin, G. B., 1987. Stimulation of seasonally anovular Merino ewes by ram. II. Premature regression of ram-induced corpora lutea. . *Anim Reprod Sci*. 1, 291-295.
- Padmanabhan, V., Evans, N. P., Dahl, G. E., McFadden, K. L., Mauger, D. T., Karsch, F. J., 1995. Evidence for short or ultrashort loop negative feedback of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology*. 62, 248-58.
- Padmanabhan, V., McNeilly, A. S., 2001. Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction*. 121, 21-30.
- Padmanabhan, V., Sharma, T. P., 2001. Neuroendocrine vs. paracrine control of follicle-stimulating hormone. *Arch Med Res*. 32, 533-43.
- Papinot, P., Caraty, A., Locatelli, A., Grino, A., Oliver, C., 1989. CRF increase induced by insulin hypoglycaemia is associated with a decrease in LH-RH secretion into hypophyseal portal blood of castrated rams treated with testosterone. *Symposium on Neuroendocrine Regulation of Reproduction*
- Parsons, B., MacLusky, N. J., Krey, L., Pfaff, D. W., McEwen, B. S., 1980. The temporal relationship between estrogen-inducible progesterin receptors in the female rat brain and the time course of estrogen activation of mating behavior. *Endocrinology*. 107, 774-9.
- Parsons, B., McEwen, B. S., Pfaff, D. W., 1982. A discontinuous schedule of estradiol treatment is sufficient to activate progesterone-facilitated feminine sexual behavior and to increase cytosol receptors for progestins in the hypothalamus of the rat. *Endocrinology*. 110, 613-9.
- Pelletier, J., Kann, G., Doalais, J., Rosselin, G., 1968. Dosage radio-immunologique de l'hormone luteinisante plasmatique chez le mouton: mise au point de la technique de dosage. *C R Acad Sci III*. 266, 2352-2354.
- Pelletier, J., Signoret, J. P., 1969. [Control of LH discharge into the blood by progesterone and estradiol benzoate in castrated lambs]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D*. 269, 2595-8.
- Petersen, S. L., Cheuk, C., Hartman, D., Barraclough, A., 1989. Medial Preoptic Microimplants of the Antiestrogen, Keoxifene, Affect Luteinizing Hormone-Releasing

- Hormone mRNA Levels, Median Eminence Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Concentrations and Luteinizing Hormone Release in Ovariectomized, Estrogen-Treated Rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 1, 279-283.
- Petraglia, F., Sutton, S., Vale, W., Plotsky, P., 1987. Corticotropin-releasing factor decreases plasma luteinizing hormone levels in female rats by inhibiting gonadotropin-releasing hormone release into hypophysial-portal circulation. *Endocrinology*. 120, 1083-8.
- Pfaff, D., 1980. *Estrogen and Brain function*. Springer, New York.
- Pfaff, D., Keiner, M., 1973. Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J Comp Neurol*. 151, 121-58.
- Pfaff, D., Schwartz-Giblin, S., McCarthy, M. M., Kow, L. M., Cellular and Molecular Mechanisms of Female Reproductive Behaviors. In: N. J. Knobil E, (Ed.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 1994a, pp. 107-220.
- Pfaff, D. W., 1973. Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. *Science*. 182, 1148-9.
- Phillips, D. J., Cummins, J. T., Clarke, I. J., 1990. Effects of modifying gonadotrophin-releasing hormone input before and after the oestrogen-induced LH surge in ovariectomized ewes with hypothalamo-pituitary disconnection. *J Endocrinol*. 127, 223-33.
- Pierce, B. N., Hemsworth, P. H., Rivalland, E. T., Wagenmaker, E. R., Morrissey, A. D., Papargiris, M. M., Clarke, I. J., Karsch, F. J., Turner, A. I., Tilbrook, A. J., 2008. Psychosocial stress suppresses attractivity, proceptivity and pulsatile LH secretion in the ewe. *Horm Behav*.
- Pierce, J. G., Parsons, T. F., 1981. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*. 50, 465-95.
- Pietras, R. J., Szego, C. M., 1977. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature*. 265, 69-72.
- Pillon, D., 2003. Action de l'oestradiol dans l'Hypothalamus Médiobasale lors de l'induction du pic préovulatoire de GnRH chez la brebis: Recherche de mécanismes moléculaires impliqués  
Science de la Vie. Thèse de Doctorat.
- Pillon, D., Caraty, A., Fabre-Nys, C., Bruneau, G., 2003a. Early decrease of proopiomelanocortin but not neuropeptide Y mRNA expression in the mediobasal

- hypothalamus of the ewe, during the estradiol-induced preovulatory LH surge. *Gen Comp Endocrinol.* 134, 264-72.
- Pillon, D., Caraty, A., Fabre-Nys, C., Bruneau, G., 2003b. Short-term effect of oestradiol on neurokinin B mRNA expression in the infundibular nucleus of ewes. *J Neuroendocrinol.* 15, 749-53.
- Piper, L. R., Bindon, B. M., The Booroola Merino and the performance of medium non-Peppin crosses at Armidale. . In: B. M. B. L.R Piper, and R.D Nethery,, (Ed.), Booroola Merino. CSIRO, Melbourne, 1982, pp. 9- 20.
- Poindron, P., Cognie, Y., Gayerie, F., Orgeur, P., Oldham, C. M., Ravault, J. P., 1980. Changes in gonadotrophins and prolactin levels in isolated (seasonally or lactationally) anovular ewes associated with ovulation caused by the introduction of rams. *Physiol Behav.* 25, 227-36.
- Popa, S. M., Clifton, D. K., Steiner, R. A., 2008. The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annu Rev Physiol.* 70, 213-38.
- Porter, D. W., Naylor, A. M., McNeilly, A. S., Lincoln, D. W., 1993. Endocrine actions of central neuropeptide Y in the ewe: activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by exogenous neuropeptide Y and role of endogenous neuropeptide Y in the secretion of luteinizing hormone during the oestrous cycle. *J Neuroendocrinol.* 5, 163-74.
- Prange-Kiel, J., Wehrenberg, U., Jarry, H., Rune, G. M., 2003. Para/autocrine regulation of estrogen receptors in hippocampal neurons. *Hippocampus.* 13, 226-34.
- Prevot, V., 2002. Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion. *J Neuroendocrinol.* 14, 247-55.
- Prevot, V., Croix, D., Bouret, S., Dutoit, S., Tramu, G., Stefano, G. B., Beauvillain, J. C., 1999. Definitive evidence for the existence of morphological plasticity in the external zone of the median eminence during the rat estrous cycle: implication of neuro-glio-endothelial interactions in gonadotropin-releasing hormone release. *Neuroscience.* 94, 809-19.
- Proescholdt, M. G., Hutto, B., Brady, L. S., Herkenham, M., 2000. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [<sup>14</sup>C]inulin in rat. *Neuroscience.* 95, 577-92.
- Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Smith, H. O., Oprea, T. I., Sklar, L. A., Hathaway, H. J., 2008. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol.* 70, 165-90.

- Quirke, J. F., Hanrahan, J. P., Gosling, J. P., 1979. Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *J Reprod Fertil.* 55, 37-44.
- Rasmussen, D. D., Malven, P. V., 1983. Effects of confinement stress on episodic secretion of LH in ovariectomized sheep. *Neuroendocrinology.* 36, 392-6.
- Rawson, J. A., Scott, C. J., Pereira, A., Jakubowska, A., Clarke, I. J., 2001. Noradrenergic projections from the A1 field to the preoptic area in the brain of the ewe and Fos responses to oestrogen in the A1 cells. *J Neuroendocrinol.* 13, 129-38.
- Revelli, A., Massobrio, M., Tesarik, J., 1998. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev.* 19, 3-17.
- Richard, P., 1967. Atlas stéréotaxique du cerveau de brebis.
- Richter, T. A., Robinson, J. E., Evans, N. P., 2001. Progesterone treatment that either blocks or augments the estradiol-induced gonadotropin-releasing hormone surge is associated with different patterns of hypothalamic neural activation. *Neuroendocrinology.* 73, 378-86.
- Richter, T. A., Robinson, J. E., Evans, N. P., 2002. Progesterone blocks the estradiol-stimulated luteinizing hormone surge by disrupting activation in response to a stimulatory estradiol signal in the ewe. *Biol Reprod.* 67, 119-25.
- Richter, T. A., Robinson, J. E., Lozano, J. M., Evans, N. P., 2005. Progesterone can block the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe by a direct inhibitory action on oestradiol-responsive cells within the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 17, 161-9.
- Rissman, E. F., 1996. Behavioral regulation of gonadotropin-releasing hormone. *Biol Reprod.* 54, 413-9.
- Rissman, E. F., Alones, V. E., Craig-Veit, C. B., Millam, J. R., 1995. Distribution of chicken-II gonadotropin-releasing hormone in mammalian brain. *J Comp Neurol.* 357, 524-31.
- Rissman, E. F., Wersinger, S. R., Taylor, J. A., Lubahn, D. B., 1997. Estrogen receptor function as revealed by knockout studies: neuroendocrine and behavioral aspects. *Horm Behav.* 31, 232-43.
- Robertson, H. A., 1969. The endogenous control of estrus and ovulation in sheep, cattle, and swine. *Vitam Horm.* 27, 91-130.
- Robinson, J. E., Karsch, F. J., 1984. Refractoriness to inductive day lengths terminates the breeding season of the Suffolk ewe. *Biol Reprod.* 31, 656-63.

- Robinson, J. E., Kendrick, K. M., Lambart, C. E., 1991. Changes in the Release of Gamma-Aminobutyric Acid and Catecholamines in the Preoptic/Septal Area Prior to and During the Preovulatory Surge of Luteinizing Hormone in the Ewe. *Journal of Neuroendocrinology*. 3, 393-399.
- Robinson, J. E., Radford, H. M., Karsch, F. J., 1985. Seasonal change in pulsatile luteinizing hormone (LH) secretion in the ewe: Relation of frequency of LH pulses to daylength and response to estradiol negative feedback. *Biol Reprod*. 33, 324-334.
- Robinson, T. J., 1954. Relationship of oestrogen and progesterone in oestrous behaviour of the ewe. *Nature*. 173, 878.
- Robinson, T. J., 1954a. The necessity for progesterone with estrogen for the induction of recurrent estrus in the ovariectomized ewe. *Endocrinology*. 55, 403-8.
- Robinson, T. J., 1955. Quantitative studies on the hormonal induction of oestrus in spayed ewes. *J Endocrinol*. 12, 163-73.
- Sagrillo, C. A., Grattan, D. R., McCarthy, M. M., Selmanoff, M., 1996. Hormonal and neurotransmitter regulation of GnRH gene expression and related reproductive behaviors. *Behav Genet*. 26, 241-77.
- Sakuma, Y., 2002. GnRH in the regulation of female rat sexual behavior. *Prog Brain Res*. 141, 293-301.
- Sarkar, D. K., Chiappa, S. A., Fink, G., Sherwood, N. M., 1976. Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature*. 264, 461-3.
- Scaramuzzi, R. J., Adams, N. R., Baird, D. T., Campbell, B. K., Downing, J. A., Findlay, J. K., Henderson, K. M., Martin, G. B., McNatty, K. P., McNeilly, A. S., et al., 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev*. 5, 459-78.
- Scaramuzzi, R. J., Baird, D. T., 1977. Pulsatile release of luteinizing hormone and the secretion of ovarian steroids in sheep during anestrus. *Endocrinology*. 101, 1801-6.
- Scaramuzzi, R. J., Campbell, B. K., Downing, J. A., Kendall, N. R., Khalid, M., Munoz-Gutierrez, M., Somchit, A., 2006. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev*. 46, 339-54.
- Scaramuzzi, R. J., Lindsay, D. R., Shelton, J. N., 1971. The effect of oestradiol benzoate on the duration of oestrous behaviour in the ovariectomized ewe. *J Endocrinol*. 50, 345-6.

- Scaramuzzi, R. J., Lindsay, D. R., Shelton, J. N., 1972. Effect of repeated oestrogen administration on oestrous behaviour in ovariectomized ewes. *J Endocrinol.* 52, 269-78.
- Scaramuzzi, R. J., Tillson, S. A., Thorneycroft, I. H., Caldwell, B. V., 1971a. Action of exogenous progesterone and estrogen on behavioral estrus and luteinizing hormone levels in the ovariectomized ewe. *Endocrinology.* 88, 1184-9.
- Schally, A. V., 1973. Hypothalamic LH and FSH releasing hormone; physiological and clinical studies. *Clin Sci.* 44, 1P passim.
- Schally, A. V., Nair, R. M., Redding, T. W., Arimura, A., 1971. Isolation of the luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone-releasing hormone from porcine hypothalami. *J Biol Chem.* 246, 7230-6.
- Scott, C. J., Clarke, I. J., 1993a. Evidence that changes in the function of the subtypes of the receptors for gamma-amino butyric acid may be involved in the seasonal changes in the negative-feedback effects of estrogen on gonadotropin-releasing hormone secretion and plasma luteinizing hormone levels in the ewe. *Endocrinology.* 133, 2904-12.
- Scott, C. J., Clarke, I. J., 1993b. Inhibition of luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes during the breeding season by gamma-aminobutyric acid (GABA) is mediated by GABA-A receptors, but not GABA-B receptors. *Endocrinology.* 132, 1789-96.
- Scott, J. C., Cummins, J. T., Clarke, J. I., 1992. Effects on Plasma Luteinizing Hormone Levels of Microinjection of Noradrenaline and Adrenaline into the Septo-Preoptic Area of the Brain of the Ovariectomized Ewe: Changes with Season and Chronic Oestrogen Treatment. *Journal of Neuroendocrinology.* 4, 131-141.
- Seeburg, P. H., Adelman, J. P., 1984. Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing hormone releasing hormone. *Nature.* 311, 666-8.
- Sherwood, N., Eiden, L., Brownstein, M., Spiess, J., Rivier, J., Vale, W., 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80, 2794-8.
- Shupnik, M. A., Rosenzweig, B. A., 1991. Identification of an estrogen-responsive element in the rat LH beta gene. DNA-estrogen receptor interactions and functional analysis. *J Biol Chem.* 266, 17084-91.
- Silverman, A. J., Jhamandas, J., Renaud, L. P., 1987. Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *J Neurosci.* 7, 2312-9.

- Simerly, R. B., Chang, C., Muramatsu, M., Swanson, L. W., 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 294, 76-95.
- Skinner, D. C., Bouchard, P., Caraty, A., 1999. The progesterone blockade of the luteinizing hormone surge is overcome by RU486. *J Neuroendocrinol.* 11, 637-41.
- Skinner, D. C., Caraty, A., 1999. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology.* 140, 165-70.
- Skinner, D. C., Dufourny, L., 2005. Oestrogen receptor beta-immunoreactive neurones in the ovine hypothalamus: distribution and colocalisation with gonadotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol.* 17, 29-39.
- Skinner, D. C., Evans, N. P., Delaleu, B., Goodman, R. L., Bouchard, P., Caraty, A., 1998. The negative feedback actions of progesterone on gonadotropin-releasing hormone secretion are transduced by the classical progesterone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 10978-83.
- Skinner, D. C., Harris, T. G., Evans, N. P., 2000. Duration and amplitude of the luteal phase progesterone increment times the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Biol Reprod.* 63, 1135-42.
- Skinner, D. C., Herbison, A. E., 1997. Effects of photoperiod on estrogen receptor, tyrosine hydroxylase, neuropeptide Y, and beta-endorphin immunoreactivity in the ewe hypothalamus. *Endocrinology.* 138, 2585-95.
- Skinner, D. C., Malpaux, B., Delaleu, B., Caraty, A., 1995. Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone in third ventricular cerebrospinal fluid of the ewe: correlation with LH pulses and the LH surge. *Endocrinology.* 136, 3230-7.
- Smith, J. T., 2008a. Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res Rev.* 57, 288-98.
- 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, 1150-7.
- Smith, J. T., Coolen, L. M., Kriegsfeld, L. J., Sari, I. P., Jaafarzadehshirazi, M. R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R. L., Tilbrook, A. J., Ubuka, T., Bentley, G. E., Clarke, I. J., Lehman, M. N., 2008b. Variation in kisspeptin and gonadotropin-inhibitory hormone expression and terminal connections to GnRH neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology.*

- Smith, R. F., Ghuman, S. P., Evans, N. P., Karsch, F. J., Dobson, H., 2003. Stress and the control of LH secretion in the ewe. *Reprod Suppl.* 61, 267-82.
- Stojilkovic, S. S., Reinhart, J., Catt, K. J., 1994. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev.* 15, 462-99.
- Stopa, E. G., Sower, S. A., Svendsen, C. N., King, J. C., 1988. Polygenic expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in human? *Peptides.* 9, 419-23.
- Stormshak, F., Bishop, C. V., 2008. Board-invited review: Estrogen and progesterone signaling: genomic and nongenomic actions in domestic ruminants. *J Anim Sci.* 86, 299-315.
- Sutherland, S. R., 1988. Seasonal breeding and oestrus in the female goat. Animal Science Group, School of Agriculture. Doctor of Philosophy.
- Sutherland, S. R., Lindsay, D. R., 1991. Ovariectomized does do not require progesterone priming for oestrous behaviour. *Reprod Fertil Dev.* 3, 679-84.
- Szego, C. M., Davis, J. S., 1967. Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 58, 1711-8.
- Taragnat, C., Axe hypothalamo-Hypophysaire: ontogenèse, morphologie et aspects fonctionnels. In: M. L. C.Thibaut, (Ed.), *La reproduction chez les Mammifères et l'Homme.* Ellipse INRA, Paris, 2001, pp. 23-47.
- Taylor, J. A., Goubillon, M. L., Broad, K. D., Robinson, J. E., 2007. Steroid control of gonadotropin-releasing hormone secretion: associated changes in pro-opiomelanocortin and preproenkephalin messenger RNA expression in the ovine hypothalamus. *Biol Reprod.* 76, 524-31.
- Thawaites, C. J., 1965. Photoperiodic control of breeding activity in the southdown ewe with particular reference to the effects of an equatorial light regime. *Journal of Agricultural Science, Cambridge.* 65, 57-64.
- Thiery, J. C., Chemineau, P., Hernandez, X., Migaud, M., Malpoux, B., 2002. Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim Endocrinol.* 23, 87-100.
- Thiery, J. C., Gayrard, V., Le Corre, S., Viguie, C., Martin, G. B., Chemineau, P., Malpoux, B., 1995. Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil Suppl.* 49, 285-96.
- Thiery, J. C., Lomet, D., Schumacher, M., Liere, P., Tricoire, H., Locatelli, A., Delagrangé, P., Malpoux, B., 2006. Concentrations of estradiol in ewe cerebrospinal fluid are

- modulated by photoperiod through pineal-dependent mechanisms. *J Pineal Res.* 41, 306-12.
- Thiery, J. C., Pelletier, J., Signoret, J. P., 1978. Effect of hypothalamic deafferentation on LH and sexual behaviour in ovariectomized ewe under hormonally induced oestrous cycle. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18, 1413-26.
- Thiery, J. C., Signoret, J. P., Blanc, M., Pelletier, J., Ravault, J. P., Caraty, A., Lavenet, C., Orgeur, P., Potrier, J. C., Venier, G., 1977. Effects of anterior hypothalamic deafferentation on LH, FSH, prolactin and sexual behavior in the ovariectomized ewe. *Ir Med Sci Reprod Obstet Gynecol.* 5, 434.
- Thimonier, J., 1989. Contrôle photopériodique de l'activité ovulatoire chez la brebis: Existence de rythmes endogènes
- Thomas, G. B., Mercer, J. E., Karalis, T., Rao, A., Cummins, J. T., Clarke, I. J., 1990. Effect of restricted feeding on the concentrations of growth hormone (GH), gonadotropins, and prolactin (PRL) in plasma, and on the amounts of messenger ribonucleic acid for GH, gonadotropin subunits, and PRL in the pituitary glands of adult ovariectomized ewes. *Endocrinology.* 126, 1361-7.
- Tilbrook, A. J., Hemsworth, P. H., Topp, J. S., Cameron, A. W. N., 1990. Parallel changes in the proceptive and receptive behaviour of the ewe. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 27 73-92.
- Tilbrook, A. J., Turner, A. I., Clarke, I. J., 2000. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Rev Reprod.* 5, 105-13.
- Tillet, Y., Batailler, M., Thibault, J., 1993. Neuronal projections to the medial preoptic area of the sheep, with special reference to monoaminergic afferents: immunohistochemical and retrograde tract tracing studies. *J Comp Neurol.* 330, 195-220.
- Tobin, V. A., Pompolo, S., Clarke, I. J., 2001. The percentage of pituitary gonadotropes with immunoreactive oestradiol receptors increases in the follicular phase of the ovine oestrous cycle. *J Neuroendocrinol.* 13, 846-54.
- Tourlet, S., Ziyazetdinova, G., Caraty, A., Tramu, G., Delsol, G., Tillet, Y., 2005. Oestradiol effect on galanin-immunoreactive neurones in the diencephalon of the ewe. *J Neuroendocrinol.* 17, 145-51.
- Troskie, B., Illing, N., Rumbak, E., Sun, Y. M., Hapgood, J., Sealfon, S., Conklin, D., Millar, R., 1998. Identification of three putative GnRH receptor subtypes in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol.* 112, 296-302.

- Turzillo, A. M., Juengel, J. L., Nett, T. M., 1995. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) increases concentrations of GnRH receptor messenger ribonucleic acid and numbers of GnRH receptors during luteolysis in the ewe. *Biol Reprod.* 53, 418-23.
- Turzillo, A. M., Nett, T. M., 1997. Effects of bovine follicular fluid and passive immunization against gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on messenger ribonucleic acid for GnRH receptor and gonadotropin subunits in ovariectomized ewes. *Biol Reprod.* 56, 1537-43.
- Turzillo, A. M., Nett, T. M., 1999. Regulation of GnRH receptor gene expression in sheep and cattle. *J Reprod Fertil Suppl.* 54, 75-86.
- Unsworth, W. P., Robinson, J. E., E-induced neuronal activation in the VMN reveals a potential role for somatostatin in the control of reproduction. 6th Ruminant Reproduction Symposium, Crieff Hdoro, Scotland, 2002.
- Van Cleeff, J., Karsch, F. J., Padmanabhan, V., 1998. Characterization of endocrine events during the peri-estrous period in sheep after estrous synchronization with controlled internal drug release (CIDR) device. *Domest Anim Endocrinol.* 15, 23-34.
- Van Vugt, D. A., Diefenbach, W. D., Alston, E., Ferin, M., 1985. Gonadotropin-releasing hormone pulses in third ventricular cerebrospinal fluid of ovariectomized rhesus monkeys: correlation with luteinizing hormone pulses. *Endocrinology.* 117, 1550-8.
- Wallace, J. M., McNeilly, A. S., 1986. Changes in FSH and the pulsatile secretion of LH during treatment of ewes with bovine follicular fluid throughout the luteal phase of the oestrous cycle. *J Endocrinol.* 111, 317-27.
- Walsh, J. P., Rao, A., Simmons, D. M., Clarke, I. J., 1998. Proopiomelanocortin mRNA levels in ovine hypothalamus are not reduced at the time of the preovulatory luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol.* 10, 803-8.
- Ward, B. J., Charlton, H. M., 1981. Female sexual behaviour in the GnRH deficient, hypogonadal (hpg) mouse. *Physiol Behav.* 27, 1107-9.
- Wise, M. E., Glass, J. D., Nett, T. M., 1986. Changes in the concentration of hypothalamic and hypophyseal receptors for estradiol in pregnant and postpartum ewes. *J Anim Sci.* 62, 1021-8.
- Wise, M. E., Nieman, D., Stewart, J., Nett, T. M., 1984. Effect of number of receptors for gonadotropin-releasing hormone on the release of luteinizing hormone. *Biol Reprod.* 31, 1007-13.

- Woolley, D. E., Hope, W. G., Thompson-Reece, M. A., Gietzen, D. W., Conway, S. B., 1994. Dopaminergic stimulation of estrogen receptor binding in vivo: a reexamination. *Recent Prog Horm Res.* 49, 383-92.
- Yahalom, D., Chen, A., Ben-Aroya, N., Rahimipour, S., Kaganovsky, E., Okon, E., Fridkin, M., Koch, Y., 1999. The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. *FEBS Lett.* 463, 289-94.
- Yamanouchi, K., Arai, Y., 1990. The septum as origin of a lordosis-inhibiting influence in female rats: effect of neural transection. *Physiol Behav.* 48, 351-5.
- Yeates, N. T. M., 1949. The breeding season of the sheep with particular reference to its modification by artificial means using light. *Journal of Agricultural Science, Cambridge.* 39, 1-34.
- Yu, W. H., Karanth, S., Walczewska, A., Sower, S. A., McCann, S. M., 1997. A hypothalamic follicle-stimulating hormone-releasing decapeptide in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 9499-503.
- Zarazaga, L. A., Guzman, J. L., Dominguez, C., Perez, M. C., Prieto, R., 2005. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim Reprod Sci.* 87, 253-67.
- Zhou, Y., Watters, J. J., Dorsa, D. M., 1996. Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology.* 137, 2163-6.
- Ziyazetdinova, G., 2007. Les systèmes cathécholaminergiques centraux impliqués dans la régulation de la reproduction chez le rat et le mouton. *Sciences de la Vie. Thèse de Doctorat.*

}

# Introduction

Texte de l'introduction

Première partie

Tapez ici le titre de la première partie en style

Partie

Tapez ici le titre de votre 1er chapitre ou 1ère division  
de la partie 1 en style Titre 1

Tapez ici le titre de niveau 2 style Titre 2

Tapez ici le titre de niveau 3 style Titre 3

Tapez ici le titre de niveau 4 style Titre 4

Tapez ici le titre de niveau 5 style Titre 5

Tapez ici le titre de niveau 6 style Titre 6

# Conclusion

Insérer ici le texte de votre conclusion

## Bibliographie

**Attention n’oubliez pas d’effacer le texte suivant quand vous n’en aurez plus besoin.**

Pour le traitement de votre bibliographie, vous pouvez :

- soit structurer vos références ; vous avez à votre disposition, dans le menu déroulant des Pages annexes, trois niveaux de titre : ‘Subdivision 1’ (style 3|Bibli\_tit2), ‘Subdivision 2’ (style 3|Bibli\_tit3) et ‘Subdivision 3’ (style 3|Bibli\_tit4)
- soit en faire une simple liste sans subdivisions (par exemple ordre alphabétique des auteurs)

Pour l’écriture de vos entrées bibliographiques vous avez 2 possibilités, que vous pouvez d’ailleurs combiner :

- écrire vos références en choisissant dans le menu déroulant des Pages annexes ‘Référence bibliographique’ (style '3|Bibli\_item)
- utiliser les champs prédéfinis ci-dessous en prenant soin, avant de les remplir, de les recopier autant de fois que nécessaire ou tout du moins en prenant la précaution d’en garder un vierge.

## Ouvrages imprimés

NOM, Prénom ou Initiales. *Titre en italique*. Lieu d’édition : Editeur, Date de publication, nombre de pages p.

## Ouvrages électroniques

NOM, Prénom ou Initiales. *Titre en italique*. [en ligne ou cédérom ou bande magnétique ou disquette], Lieu d’édition : Editeur, Date de publication recommandée, [référence du JJ mois AAAA (date à laquelle le document a été consulté)]. renseignements nécessaires pour localiser ou identifier le document cité (ex. URL)

## Chapitre dans un ouvrage imprimé

NOM, Prénom ou Initiales. Titre du chapitre. In : NOM, Prénom ou Initiales (éd.), *Titre de l’ouvrage en italique*. Lieu d’édition : Editeur, Date de publication, nombre de pages p.

## Rapports imprimés

NOM, Prénom ou Initiales. *Titre en italique*. Lieu de publication, Date de publication

## Travaux universitaires

NOM, Prénom ou Initiales. *Titre du mémoire ou de la thèse en italique*. Nature de la thèse ou du mémoire, Université de soutenance, Date de soutenance, Nombre de pages p.

### Articles de périodiques imprimés

NOM, Prénom ou Initiales. Titre de l'article. *Titre du périodique en italique*, Année, volume et/ou numéro, pagination

### Articles de périodiques électroniques

NOM, Prénom ou Initiales. Titre de l'article. *Titre du périodique en italique*, [en ligne ou cédérom ou bande magnétique ou disquette], Année, volume et/ou numéro, [référence du JJ mois AAAA (date à laquelle le site a été consulté)]. renseignements nécessaires pour localiser ou identifier le document cité (ex. URL)

### Communication dans un congrès

NOM, Prénom ou Initiales. Titre de la communication. In : NOM, Prénom ou Initiales (éd.), *Titre du congrès, Lieu du congrès, Date du congrès*. Lieu d'édition : Editeur, Date de publication, pagination

### Sites web consultés

Nom du site. [référence du JJ mois AAAA (date à laquelle le site a été consulté), URL du site

## Annexes

## Annexe 1 Titre de votre annexe

Si vous désirez structurer chaque annexe, vous avez à votre disposition, dans le menu déroulant des Pages annexes, un niveau de titre : ‘Subdivision 1’ (style 3\Ann\_tit3).

**N’oubliez pas d’effacer ce texte quand vous n’en aurez plus besoin.**

# **Etude de la sensibilité différentielle de l'hypothalamus à l'œstradiol pour induire le pic préovulatoire de LH et le comportement sexuel : comparaison entre brebis Ile-de-France et Romanov**

## **Résumé**

En utilisant un modèle de phase folliculaire artificielle, la quantité minimale d'œstradiol (E) nécessaire pour induire le pic préovulatoire de LH et le comportement sexuel a été comparée chez des brebis de prolificité différentes : Ile de France (IF) vs Romanov (ROM).

Un signal œstrogénique très faible induit le comportement sexuel chez la brebis ROM mais pas chez l'IF. L'induction du pic préovulatoire de LH nécessite des quantités d'E très supérieures chez la ROM par comparaison à l'IF. Le pic de LH apparaît plus tard chez la ROM.

L'étude de la sensibilité hypophysaire et hypothalamique à l'E a montré que le moment du pic préovulatoire de LH est essentiellement contrôlé par l'hypothalamus.

Chez la ROM, des doses modérées d'E stimulent une faible libération de GnRH dans le liquide céphalorachidien, sans qu'elle ne soit traduite au niveau hypophysaire par une augmentation de libération parallèle de LH. Ce peptide, participerait au contrôle du comportement sexuel induit par l'E.

La grande différence de sensibilité à l'E entre les deux races semble être liée à un seuil de « lecture » différent du signal œstrogénique pour induire le pic de LH et le comportement sexuel.

**Mots clés** : brebis, œstradiol, hypothalamus, hypophyse, pic préovulatoire, LH, GnRH, comportement sexuel

## **Abstract**

Using an artificial follicular phase model, the minimum estradiol (E) requirement to induce the preovulatory LH surge and estrous behaviour, was compared between two breeds of ewes having either single (Ile de France= IF) or multiple (Romanov= ROM) ovulations. While a small E signal is sufficient to induce estrous behaviour, in ROM ewe, the same treatment has no effect on IF ewe. A much larger amount of E is required to induce the LH surge in the ROM compared to the IF. The onset of the LH surge occurred earlier in IF.

Pituitary and hypothalamic sensitivity to E were studied *in vivo* and *in vitro*. The timing of the LH surge is essentially under the control of the hypothalamus. The latency to the onset of the LH surge is timed by a negative feedback effect of E at the hypothalamic level which is longer in ROM ewes.

A moderate E signal stimulates a light GnRH secretion into the cerebrospinal fluid, which was not accompanied by a parallel pituitary LH discharge. GnRH appears involved in the control of estrous behaviour.

The difference in sensitivity to E between IF and ROM ewes to induce LH surge and estrous behaviour is more than likely due to a different threshold in the lecture of the E signal.

**Key words:** ewe, estradiol, hypothalamus, pituitary, LH surge, estrous behaviour