

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contrôle de l'ovulation chez la brebis Suffolk

LAMBERT, Olivier

Award date:
1990

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTÉ DES SCIENCES

**CONTROLE DE L'OVULATION
CHEZ LA BREBIS *SUFFOLK***

Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
par

LAMBERT Olivier

CONTROLE DE L'OVULATION CHEZ LA BREBIS SUFFOLK.

LAMBERT OLIVIER.

Résumé

L'objectif de ce travail a été de déterminer au début de la saison de reproduction (juillet à octobre), les effets de deux hormones chez la brebis SUFFOLK:

- La PMSG, administrée selon deux doses (500 et 800 UI) sur l'efficacité de l'induction et de la synchronisation des cycles, sur le moment de l'ovulation et le taux d'ovulation.
- La MELATONINE sur le moment d'entrée en saison de reproduction, le taux d'ovulation et les fertilité et prolificité à l'insémination.

Nous aboutissons aux conclusions suivantes:

- La saison de reproduction des brebis SUFFOLK commence en juillet dans nos régions, mais il existe une variabilité individuelle importante.
- La dose de 800 UI de PMSG est préférable à celle de 500 UI pour induire l'ovulation.
- Les doses utilisées ne provoquent pas un réel effet superovulatoire.
- L'intervalle entre l'injection de la PMSG et le moment d'ovulation diminue de juillet à octobre.
- L'intervalle entre l'apparition du pic de LH et l'ovulation est d'environ 22 heures et semble rester constant.
- Le traitement à la mélatonine que nous avons effectué ne permet pas d'avancer la saison de reproduction.
- Ce traitement semble augmenter les taux d'ovulation ainsi que les prolificités et fertilités.
- La mélatonine exogène ne semble pas modifier les concentrations plasmatiques diurnes de prolactine.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1990

Promoteur : R. Paquay

Je tiens à remercier mon promoteur, le Dr R. PAQUAY d'avoir accepté que je puisse réaliser ce mémoire dans son laboratoire.

Je remercie également le Dr J-L. BISTER pour l'apprentissage de diverses techniques ainsi que pour ses conseils judicieux dans l'élaboration de cette étude.

Je voudrais tout particulièrement remercier Mademoiselle BENEDICTE NOEL pour son aide efficace lors des endoscopies ainsi que pour sa grande disponibilité tout au long de l'année.

Outre leur sympathique accueil, le personnel du laboratoire ainsi que celui du Centre de Recherche Ovine de Faulx-les-Tombes ont été d'une aide efficace et exemplaire dans l'aboutissement de ce travail, qu'ils en soient tous remerciés.

Enfin, je manifeste ma gratitude envers mes parents qui m'ont permis de mener à bien ces études, mes soeurs ainsi qu'à mes amis et amies pour leur aide et leur soutien constant au cours de l'élaboration de ce travail.

INTRODUCTION

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Aspects généraux de la reproduction chez la brebis.....	1
A.1. Introduction.....	1
A.2. Le cycle oestral de la brebis.....	1
a. Phase lutéale.....	2
b. Phase folliculaire.....	3
A.3. L'anoestrus.....	4
a. L'anoestrus saisonnier.....	4
b. Mécanismes responsables de l'instauration des cycles.....	5
B. Croissance et maturation folliculaire.....	7
B.1. Ovogenèse.....	7
B.2. Folliculogenèse.....	7
a. Folliculogenèse basale.....	7
b. Folliculogenèse tonique.....	8
B.3. L'atrésie folliculaire.....	10
B.4. La stéroïdogénèse.....	10
B.5. La maturation ovocytaire.....	11
C. Ovulation.....	13
C.1. Description morphologique.....	13
C.2. Mécanismes biochimiques.....	13
C.3. Mécanismes endocriniens.....	14
C.4. Moment de l'ovulation.....	15
C.5. Taux d'ovulation.....	15
C.6. Maîtrise de l'ovulation chez la brebis.....	18
a. Synchronisation des cycles.....	19
b. Induction des cycles.....	20
D. La PMSG.....	21
D.1. Origine.....	21
D.2. Structure.....	21
a. Structure polypeptidique.....	22
b. Structure hydrocarbonée.....	22
D.3. Propriétés.....	23
a. Activité biologique.....	23
b. Demi-vie et catabolisme.....	23
c. Reconnaissance spécifique des récepteurs.....	24
d. Activation transmembranaire.....	24
e. Immunogénicité.....	25

D.4. Traitement à la PMSG.....	25
a. Effets sur la réponse ovarienne.....	25
b. Modulations des effets.....	26
c. Variabilité des effets.....	28
E. La MELATONINE.....	29
E.1. Sécrétion.....	29
a. Biosynthèse.....	29
b. Transport et métabolisme.....	30
E.2. Contrôle de la sécrétion.....	30
a. Relations avec la photopériode.....	30
b. Relations avec l'état physiologique.....	32
c. Relations endocrines.....	32
E.3. Actions.....	33
a. Sites d'action.....	33
b. Mécanismes d'action.....	34
c. Actions principales.....	34
E.4. Traitements à la mélatonine.....	35
a. Modes d'administration.....	35
b. Effets des traitements.....	37
c. Moment du traitement.....	38

TRAVAIL PERSONNEL

A. Rappel des objectifs.....	39
A.1. Etude de la PMSG.....	39
A.2. Etude de la MELATONINE.....	39
B. Plan expérimental.....	40
B.1. Etude de la PMSG.....	40
B.2. Etude de la MELATONINE.....	41
C. Méthodes utilisées.....	42
C.1. Traitement à la mélatonine.....	42
C.2. Synchronisation et induction des cycles.....	42
C.3. Traitement superovulatoire.....	42
C.4. Prélèvements sanguins.....	43
C.5. Endoscopies.....	43
C.6. Inséminations artificielles.....	44
C.7. Dosages hormonaux.....	45
a. Principe du dosage.....	45
b. Calcul des résultats.....	45
c. Dosage de la progestérone.....	46
d. Dosage de la LH.....	47
e. Dosage de la PRL.....	47
f. Dosage de la mélatonine.....	48

D. Résultats.....	50
D.1. Etude de la PMSG.....	50
a. Entrée en cycles des brebis.....	50
b. Induction et synchronisation des cycles.....	50
c. Taux d'ovulation.....	51
d. Population folliculaire.....	53
e. Moment de l'ovulation.....	54
f. Taux plasmatiques de P4 et taux d'ovulation.....	54
D.2. Etude de la MELATONINE.....	55
a. Efficacité du traitement.....	55
b. Influence du traitement sur le taux plasmatique de PRL.....	56
c. Entrée en cycles des brebis.....	56
d. Effet du traitement sur les taux d'ovulation.....	57
e. Fertilité et prolificité.....	57
E. Discussion.....	59
E.1. L'entrée en saison de reproduction.....	59
E.2. La PMSG.....	59
E.3. La MELATONINE.....	62
E.4. Le mode d'insémination.....	64
F. Conclusions.....	65

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Abréviations et définitions

ABREVIATIONS ET DEFINITIONS

- ANTENNAISE : Brebis se trouvant dans sa deuxième année
- CLAF : Corpus Luteum Angiogenic Factor
- E2 : Oestradiol 17- β
- EGF : Epidermal Growth Factor
- FECONDITE : Nombre d'agneaux nés / nombre de brebis mises à la lutte
- FERTILITE : Nombre de brebis mettant bas / nombre de brebis mises à la lutte
- FGA : Fluorogestoneacétate
- FGF : Fibroblaste Growth Factor
- FRP : Follicular Regulatory Protein
- FSH : Follicle Stimulating Hormone
- FSH RBI : FSH receptor binding inhibitor
- GnRH : Gonadotrophine Releasing Hormone
- HIOMT : Hydroxyindole-o-méthyl transférase
- IAc : Insémination exocervicale
- IAu : Insémination intra-utérine
- IGF 1 : Insuline Like Growth Factor ou Somatomédine C
- LH : Lutéinizing Hormone
- MAP : Medroxyacétate de Progestérone
- MEL : Mélatonine
- OMI : Oocyte Meiosis Inhibitor
- P4 : Progestérone
- PGF $_{2\alpha}$: Prostaglandine F $_{2\alpha}$
- PMSG : Pregnant Mare Serum Gonadotropin
- PRL : Prolactine
- PROLIFICITE : Nombre d'agneaux nés (vivants-morts ou avortons) / nombre de brebis
ayant agnelé
- RIA : Radio Immuno-Assay
- TGF : Transforming Growth Factor
- TO : Taux d'Ovulation

Introduction

Les ovins, malgré une longue tradition d'élevage restent des animaux fortement conditionnés par leur environnement naturel. Ainsi, les faibles taux d'ovulation et la reproduction saisonnée limitent la rentabilité des élevages.

Les recherches actuelles tendent à augmenter les taux d'ovulation, principalement en utilisant des hormones gonadotropes, à déterminer de façon précise le moment de l'ovulation afin de déposer le sperme au bon moment lors des inséminations artificielles et enfin, à déplacer la période de reproduction afin de répartir les naissances dans l'année et augmenter le nombre de portées par brebis.

La synchronisation ou l'induction des cycles suivie d'une stimulation de l'ovulation par la Pregnant Mare Serum Gonadotropine (PMSG) est couramment pratiquée avec un réel succès. Cependant, chez la brebis Suffolk, on obtient de très faibles taux de fertilité par cette méthode.

Il nous a donc paru indispensable de préciser les moments et les taux d'ovulation en début de saison de reproduction (Juillet, Août, Septembre, Octobre) et de la dose de PMSG (500 ou 800 UI). Chaque traitement a été associé à des analyses de taux plasmatiques de différentes hormones impliquées dans le contrôle des mécanismes de la reproduction.

Sur d'autres brebis, nous avons fait un essai d'avancement de la saison de reproduction par injection de MELATONINE en période de jours longs (Juin). Cette injection a été réalisée selon un procédé inédit chez les ovins. Afin de tester son efficacité et son influence sur l'environnement hormonal des brebis, nous avons procédé à des prélèvements sanguins et à la mise au point du dosage de la mélatonine par la méthode radioimmunologique (RIA). Nous avons également étudié l'efficacité de deux types d'insémination artificielle (intra-utérine et exocervicale) sur ces animaux.

Ce travail est d'abord constitué d'une revue bibliographique des phénomènes liés à la reproduction du mouton puis, d'une synthèse sur le travail personnel réalisé au cours de cette année.

Revue bibliographique

- A. Aspects généraux de la reproduction chez la brebis
- B. Croissance et maturation folliculaire
- C. Ovulation
- D. PMSG
- E. Mélatonine

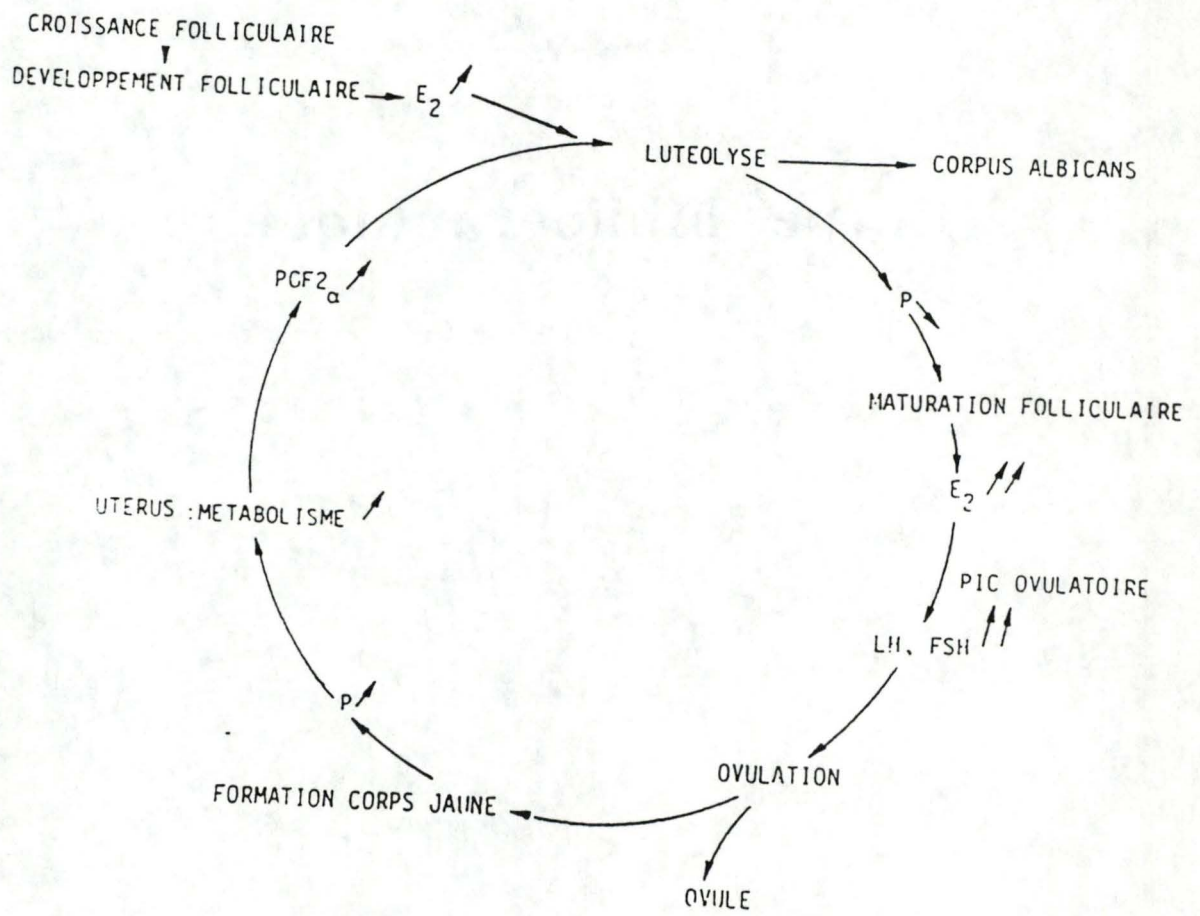


FIGURE 1: Représentation schématique du cycle oestral de la brebis (BISTER, 1989).

A . Aspects généraux de la reproduction chez la brebis.

Les principales sources bibliographiques utilisées afin de réaliser cette première partie de notre revue bibliographique sont: DRIANCOURT (1984), DERIVAUX et ECTORS (1988) et BISTER (1989).

A.1. Introduction.

Le mouton domestique est une espèce possédant une activité sexuelle du type polyoestrus saisonnier, c'est à dire qu'à partir de la puberté (7 à 9 mois si la brebis est née suffisamment tôt dans l'année et si elle atteint 50 à 60 % du poids adulte), une succession de cycles oestriques se produit pendant une période de l'année . Cette période de reproduction commence en photopériode décroissante (août-septembre) et se termine lorsque la durée des jours augmente (février/mars pour la SUFFOLK selon MALPAUX, 1988a). Le restant de l'année, la brebis ne présente pas de comportement oestrique ni d'ovulation, malgré une activité ovarienne relativement peu réduite; cette période est appelée période d'anoestrus.

Dans les pays tropicaux ou subtropicaux, cette influence saisonnière est nettement moins ou nullement marquée.

La période d'activité sexuelle (breeding-season) est maximale à la fin de l'automne et au début de l'hiver; sa durée varie suivant les races: elle est notamment plus longue chez la race FINNOISE que chez les races MERINOS, SUFFOLK ou TEXEL.

A.2. le cycle oestrique de la brebis.

Le cycle de la brebis a une durée moyenne de 17 jours (16-19 J), il est généralement plus court chez les jeunes sujets que chez les adultes.

On distingue classiquement deux phases inégales au cours du cycle; la **phase lutéale** (J1 à J14) qui correspond à l'établissement et au maintien du corps jaune apparu suite à l'ovulation (J0) et la **phase folliculaire** (J15, J16 et J17=0) correspondant à la croissance terminale et à la maturation finale des follicules se terminant par l'ovulation (Fig. 1).

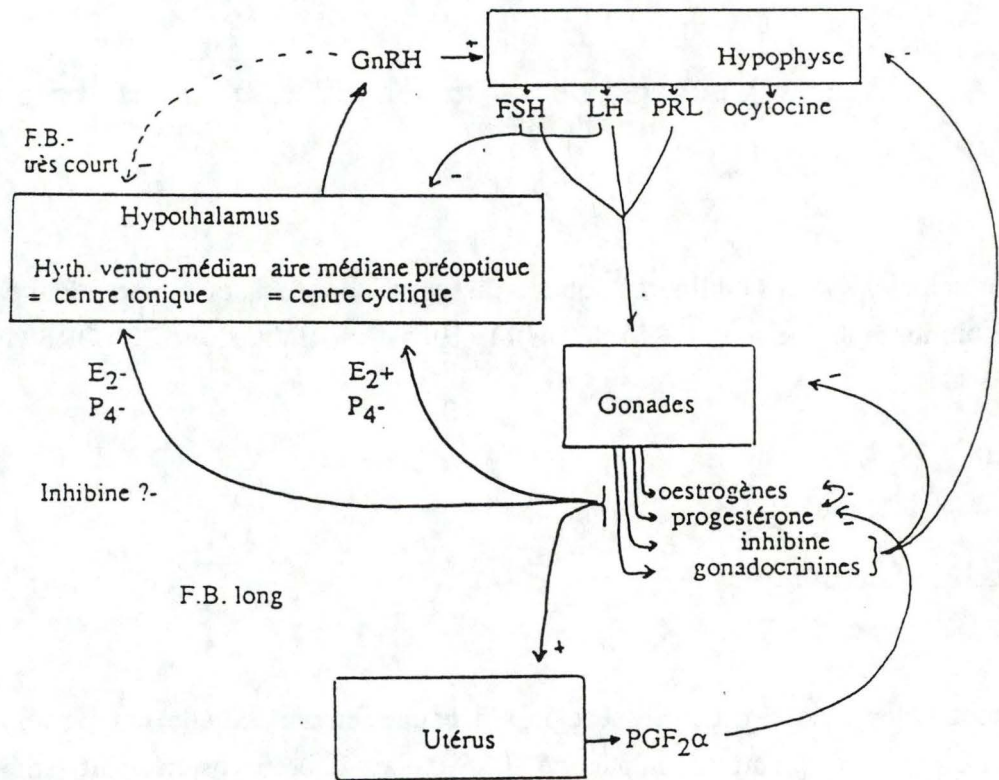


FIGURE 2: Contrôle endocrinien du cycle sexuel (BISTER, 1989).

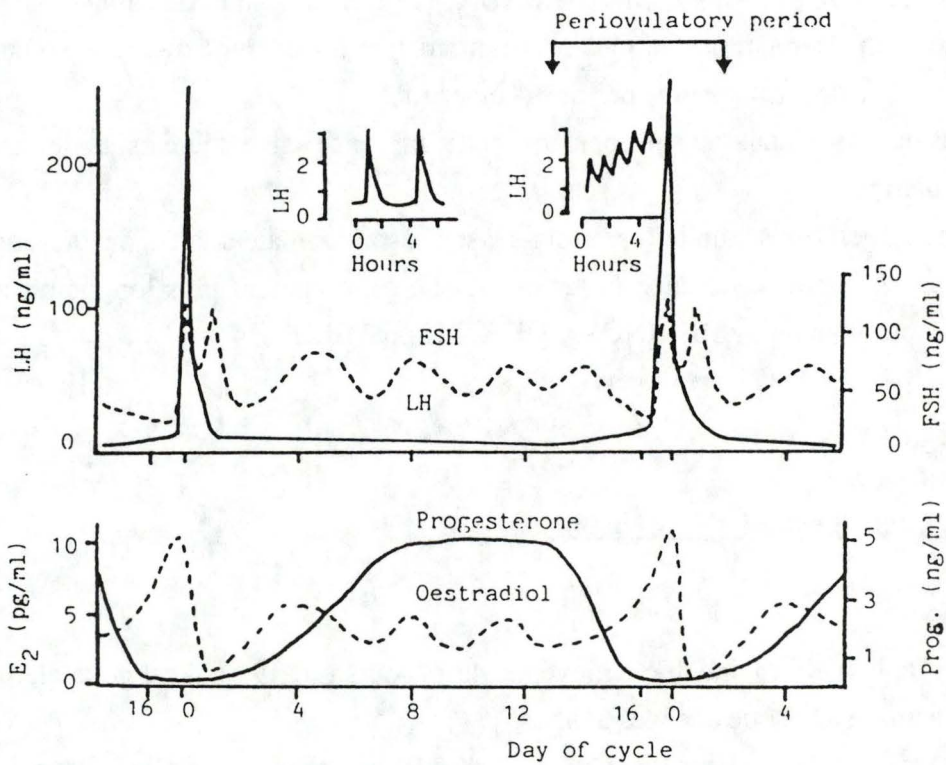


FIGURE 3: Evolution des profils hormonaux (E₂, LH, FSH et P₄) au cours du cycle oestral chez la brebis (J0=jour du pic de LH; JACQUES, 1989).

Les événements se manifestant au niveau de l'ovaire sont influencé par les facteurs hormonaux sécrétés par l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire-utérus et différents mécanismes d'interaction et de rétrocontrôle assurent un fonctionnement harmonieux de l'activité sexuelle (Fig. 2 et 3).

a. Phase lutéale.

Suite à l'ovulation, sous l'action de la LH (Lutéinizing Hormone), de la FSH (Follicle Stimulating Hormone) et de plusieurs cybermines dont le FGF (Fibroblaste Growth Factor) et le CLAF (Corpus Luteum Angiogenic Factor), un remaniement des cellules thécales et folliculaires restées dans l'ovaire se produit; une glande endocrine temporaire est ainsi formée: le Corpus Luteum.

La prolactine (PRL) stimule l'apparition de récepteurs cellulaires hormonaux sur les follicules ainsi que sur les corps jaunes. De plus, elle active la synthèse de cholestérol qui est le précurseur des stéroïdes sexuels.

La FSH et les oestrogènes interviendraient, aussi, pour favoriser la prolifération des cellules du futur corps jaune.

Ce corps jaune sécrète des oestrogènes mais principalement de la progestérone qui est nécessaire à la nidation de l'embryon. Le taux sanguin de progestérone augmente juste après l'ovulation et pendant une bonne moitié de la phase lutéale pour atteindre des valeurs constantes jusqu'à la lutéolyse. Le taux important de progestérone ainsi produit par le corps jaune en activité, inhibe la maturation finale des follicules et l'ovulation.

Le contrôle paracrine du corps jaune est important mais encore mal connu. Le CLAF, qui semble être en fait une forme tronquée du FGF est un facteur responsable de l'extraordinaire développement du corps jaune et de sa vascularisation après l'ovulation. Des effets de l'EGF (Epidermal Growth Factor) et de l'IGF1 (Insuline Like Growth Factor ou Somatomédine C) sont suspectés.

Au cours d'un même cycle, il semble évident que l'on retrouve trois vagues de croissance folliculaire par cycle dont deux en phase lutéale; les follicules de ces deux vagues sont voués à l'atrésie et seuls des follicules de la troisième peuvent évoluer jusqu'à l'ovulation (BISTER, 1980; JACQUES, 1989).

En fait, trois vagues d'émission de FSH provoquent une croissance et une maturation des follicules antraux jusqu'à atteindre un diamètre de 4 à 7 mm (DRIANCOURT, 1984). Les follicules antraux en croissance produisent de grandes quantité d'oestrogènes et de substances paracrines comme l'inhibine. Cette dernière provoque une baisse de la libération de FSH et entraîne l'atrésie des follicules en croissance et donc une diminution de la production d'oestradiol. Il y a alors levée de l'inhibition des sécrétions hypothalamiques et hypophysaires qui se solde par une nouvelle hausse de FSH et une nouvelle vague de croissance folliculaire.

En l'absence de gestation, les augmentations des taux plasmatiques d'oestrogènes suite aux vagues de maturation folliculaire ainsi que l'action de la prostaglandine PGF2 α provoquent la régression du corps jaune ou lutéolyse. La PGF2 α , d'origine utérine, atteint le corps jaune ipsilatéral par un transfert à contre-courant entre la veine utérine et l'artère ovarienne ou par les canaux lymphatiques. Elle agit en dissociant la LH de ses récepteurs membranaires et en provoquant une constriction vasculaire locale. Après la lutéolyse, seule subsistera une trace à la surface de l'ovaire: Corpus Albicans.

b. Phase folliculaire.

La phase folliculaire débute lors de la régression du corps jaune du cycle précédent. Cette phase est ainsi nommée parce qu'elle coïncide avec le démarrage de la troisième vague de croissance folliculaire, la maturation finale du ou des follicules dominants et enfin l'ovulation. Mais il faut garder à l'esprit que la croissance folliculaire se poursuit pendant tout le cycle oestral.

Le contrôle hormonal de la croissance folliculaire est loin d'être complètement élucidé; néanmoins plusieurs faits sont bien établis .

La FSH est essentielle à la croissance et à la maturation folliculaire; elle provoque la formation de l'antrum et inhibe l'atrésie des follicules à antrum. Elle stimule également la production d'oestradiol et la maturation ovocytaire.

L'oestradiol 17 β (E2) est synthétisé principalement par les cellules de la granulosa par transformation des androgènes produits par la thèque. Il favorise la formation de l'antrum et s'oppose à l'atrésie des follicules.

Mais l'oestradiol produit au cours de la troisième vague va aussi stimuler le centre cyclique d'émission de la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) qui en phase lutéale, est inhibée par la progestérone. Ces variations entraînent, peu avant l'ovulation une libération importante d'hormones hypophysaires (pics préovulatoires de LH et FSH).

Pour la LH, l'augmentation préovulatoire de la fréquence des pulses provoque un pic pouvant dépasser des concentrations de 100 ng/ml.

La FSH est libérée sous forme de deux décharges périovulatoires.

Les androgènes favorisent l'atrésie folliculaire, s'ils sont émis en abondance et l'inhibine produite par les gros follicules, freine la sécrétion de FSH.

Les connaissances dans le contrôle paracrine de l'activité folliculaire sont en plein essor. De nombreuses cybernines y participent: FGF pour la prolifération des cellules de la granulosa et la vascularisation, EGF, TGF α et TGF β pour les phénomènes de dominance, de sélection et d'atrésie, OMI (Oocyte Meiosis Inhibitor) et MPF (Maturation Promoting Factor) pour la maturation ovocytaire. Ces phénomènes seront développés ultérieurement.

Blackface	6,9 cycles	139 j. de saison de reproduction
Welsh moutain	7,0 —	133 j. —
Border Leicester	7,2 —	131 j. —
Romney Marsh	9,7 —	171 j. —
Suffolk	10,2 —	189 j. —
Welsh x Dorset Horn.....	10,4 —	179 j. —
Dorset Horn.....	12,4 —	223 j. —

TABLEAU 1: Durée de la saison de reproduction chez différentes races de brebis (CRAPLET et THIBIER, 1980).

A.3. L'anoestrus

Outre l'anoestrus saisonnier, on peut distinguer l'anoestrus prépubertaire, l'anoestrus de gestation et l'anoestrus de lactation; nous ne détaillerons pas ces derniers.

a. anoestrus saisonnier.

Chez la plupart des espèces, les naissances ont lieu au printemps, période la plus propice au bon développement des jeunes. Chez les ovins, malgré une longue domestication et une grande sélection, cette saisonnalité de la reproduction a été conservée (Tabl. 1). Elle est dirigée par la photopériode selon des mécanismes qui seront décrits plus loin..

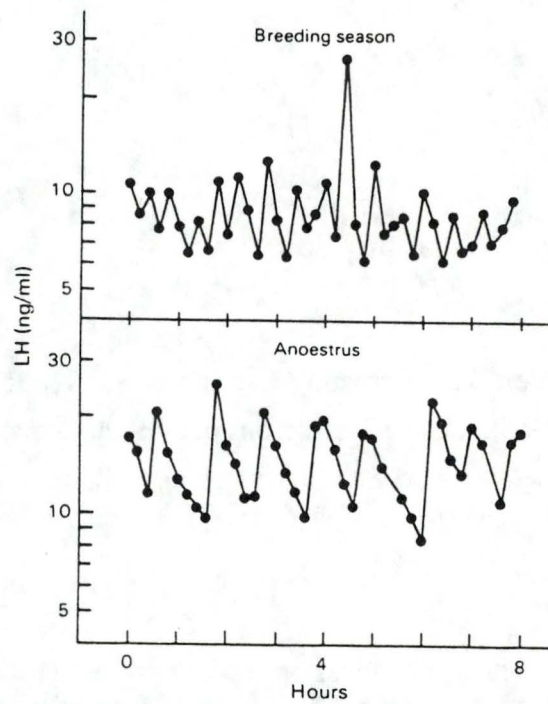
Durant la période d'anoestrus, aucune ovulation n'a lieu chez la brebis Suffolk, tandis que pour certaines races comme les Merinos, des ovulations ainsi qu'un ou deux cycles isolés sont parfois observés (PEARCE et al., 1988).

La brebis SUFFOLK est considérée, dans nos pays, comme une race facilement désaisonnable; elle est fréquemment inséminée en juillet, période de jours longs, de façon à obtenir des "agneaux de Pâques". Néanmoins, chez des brebis croisées SUFFOLK, POULTON (1988) observe l'entrée naturelle en cycle au mois de septembre seulement.

La période d'anoestrus commence à la moitié de l'hiver (ROBINSON et KARSCH, 1984 cités par MALPAUX et al., 1988a). Mais NOEL (communication personnelle) a observé par dosage de progestérone et endoscopies journalières sur 12 brebis SUFFOLK, que tous les animaux étaient encore en cycle au début du mois de mars.

On divise la période d'anoestrus en anoestrus profond et anoestrus léger suivant la sensibilité différente de la brebis à une induction des ovulations. En anoestrus, la sécrétion endogène de LH et de FSH est suffisante pour permettre la croissance folliculaire terminale (PHILIPON, 1988). Malgré une déficience fonctionnelle de leurs cellules, le nombre de follicules atteignant une taille préovulatoire est identique en cycle, en anoestrus léger et en anoestrus profond (JACQUES, 1989).

D'un point de vue hormonal, l'absence de cycles durant l'anoestrus est dû à une plus grande sensibilité de l'axe hypothalamo-hypophysaire au feed-back négatif des oestrogènes en jours longs qu'en jours courts (LEGAN et KARSCH, 1983). Par contre, le rétrocontrôle positif de la LH par les oestrogènes ne paraît pas être modifié, mais les concentrations en



Concentrations of LH in samples of serum obtained every 12 min from long-term ovariectomized Suffolk ewes maintained outdoors. Data are from one representative individual during the middle of the breeding season (December) and in mid-anoestrus (June).

FIGURE 4: Pulsatilité de la LH en anoestrus et en saison de reproduction (GOODMAN and KARSCH, 1981).

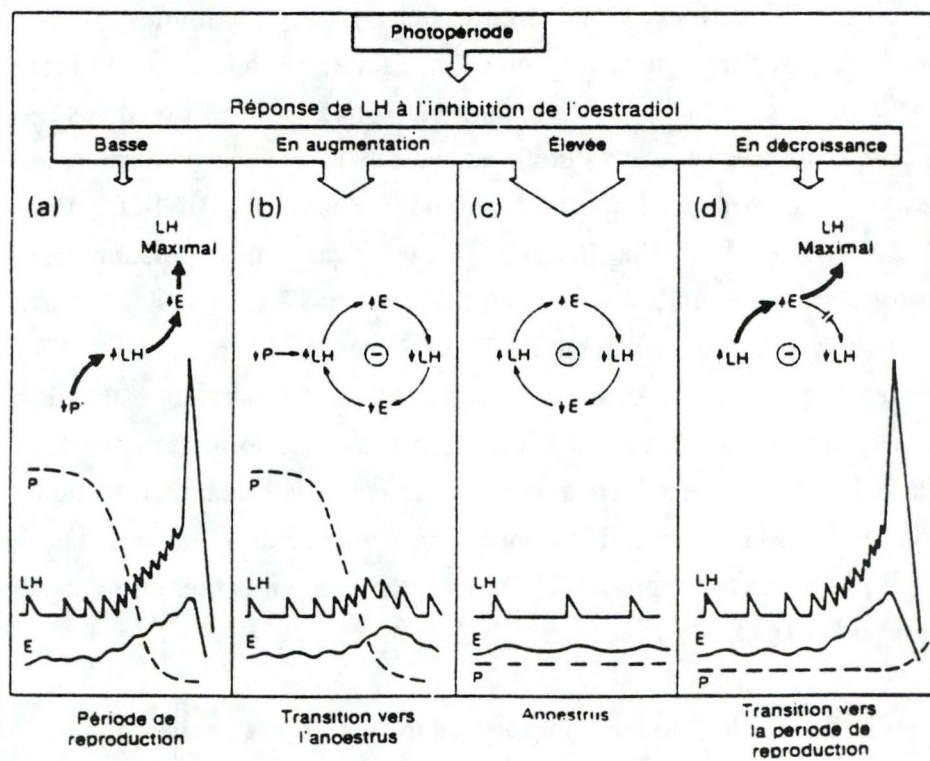


FIGURE 5: Schéma hypothétique du contrôle de l'activité saisonnière chez la brebis (KARSCH et al., 1980).

oestradiol sont trop faibles (6 à 12 pg/ml: CRAPLET et THIBIER, 1980) pour déclencher le feed-back positif.

L'anoestrus semble, avant tout, caractérisé par des niveaux élevés en prolactine et un niveau basal de progestérone suite à l'absence de lutéinisation.

La sécrétion de FSH ne semble pas différente de celle observée en anoestrus si ce n'est l'absence des pics préovulatoires (BISTER, 1980). Certains auteurs observent des fluctuations identiques à celles observées en phase lutéale (CRAPLET et THIBIER, 1980; BISTER et PAQUAY, 1983) tandis que d'autres font part de variations saisonnières (Mc NATTY et al., 1984, cités par JACQUES, 1989, MONGOMERY, 1988).

La fréquence des pulses de LH est plus faible qu'en phase lutéale (1 pulse de LH toutes les 8 à 12 heures; SCARAMUZI ET BAIRD, 1979; cités par JACQUES, 1989) mais l'amplitude de ces pulses est un peu supérieure à celle que l'on observe en période d'activité ovarienne cyclique (Fig. 4).

Lors du passage anoestrus-oestrus, un cycle court de 5 à 6 jours a généralement lieu. BISTER (1980) observe que la période de reproduction commence par un cycle de 4 à 6 jours. L'ovulation du premier cycle, associée à un pic de LH et de FSH est suivie d'une production éphémère et faible de progestérone. Quatre à dix jours plus tard, un nouveau pic de LH apparaît, sans que le taux de FSH n'atteigne des valeurs élevées. Un nouveau pic de FSH important le suit de deux jours et ensuite, la sécrétion de progestérone reprend son profil cyclique normal.

Lors de ce premier cycle, il y a ovulation sans manifestation extérieure du comportement de chaleurs; on parle alors d'ovulation silencieuse.

b. Mécanismes responsables de l'instauration des cycles.

La réponse hypophysaire ne serait pas la cause de la reprise des cycles car l'activité de la LH n'est pas modifiée pendant l'anoestrus et un pic de LH peut facilement être provoqué par des injections d'oestrogènes pendant cette période. De plus, la sensibilité de l'hypophyse au GnRH n'est pas diminuée. Pour KARSCH et al. (1980), c'est un changement au niveau du feed-back des oestrogènes qui explique le passage de l'anoestrus à la période sexuelle (Fig. 5).

Le début des cycles sexuels coïncide avec la chute du taux de PRL plasmatique, lui-même parallèle à la durée d'éclairement (RAVAULT, 1986).

La PRL pourrait expliquer ce profond changement au niveau du rapport entre les oestrogènes et les glandes hypothalamique et hypophysaire. Chez une brebis en lactation, la prolactine émise abondamment lors de chaque têtée est associée à une absence de cycles (BISTER, 1988). Mais des expériences visant à diminuer artificiellement les taux élevés de PRL

n'ont pu mettre en évidence des retours en cycles plus précoces (MANDIKI, communication personnelle).

En contrôlant l'alimentation et en maintenant des brebis à 50 et 60 kg, MONGOMERY et al. (1988) ont montré sur deux années d'expérimentation que le poids vif de l'animal n'influence pas la date d'entrée en période de reproduction mais que l'entrée en cycle varie très fort d'une année à l'autre suivant les conditions environnementales (disponibilité alimentaire...).

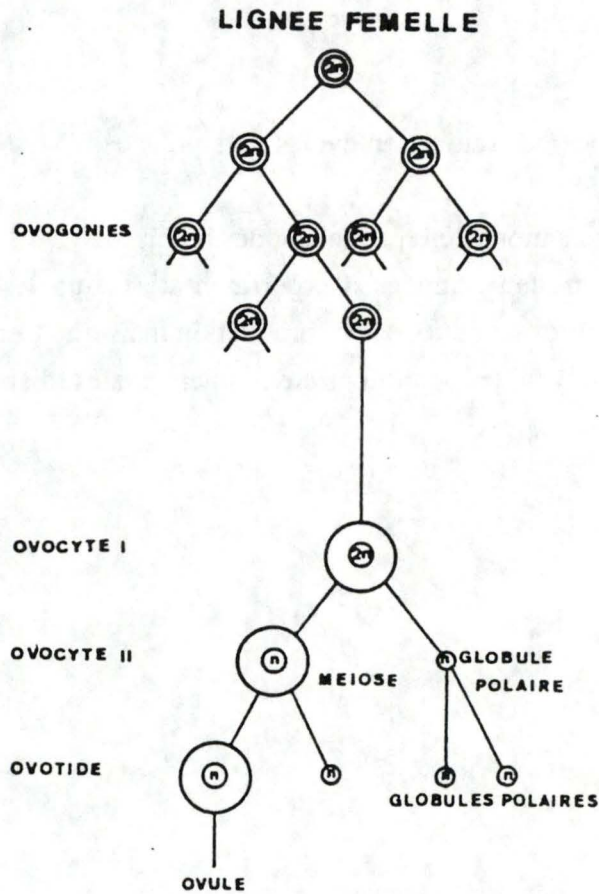


FIGURE 6: Ovogenèse (TITECA, 1987).

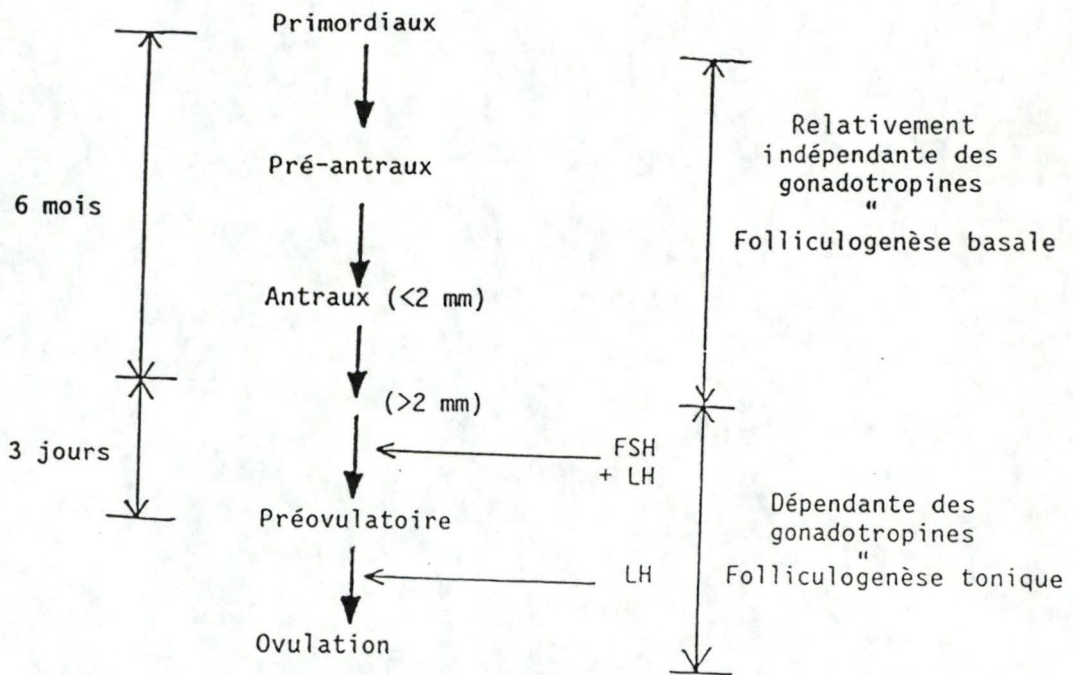


FIGURE 7: Résumé des principales étapes de la folliculogenèse chez la brebis (JACQUES, 1989).

B. Croissance et maturation folliculaire.

Chez les mammifères femelles, la gamétogenèse est un phénomène discontinu. L'**ovogenèse** (Fig.6) consistant en l'établissement d'un stock de follicules primordiaux est suivie d'une **folliculogenèse basale** qui amène certains follicules à se différencier de façon indépendante de l'état physiologique de l'animal et des gonadotropines.

Ensuite, des follicules peuvent être recrutés pour entamer une maturation finale appelée **croissance folliculaire terminale** ou **folliculogenèse tonique**. Ceux-ci vont être sélectionnés; la plupart régresseront tandis que les autres se développeront jusqu'à ovuler. Cette dernière étape est fortement contrôlée par les hormones gonadotropes (Fig.7).

B.1. Ovogenèse.

La formation des ovocytes commence dès la vie intra-utérine et s'arrête après la naissance. Les cellules précurseurs des ovocytes, les ovogonies sont originaires de l'endoblaste de la vésicule ombilicale. Elles se transforment en ovocytes de premier ordre et ceux-ci commencent la prophase de la première division méiotique mais restent bloqués au stade diplotène jusqu'à l'ovulation. Leur phase de croissance commencera à partir de la période prépubertaire, sans relation apparente entre eux.

B.2. Folliculogenèse.

a. Folliculogenèse basale.

A l'âge adulte, l'ovaire de la brebis contient 12.000 à 86.000 follicules primordiaux et entre 100 à 400 follicules en croissance (Fig.8), seuls 10 à 40 de ceux-ci sont visibles à la surface de l'ovaire (CAHILL et al.,1979).

La croissance d'un follicule nécessite plusieurs mois. Régulièrement, des follicules primaires entament leur développement. La plupart sont voués à la régression et l'atrésie plus ou

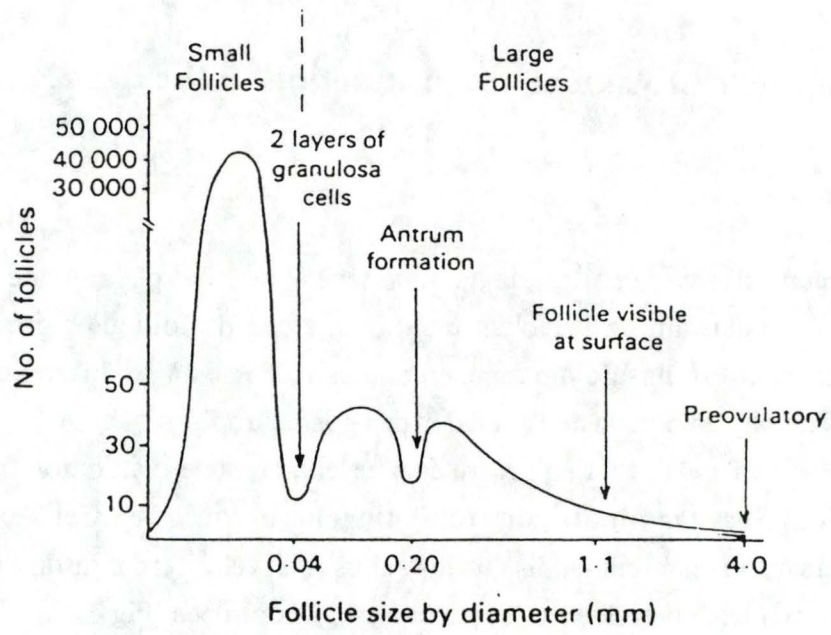


FIGURE 8: Structure de la population folliculaire chez la brebis (JACQUES, 1988).

moins précoce. Les autres augmentent de volume suivant une courbe d'allure exponentielle, passant du stade de follicule primaire à 0,5 mm en quelques mois puis mûrissant de manière à atteindre 4 à 5 mm en quelques jours.

Les follicules sont disposés dans le stroma du cortex de l'ovaire et on distingue selon leur état de développement (Fig.9):

- les **follicules primordiaux** qui contiennent un ovocyte entouré d'une zone pellucide (formée de glycoprotéines acellulaires synthétisées au début de la croissance de l'ovocyte) et d'une assise de cellules folliculaires aplaties
- les **follicules primaires** dont l'unique couche devient cubique
- les **follicules secondaires** qui sont entourés de plusieurs couches de cellules formant la granulosa; ces cellules sont riches en récepteurs à la FSH.

Le stroma ovarien entourant le follicule se modifie pour former les thèques folliculaires; on y distingue en effet la thèque interne à cellules cubiques et à fonction endocrine de la thèque externe faite principalement de tissu conjonctif et ayant un rôle de soutien et protecteur. Ces thèques sont séparées de la granulosa par une membrane basale. Le follicule à ce stade est appelé **follicule tertiaire**. Pendant que le follicule croît, surtout par augmentation du nombre et de la taille des cellules de la granulosa, des accumulations de liquides, synthétisés par les cellules granulosaes et particulièrement riches en acide hyaluronique, apparaissent (fluide folliculaire).

Les cavités (corps de Call-Exner) contenant ce liquide, confluent en une seule; l'antrum folliculaire. L'ovocyte se trouve dans une protrusion interne de cellules granulosaes, le cumulus oophorus. A ce stade terminal de la croissance folliculaire, le follicule mûr histologiquement est communément appelé **follicule de De Graaf**.

Dans un premier temps, seules les cellules thécales ont des récepteurs à LH mais lors de la folliculogénèse, les cellules granulosaes en acquièrent beaucoup.

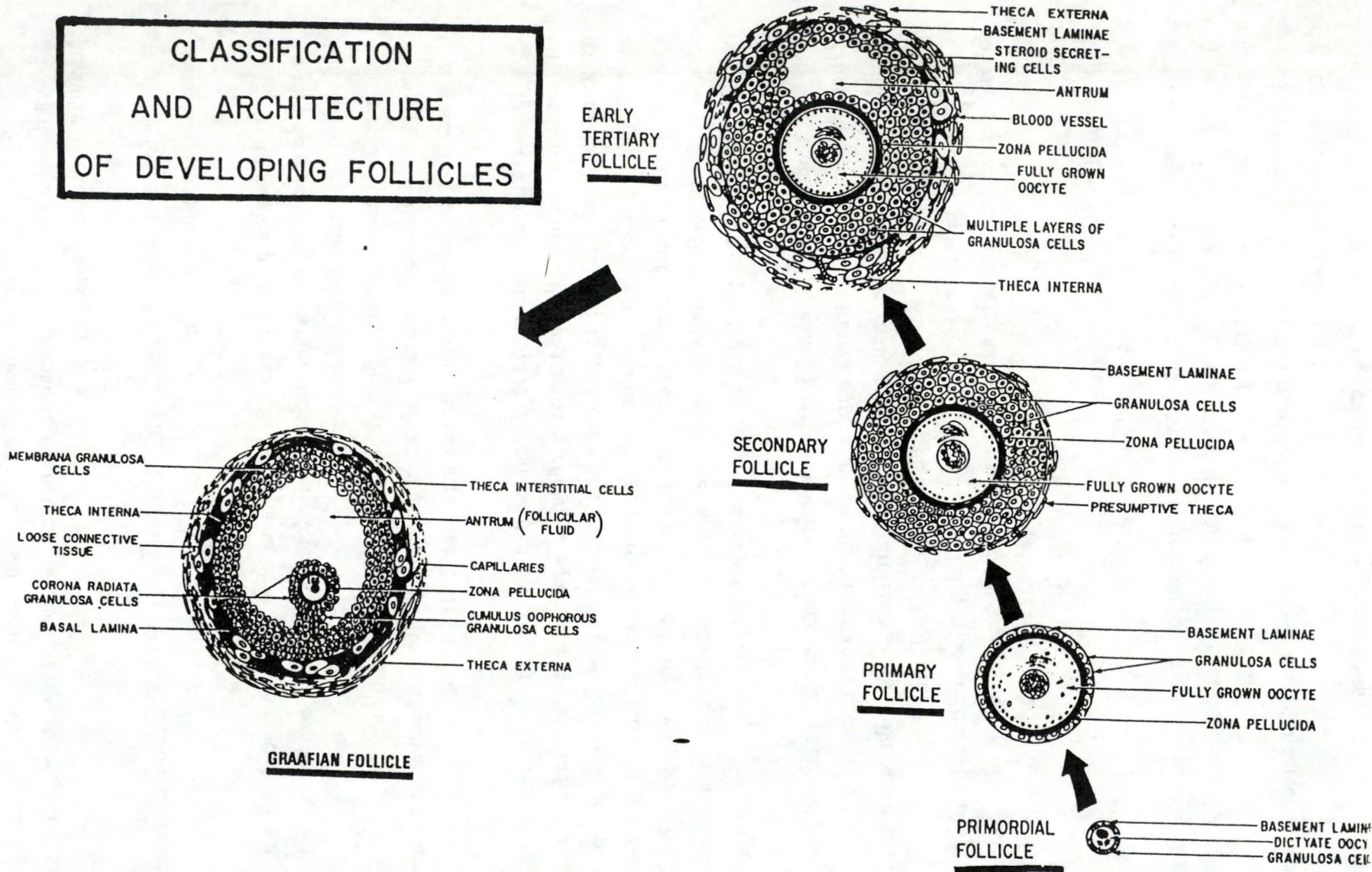
a. Folliculogénèse tonique.

La folliculogénèse tonique est la croissance finale du follicule précédant l'ovulation. Cette croissance est sous la dépendance directe des gonadotropines et concerne des follicules de diamètre supérieur à 2 mm (JACQUES,1989).

La folliculogénèse tonique correspond à la troisième vague de croissance folliculaire qui dure en moyenne 3 à 4 jours chez la brebis.

Trois phénomènes peuvent caractériser la folliculogénèse tonique:

CLASSIFICATION AND ARCHITECTURE OF DEVELOPING FOLLICLES



Photomicrographs showing the architecture and classification of ovarian follicles during their growth and development. At the secondary stage, the follicle becomes surrounded by the prospective TI cells. At the early tertiary stage some precursor theca cells transform into large polygonal cells and express their differentiated state as TI cells. In the Graafian follicle the number of differentiated TI cells increases as a result of mitosis in a stem cell population.

FIGURE 9: Structure et classification des follicules en développement (NOEL, 1989).

Il s'opère d'abord un **recrutement** des follicules potentiellement capables d'ovuler. Puis, parmi ces follicules se produit la **sélection** d'un follicule qui va exercer un phénomène de **dominance** sur les autres et provoquer leur atresie .

Le recrutement de follicules et la sélection sont des processus s'accomplissant constamment pendant le cycle, mais chez la brebis ROMANOV, contrairement à la TEXEL et l'ILE-de-FRANCE, les mécanismes de recrutement et de sélection semblent s'exercer avec des intensités différentes en phase lutéale et en phase folliculaire (JACQUES, 1989).

recrutement

Le recrutement est l'objet actuellement de nombreuses recherches car c'est de lui que dépend en grande partie le nombre de follicules ovulant. De plus, on ne distingue pas encore très bien l'influence des hormones gonadotropes (LH et FSH) sur ce phénomène.

Alors que chez la rate, c'est au moment de l'oestrus que le recrutement a lieu, chez les primates et les brebis, c'est au moment de la lutéolyse (CAHILL, 1979 ; PHILIPON, 1988).

Le recrutement semble être déclenché, chez la brebis par l'augmentation de la fréquence des pulses de LH . JACQUES (1989) qui a observé des niveaux de FSH similaires en saison et en contre-saison, attribue à cette hormone un rôle clé dans le recrutement des follicules, en favorisant surtout la croissance de l'antrum. Des follicules peuvent en effet, atteindre en dehors de la saison de reproduction une taille "préovulatoire" c'est à dire identique à celle des follicules arrivés à maturité juste avant l'ovulation.

Mais une injection de LH seule en anoestrus profond est incapable d'induire l'ovulation tandis que couplée à de la FSH, l'injection de LH est efficace (OUSSAID, 1982). Il semble donc qu'une imprégnation par la FSH soit nécessaire pour avoir une bonne maturation.

sélection

La sélection serait, pour la plupart des auteurs, la conséquence d'une diminution du taux plasmatique de FSH liée à une production croissante d'inhibine et d'oestradiol par les gros follicules. Deux hypothèses sont actuellement débattues pour expliquer le mode de sélection:

L'hypothèse de la stabilité suppose que le(s) follicule(s) destiné(s) à ovuler serait(ent) protégés de la diminution de FSH par de fortes concentrations en oestradiol dans le fluide antral (DRIANCOURT, 1984). JACQUES (1989) a observé qu'une augmentation du nombre de dominants peut être liée à des niveaux anormalement élevés de FSH après une hémi-castration. Cependant, DI ZEREGA et HODGEN (1981) ont montré qu'un apport de FSH , n'est pas suffisante chez le rhésus pour abolir la sélection.

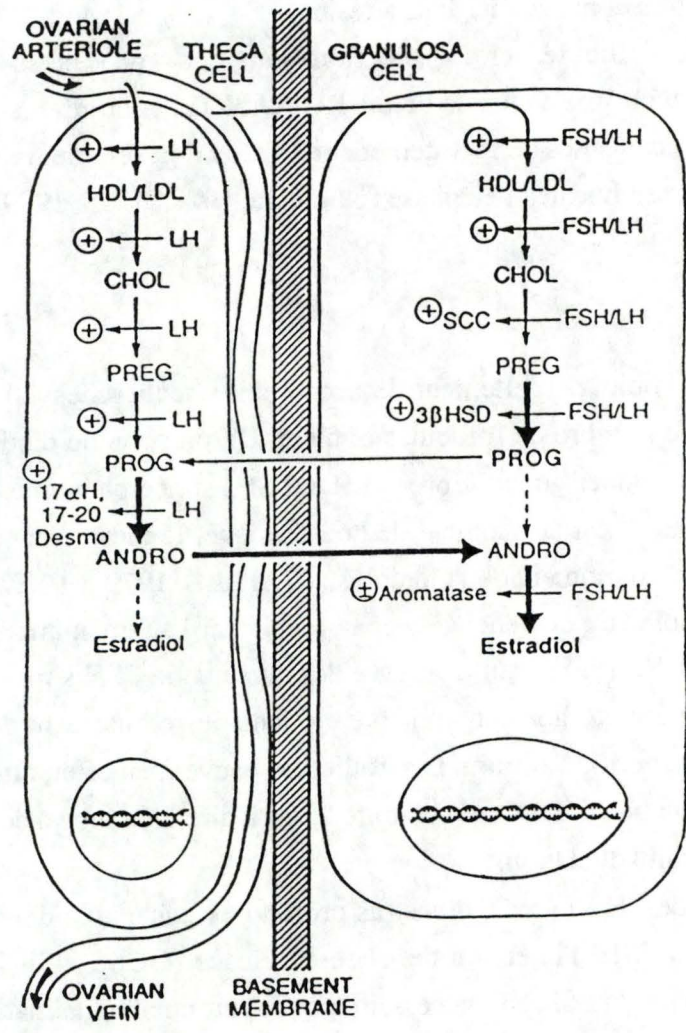


FIGURE 10: Contrôle de la biosynthèse des stéroïdes (IRELAND, 1987).

L'hypothèse de l'élimination est basée sur le fait que le follicule qui va ovuler puisse contribuer directement à l'élimination des autres par sécrétion de substances paracrines inhibitrices ou anti-aromatisantes de type FSH RBI (FSH receptor binding inhibitor) ou de type FRP (Follicular Regulatory Protein). Celui-ci supprime la réponse des autres follicules à une stimulation gonadotrope et les concentrations en FRP sont plus élevées dans les follicules atrophiques que dans les follicules sains (IRELAND, 1987).

Les TGF (Transforming Growth Factor) semblent également impliqués dans les phénomènes de dominance et d'atrésie. Le TGF α diminue le nombre de récepteurs à la LH et l'activité aromatasase et est capable de retarder la sélection des follicules et même l'ovulation. Par contre, TGF β a des effets opposés.

B.3. L'atrésie folliculaire.

L'atrésie, processus involutif du follicule est le lot de la grande majorité des follicules. Elle se caractérise par une perte de vascularisation de la thèque, l'arrêt des mitoses des cellules folliculaires, la pycnose de leur noyau, la séparation des cellules de la membrane basale et la mort de l'ovocyte. Ce processus d'atrésie s'observe à tous les stades du développement folliculaire (PHILIPON, 1988). Si le follicule est arrivé au stade cavitaire, la cavité antrale se trouve envahie par des fibroblastes, et seule subsiste encore quelque temps la membrane dite de Slaviansky.

L'atrésie des follicules est la conséquence de la sélection qui s'opère de manière continue. C'est non seulement un phénomène histologique mais encore fonctionnel; une modification de la stéroïdogénèse précède la régression morphologique (JACQUES, 1989). La perte de l'activité aromatasase provoque une augmentation des concentrations en androgènes et une diminution de celles d'oestrogènes dans le fluide folliculaire.

B.4. La stéroïdogénèse.

Le follicule est une glande endocrine évolutive dans laquelle sont synthétisés divers stéroïdes. La transformation des stéroïdes schématisée à la figure n° 10 se déroule au niveau des cytochromes P450. Le précurseur, le cholestérol est transformé en pregnenolone qui est transformé en androgènes par les cellules de la thèque interne.

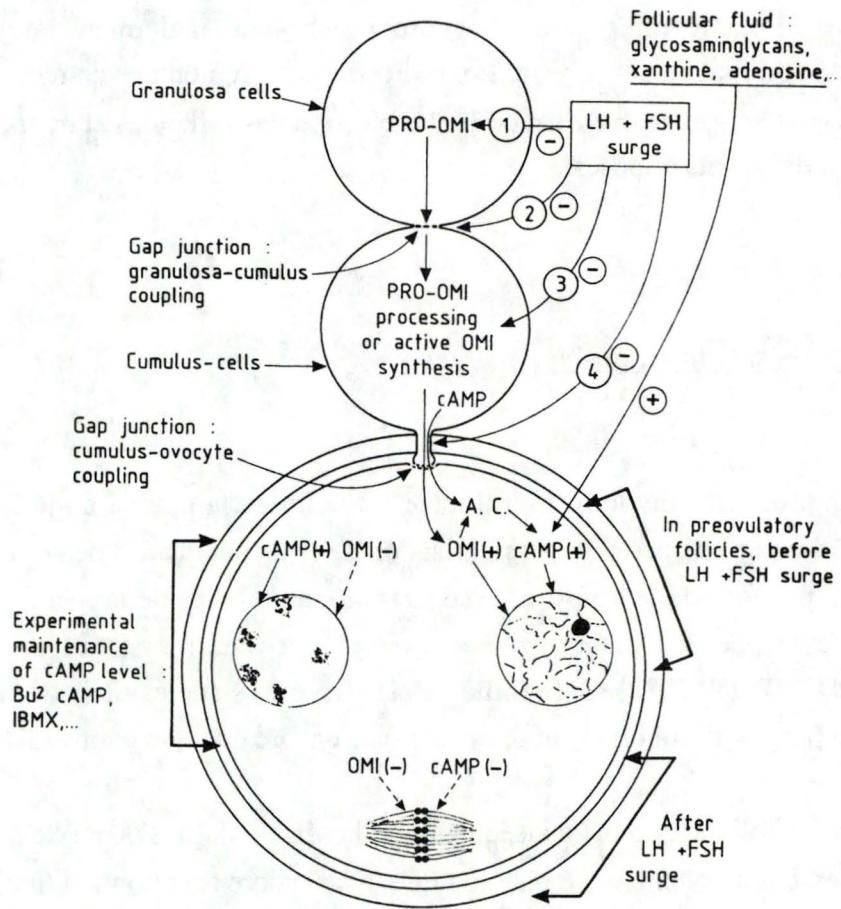


FIGURE 11: Mécanisme d'action du pic de LH sur la maturation de l'ovocyte (THIBAUT et al., 1987).

Les androgènes sont convertis en oestrogènes par le cytochrome P450 aromatasase couplé à une flavoprotéine. Cette aromatisation se fait au niveau des cellules granulosales et elle augmente continuellement avec la taille du follicule (JACQUES, 1989). Certains auteurs (TSONIS et al., 1984) estiment qu'au delà de 4 mm de diamètre, l'aromatisation n'augmente plus avec la taille du follicule. Lors du processus d'ovulation, la décharge de LH provoque la perte de l'activité aromatasase.

Lors de l'anoestrus, les faibles taux d'oestrogènes peuvent être expliqués par deux hypothèses: soit un manque de précurseurs d'oestrogènes , soit une déficience dans l'activité aromatasique des cellules granulosales.

Mc NATTY et al. (1985) ont montré que l'activité aromatasase était similaire en anoestrus que celle mesurée lors des cycles, tandis que JACQUES (1989), en ayant étudié les sécrétions folliculaires *in vitro* , suggère qu'il existe une déficience dans l'activité aromatasase en anoestrus.

B.5. La maturation ovocytaire.

La première division de la méiose est achevée au moment de l'ovulation. La chromatine est également répartie entre les cellules filles mais un des ovocytes II contient presque tout le cytoplasme. L'autre devient le premier globule polaire, une très petite cellule contenant un noyau et une faible quantité de cytoplasme. Le premier globule polaire est expulsé et immédiatement après, commence la deuxième division s'arrêtant en métaphase et ne s'achevant que lors de la fécondation. L'ovocyte II reste alors viable environ 24 heures.

La reprise de la méiose dans l'ovocyte se produit après la décharge de LH dans le follicule préovulatoire. Le pic préovulatoire semble agir directement ou indirectement à quatre niveaux dans la maturation de l'ovocyte (Fig. 11; Thibault et al, 1987):

- 1) en modifiant l'activité biochimique des cellules du cumulus et des cellules granulosales (modification confirmée par le changement du rapport Oestradiol/Progestérone)
- 2) en dissociant les cellules du cumulus de la granulosa
- 3) en supprimant la capacité des cellules du cumulus d'activer les inhibiteurs méiotiques (OMI et AMP_c)
- 4) en modifiant le cytosquelette des prolongements cytoplasmiques des cellules du cumulus dans la zona pellucida de façon à séparer l'ovocyte du cumulus oophorus.

Thibault et al (1987) ont également montré que des changements nucléaires et cytoplasmiques ainsi qu'une perte de sensibilité vis à vis d'inhibiteurs se produisent bien avant la décharge de LH pour les ovocytes des plus gros follicules.

Les mécanismes de régulation de la reprise de la méiose restent controversés mais tous semblent aboutir à une régulation des taux intra-ovulaires d'OMI (Oocyte meiosis inhibitor) produit par les cellules granulosales et d'AMP_c qui empêche notamment la dissolution de l'enveloppe nucléaire. A ce propos, il est intéressant de constater que chez la brebis, contrairement à la ratte, le taux d'AMP_c intra-ovocytaire augmente lors de la première heure de culture *in vitro* en présence de LH et FSH.

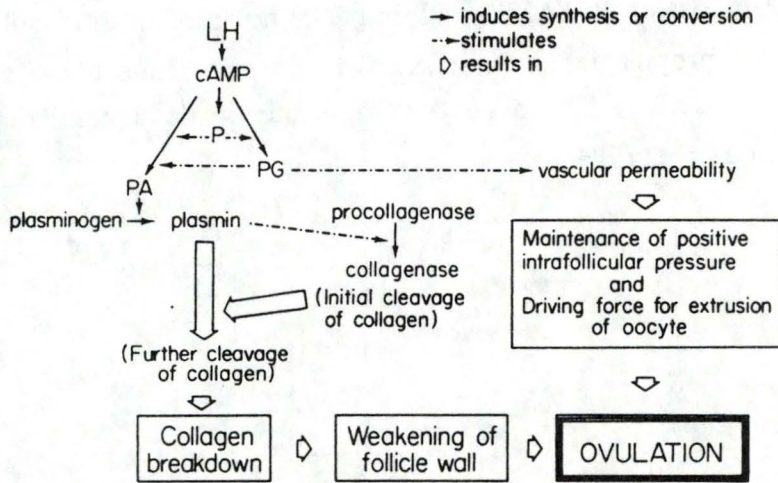


FIGURE 12: Modèle simplifié du processus d'ovulation chez la brebis (BRANNSTROM, 1988).

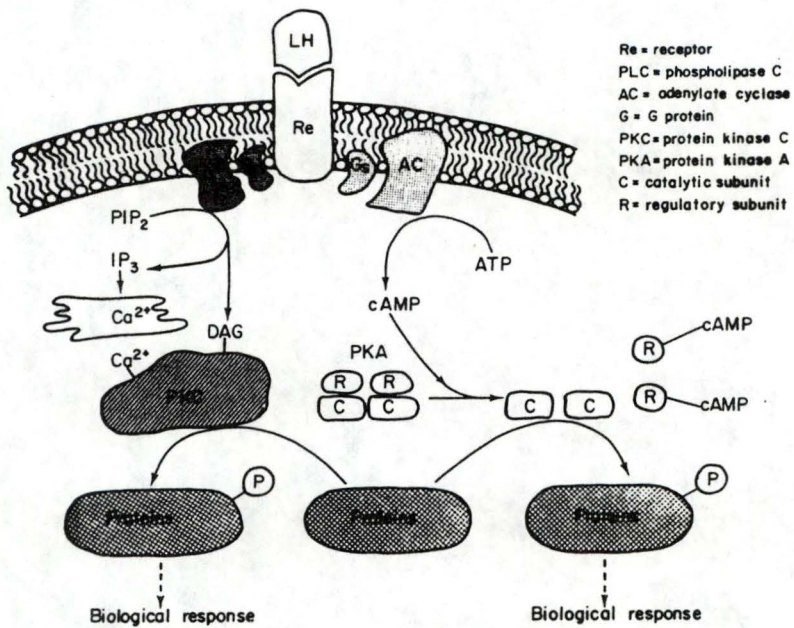


FIGURE 13: Systèmes de messages secondaires impliqués dans la transmission du signal de la LH (BRANNSTROM, 1988).

C. Ovulation.

L'ovulation consiste en la rupture du follicule mûr à la surface de l'ovaire avec libération de l'ovocyte dans la cavité péritonéale. L'ovocyte est capté par le pavillon de l'oviducte et pénètre dans la lumière tubaire grâce à l'activité des cellules ciliées. Chez la brebis, précédant l'ovulation, se manifeste un comportement d'oestrus qui consiste principalement en la recherche et l'acceptation du mâle. Ce comportement d'oestrus a lieu plus fréquemment en fin d'après-midi (COGNIE et al.,1970).

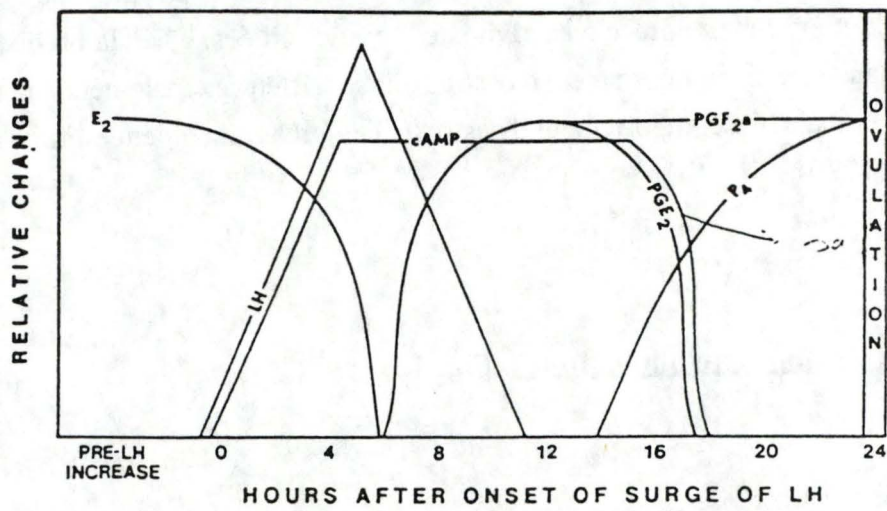
C.1. Description morphologique. (Fig. 12)

L'ovulation se caractérise :

- par un détachement de la corona radiata de la granulosa périphérique.
- par un amincissement de la trame conjonctivo-épithéliale de l'ovaire suite à l'action de divers enzymes protéolytiques; protéases, collagénases et la plasmine produite à partir du plasminogène plasmatique et du liquide folliculaire.
- par une ischémie locale et une modification de la pression intrafolliculaire.

C.2.Mécanismes biochimiques.

La liaison de la LH à ses récepteurs active un système de messagers secondaires qui, par leurs modifications sont responsables de l'activation cellulaire. Le médiateur intracellulaire de l'action des gonadotropines lors de leur fixation au récepteur est principalement l'AMPc (MARSH ,1976) mais pour BRÄNNSTRÖM (1988), le système phosphoinositide / protéine kinase C serait aussi impliqué , peut-être dans une moindre mesure, dans l'activation des cellules granulosales (Fig. 13).



Relative follicular changes with respect to the surge of LH in estradiol-17 β (E₂), progesterone (P₄), cAMP, PGE₂, and PGF_{2 α} .

FIGURE 14: Schéma décrivant les modifications hormonales avant l'ovulation (TITECA, 1987).

Les hormones gonadotropes sont des glycoprotéines présentant une hétérogénéité importante due au type de glycosylation. Une hormone gonadotrope déglycosylée a un rôle antagoniste en ce sens qu'elle se fixe avec une plus grande affinité sur le récepteur mais qu'elle est incapable d'activer l'adénylate cyclase. La liaison peptide-récepteur se ferait donc par la portion peptidique tandis que la chaîne polysaccharidique jouerait un rôle essentiel dans le mécanisme d'action (JACQUES, 1989)

C.3. Mécanismes endocriniens.

En anoestrus saisonnier, les follicules se développent jusqu'à une taille proche de la taille préovulatoire et le nombre de follicules atteignant ce stade est semblable en période d'anoestrus et en période de reproduction (JACQUES, 1989).

Il semble donc que les mécanismes contrôlant l'ovulation sont distincts de ceux contrôlant la croissance folliculaire terminale. Une immunisation contre la LH ou l'injection d'anticorps anti-GnRH bloque l'ovulation mais une injection de LH seule, en dehors de la période d'anoestrus profond, suffit à rétablir l'ovulation (PHILIPON, 1988). Cela pourrait expliquer un rôle prépondérant de la LH par rapport à la FSH pour le contrôle de l'ovulation.

Juste avant l'ovulation (Fig. 14), la fréquence de la sécrétion pulsatile de LH au niveau de l'hypophyse augmente durant 10 à 20 heures et provoque une élévation très importante de LH circulante (50 à 500 fois le niveau basal).

Lors du pic préovulatoire de LH et FSH, la FSH agit principalement sur la folliculogénèse et la dissociation du cumulus oophorus et est capable de stimuler la synthèse du plasminogène tandis que la LH est responsable de la ponte ovulaire et de la formation du corps jaune.

La progestérone synthétisée sous l'action de la LH stimule l'activité de la collagénase et sensibilise l'utérus aux oestrogènes.

La concentration intra-folliculaire en $\text{PGF}_{2\alpha}$ augmente de façon importante lors de la décharge ovulante. Elle aurait pour effet de fragiliser la membrane des lysosomes de l'épithélium ovarien et de stimuler les contractions des fibres musculaires lisses du follicule.

L'inhibine présente dans le fluide folliculaire et synthétisée d'autant plus que le follicule est développé, est libérée massivement lors de l'ovulation entraînant ainsi une diminution importante des sécrétions de FSH.

TABLEAU 2: Influence de la saison sur l'intervalle moyen fin du traitement progestatif-début observé des chaleurs (COGNIE et al.,1970).

Traitement	Anœstrus	Saison sexuelle
FGA seul	42 h 7 ± 1,45 (37)	37 h 7 ± 1,02 (48)
FGA + PMSG	32 h 7 ± 0,71 (48)	30 h 0 ± 0,80 (49)

() Nombre d'animaux venus en œstrus.

C.4. moment de l'ovulation.

Chez la brebis, l'ovulation se produit 16 à 24 heures après le début de l'oestrus. A ce moment, la deuxième mitose a eu lieu et le premier globule polaire est expulsé.

Une indication de l'imminence de l'ovulation est l'apparition à la surface du follicule de la macula pelucida, zone transparente produite par un arrêt local de la circulation.

COGNIE et al.(1970) ont montré qu'après synchronisation des chaleurs, l'oestrus apparaît plus rapidement en période de reproduction qu'en anoestrus bien que l'intervalle oestrus-ovulation ne soit pas influencé par la saison. Cet avancement serait lié à la variation saisonnière de sensibilité de l'hypothalamus au feed-back négatif des oestrogènes (Tabl. 2).

Beaucoup de facteurs environnementaux peuvent avoir une influence sur le moment d'ovulation sans que ces effets ou leurs causes ne soient discernables; le changement d'environnement des brebis ainsi que d'autres stress (prises de sang) pourraient retarder la mise en place du pic préovulatoire et de l'ovulation de plus de 24 heures (MARTIN et al., 1981; cités par COGNIE, 1984).

Bien que la saison ait une influence sur l'apparition de l'oestrus, elle ne modifie pas le moment d'ovulation par rapport au début observé de l'oestrus (COGNIE et al., 1970).

Sans que des études aient été faites à ce sujet, il semble que la présence de brebis en chaleur puisse stimuler la réponse ovarienne de brebis en fin de traitement de synchronisation (COGNIE et al., 1984).

Enfin, signalons que la présence d'un bélier dans le troupeau avance le moment de l'ovulation et bien que l'ovulation soit spontanée chez la brebis, elle est hâtée par l'accouplement qui, en plus, augmente le taux d'ovulation (CRAPLET et THIBIER, 1980).

C.5. Le taux d'ovulation.

Les différences de taux d'ovulation (TO) entre les races tendraient à démontrer que ce caractère est fortement lié au génotype mais selon SHRESTHA et HEANEY (1987), la fertilité et la fécondité sont des facteurs dépendant très peu de l'héritabilité (étude faite sur 2380 brebis).

Néanmoins, le TO reste soumis à beaucoup d'influences environnementales ou physiologiques; il existe, en effet, une grande variabilité au sein d'une même race, les TO peuvent même fluctuer d'un cycle à l'autre car les brebis ne sont pas capables de maintenir des TO de 2 ou 3 (MONGOMERY et al., 1988).

Etude du TO en fonction de la race

Le TO des races ROMANOV et BOORoola sont respectivement de 2,68 et de 2,86 (SCARAMUZI et RADFORD, 1983) . Ces races sont donc considérées comme prolifiques.

L'ILE-DE-FRANCE (race non-prolifique) a un TO de 1,12 (JACQUES et al., 1986). Chez la SUFFOLK, il serait de l'ordre de 1,5 en pleine saison de reproduction (novembre; NOEL, communication personnelle).

Chez la brebis ROMANOV, DRIANCOURT et al. (1986) ont montré, par laparotomies et marquages à l'encre de chine des follicules, que c'est un recrutement important suivi d'une sélection normale qui aboutit à un TO élevé. Ils observent aussi que la taille des follicules préovulatoires est moindre que chez les races non-prolifiques.

Chez la brebis FINNOISE qui a un TO proche de celui de la ROMANOV, le nombre de gros follicules entamant la croissance entre la veille et le lendemain de la lutéolyse est le même que chez les autres races mais la perte par atresie est moindre (DRIANCOURT et al. ,1986).

C'est donc un recrutement normal allié à un taux d'atresie plus faible qui explique la prolificité de la race.

La brebis BOORoola aurait un TO élevé grâce à une stimulation des hormones gonadotropes s'opérant sur les cellules granulosales issues de follicules de diamètre plus faibles que chez les autres races. Beaucoup d'auteurs considèrent que cette action précoce des gonadotropines serait liée à la présence d'un gène majeur ou d'un groupe de gènes chez certaines BOORoola (PHILIPON, 1988).

Chez les races prolifiques, différentes stratégies aboutissent à des TO élevés et comparables: Une prolificité élevée peut être fonction d'un recrutement plus important, d'une sélection moindre ou d'une combinaison de ces deux facteurs (JACQUES, 1989).

Pour toutes ces races, les follicules ovulatoires sont de taille réduite par rapport à ceux des races non-prolifiques bien que les vitesses de croissance et de régression soient semblables quelle que soit la prolificité (PHILIPON, 1988).

Etude du TO en fonction de facteurs hormonaux

Il est très difficile de déterminer le rôle exact d'une hormone sur le TO; les études faites à ce sujet se basent sur une corrélation entre un TO élevé et un taux plasmatique hormonal important sans pour autant démontrer une relation de cause à effet.

Etant donné que le TO est lié à l'importance du recrutement et de la sélection lors de la croissance folliculaire terminale, les facteurs contrôlant cette croissance seraient déterminants

pour le TO. CAHILL et al. (1979) pensent que le grand nombre de follicules disponible, lors de la stimulation ovulatoire chez les races prolifiques, est dû à une influence plus importante de la LH et de la FSH sur la population folliculaire.

Chez la brebis BOORoola, les taux de FSH sont très élevés durant le pic préovulatoire mais toutes les races prolifiques ne sont pas caractérisées par de tels taux (JACQUES, 1989). Ainsi, des études plus récentes montrent que les taux de FSH de la FINNOISE (race prolifique) sont inférieurs à ceux de la GALWAY (race non-prolifique) pendant la période préovulatoire (PHILIPON, 1988). Néanmoins, Mc NATTY et al. (1985) montrent que les brebis ROMNEY (race non prolifique) ayant deux ovulations ont un taux de FSH plus élevé pendant les 48 heures précédant la lutéolyse que celles qui ne présentent qu'une ovulation.

Une plus grande sensibilité à la FSH des cellules granulosales pourrait aussi expliquer une modulation de la FSH sur le TO. C'est ainsi que des follicules de brebis BOORoola cultivés *in vitro* répondent à un apport de FSH de façon plus précoce (dès 3 mm) chez les brebis porteuses du gène de fécondité que chez les autres (PHILIPON, 1988).

WEBB et GAULD (1984) observent que le nombre de follicules ovulant est égal à celui des follicules ayant acquis des récepteurs à la LH sur les cellules granulosales. Ces follicules présentent également une forte activité aromatasique.

Il semble, en tout cas, que le TO soit indépendant de la concentration maximale de LH lors du pic préovulatoire car la sélection des follicules se fait bien avant la décharge de LH (CAHILL et al., 1979).

Etude du TO en fonction du poids de la brebis

Le TO est fonction du poids vif de l'animal (MONGOMERY et al., 1988). EDEY (1968; cité par SCARAMUZZI et RADFORD, 1983) avaient déjà observé que pour les brebis en bon état corporel, la relation entre le poids et le TO est linéaire. Cette relation pourrait être expliquée par un recrutement normal mais une sélection moindre chez les brebis lourdes (DRIANCOURT et al., 1984). L'écart entre les TO de brebis lourdes et légères reste constant au cours de l'année (MONGOMERY et al., 1988).

SCARAMUZZI et RADFORD (1983) ont montré que non seulement, le poids corporel des brebis à la lutte (effet statique du poids vif) mais aussi l'augmentation de ce poids avant la lutte (effet dynamique de l'amélioration du poids corporel) sont liés à une augmentation des ovulations multiples. Ceci est à la base de la technique du "flushing" alimentaire qui vise à augmenter la prolificité moyenne du troupeau par un apport supplémentaire d'aliments énergétiques avant, pendant et un certain temps après l'ovulation. Mais pour MONGOMERY (1988), un flushing de courte durée (3 semaines) avant la lutte n'augmente pas significativement le TO.

Etude du TO en fonction de la saison

A partir du début de la saison de reproduction, les TO augmentent jusqu'à des maxima avant les jours les plus courts de l'année puis diminuent en s'approchant de la fin de la période sexuelle (MONGOMERY et al., 1988). Ces auteurs expliquent la précocité des maxima de TO par rapport à la photopériode par un rapide déclin du nombre de follicules à antrum au début de la saison de reproduction. Mais DRIANCOURT (1984) ne constate aucune corrélation entre le pourcentage de follicules à antrum pendant la saison de reproduction et le TO.

C.6. Maîtrise de l'ovulation chez la brebis.

Outre l'usage de la PMSG afin de provoquer une superovulation et de la mélatonine pour avancer la saison de reproduction (nous détaillerons ces deux traitements dans les chapitres ultérieurs), diverses techniques peuvent être mises en oeuvre afin de manipuler la reproduction chez les brebis:

- l'administration de progestérone provoque une inhibition de l'ovulation jusqu'à la cessation du traitement
- une injection de PGF₂ α peut induire la lutéolyse chez la brebis en cycle
- des facteurs environnementaux contrôlés peuvent, via le système nerveux, entraîner des modifications dans la sécrétion de GnRH (effet bélier).
- enfin, de la même manière que la PMSG, l'injection d'hormones gonadotropes, LH et FSH ou d'hormones hypothalamiques peut provoquer un pic de LH et de FSH et donc l'ovulation.

L'objectif final des traitements est de provoquer une ou de préférence plusieurs ovulation(s) fertile(s) , à un moment choisi.

Lorsqu'on envisage le contrôle artificiel de l'ovulation, il faut distinguer une **synchronisation** chez des animaux en cycle d'une **induction** de l'ovulation chez des animaux en anoestrus.

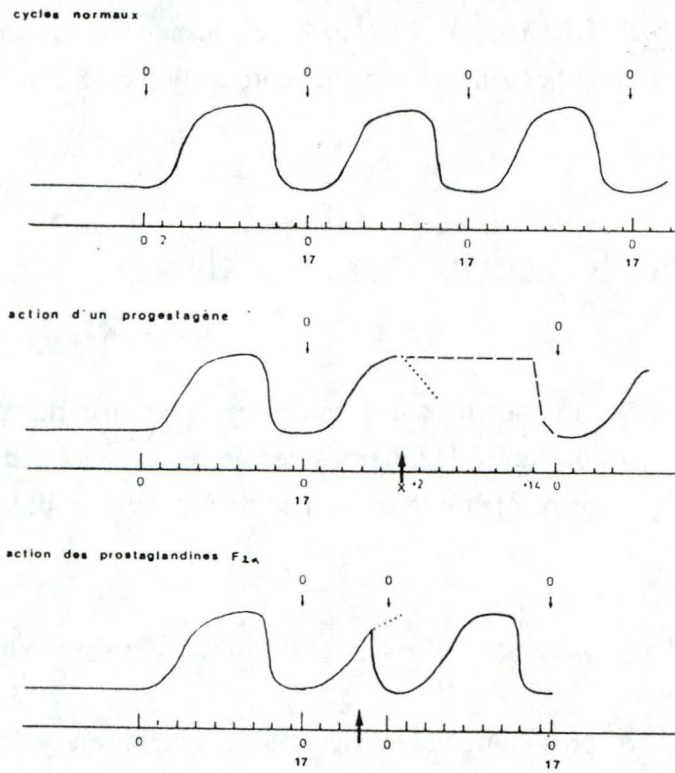


FIGURE 15: Schéma de l'action d'un progestagène ou de prostaglandines sur le contrôle du cycle ovarien (représenté par la sécrétion de progestérone). O = Ovulation = j0 du cycle (BISTER, 1989).

a. synchronisation des cycles.

La synchronisation des cycles (Fig.15) est basée sur l'action inhibitrice de la progestérone (P4) sur la maturation folliculaire et sur l'ovulation (BISTER, 1989). L'administration de P4 ou d'un dérivé de synthèse prolonge l'inhibition due au corps jaune jusqu'au moment souhaité. Une autre méthode est basée sur l'arrêt de la sécrétion endogène de P4 par une lutéolyse artificiellement provoquée lors d'une injection de prostaglandines.

La durée d'administration d'un progestagène doit être au moins aussi longue que la durée de vie naturelle du corps jaune.

Le progestagène peut être de la P4 naturelle ou un dérivé: MAP (médroxyacétate de progestérone), FGA (fluorogestoneacétate), CAP (chlormadinone).

L'administration peut se faire:

- par implants sous-cutanés: un implant de silastic imbibé de MAP est inséré sous la peau, souvent au niveau thoracique sous la patte antérieure.
- par voie orale: 10 à 15 mg de P4 par jour pendant 12 à 14 jours.
- par injections intramusculaires ou sous-cutanées répétées.
- par un dispositif vaginal (éponge de polyuréthane imprégnée du progestagène).

En raison de sa commodité d'utilisation, de la précision de la dose reçue et des bons résultats généralement obtenus (COGNIE, 1988), ce sont des éponges vaginales de MAP ou de FGA qui sont presque toujours utilisées. DERYCKE et al. (1987) n'ont trouvé aucune différence de fertilité chez des brebis TEXEL traitées avec des éponges de FGA ou de MAP en saison de reproduction.

L'oestrus apparaît environ 22 heures après le retrait de l'éponge et l'ovulation 54 heures après ce retrait (COGNIE et al., 1970).

L'induction de la lutéolyse est souvent provoquée par l'administration de prostaglandines F2 α (PGF2 α) ou leurs dérivés de synthèse, le Cloprosténol commercialisé par ICI sous le nom d'ESTRUMATE*.

Il semble que la dose entraînant la meilleure fertilité soit de l'ordre de 100 mg. Ce traitement n'est pas efficace sur les animaux n'ayant pas un corps jaune en activité, à savoir du jour 0 au jour 3 et à partir du moment où les prostaglandines endogènes sont sécrétées c'est-à-dire du jour 14 au jour 17 du cycle (ACRITOPOULOU et HARESIGN, 1980; cités par NOEL, 1989). Dans ces cas, il est nécessaire de procéder à une seconde injection plusieurs jours après la première afin de synchroniser tout le troupeau. GREYLING et VAN DER WESTHUYSEN (1980) ont étudié l'influence de l'intervalle entre les deux injections sur l'efficacité de la

synchronisation. Il ressort de leur étude que l'intervalle doit être d'au moins 11 jours et ne pas dépasser 13 à 14 jours.

Etant donné que la $PGF2\alpha$ a une action limitée à la phase lutéale du cycle, on peut provoquer une phase lutéale artificielle de façon à stimuler le système nerveux (priming de la P4) puis injecter des prostaglandines. Il semble que le moment d'administration du cloprosténol par rapport au retrait de l'éponge n'exerce pas d'effet significatif sur la durée de l'oestrus. Par contre, le moment du cycle auquel on a commencé le traitement apparaît être important quelque soit le traitement de synchronisation (GREYLING et VAN DER WESTHUYSEN, 1980).

L'effet bélier est une autre technique possible. WHITTEN (1966; cité par COLLIGNON, 1984) montre que la distribution des accouplements est très élevée le troisième jour après l'introduction d'un mâle dans un groupe de souris; la présence du mâle supprime également les irrégularités du cycle chez les femelles groupées et entraîne leur synchronisation. De même, la présence du mâle peut accélérer l'apparition du pic de LH et l'ovulation qui le suit (CRAPLET et THIBIER, 1980).

b. Induction des cycles.

L'induction des cycles peut être réalisée hors de la saison de reproduction, également par des progestagènes. Il apparaît en effet, que si les progestagènes sont inhibiteurs de la maturation folliculaire et de l'ovulation, ils ont au contraire un effet stimulateur via l'hypothalamus, à la fois sur le comportement oestral et sur les fonctions de reproduction. En effet, une imprégnation préalable du système nerveux est nécessaire pour que l'oestradiol en dose physiologique puisse provoquer le comportement oestral (BISTER, 1989).

Ce traitement aux progestagènes est en général réalisé par application d'éponges vaginales pendant 10 à 13 jours et doit être accompagné d'une stimulation ovarienne en fin de traitement, souvent par injection de PMSG. En anoestrus profond, l'ovulation ainsi induite est fertile mais les cycles ne se poursuivent pas.

L'effet bélier peut être utilisé pour induire les cycles en fin d'anoestrus. L'introduction soudaine d'un mâle dans le troupeau de brebis déclenche dans les 24 heures une décharge de LH qui sera suivie d'ovulation. Dans 50 % des cas, cette ovulation conduit à un corps jaune éphémère avec une faible sécrétion de progestérone (cycle court). Dans les autres cas, le corps jaune est normal. Par après, les cycles se poursuivent pendant la saison de reproduction.

D. La PMSG.

D.1. Origine.

La PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropine), est aussi appelée equine chorion gonadotropin.

Découverte dans les années 50 par COLE et HART, cette hormone, est sécrétée au niveau des "endomérials cups" du placenta chez la jument gravide (PAPKOFF, 1981). Les "endomérials cups" sont des formations particulières de cellules trophoblastiques envahissant l'endomètre maternel et se présentant sous forme de surélévations circulaires autour du sac vitellin (DERIVAUX et ECTORS, 1986).

La PMSG est présente dans le sang de l'animal entre le 40^e et le 150^e jour de la gestation à des concentrations allant de 100 à 150 UI par ml de sérum (GOSLING et al., 1979). Son rôle est d'induire de multiples ovulations et corps jaunes qui contribuent au maintien de la gestation.

D.2. Structure.

La PMSG est une glycoprotéine constituée de deux sous-unités et elle a un poids moléculaire de 64.000 δ (DERIVAUX et ECTORS, 1986). Pour GOSPODAROWICZ (1972), le poids moléculaire serait d'environ 53000 δ . Ce même auteur a montré qu'une alkylation et une réduction de la PMSG changeait de façon drastique le profil électrophorétique: il obtient ainsi un poids moléculaire de 23000 δ .; ce qui correspond à ce qu'on peut attendre d'un oligomère composé de deux protomères. De plus, l'analyse des groupes terminaux de la protéine par la technique de Dansyl révèle qu'il existe 2 acides aminés différents, la phénylalanine et la sérine à l'extrémité N-terminale. Chaque sous-unité α et β , liée de façon non-covalente, possède une ou plusieurs parties d'hydrates de carbone (GOSPODAROWICZ, 1972; PAPKOFF, 1981; COMBARNOUS, 1987).

La PMSG a une structure semblable à la LH et à la FSH; les sous-unités de la PMSG pouvant même se combiner aux sous-unités de la LH et de la FSH de manière à donner des molécules hybrides douées d'une certaine activité. Ces trois hormones pourraient même provenir d'une gonadotropine ancestrale (GOSLING et al., 1979).

TABLEAU 3: Composition en acides aminés de la PMSG (PAPKOFF, 1981).

Amino acid composition* of equine
chorionic gonadotropin produced in vivo
and in vitro and isolated from endometrial cup tissue

	eCG (serum, PMSG)	eCG** (tissue)	eCG (culture medium)
Lysine	5.4	5.9 - 6.8	5.5
Histodine	2.5	1.7 - 2.4	2.8
Arginine	6.1	3.7 - 5.7	4.3
Aspartic Acid	5.5	7.2 - 7.6	9.3
Threonine	8.6	6.8 - 8.7	6.1
Serine	8.0	7.4 - 11.5	6.8
Glutamic Acid	8.4	8.7 - 9.2	9.4
Proline	12.5	6.8 - 10.3	7.2
Glycine	5.1	5.4 - 7.0	6.6
Alanine	7.5	6.9 - 7.2	7.0
½ Cystine	7.5	4.3 - 5.6	7.0
Valine	4.6	5.9 - 8.2	7.2
Methionine	1.7	1.0 - 1.6	1.6
Isoleucine	4.8	3.6 - 4.8	3.4
Leucine	6.3	5.5 - 8.2	7.5
Tryosine	2.4	2.2 - 3.4	4.2
Phenylalanine	4.0	3.0 - 3.7	4.2
Amino terminal residues	Phe Ser	Phe others	Phe Leu

*Results are calculated as residues per 100 amino acid residues

**Range of values for four preparations. Taken from (18).

a. Structure polypeptidique.

La chaîne polypeptidique α de la glycoprotéine est produite par un seul gène (BOUTHBY et al., 1981; cités par COMBARNOUS, 1987). La sous-unité β contient 118 à 121 acides-aminés chez les hormones pituitaires mais la sous-unité β de la PMSG ainsi que de la LH équine ont une portion polypeptidique supplémentaire au C-terminal; Ces deux sous-unités β possèdent chacune 145 acides-aminés (COMBARNOUS, 1987).

Des études sur la structure des gonadotropines montrent qu'elles ont un contenu faible en hélices α et qu'elles se trouvent principalement sous forme de feuillets β (COMBARNOUS, 1987).

Chaque sous-unité α et β contient 5 à 6 ponts di-sulfures dont la position semble identique pour toutes les gonadotropines.

Dans la sous-unité α , les ponts S-S seraient fort proches les uns des autres tandis que dans la sous-unité β , ils seraient distribués tout au long de la séquence en acides-aminés (COMBARNOUS, 1987). Notons aussi qu'autour d'un noyau central, le polypeptide sans cystéine forme trois boucles.

Cette ordonation spatiale est liée aux liaisons non-covalentes des sous-unités. Celles qui sont libres, sont totalement dépourvues d'activité gonadotrope et leur association est nécessaire à l'expression de l'activité spécifique.

La composition en acides-aminés de la PMSG est typique des hormones glycoprotéiques en ce sens que la molécule contient beaucoup de cystéine et de proline (GOPODAROWICZ, 1979) et de faibles quantités d'histidine, de méthionine et de thyrosine (Tabl. 3).

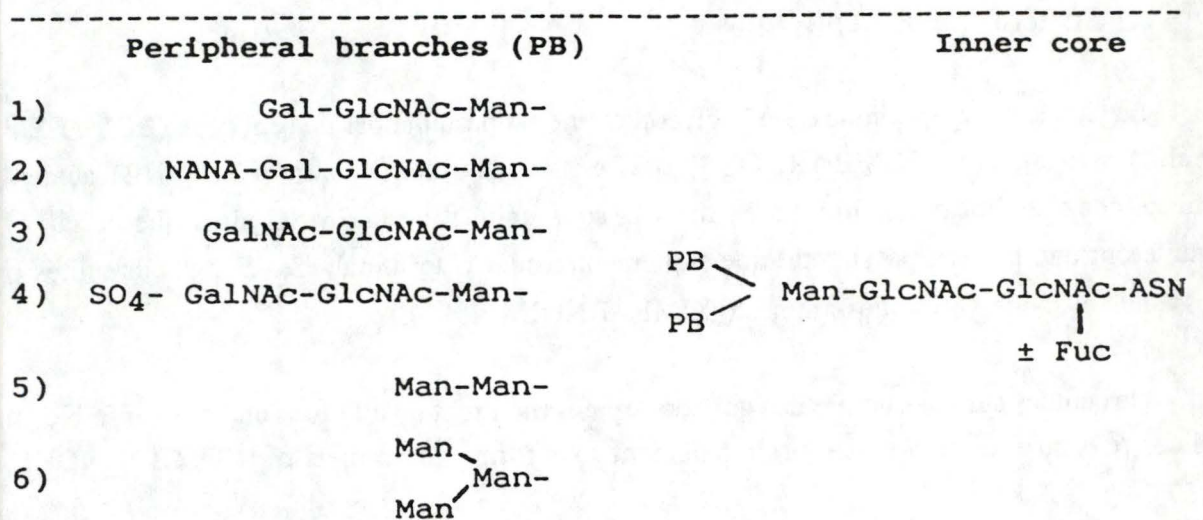
b. Structure hydrocarbonée.

La majorité des hydrates de carbone de la PMSG est associée à la sous-unité β : 55,3 % à la sous-unité β pour 18,6 % à la sous-unité α .

Les sucres représentent 41 à 45 % de la glycoprotéine; ce qui est nettement plus que pour la LH ou la FSH.

La PMSG contient des sucres neutres (manose, galactose et fucose; Fig.16), des hexosamines (glucosamine et galactosamine) mais elle est surtout caractérisée par une haute teneur en acide sialique (10 à 13,5 % de l'hormone: GOSPODAROWICZ, 1972; DERIVAUX et ECTORS, 1986).

Cette teneur en acide sialique est responsable de la nature acide de la PMSG et de sa longue demi-vie.



NANA: N-acetyl neuraminic acid (sialic acid); Gal: galactose; GlcNAC: N-acetyl glucosamine; GalNAC: N-acetyl galactosamine; Man: mannose; Fuc: fucose.

FIGURE 16: Structures d'oligosaccharides N-liés de la PMSG (COMBARNOUS, 1987).

TABLEAU 4: Résumé de l'activité LH et FSH des sous-unités de la PMSG et des sous-unités recombinantes (PAPKOFF, 1981).

Preparation	LH Potency (%)	FSH Potency (%)
PMSG	100	100
PMSG- α	3.6	2.5
PMSG- β	6.2	5.0
PMSG- α + PMSG- β	27.4	33.6
PMSG- α + oLH- β	20.6	--
PMSG- α + oFSH- β	--	16.0
PMSG- α + hCG- β	33.2	--

D.3. Propriétés.

a. Activité biologique.

La PMSG ne possède une activité que sous sa forme oligomérique et l'importance de cette activité est liée à la composition en hydrates de carbone.

En effet, le retrait de l'acide sialique de la PMSG diminuerait de façon importante, l'activité *in vivo* en affectant la liaison hormone-récepteur (COMBARNOUS, 1987).

La PMSG possède à la fois une activité LH et FSH (DERIVAUX et ECTORS, 1986). Le fait que cette hormone possède une double activité, n'est pas un phénomène unique (PAPKOFF, 1981): l'hormone de croissance possède aussi une activité lactogène et la corticotrophine possède une activité mélanotrope.

La PMSG est principalement une hormone lutéinisante (GOSLING et al., 1979). Cet auteur cite COMBARNOUS et al. (1978) qui ont montré que la PMSG a la même affinité que la LH pour les récepteurs à la LH mais 4 fois moins d'affinité que la FSH pour les récepteurs à la FSH.

Il semble difficile d'établir les causes de l'activité lutéinisante prédominante de la PMSG. Néanmoins, lorsqu'on observe la composition en acides aminés de la PMSG par rapport à celle de la LH et de la FSH, on remarque une similitude très importante du contenu en thréonine, lysine, acide aspartique, proline et tyrosine entre la LH et la PMSG.

Si on compare la composition des sous-unités de la PMSG par rapport à leurs équivalents chez la LH et la FSH (Tabl. 4), on note que:

- les trois sous-unités α ont une composition similaire
- la composition de la sous-unité β est plus proche de celle de la LH β que de la FSH β bien qu'il n'y ait pas d'identité absolue.

Enfin, les acides aminés terminaux de la PMSG sont identiques à ceux de la LH équine. Il n'y a pas de données sur les acides aminés terminaux de la FSH.

b. Demi-vie et catabolisme.

Tous les auteurs sont d'accord sur le fait que c'est la haute teneur en acide sialique qui est la raison de la longue demi-vie (5 à 6 jours) de la PMSG dans la circulation (GOSPODAROWICZ, 1972; GOSLING et al., 1979; PAPKOFF, 1981).

La dégradation des gonadotropines a lieu principalement dans le foie et les reins (COMBARNOUS, 1987). Dans le foie, des lectines membranaires des hépatocytes peuvent se

lier à des glycoprotéines par leur résidu galactose terminal et ainsi amener une internalisation et une dégradation par la cellule.

COMBARNOUS (1987) pense que l'acide sialique protège ces résidus galactose, empêchant ainsi la capture des glycoprotéines par les lectines hépatiques.

Selon DERIVAUX et ECTORS (1986), la PMSG n'est pas excrétée dans les urines mais LEFORT et al. (1986; cités par COMBARNOUS, 1987) ont réussi à suivre par immunoassay sur de l'urine, l'évolution de la PMSG intra-corporelle. Ces derniers auteurs pensent que l'excrétion urinaire de la PMSG a lieu rapidement et sans qu'elle soit fort dégradée.

c. Reconnaissance spécifique des récepteurs.

Bien que tout le monde admette que les complexes hormone-récepteur soient des structures oligomériques, encore peu de choses sont connues sur leurs structures et des hypothèses divergentes existent à ce propos. Quoiqu'il en soit, il a été montré que des gonadotropines presque complètement déglycosylées sont toujours capables de se lier spécifiquement à leurs récepteurs; indiquant que leur partie polypeptidique est entièrement responsable de la reconnaissance au récepteur (COMBARNOUS, 1987).

Deux modèles ont été proposés afin d'expliquer la liaison et la double activité LH et FSH de la PMSG:

Dans le premier, la spécificité de l'hormone est déterminée par la charge électrique d'une boucle faite par un pont di-sulfures. Cette charge pourrait changer suite à une déamination d'un acide aminé et entraîner le passage d'une activité à l'autre.

Dans le second proposé par COMBARNOUS (1987), toutes les glycoprotéines ont un site de haute affinité commun mais aussi des sites d'inhibition spécifiques différents qui empêchent l'association d'une hormone à un récepteur d'une autre hormone. Dans le cas de la PMSG, le site inhibiteur ne serait pas en position correcte pour le récepteur à la LH ou le récepteur à la FSH.

d. Activation transmembranaire.

La transmission intracellulaire du message se fait, comme pour la LH, par la voie de l'AMP_c (GOSLING et al., 1979).

Bien que les effets des messagers intracellulaires soient indépendants de l'hormone qui a amené leur production, la cinétique et le taux de ces messagers varient suivant l'hormone stimulante (COMBARNOUS, 1987).

A l'heure actuelle, peu de choses sont établies quant au mécanisme d'activation de l'adénylate cyclase par la PMSG. Néanmoins, COMBARNOUS (1987) pense que c'est un noyau interne de la chaîne hydrocarbonée qui est impliquée dans la stimulation.

e. Immunogénicité.

DRIANCOURT (1987) observe une diminution du taux d'ovulation pour des stimulations répétées à la PMSG.

D'après DEBECKER (1984), la PMSG n'est pas immunogène mais selon MAULEON (1975; cité par HEINS et al., 1986), des traitements rapprochés, tous les 17 jours, provoquent la formation d'anticorps à la PMSG. Par contre, SCHAM et al. (1973; cités par DRIANCOURT, 1987) n'ont jamais pu mettre en évidence la présence d'anticorps à la PMSG chez des brebis dont la population folliculaire a été réduite par des traitements répétés à la PMSG.

D.4. Traitement à la PMSG.

L'injection de PMSG à la fin d'un traitement progestatif, stimule la croissance folliculaire, avance le début des chaleurs et augmente le taux d'ovulation (COGNIE, 1988) mais ne semble pas augmenter significativement la fertilité du troupeau si elle est réalisée en saison de reproduction (HEINS et al., 1986).

a. Effets sur la réponse ovarienne.

La réponse ovarienne à la PMSG est caractérisée selon WHYMAN et MOORE (1980) par une augmentation du poids des ovaires, des ovulations multiples et l'apparition de follicules kystiques (qui perdurent à la surface de l'ovaire sans ovuler).

DRIANCOURT (1987) observe que la PMSG permet un recrutement de follicules plus petits (0,8 à 2 mm) que lors de la lutéolyse d'un cycle naturel (qui sont alors supérieurs à 2 mm; TSONIS et al., 1984). De plus, SAUMANDE et al. (1978; cités par DRIANCOURT, 1987) ont remarqué que le taux d'ovulation après une injection de PMSG est plus élevé si l'ovaire possède beaucoup de petits follicules.

MOORE et al. (1981; cités par NOEL, 1989) ont observé que la PMSG sauve les follicules en début d'atrésie et empêche les follicules antraux de dégénérer. Mais lorsque

DRIANCOURT (1987) diminue la population folliculaire antrale par ovariectomie unilatérale, le taux d'ovulation entraîné par la stimulation de PMSG ne varie pratiquement pas.

La longue demi-vie de la PMSG pourrait provoquer une perte de réceptivité et une désensibilisation des cellules ovariennes aux hormones gonadotropes et principalement à la LH (HEINS et al., 1986). Cela entraînerait un manque de lutéinisation des cellules et de l'environnement hormonal ne serait plus favorable à la survie et au développement des embryons.

COGNIE et al. (1970) ont montré que la PMSG avance, de plus de 15 heures, le moment de l'ovulation par rapport au début de l'oestrus mais d'autres auteurs ne sont pas en accord avec cette affirmation, ou du moins, pensent que l'avancement de l'ovulation n'est pas aussi important (WHYMAN et MOORE, 1980).

b. Modulations des effets.

Les effets de la PMSG sont variables selon un grand nombre de facteurs dont la saison, le génotype, la dose injectée et l'individu.

Saison

Nous avons vu que le taux d'ovulation moyen varie au cours de la saison; il est maximum avant les jours les plus courts de l'année puis diminue lorsqu'on approche la fin de la période de reproduction (MONGOMERY et al., 1988).

La saison influence aussi le contrôle artificiel de l'ovulation (COGNIE, 1988). Il semble en effet que les résultats obtenus chez la brebis TEXEL soient les meilleurs en saison de reproduction (octobre-novembre), diminuent en anoestrus léger (février-mars et août-septembre) et soient faibles en anoestrus profond (avril-juillet), (MUURLING et al., 1969; cités par NOEL, 1989).

L'intervalle entre l'injection de PMSG et l'ovulation est plus court en période de reproduction qu'en anoestrus (COGNIE, 1970). L'oestrus est avancé de 6,4 heures, quelle que soit la dose de PMSG, en automne par rapport au printemps chez les brebis BORDER, LEICESTER-MERINOS (EVANS et ROBINSON, 1980).

NOEL (1989) a observé chez des brebis SUFFOLK, un avancement des ovulations en octobre (pleine saison de reproduction) par rapport aux mois de juillet, janvier et avril (respectivement: 4,6h ; 1,7h ; 1,6h).

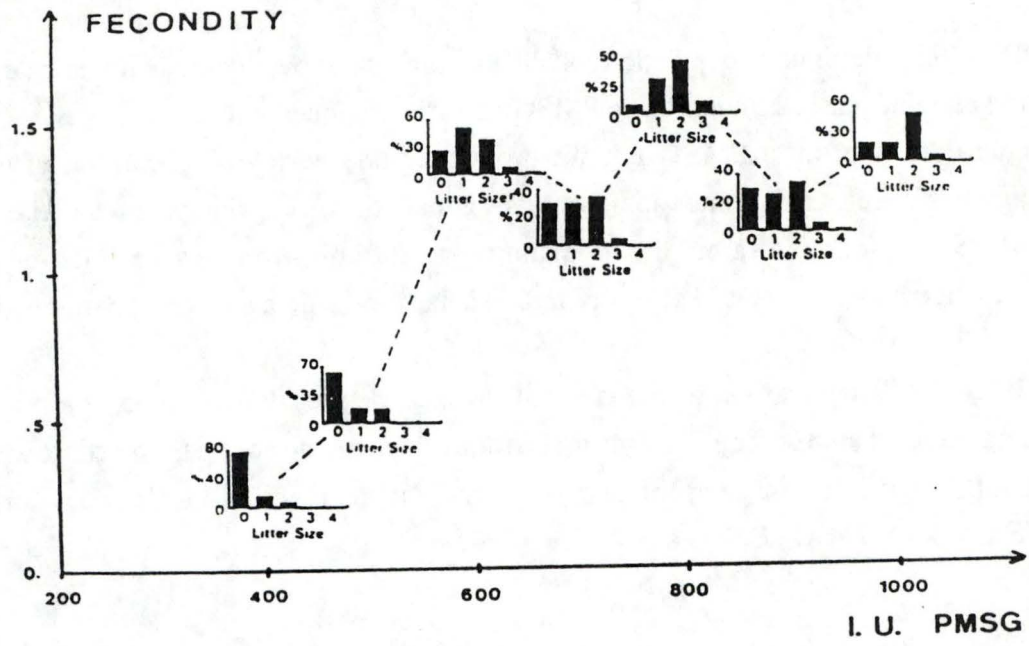


FIGURE 17: Fécondité des brebis après injections de différentes doses de PMSG en période d'oestrus. Les histogrammes montrent la fréquence des naissances multiples (BISTER et al.,1986).

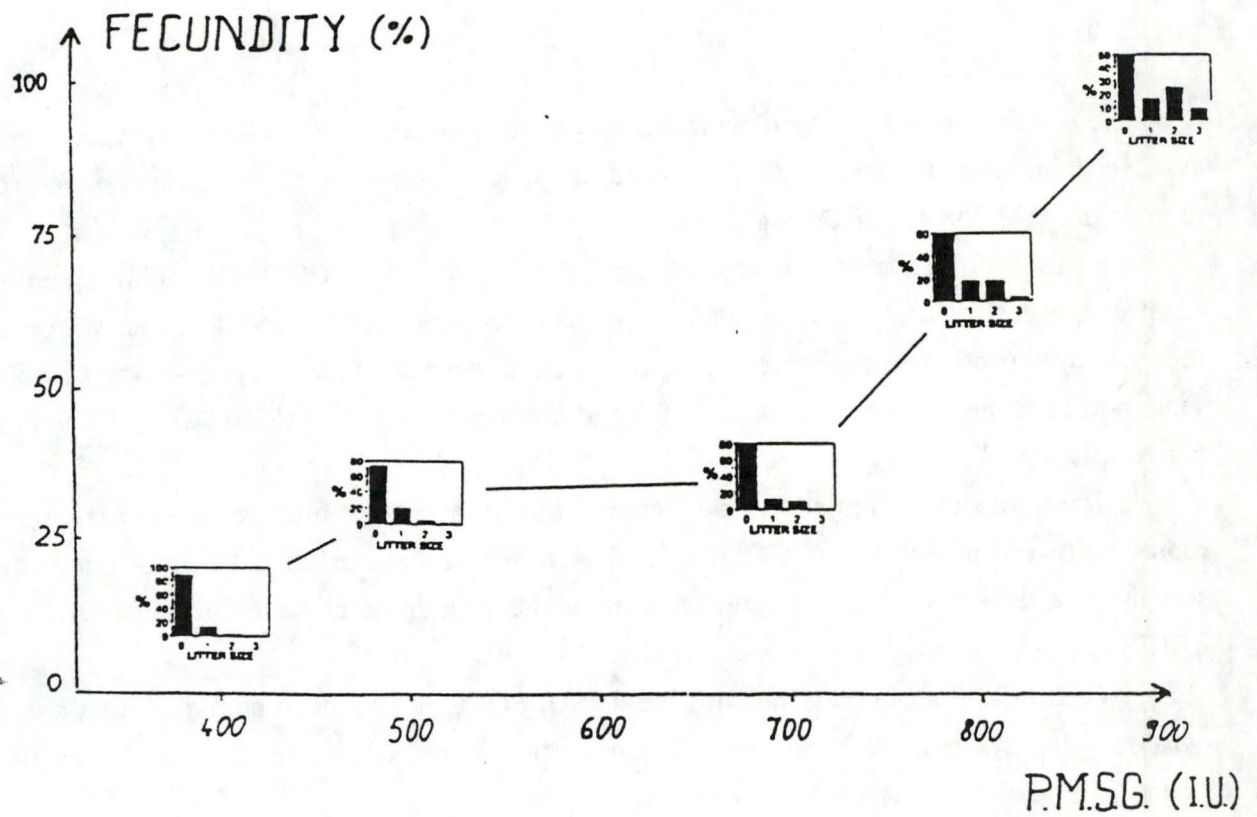


FIGURE 18: Fécondité des brebis après injections de différentes doses de PMSG en période d'anoestrus. Les histogrammes montrent la fréquence des naissances multiples (BISTER et al.,1986).

Génotype

Le facteur "race" de la brebis est très important dans le choix de la dose de PMSG à injecter, d'abord, parce que l'aptitude au désaisonnement est spécifique de chaque race, ensuite parce que chez des races naturellement prolifiques, l'administration de faibles doses de PMSG a déjà un effet superovulatoire (HEINS et al., 1986).

Chez trois races prolifiques étudiées (FINNISH LANDRACE, D'MAN et BOOROOOLA F⁺ -ROMNEY), la réponse ovulatoire à des injections de PMSG est semblable bien que les génotypes soient fort différents. Par contre, chez les races non-prolifiques (TIMHADITE, GALWAY et ROMNEY), la réponse à la PMSG est plus disparate (QUIRKE et al., 1987).

BINDON et al. (1975; cités par HEINS et al., 1986) ont observé que la PMSG est trois fois plus efficace pour élever le taux d'ovulation d'une partie d'un troupeau de MERINOS sélectionnée pendant plusieurs générations par rapport à une autre partie non-sélectionnée en ce sens.

Dose utilisée

La dose de PMSG est choisie en tenant compte des paramètres évoqués ci-dessus.

Il y a généralement un consensus pour affirmer que la prolificité est augmentée par la PMSG et beaucoup d'expériences montrent une corrélation entre la dose de PMSG et la prolificité (EVANS et ROBINSON, 1980; QUIRKE et al., 1987; BISTER et al., 1986) (Fig.17 et Fig.18). Mais au-delà d'une certaine dose, le taux de mortalité embryonnaire s'élève considérablement (HEINS et al., 1986). Cette observation est liée à la capacité limitée de l'utérus à accueillir des oeufs fécondés (QUIRKE et al., 1987).

De plus, chez la brebis ou la vache, la PMSG pourrait induire une méiose prématurée chez certains follicules en entraînant des oocytes de piètre qualité (CALLESEN et al., 1986) et réduirait la proportion d'oeufs fertilisés (WHYMAN et MOORE, 1980). Cette qualité médiocre pourrait être aussi due à une perturbation de la stéroïdogénèse par une trop forte stimulation par la PMSG.

Afin de réduire les effets néfastes de fortes doses de PMSG et de diminuer sa demi-vie dans la circulation, on peut pratiquer des injections d'anticorps anti-PMSG après le pic de LH. Ce traitement réduit en deux heures, les concentrations plasmatiques de PMSG à des seuils non détectables par RIA (DIELEMAN et al., 1987).

Bien que certains auteurs (COGNIE et al., 1970) observent un raccourcissement de l'intervalle injection de PMSG-heure d'ovulation avec une augmentation de la dose de PMSG, NOEL (1989), sur la brebis SUFFOLK, n'a pas observé de différence significative dans le moment d'ovulation pour des doses de 500 et 800 UI.

c. Variabilité des effets.

Les effets des traitements hormonaux à la PMSG peuvent être très variables d'une année à l'autre ou d'un individu à l'autre même si des doses identiques de PMSG sont employées (EVANS et ROBINSON, 1980; BISTER et al., 1986; HEINS et al., 1986).

CALLESEN et al. (1986) montrent qu'il existe chez la femme, la vache et la brebis, une variabilité individuelle très importante dans la stéroïdogénèse avant, durant et après le pic préovulatoire. Cette variabilité serait liée à l'hétérogénéité du pool de follicules recrutés au moment de la stimulation par l'hormone gonadotrope et ensuite à la capacité de ces follicules à se développer. La sensibilité des animaux au stress pourrait aussi expliquer des résultats fort variables d'un individu à l'autre. C'est de cette façon que COGNIE et al. (1970) expliquent que seulement une partie de leur troupeau a des ovulations précoces suite à l'injection de PMSG.

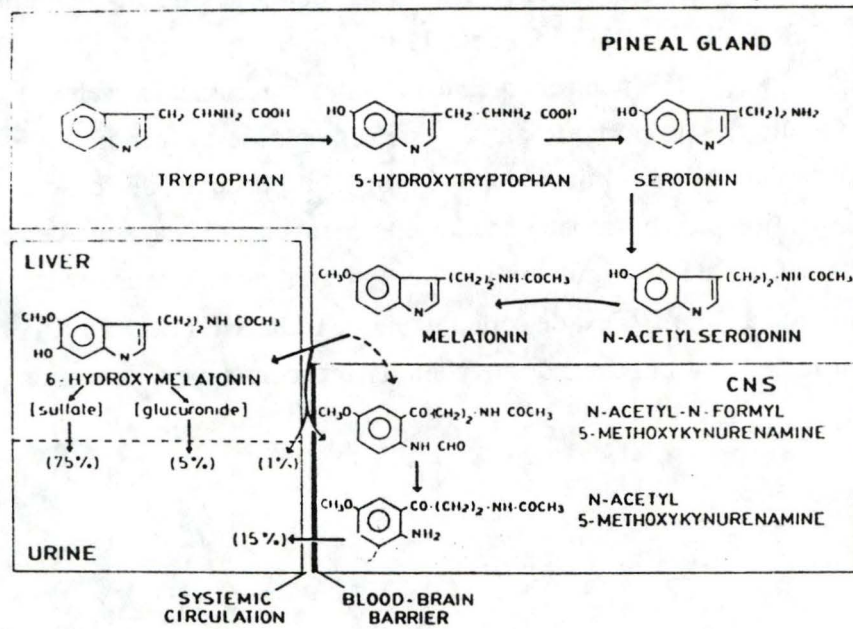


FIGURE 19: Biosynthèse et catabolisme de la MEL (CARDINALI, 1981).

E. La Mélatonine.

L'épiphyse ou organe pinéal, est probablement issu d'un bourgeonnement du toit diencéphalique du cerveau. Cet organe associé chez certains vertébrés inférieurs, à une formation surnuméraire appelée organe parapinéal demeure photosensible; directement chez les non-mammaliens et indirectement chez les mammifères.

D'un point de vue évolutif, il semble que les cellules pinéales (pinéaloctes) soient issues de photorécepteurs semblables structurellement et biochimiquement à ceux de la rétine. En effet, chez les non-mammaliens, on y retrouve des disques similaires à ceux des bâtonnets et des cônes de la rétine mais en nombre variable suivant l'espèce. De plus, on a pu montrer dans les pinéaloctes, la présence de molécules apparentées à celles impliquées dans la phototransduction de la rétine (opsine, vitamine A ; COLLIN et al., 1988).

Les pinéaloctes élaborent deux types de molécule "message"; des peptides et des indoles dont la mélatonine qui a été considérée dès sa découverte en 1958 par LERNER et ses collaborateurs comme le principal indole pinéal.

E.1. Sécrétion.

a. Biosynthèse. (Fig.19)

La mélatonine est synthétisée à partir d'un précurseur, le tryptophane prélevé du flux sanguin par les pinéaloctes (CARDINALI, 1981).

Le tryptophane est transformé en 5 hydroxytryptophane (5HT) par la tryptophane hydroxylase appelée aussi Tryptophane-5-monooxygénase .

La 5 hydroxy-tryptophane décarboxylase transforme le 5HT en sérotonine qui est elle-même convertie en N-acétylsérotonine par la sérotonine-N-acetyltransférase (NAT).

La N-acétylsérotonine est O-méthylé par une enzyme clé, l'hydroxyindole-O-méthyl transférase (HIOMT) de façon à former la N-acéty-5-méthoxytryptamine, plus connue sous le nom de mélatonine (MEL).

b. Transport et métabolisme.

La MEL est libérée dans le sang mais aussi dans le liquide céphalo-rachidien (CARDINALI, 1981).

Il semble que le transfert s'effectue par simple diffusion (CARDINALI, 1981), la diffusion selon un gradient de concentration étant facilitée par sa lipophilie. PANG et YIP (1988) observent que le taux de MEL fluctue continuellement dans les vaisseaux irrigant la pinéale du rat mais un tel mode épisodique est mis en doute par la plupart des autres chercheurs.

Une éventuelle sécrétion pulsatile de la MEL pourrait être expliquée par la liaison de l'hormone à une ou plusieurs protéine(s) dès l'intérieur des pinéaloctes.

Dans le sang, 60 à 70 pourcents de la MEL sont liés à de l'albumine, tandis que cette fraction liée est nulle dans le liquide céphalo-rachidien. (CARDINALI, 1981).

Le métabolisme de la MEL est très rapide; après un simple passage dans le foie, 92 à 97 pourcents de la MEL sont transformés en 6-hydroxymélatonine ou dégradée par sulfato et glucuronocouplages avant d'être excrétés dans les urines (CARDINALI, 1981).

E.2. Contrôle de la sécrétion.

a. Relations avec la photopériode.

Pour que la photopériode influence l'activité reproductrice, il faut que la lumière soit perçue par l'animal, qu'une évaluation du jour puisse être réalisée et que l'information venant du système de mesure de la photopériode soit transmise à l'axe hypothalamo-hypophysaire.

La MEL peut jouer ce rôle de transmission de l'information photopériodique vers les régulations endocrines de l'organisme. Cette hormone est en effet sécrétée selon un rythme lié à la photopériode, la sécrétion ayant lieu en phase d'obscurité.

Lors de la transition lumière-obscurité la sécrétion de MEL par la glande pinéale se modifie rapidement (15 minutes; NETT et NISWENDER, 1982). Cette transition fort courte prêche en faveur d'une activation ou d'une inhibition de la synthèse de MEL via un mécanisme indépendant de la synthèse protéique (RAVAULT, 1986).

Pour plusieurs auteurs, le rythme de production de MEL est généré de façon endogène mais est entraîné par un cycle lumière-obscurité (NETT et NISWENDER, 1982; PEVET, 1988). La lumière semble bien inhiber la production de MEL mais ROLLAG et NISWENDER (1976) rapportent que pour une durée suffisamment longue, le déclin de la sécrétion de MEL a lieu avant l'apparition de la lumière. De plus, ces auteurs ont montré que si des brebis sont maintenues dans une obscurité totale, un rythme circadien de sécrétion persiste. En maintenant

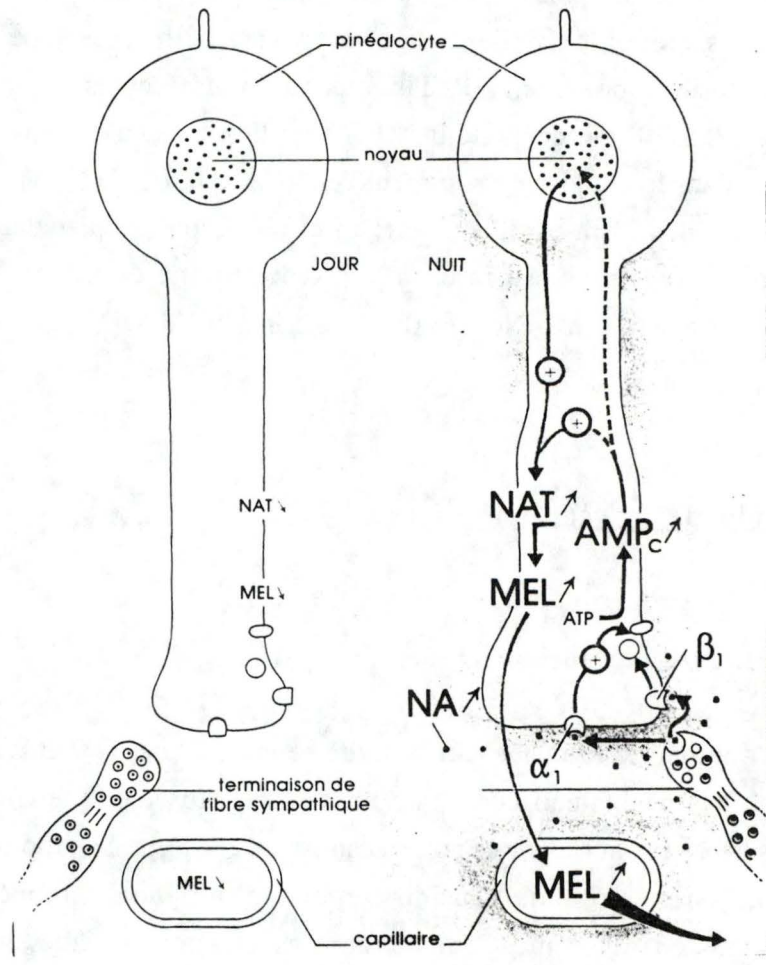
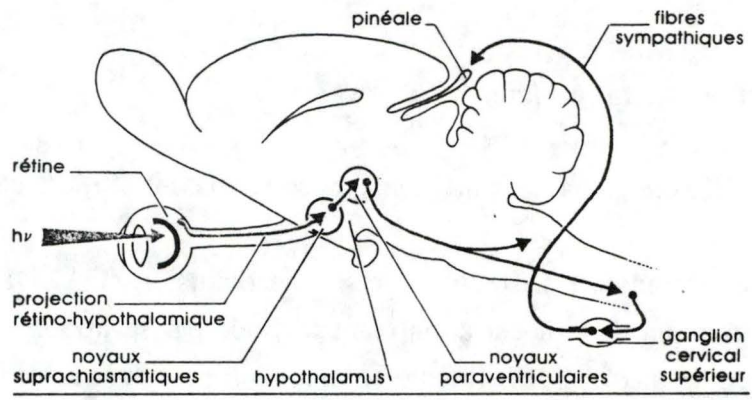


FIGURE 20: Mécanisme de transmission de l'information photopériodique jusqu'à la sécrétion de mélatonine (COLLIN et al., 1988).

l'animal dans ces conditions, des décalages de la sécrétion de MEL par rapport à l'alternance naturelle jour-nuit se manifestent (COLLIN et al., 1988).

Le rythme de sécrétion de la MEL est donc bien imposé par une horloge biologique interne et cette horloge est "remise à l'heure" par les conditions environnementales.

Chez le brochet et le poulet, la synthèse de MEL semble contrôlée par une inhibition en phase claire tandis que chez le rat, c'est une activation des pinéaloctes par la Nor-adrénaline des fibres sympathiques qui stimulent la production nocturne de MEL (COLLIN et al., 1988). Chez le bélier ILE-de-FRANCE (ARENDT et RAVAUULT, 1988), une intensité lumineuse de 1.02 Lux est déjà capable de réduire de près de moitié la sécrétion de MEL (un éclairage artificiel normal étant d'environ 300 Lux).

Voies impliquées (Fig.20)

Bien qu'il ait été montré que la majorité des reptiles et des oiseaux ont gardé une certaine sensibilité à la lumière par de nombreux photorécepteurs pinéaux (COLLIN et al., 1988), l'information liée à la lumière est transmise via la rétine, chez les mammifères.

Le message suit les voies rétino-hypothalamique, arrive aux noyaux suprachiasmatiques puis à l'hypothalamus tubéral et latéral. De là, des projections descendantes se dirigent vers les colonnes intermédiolaterales de la moëlle épinière. La voie continue par des connexions pré-ganglionnaires vers les ganglions cervicaux supérieurs, les neurones ganglionnaires supérieurs (fibres sympathiques) constituant la voie finale pour le contrôle de la synthèse de la MEL par la lumière (CARDINALI, 1981).

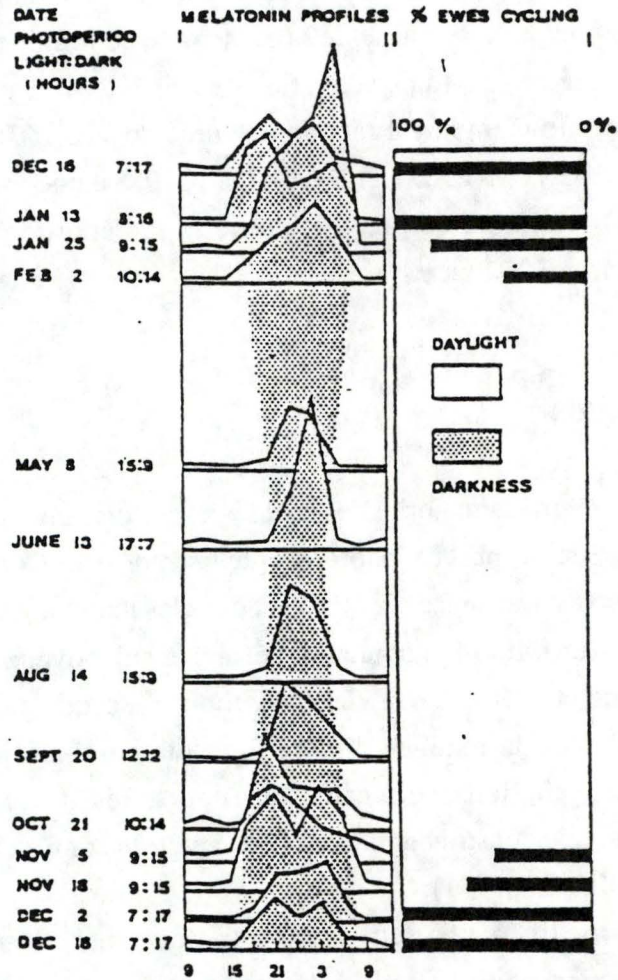
La Nor-adrénaline ainsi libérée la nuit, se lie aux récepteurs b1 et a1 et augmente la production d'AMPC. Ce dernier induit l'activité nocturne de la sérotonine-N-acétyltransférase (NAT) soit en déclenchant, via le noyau, la synthèse directe de l'enzyme ou celle d'une protéine qui la stimulerait, soit en s'opposant à son inactivation (COLLIN et al., 1988).

Cette élévation nocturne de l'activité de la NAT entraîne la synthèse nocturne de la MEL, suivie de sa libération.

Evolution circadienne

Chez les ovins, les concentrations circadiennes de MEL montrent des élévations nocturnes supérieures à 200 pg/ml et en phase d'éclaircissement, des concentrations basales de l'ordre de 0 à 30 pg/ml (ROLLAG et NISWENDER, 1976; MALPAUX et al., 1988(b)).

La nuit, en période de jours courts, la sécrétion de la MEL semble biphasique (Fig.21) ; ce fait a été montré par ARENDT (1985).



Plasma melatonin at 3 h intervals in 4-6 ewes sampled at 2 week to 2 month intervals for one year. Mean values are shown, without statistics, for clarity. Solid bars indicate number of ewes cycling. Analysis of variance indicates significant effects of time of day, time of year, number of hours after sunset and number of hours after sunrise ($p < 0.01-0.0001$).

FIGURE 21: Evolution des concentrations circadiennes de MEL au cours de l'année (ARENDDT,1985).

En lumière continue, le rythme circadien est aboli et la concentration de MEL se maintient à un taux basal (COLLIN et al., 1988) tandis qu'en obscurité continue le rythme se maintient. Il existe dès lors plusieurs oscillateurs, au moins deux, localisés dans les noyaux suprachiasmatiques qui interagissent entre eux (EARL et al., 1985). Un des oscillateurs devrait nécessairement être responsable du profil de la sécrétion de MEL en l'absence de lumière.

Evolution annuelle

ARENDDT (1985; Fig.20) a démontré, s'il le fallait encore, que la durée de sécrétion de la MEL est fonction de la longueur du jour. Mais il ressort de son étude, qu'en jours longs, l'amplitude des pics nocturnes de MEL est plus importante qu'en jours courts.

b. Relations avec l'état physiologique.

Chez les brebis, l'amplitude des taux de MEL ne semble pas différer selon l'état physiologique. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les phases lutéale et folliculaire du cycle même si l'activité de la HIOMT dans la glande pinéale est plus importante en phase folliculaire (ROLLAG et al., 1978).

c. Relations endocrines.

Les prostaglandines dont la libération dépend des décharges de Nor-adréraline influencent la sécrétion de MEL.

Mais, un aspect fort peu abordé dans les études est celui d'un éventuel contrôle de la pinéale par les stéroïdes. Ceux-ci sont en effet capable de passer de la circulation sanguine à l'intérieur des cellules cérébrales et certains auteurs (PEVET, 1988) pensent que les stéroïdes gonadaux peuvent interagir avec la pinéale dans les modifications saisonnières. De plus, CARDINALI (1981) rapporte que des expériences *in vivo* et *in vitro* ont mis en évidence un contrôle des oestrogènes et de la testostérone sur la sécrétion de MEL.

Enfin, PIRAUX (1990), a observé des taux de MEL supérieurs aux taux physiologiques chez des brebis TEXEL traitées aux glucocorticoïdes. Bien que ce se soit encore une hypothèse, ces derniers pourraient éventuellement stimuler les voies sympathiques contrôlant la sécrétion de MEL ou agir directement sur la pinéale.

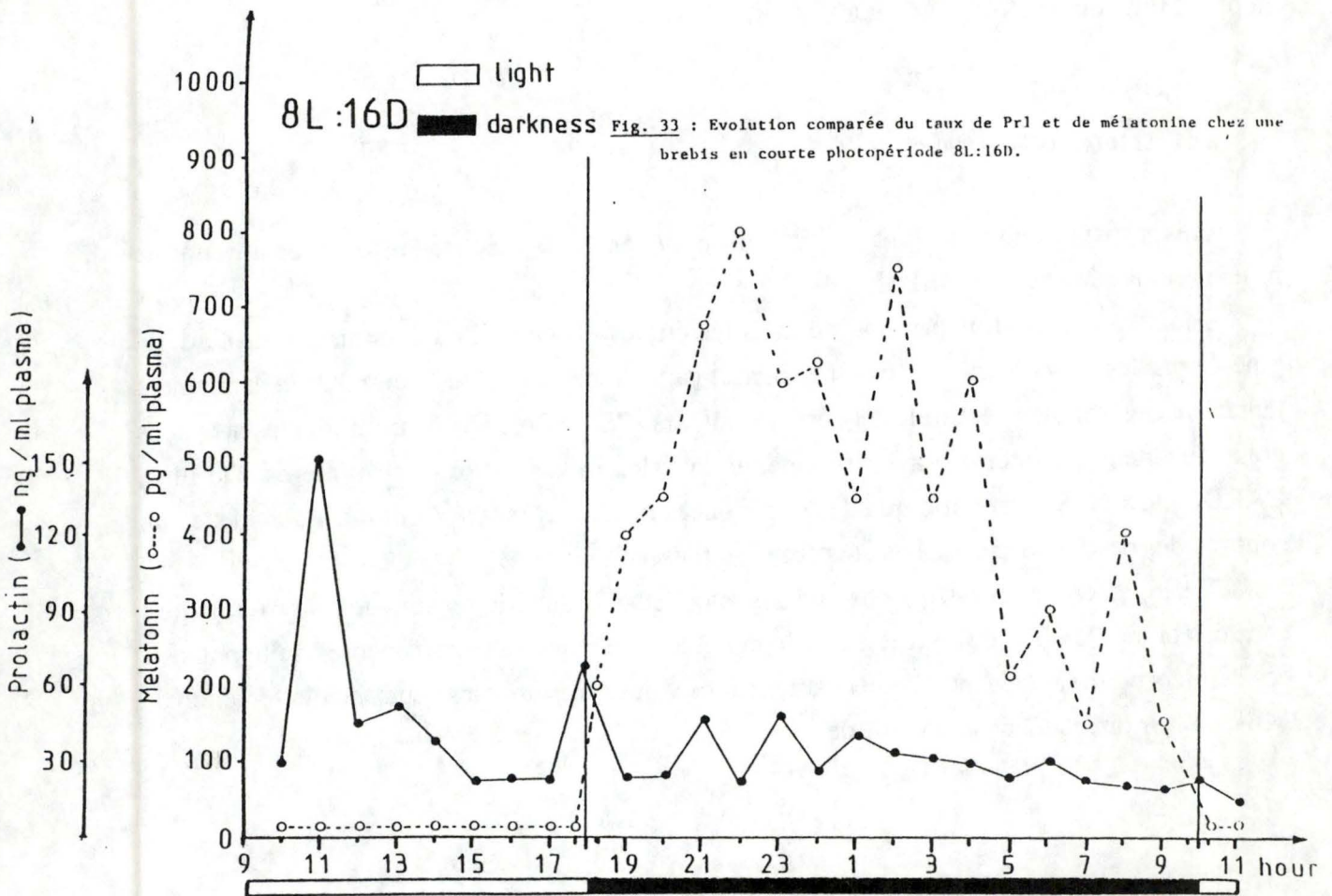
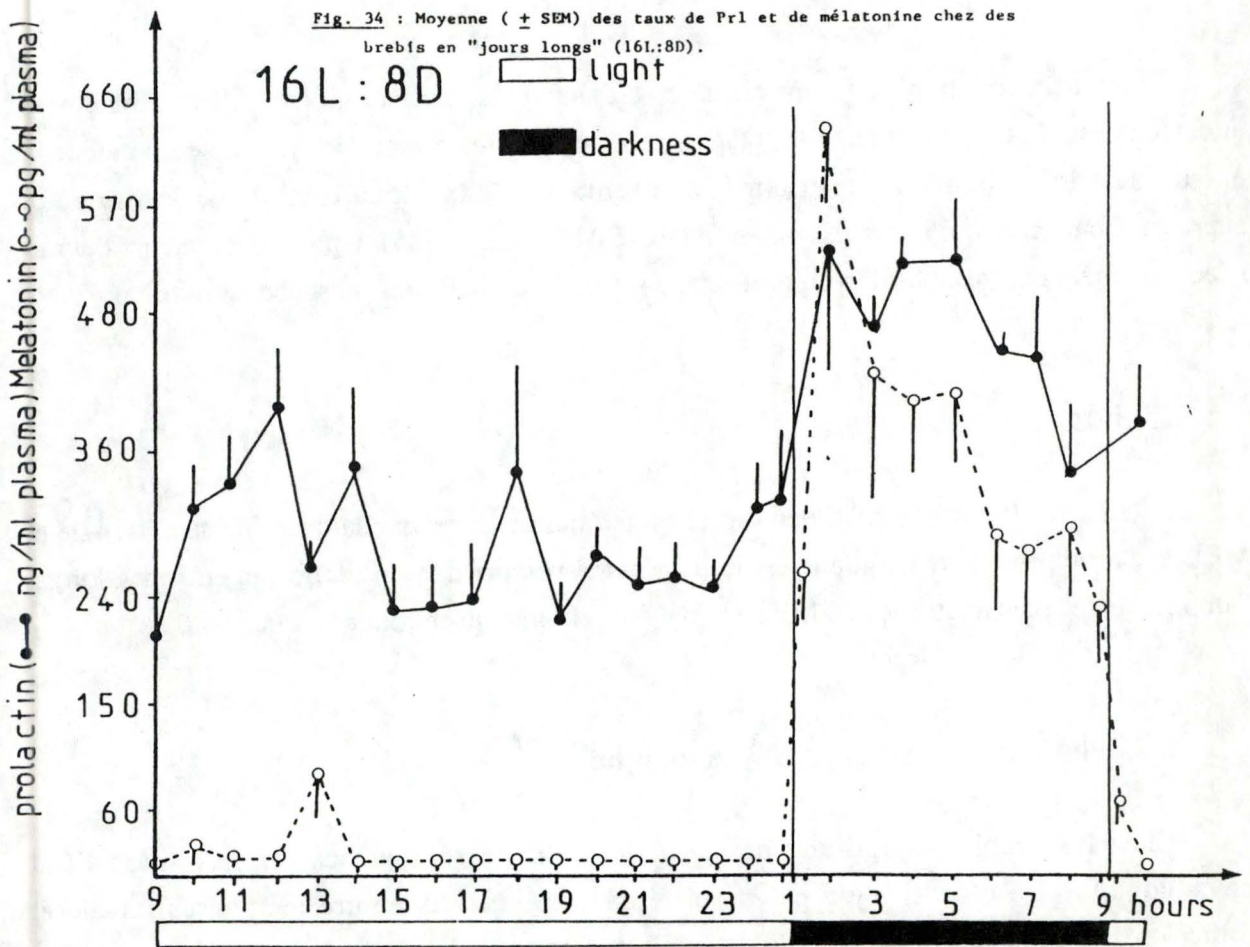


FIGURE 22: Relations entre les taux de PRL et de MEL en jours courts et en jours longs (RAVAULT, 1986).

Relations entre la MEL et la PRL

MUNRO et al. (1980) ont montré que des brebis pinéalectomisées durant la saison de reproduction ont des taux de PRL plus faibles que des brebis contrôles. Mais différents travaux ont montré une influence de la MEL sur les taux plasmatiques de la PRL chez les ovins et chez d'autres espèces (KENNAWAY et al., 1982, POULTON et al., 1986). La MEL et la PRL présentent toutes deux des profils de sécrétion liés à la photopériode (Fig.22: RAVAULT, 1986).

SYMONS et al. (1983) rapportent qu'un traitement oral à la MEL chez des brebis croisées SUFFOLK, n'est pas capable d'éliminer les augmentations de PRL au crépuscule. SYMONS suggère dès lors que le rythme circannuel de sécrétion de PRL est médié par la glande pinéale mais pas le rythme circadien.

EARL et al. (1985) observent que les brebis maintenues en jours courts ont des concentrations en PRL significativement plus faibles que les brebis en jours longs, même après une injection de TRH, hormone stimulant la production de PRL par l'hypophyse. Mais KENNAWAY et al. (1982) montrent que la MEL exogène n'influence pas les concentrations en PRL après une injection de TRH.

Une explication possible de ce paradoxe serait que la MEL agirait sur l'hypothalamus en modulant la dynamique d'action de la dopamine (KENNAWAY et al., 1982). Or la dopamine est un inhibiteur de la libération de PRL (BISTER, 1989). L'action de la MEL sur la production de PRL se situerait qu'au niveau de l'hypothalamus et non au niveau de l'hypophyse.

E.3. Actions.

a. Sites d'action.

lorsque l'on injecte de la MEL radioactive dans le fluide cérébrospinal, celle-ci se concentre dans l'hypothalamus (NETT et NISWENDER, 1982). Chez le rat, les concentrations les plus importantes de récepteurs à la MEL se situent dans l'hypothalamus, dans l'hypophyse mais aussi sur les cellules de l'ovaire, de l'utérus, des testicules, des yeux et du foie (CARDINALI, 1981; PEVET, 1988).

Des études sur l'affinité des liaisons d'analogues de la MEL à ses récepteurs aboutissent à la conclusion que les groupements 5-methoxy et N-acetyl sont nécessaires à la pleine expression des capacités de liaison (PEVET, 1988).

b. Mécanismes d'action.

Deux hypothèses concernant la nature du message orchestrant les fonctions saisonnières sont régulièrement proposées et débattues:

L'une propose que ce soient les changements dans la durée de la sécrétion qui constituent l'information (ENGLISH et al., 1986; KARSCH et al., 1988), l'autre suggère que l'action de la MEL est subordonnée à des variations circadiennes de sensibilité de l'organisme à cette hormone (RAVAULT, 1986). Selon cette dernière hypothèse, la longueur du jour est déterminée par la coïncidence de taux élevés de MEL avec un moment donné de la journée (PEVET, 1988). Cette éventuelle période sensible à l'action de la MEL n'a pas été identifiée chez la brebis (WAYNE et al., 1988). Enfin, signalons que pour KARSCH et al. (1988), ce sont les variations et leur nature qui sont les facteurs déterminant dans le signal de la MEL à l'hypothalamus.

Quoiqu'il en soit, il semble que la MEL agisse principalement sur les voies sérotoninergiques (PEVET, 1988). Elle peut stimuler de façon spécifique les cellules possédant des récepteurs à la MEL mais, elle est aussi capable de moduler d'autres réponses sur d'autres récepteurs. Par exemple, il serait possible que la MEL contrôle la libération de dopamine de la rétine du lapin et du poulet en agissant sur les récepteurs à dopamine (PEVET, 1988).

C'est ainsi qu'elle peut affecter les processus dépendant de microtubules et de microfilaments au niveau des cellules hypothalamiques; le groupement méthoxy-indole peut se lier à la tubuline et empêcher l'assemblage des dimères de tubuline. Or, les microtubules sont des organites impliqués dans le transport intracellulaire et par conséquent dans l'activité sécrétoire (PEVET, 1988).

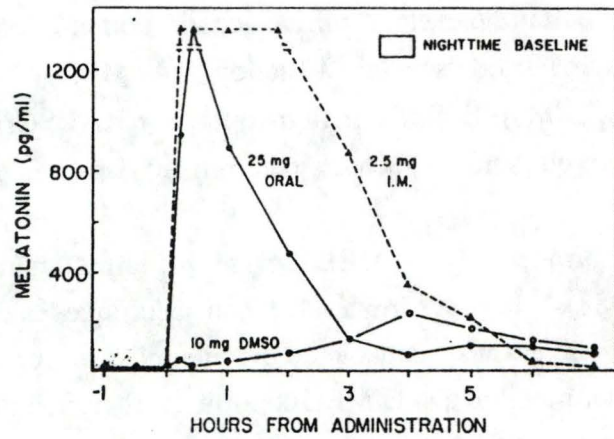
c. Actions principales.

Chez les amphibiens et certains reptiles, l'action mélanotrope de la MEL est particulièrement remarquable. Chez le lézard, chez les animaux hibernants et peut-être chez les mammifères nouveaux-nés, la pinéale intervient dans les aptitudes de thermorégulation (COLLIN et al., 1988).

La MEL semble aussi intervenir dans la modulation de l'activité cérébrale, notamment en induisant l'état de sommeil mais c'est surtout son action sur l'activité reproductrice qui fait actuellement l'objet de nombreuses recherches.

L'information photopériodique que peut fournir la MEL est d'une importance capitale pour les espèces à reproduction saisonnière comme le mouton.

Chez ces animaux, la pinéalectomie conduit, à long terme, à une désynchronisation de l'activité reproductrice par rapport aux saisons (COLLIN et al., 1988). Il semble bien que la



Serum concentrations of melatonin in ewes (n=3/treatment) using three different routes of administration. I.M.=intramuscular injection; DMSO= cutaneous administration in dimethylsulfoxide. The shaded area represents normal night time levels of melatonin in ewes.

FIGURE 23: Evolution des concentrations de mélatonine après trois types de traitements (NETT et NISWENDER, 1982).

MEL agisse sur l'axe hypothalamo-hypophysaire en entraînant le rythme reproducteur ou en agissant comme une horloge interne (NETT et NISWENDER, 1982; PEVET, 1988).

En fait, l'action de la MEL sur les hormones gonadotropes n'est pas encore bien déterminé mais il semble que chez des reproducteurs en jours longs (rat, hamster, souris...) la MEL ait un effet négatif sur l'émission de LH (PEVET, 1988) et de FSH (HARDY, 1989) par l'intermédiaire de la GnRH.

Chez le rat, il est possible que la MEL supprime les réponses pituitaires à la GnRH en agissant directement sur les cellules gonadotropes (MARTIN et al., 1982; cités par ALEXANDRE, 1989). Chez cet animal, de fortes doses de MEL exogène peuvent inhiber la libération de GnRH par l'hypothalamus. Cependant, SYMONS et ARENDT (1983) observent que chez le mouton, la réponse de la LH à la GnRH ne diffère pas significativement le jour de la nuit et que si la MEL est administrée le jour, elle n'affecte pas la réponse à la GnRH.

Le feed-back de l'E2 sur la sécrétion des gonadotropines change avec la photopériode (LEGAN et KARSCH, 1983) et chez le rat, MOGUILEVSKY et al. (1979) pensent qu'une faible dose de MEL peut faciliter le feed-back positif des stéroïdes sur la libération de LH.

E.4. TRAITEMENTS A LA MELATONINE.

a. Modes d'administration.

On peut distinguer deux grands types de mode d'administration de la MEL:

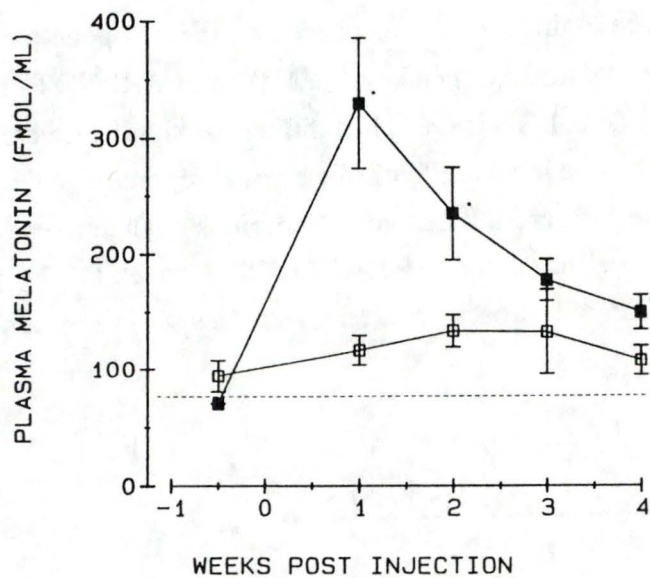
- l'administration quotidienne par voie orale ou par injection (Fig.23)
- la pose d'implants ou l'ingestion de diffuseurs intraruminaux (bolus).

Les techniques du deuxième type permettent une libération continue de MEL et sont les seules réellement applicables à grande échelle.

Administration orale

Pour être administrée oralement, la MEL cristalline est dissoute dans de l'éthanol et est diluée avec de l'eau de façon à obtenir des concentrations de l'ordre de 0,01% (poids/volume). On administre environ 30 ml de solution par brebis et par jour (RONAYNE et al., 1989).

Une autre méthode consiste à mélanger quotidiennement 2 à 3,5 mg de MEL à la nourriture de chaque brebis. Cette méthode par voie orale est efficace pour mimer une



Plasma melatonin concentrations from control (□) and melatonin-treated (■) cows from 3 d before until 4 wk after melatonin treatment (mean \pm SEM). The horizontal dashed line indicates the limit of detection of the melatonin assay. *Significantly different from control ($P < 0.05$).

FIGURE 24: Evolution des concentrations de MEL après une injection de mélatonine dans de la graisse de boeuf chez la vache (SHARPE, 1986).

photopériode courte afin d'induire une activité de reproduction précoce (KENNAWAY et al., 1982; POULTON et al., 1986; RONAYNE et al., 1989).

Injections

L'injection se pratique par voie sous-cutanée ou intramusculaire. L'injection sous-cutanée est faite à raison de 10 mg dans une solution de diméthylsulfoxyde. Elle ne provoque malheureusement qu'une augmentation transitoire de la concentration plasmatique (KENNAWAY et al., 1982; NETT et NISWENDER, 1982; ENGLISH et al., 1986).

C'est pourquoi certains auteurs (SHARPE et al., 1986) ont injecté sous la peau, de la MEL mélangée à de la graisse de boeuf afin que l'hormone diffuse lentement. Chez les bovins, cette méthode permet de maintenir, pendant une à deux semaines, des concentrations plasmatiques de MEL plus élevées, surtout pendant la journée que chez les animaux témoins (Fig.24).

L'injection intramusculaire se pratique à raison de 2,5 mg de MEL en solution huileuse chaque jour en fin d'après-midi. Ce type d'injection maintient des concentrations plasmatiques élevées de MEL plus longtemps que l'injection sous-cutanée en milieu diméthylsulfoxyde (NETT et NISWENDER, 1982).

Implants

Les implants sous-cutanés ou intravaginaux sont constitués sachets de Silastic (5 cm sur 5 cm et de 0,13 mm d'épaisseur) contenant 1g de MEL.

La libération continue de l'hormone permet de maintenir des concentrations plasmatiques supérieures aux niveaux physiologiques nocturnes pendant plusieurs mois (ENGLISH et al., 1986). Chez des brebis traitées, les niveaux de MEL plasmatique montrent que la concentration due à la diffusion par l'implant se superpose à la concentration naturellement présente (ENGLISH et al., 1986; POULTON et al., 1986).

En Australie, STAPLES et al. (1986) étudient depuis quelques années, la mise au point d'implants sous-cutanés se présentant sous forme de petites sphères de polymère imprégnées de 18 mg de MEL et commercialisés sous le nom de REGULIN* (Ltd, Melbourne, Australia). Elles présentent l'avantage de ne nécessiter qu'une opération chirurgicale minime pour la pose et le retrait (KOUIMTZIS et al., 1989).

Bolus

Le bolus est une sphère poreuse de polymères biodégradables contenant de la MEL. Il est avalé avec la nourriture et se maintient dans le rumen car son poids est suffisant pour ne pas remonter lors de la rumination.

La diffusion par le bolus maintient des concentrations plasmatiques de MEL élevée (POULTON et al., 1987) et la durée du traitement est uniquement fonction de cette vitesse de diffusion.

b. Effets des traitements.

L'objectif principal des traitements à la MEL est de simuler l'apparition de jours courts et d'avancer ainsi la saison de reproduction. En effet, la libération continue de MEL à partir d'implants (KENNAWAY et al., 1982) ou l'administration orale (RONAYNE et al., 1989) provoquent les mêmes effets que ceux observés suite à l'exposition aux jours courts.

Il semble qu'il faille un minimum de concentration et de temps d'action de la MEL afin d'engendrer une réponse (POULTON et al., 1988).

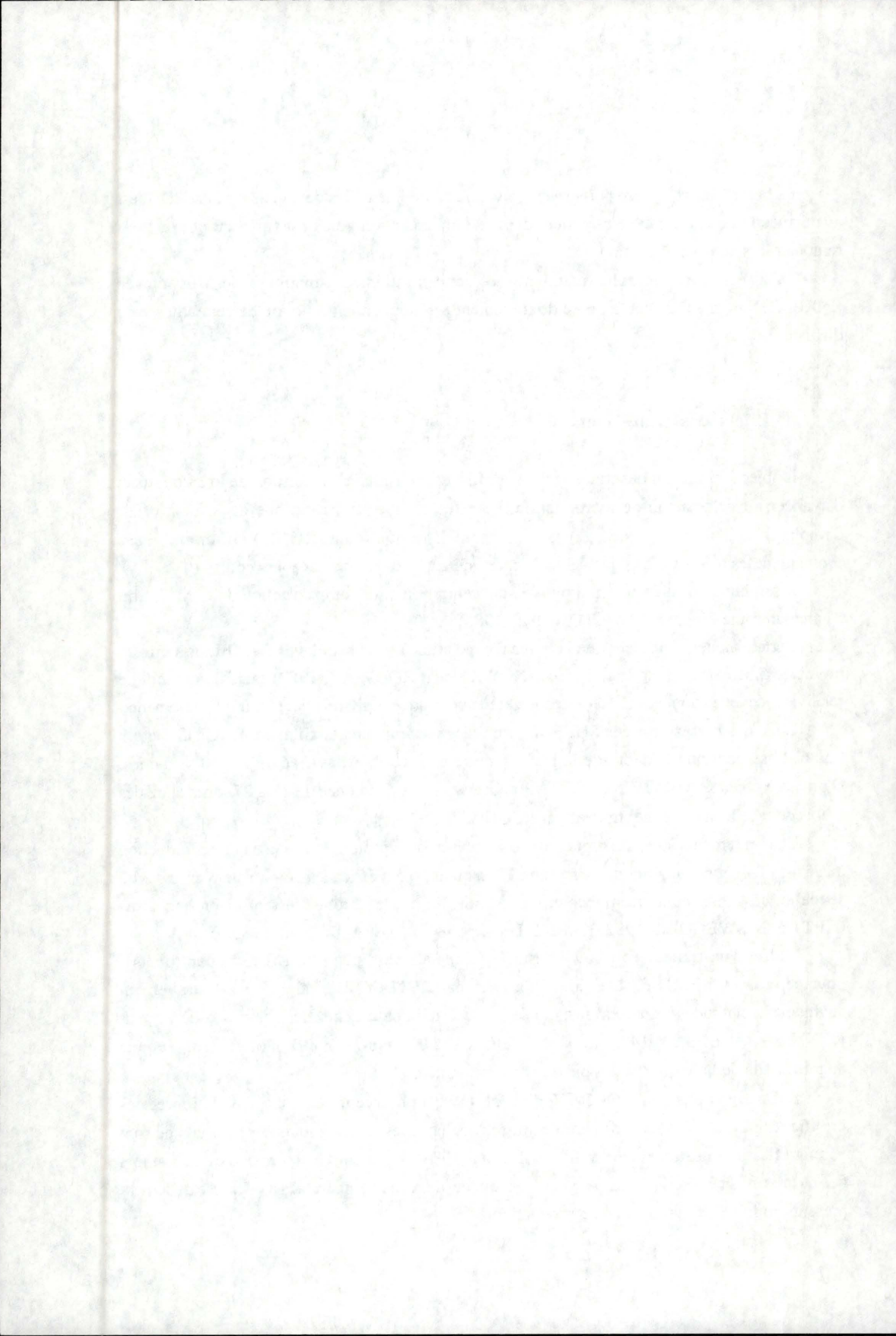
Certains auteurs pensent que la durée d'exposition à des taux élevés de MEL doit être au moins de 5 semaines pour être efficace (NOWAK and RODWAY, 1987) mais il convient de relativiser de telles données car chaque race et même chaque individu peut réagir différemment.

Chez des brebis croisées SUFFOLK, traitées par implants de Silastic, ENGLISH et al. (1986) observent que le début de la période de reproduction est avancé de 5 à 10 semaines. D'un autre côté, KOUIMTZIS et al. (1989) observent une différence de 17 à 27 jours chez des brebis de race locale (Grèce) traitées par REGULIN*.

Des traitements à la MEL sont aussi pratiqués afin de prolonger la saison de reproduction à la fin de l'hiver et au début du printemps. Bien qu'ils soient efficaces pour prolonger l'activité sexuelle, ces traitements n'empêchent, en aucune façon, les brebis de rentrer en anoestrus (NETT et NISWENDER, 1982; KARSCH et al., 1984; MALPAUX et al., 1988(a)).

L'effet d'un traitement à la MEL sur la fréquence des pulses de LH reste controversé; pour certains (CHEMINEAU et al., 1986; cités par RONAYNE et al., 1989), le traitement augmente l'amplitude des pulses ainsi que la concentration basale chez des chèvres laitières mais KENNAWAY et al. (1982) ainsi que RONAYNE et al. (1989) n'observent aucune augmentation de la fréquence des pulses après traitement.

Enfin signalons que KOUIMTZIS et al. (1989) observent des taux d'ovulation et des prolificités plus élevées chez des brebis traitées que chez les témoins mais ces résultats ne sont pas significatifs statistiquement. WIGZELL et al. (1986) suggèrent que les taux d'ovulation lors des oestrus avancés par la MEL peuvent atteindre des niveaux comparables à ceux naturellement présents au milieu de la saison de reproduction.



c. Moment du traitement.

Quelque soit le type de traitement, le moment d'administration au cours de la journée et au cours de l'année sont importants.

L'efficacité maximale est atteinte si l'administration quotidienne est réalisée en fin d'après-midi ou le soir. Si la MEL est administrée au milieu de la journée, les concentrations plasmatiques redescendent rapidement à un niveau basal et la MEL ne semble pas avoir d'effet sur la fonction de reproduction (NETT et NISWENDER, 1982).

Beaucoup d'auteurs sont d'accord pour dire que le traitement à la MEL n'est pas efficace si les brebis n'ont pas été soumises préalablement à des jours longs. Seuls des traitements effectués à partir des mois de mai ou de juin sont susceptibles de donner des résultats concluants dans nos régions (NETT et NISWENDER, 1982; ENGLISH et al., 1986).

Travail personnel

- A. Rappel des objectifs
- B. Plan expérimental
- C. Méthodes utilisées
- D. Résultats
- E. Discussion
- F. Conclusions

A. Rappel des objectifs.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié l'influence de deux hormones, la PMSG et la MELATONINE sur les mécanismes de la reproduction chez la brebis SUFFOLK.

A.1. Etude de la PMSG.

Nous avons étudié les effets d'un contrôle hormonal de l'ovulation par des progestagènes avec deux doses différentes de PMSG (500 et 800 UI) et à quatre moments différents de la saison de reproduction.

Les paramètres analysés ont été, l'incidence, le taux et le moment de l'ovulation (par endoscopies) et les phénomènes hormonaux qui l'accompagnent (par dosage de la LH, P4).

A.2. Etude de la MELATONINE.

La reproduction des brebis SUFFOLK est généralement programmée comme chaque année pour le mois de juillet de façon à obtenir des "agneaux de Pâques".

Les résultats obtenus à cette époque avec cette race sont souvent assez médiocres. C'est pourquoi nous avons testé un traitement à la mélatonine au mois de juin en vue d'avancer la saison de reproduction.

Nous avons étudié la reprise de l'activité sexuelle saisonnière, le taux d'ovulation, les teneurs plasmatiques en hormones (MEL et PRL) et pour ce faire, avons mis au point le dosage de la MEL par RIA.

Nous avons également étudié les fertilités et prolificités selon le traitement et selon deux types d'inséminations artificielles (intra-utérine et exocervicale).

TABLEAU 1: Animaux expérimentaux pour l'étude de la PMSG.

GROUPE A			GROUPE B		
BREBIS	DATE DE NAISSANCE	POIDS (KG)	BREBIS	DATE DE NAISSANCE	POIDS (KG)
25	1/1/83	66	3	17/12/85	58
79	3/2/85	70,5	4	4/2/83	62
37	26/2/83	68	9	20/12/82	71
42	25/3/84	73,5	20	28/12/82	46
48	28/3/84	67,25	21	29/12/83	79,5
51	3/4/84	57,5	33	5/2/83	61,5
58	12/1/85	54	47	20/12/82	62,75
63	13/1/85	59,5	55	3/1/85	61
69	18/12/85	72	57	6/1/85	78,5
70	3/2/85	67,25	96	27/2/86	61
74	9/4/85	50	109	4/1/87	68
76	23/3/85	67	114	4/1/87	58,5
83	17/12/85	68	115	4/1/87	58,5
86	18/12/85	61,5	120	4/1/87	62
89	19/12/85	64	122	4/1/87	58
90	19/12/85	64	127	4/1/87	59
92	20/1/86	68,5	132	21/12/86	59
103	31/3/86	68,5	64	13/1/85	62
108	4/1/87	62,5	349	8/1/88	53
388	12/4/88	46,5	382	2/4/88	41,5

B. Plan expérimental.

Toutes les expériences *in vivo* ont été effectuées au centre de recherche ovine de Faulx-les-Tombes (C.R.O.). Les brebis impliquées dans les expériences restaient constamment en pâture et n'étaient rentrées en bergerie que pour effectuer les manipulations (endoscopies, pesées...). Les dosages hormonaux ont été réalisés par la méthode radioimmunologique au laboratoire de Physiologie Animale.

B.1. Etude de la PMSG.

Quarante brebis adultes ont participé à cette expérience et ont été réparties en deux groupes homogènes de 20 individus (tableau 1).

L'étude s'est déroulée pendant les mois de juillet, août, septembre et octobre 1989.

Un groupe a été suivi en juillet et septembre (groupe A), l'autre en août et octobre (groupe B).

Au cours de ces quatre mois, des prélèvements sanguins ont régulièrement été effectués afin de déceler la présence et de caractériser les phases lutéales.

Chaque mois, les brebis ont été réparties en trois lots qui ont été synchronisées à tour de rôle à un jour d'intervalle. La synchronisation a été réalisée au moyen d'une éponge intravaginale de 40 mg de fluorogestone acetate (FGA) et lors du retrait (14^{ème} jour), une injection intramusculaire de 500 ou 800 UI de PMSG a été effectuée.

De 8 à 24 heures après l'injection de PMSG, des prises de sang bihoraires ont été effectuées de façon à cerner le pic préovulatoire de LH.

A partir de la 55^{ème} heure suivant l'injection de PMSG, des endoscopies régulières ont été pratiquées afin de préciser le moment de l'ovulation, le taux d'ovulation et l'importance de l'activité ovarienne.

Calendrier

Prises de sang afin de déterminer l'activité cyclique: 5/7; 11/7; 24/7; 31/7.

Placement des éponges: 14 jours avant l'injection de PMSG.

Injection de PMSG: juillet: 16; 17; 18.

août: 21; 22; 23.

septembre: 25; 26; 27.

octobre: 23; 24; 25.

Prises de sang afin de déterminer la qualité des corps jaunes induits: 24/7; 31/7; 29/8; 5/9; 2/10; 6/10; 3/11.

Pesées: 31/7; 11/9.

TABLEAU 2: Animaux expérimentaux pour l'étude de la MELATONINE.

	GROUPE MELATONINE			GROUPE CONTROLE		
	BREBIS	DATE DE NAISSANCE	POIDS (KG)	BREBIS	DATE DE NAISSANCE	POIDS (KG)
INSEMINATIONS EXOCERVICALES	15	25/12/82	84	14	23/12/82	54
	31	10/5/85	66	29	14/1/83	64
	72	19/2/85	66	66	15/1/85	53
	82	17/12/85	58	78	14/4/85	74
	95	21/1/86	70	94	21/1/86	55
	102	7/2/86	61	100	5/2/86	59
	111	5/1/87	57	110	22/12/86	72
	118	18/12/86	58	117	24/12/86	60
	125	19/1/87	63	124	4/2/87	46
	131	9/1/87	71	129	15/3/87	62
	305	29/11/87	53	135	2/2/87	50
	306	30/11/87	53	304	29/11/87	60
	321	16/12/87	45	311	3/12/87	58
	330	20/12/87	54	329	20/12/87	60
	345	3/1/88	52	339	24/12/87	49
	364	20/1/88	51	355	11/1/88	48
	368	16/3/88	48	367	16/3/88	48
380	30/3/88	53	379	23/3/88	61	
INSEMINATIONS INTRA-UTERINES	13	23/12/82	70	2	20/12/82	64
	19	28/12/83	72	17	27/12/82	82
	62	13/1/85	61	50	1/4/84	54
	75	10/4/85	67	73	30/3/85	70
	87	18/12/85	76	85	17/12/85	64
	99	31/3/86	65	97	8/3/86	53
	106	8/1/87	63	105	16/1/87	49
	113	27/12/86	55	112	23/12/86	68
	123	22/1/87	46	121	4/1/87	62
	128	5/1/87	64	126	19/12/86	57
	134	1/2/87	65	133	5/2/87	62
	300	26/12/87	58	309	30/11/87	53
	310	30/11/87	58	316	2/12/87	45
	323	20/12/87	52	331	20/12/87	55
	334	23/12/87	55	338	1/1/88	63
	340	1/1/88	55	349	24/12/87	49
	350	8/1/88	47	366	21/1/88	48
372	18/3/88	49	370	17/3/88	51	
386	30/3/88	48	381	30/3/88	46	

B.2. Etude de la MELATONINE.

Cette étude a été réalisée sur 74 brebis adultes (n=43), antennaises ayant déjà mis bas (n=14) ou antennaises nullipares (n=17).

Ces brebis (tableau 2) ont été réparties en deux lots homogènes, l'un étant traité à la mélatonine, l'autre étant le groupe témoin.

Des prises de sang ont été effectuées afin de déterminer la présence ou l'absence de phase lutéale (concentration plasmatique en P4 > à 0,4 ng/ml et de mesurer les concentrations plasmatiques diurnes en MEL et PRL.

Les ovulations ont été synchronisées par éponges vaginales de FGA 40mg et injection de 700 UI de PMSG. L'insémination a été réalisée pour moitié en exocervicale et pour moitié en intra-utérine à partir de semence fraîche prélevée chez trois béliers .

Calendrier

13/6/89 : injection sous-cutanée de 100 mg de mélatonine dans 3,0 ml de graisse de boeuf à 37 brebis.

21/6/89 : prises de sang à toutes les femelles entre 14 et 16 H

05/7/89 : prises de sang à toutes les femelles entre 14 et 16 H

11/7/89 : prises de sang entre 14 et 16 H + pose des éponges à toutes les femelles.

25/7/89 : 8H00 : retrait des éponges + PMSG (700 UI)

27/7/89 : 14H00 : inséminations artificielles exocervicales (IAc)

15H00 à 22H00 : inséminations artificielles intra- utérines (IAu).

04/8/89 : endoscopies afin de déterminer le nombre de corps jaunes

A partir des 07/8/89 et 21/8/89 : première et deuxième présentation au bélier des femelles non gestantes.

C. Méthodes utilisées.

C.1. Traitement à la mélatonine.

Pour cette expérience, nous avons essayé un traitement consistant en une injection sous-cutanée de 100 mg de mélatonine (SIGMA M5250) mélangée à 3 ml de graisse de boeuf. Cette méthode a déjà été pratiquée par SHARPE (1986) chez les bovins en anoestrus post-partum.

La mélatonine est suspendue dans de la graisse de boeuf puis répartie et stockée en seringues à 4°C . Pour l'injection, les seringues sont chauffées à 50°C de façon à liquéfier la graisse. L'injection s'est avérée irréalisable dans ces conditions car les cristaux de mélatonine s'accumulaient et obstruaient l'entrée de l'aiguille... En refroidissant légèrement la graisse, les cristaux restaient dispersés et l'injection a été bien plus aisée.

C.2. Synchronisation et induction des cycles.

La synchronisation et l'induction des cycles sont réalisées au moyen d'éponges de polyuréthane imprégnées de 40 mg d'un dérivé de la progestérone, la fluorogestone-acétate (FGA), commercialisée par INTERVET (Chronogest*, SEARLE).

Le placement de l'éponge se réalise au moyen d'un applicateur en PVC dans lequel est introduite l'éponge. L'applicateur est introduit dans le vagin et l'éponge est poussée à l'intérieur à l'aide d'un mandrin.

Avant chaque pose d'éponge, l'applicateur est soigneusement désinfecté au DETTOL* et lubrifié au moyen d'HIBITANE* en crème.

Le retrait de l'éponge se fait après 14 jours en tirant légèrement vers le bas la ficelle dépassant de la vulve et à laquelle est fixée l'éponge.

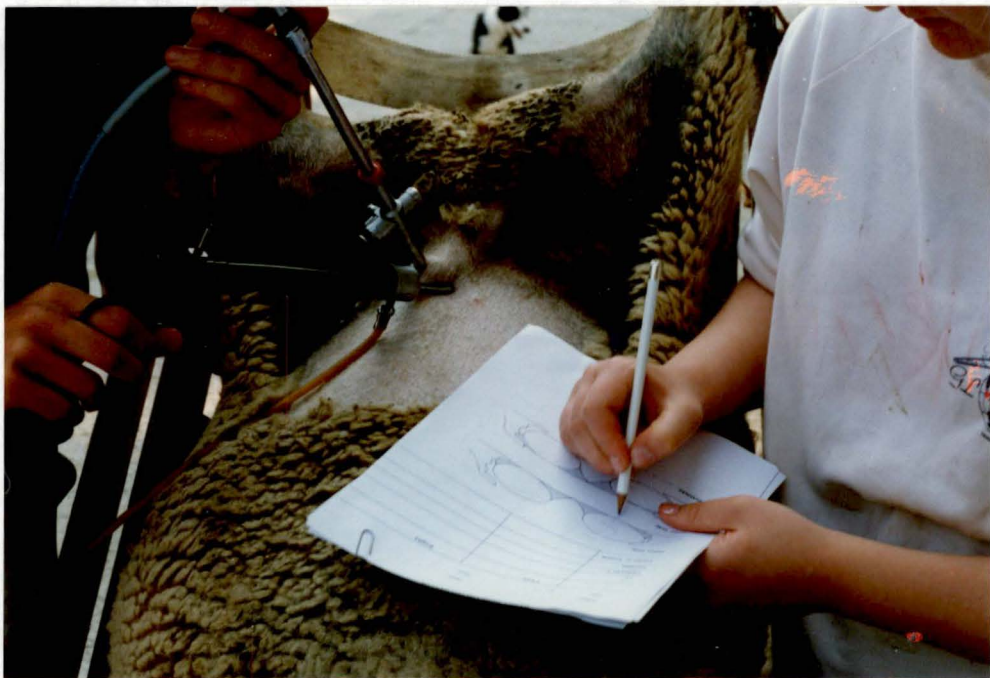
C.3. Traitement superovulatoire.

La PMSG utilisée est commercialisée par la firme INTERVET sous le nom de FOLLIGON*. La gonadotropine est présentée sous forme lyophilisée et est mise en solution

PHOTO 1: Matériel d'endoscopie.



PHOTO 2: Observation des ovaires par endoscopie.



extemporanément. Le FOLLIGON* est injecté par voie intramusculaire à différentes doses suivant les conditions particulières des expériences.

C.4. Prélèvements sanguins.

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau de la jugulaire. On gonfle la veine au moyen d'un garrot à la base du cou puis on y introduit une aiguille stérile. Le sang est recueilli dans des tubes préalablement héparinés pour prévenir toute coagulation et est immédiatement centrifugé afin de séparer les éléments figurés du plasma. Dès la fin de la centrifugation, le plasma est recueilli et stocké à -20°C dans des tubes de polystyrène jusqu'à l'analyse.

C.5. Endoscopies.

L'endoscopie est l'observation des organes internes à l'aide d'une fibre optique. Cette technique remplace avantageusement une laparotomie, grâce à sa souplesse d'utilisation et au faible traumatisme qu'elle engendre chez la brebis.

Néanmoins, une pratique courante est nécessaire afin d'interpréter correctement toutes les observations.

Pour réaliser l'endoscopie, la brebis est maintenue en décubitus dorsal sur une table inclinable, l'arrière-train est soulevé plus haut que la tête afin de faciliter l'observation des ovaires par un tassement des viscères contre le diaphragme.

Une anesthésie locale est effectuée au moyen de 1 ml de XYLOCAINE* et d'adrénaline aux endroits de perforation. La paroi abdominale est rasée et désinfectée soigneusement (HIBITANE* ou DETTOL*). Deux perforations de la paroi abdominale sont pratiquées au trocart à 10 cm de part et d'autre de la ligne médiane et à une quinzaine de cm de la naissance du pis en évitant soigneusement la veine mammaire. Un endoscope WOLF d'une optique de 10 mm est introduit dans un des trous. Il est muni d'une fibre souple le reliant à une source lumineuse de 150 W. Dans l'autre trou, est introduit un palpeur gradué permettant de manipuler les ovaires et de mesurer la taille de tous les follicules visibles sur chaque ovaire (photo 1 et 2).

Lors de l'opération, de l'air stérile est insufflé dans la cavité abdominale au moyen d'un petit compresseur afin de soulever la paroi abdominale et le péritoine. L'observation terminée, les instruments sont retirés et désinfectés à l'alcool, la plaie est désinfectée, puis fermée au

moyen d'une agraffe de MICHEL. Un antibiotique pénicillanique (PENI. DSH 20*) est injecté par voie intramusculaire.

C.6. Inséminations artificielles (IA)

Cette technique comporte de grands avantages comme l'utilisation plus intensive des meilleurs géniteurs (10 inséminations/éjaculat en IAc et 100/éjaculat en IAU en moyenne).

Elle permet aussi de concentrer les agnelages du troupeau en quelques jours, ce qui facilite beaucoup leur surveillance.

Pour les deux techniques d'inséminations utilisées, du sperme frais a été récolté dans les heures précédant l'insémination. Le pouvoir fécondant des spermatozoïdes a été testé et ensuite ceux-ci ont été dilués et conditionnés en paillettes de 0.25 ml à raison de $400 \cdot 10^6$ spermatozoïdes/dose.

Pour l'insémination exo-cervicale (IAc), 54h après le retrait de l'éponge, la brebis est immobilisée par un aide et son arrière-train est posé sur un chevalet. Outre le pistolet contenant la paillette, l'inséminateur est équipé d'un spéculum lumineux.

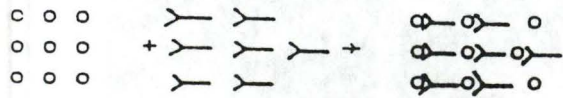
L'inséminateur écarte les lèvres de la vulve avec le spéculum, repère le cervix et y dépose la semence.

Après chaque brebis, le spéculum est désinfecté au DETTOL*, essuyé et enduit d'une pommade antiseptique et lubrifiante.

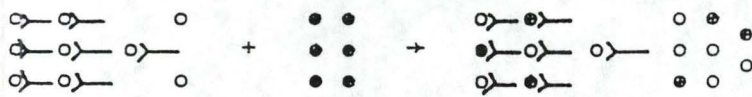
L'insémination intra-utérine (IAU) est réalisée 55 à 60 h après le retrait de l'éponge; elle consiste à injecter une dose de spermatozoïdes directement dans chaque corne utérine par endoscopie. La fibre optique est introduite dans un des deux trous pratiqués dans la paroi abdominale, dans l'autre, c'est la seringue au moyen de laquelle on injecte les spermatozoïdes dans les deux cornes.

L'IAU présente d'énormes avantages par rapport à l'IAc bien qu'elle soit plus lourde de réalisation. Elle permet de contourner le problème du passage des spermatozoïdes à travers le cervix. Celui-ci s'oppose par ses replis et sa glaire, au passage des spermatozoïdes. Ce barrage est d'autant plus important que l'induction de l'ovulation par les éponges de progestagènes semble entraîner un milieu moins favorable à la survie et au passage des spermatozoïdes à ce niveau. Elle permet aussi de diminuer les doses de spermatozoïdes ($20 \cdot 10^6$ spermatozoïdes par corne au lieu de $400 \cdot 10^6$ lors de l'IAc).

Fixation de l'H° sur l'As



Compétition entre l'H* et l'H°



Séparation de la fraction liée et de la fraction libre et comptage de la radioactivité de l'une des fractions.

légende

- = H°
- = H*
- >— = As

FIGURE 1: Principe du dosage par RIA (BISTER, 1980).

C.7. Dosages hormonaux.

Toutes les analyses des taux plasmatiques d'hormones ont été réalisés par la méthode radioimmunologique (RIA). La qualité des dosages RIA est due principalement à leurs caractéristiques de spécificité, de sensibilité et de reproductibilité.

a. Principe du dosage (BISTER, 1980) fig.1

Le dosage radioimmunologique est basé sur la compétition entre une quantité déterminée d'hormone marquée (par la fixation d'un ou de plusieurs atomes radioactifs; I^{131} , I^{125} , H^3 ...) et la quantité variable d'hormone se trouvant dans l'échantillon à analyser, vis-à-vis d'un antisérum (AS) qui lui est spécifique.

La quantité d'hormone marquée (H^*) liée à l'antisérum spécifique sera d'autant plus faible que la quantité d'hormone "froide" (H^o) de l'échantillon sera élevée.

En séparant H^* liée à l'antisérum de H^* libre, on peut par mesure de la radioactivité de l'une des fractions, calculer la quantité d' H^o .

Une courbe standard effectuée dans les mêmes conditions avec des quantités connues d' H^o sert de référence.

Suivant l'efficacité des protocoles vis-à-vis de certaines hormones et suivant la disponibilité en matériel de comptage, nous avons utilisé l' I^{125} pour les hormones protéiques et l' H^3 pour les stéroïdes et la mélatonine.

b. Calcul des résultats.

Le calcul des résultats se fait en approximant la courbe standard et en transformant les DPM en concentrations hormonales par la formule:

$$A = A^o \frac{C_m}{C_m + C_f} + BG$$

A = nombre de DPM

A^o = nombre de DPM en l'absence d'hormone froide

C_m = concentration en hormone marquée

C_f = concentration en hormone froide

BG (Back-Ground) = fixation aspécifique (en l'absence d'AS).

MODE OPERATOIRE du dosage de la P4 au H³

Extraction:

- 1) Extraction de la P4 contenue dans 200 μ l de plasma par 2 ml d'hexane, puis agitation pendant deux minutes au vortex.
- 2) Prélèvement d'un ml de surnageant.
- 3) Evaporation à sec dans une étuve sous vide à 40°C.

Fixation Ag-Ac:

- 1) Addition de
 - 50 μ l de plasma de plasma de brebis ovariectomisée.
 - 100 μ l de P4*
 - 100 μ l d'AS
- 2) Incubation 1/2 heure à 37°C et une nuit à 3°C.

Séparation:

- 1) Addition de 500 μ l de dextran-charcoal à 3°C.
- 2) Agitation et incubation pendant 10 min à 3°C.
- 3) Centrifugation pendant 10 min à 0°C et à 2800 rpm.

Comptage:

- 1) Prélèvement de 300 μ l de surnageant (phase liée) et addition de 3 ml d'Ecoscint A.
- 2) Comptage 5 min à l'analyseur β .

La courbe standard est réalisée à partir de 100 μ l de solutions contenant 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10 ng de P4/ml.

c. Dosage de la progestérone.

La progestérone plasmatique est extraite par de l'hexane (MERCK 4367) avec un coefficient d'extraction compris entre 90 et 100%.

Les standards utilisés ont été préparés par pesée précise et dilution de progestérone cristalline (MERCK 246/4).

Afin de diluer la progestérone froide et radioactive, nous avons utilisé un tampon phosphate 0,06 M de pH 7,55 appelé tampon wide. Ce tampon est préparé au départ d'une solution stock 0,6 M elle-même préparée à partir de 7,5 g de KH_2PO_4 et 77,9 g de NaH_2PO_4 par litre d'eau distillée.

La progestérone radioactive est tritiée (1-2-6-7 H^3 P₄) d'activité spécifique de 80 Ci/mmmole (2,96 TBq/mmmol) et concentration radioactive est de 1 mCi/ml toluène.

A partir de cette solution, nous avons préparé un stock (50 ml dans 5ml de solution benzène-éthanol) qui sert à préparer la solution de progestérone radioactive pour le dosage.

- 100 μl de la solution stock
- évaporation sous vide
- reprendre par 0,5 ml de tampon wide de façon à obtenir ± 7000 CPM pour le TOTAL COUNT (100 μl dans 3 ml de liquide scintillant).

L'antisérum (AS) provient du "laboratoire d'hormonologie" de Marloie. Il a été obtenu par immunisation de lapins par la progestérone et il présente une bonne spécificité vis-à-vis de celle-ci.

Afin d'adsorber la phase libre et ainsi de la séparer de la phase liée à l'antisérum, on utilise une solution de dextran-charcoal (220 mg de charcoal Norit A Serva et 22mg de dextran T 70 Pharmacia par 100 ml de tampon wide).

Le comptage se réalise sur 300 μl de surnageant (phase liée) mélangée à 3 ml d'Ecoscint A, le liquide scintillant produit par la firme National Diagnostics, dans une minifiole de polyéthylène et compté sur un compteur à scintillations Beckman pendant 5 minutes. Le % d'erreur est de l'ordre de 5 à 10%.

MODE OPERATOIRE du dosage de la LH à L¹²⁵

- On prélève 50 µl de plasma auxquels sont ajoutés 50 µl d'anti-serum
- le mélange est homogénéisé au vortex
- la réaction Ag-Ac s'équilibre durant un temps d'incubation de 4 heures à température ambiante
- adjonction de 50 µl de LH* et agitation au vortex
- nouvelle incubation d'une nuit
- ajout de 250 µl d'ARGG suivie d'une incubation pendant 4 heures
- séparation des fractions liée et libre par centrifugation 15 minutes à 3000 rpm
- le surnageant est éliminé
- mesure de la radioactivité du culot.

d. Dosage de la LH.

Le dosage de la LH s'effectue en utilisant un traceur marqué à l' ^{125}I .

La précipitation de la phase liée nécessite un immunoabsorbant. Celui-ci est de l'Anti-Rabbit Gamma Globuline (ARGG), fourni par le laboratoire d'hormonologie de Marloie.

La courbe standard a été réalisée en remplaçant les 50 ml de plasma par 50 μl d'hormone froide à des concentrations connues: 0; 1; 1,6; 2; 4; 6; 12,5; 25; 50; 75 et 100 ng/ml.

La mesure de la radioactivité est effectuée par un analyseur gamma à passeur d'échantillons, le temps de comptage étant de une minute.

e. Dosage de la PRL.

Il a été réalisé selon la même procédure que pour la LH excepté que l'on rajoute 25 μl de plasma ne contenant pas de PRL dans les standards et 25 μl de tampon BSA dans les échantillons.

MODE OPERATOIRE du dosage de la MEL au H³

- Prélèvement de la CS (250 ou 500 µl)
- ajout de l'AS (50 ou 100 µl) et de la MEL* (50 µl)
- agitation au vortex
- incubation d'une nuit à 4°C
- adjonction de 500 µl de dextran-charcoal afin de séparer les deux phases
- agitation au vortex suivie de 10 minutes d'incubation à 4°C
- centrifugation pendant 10 minutes à 0°C et à 2800 RPM
- placer 300 µl du surnageant dans 3 ml de liquide scintillant
- vortexer à température ambiante
- laisser reposer une nuit
- mesurer la radioactivité du tube au compteur β.

f. Dosage de la mélatonine.

Produits utilisés

La MEL tritiée (O-methyl- H^3 mélatonine) est commercialisée par la firme Amersham (code TRK. 798). Elle possède une activité spécifique de 12,2 GBq/mg (357mCi/mg) et la concentration radioactive est de 37 MBq/ml d'éthanol (1,0 mCi/ml). Pour les dosages, la MEL* a été diluée dans du wide 0,06 M (pH=7,55) de façon à obtenir un TC de ± 10000 DPM.

La MEL froide cristalline (Sigma Chemical Co., St Louis, M.O) a été dissoute dans de l'éthanol de façon à obtenir une solution stock A de 1 mg/ml.

L'anti-serum de mouton (G/S/704-6483) est commercialisé par Guildhay Antisera (Guildford, Surrey, G-B) et possède les spécificités de réactions décrites ci-dessous:

- mélatonine	100
- N acétyl-tryptamine	0,91
- 6-hydroxy mélatonine	0,33
- N-acétyl tryptophane	0,22
- autres composants	< à 0,06

La limite inférieure de sensibilité de cet AS est de 2,5 à 5 pg par tube en dosant 500 μ l de plasma. L'AS a été dissout dans du tampon phosphate wide albuminé à 0,5% par addition de BSA, fraction 5.

La séparation de la phase liée de la libre a été réalisée par du dextran-charcoal ensuite, le surnageant a été mélangé au liquide scintillant (Ecoscint A) puis passé au compteur à scintillations pendant 4 minutes.

préparation de la courbe standard (CS)

- diluer 100 μ l de la solution stock A dans 100 μ l de wide 0,06 (pH=7,55) de façon à obtenir une concentration de 1 μ g/ml (solution stock B)
- diluer 100ml de la solution stock B dans 100ml de wide de façon à avoir une solution de travail de 1 ng/ml
- ensuite, en diluant de façon adéquate, on prépare des solutions de concentrations connues de: 0; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1000 et 2000 pg/ml.

Mise au point du dosage

La méthode employée est directe, c'est-à-dire qu'elle ne nécessite pas d'extraction préalable de l'hormone du plasma.

Devant établir un protocole de dosage de la MEL par RIA, nous avons procédé à des essais préalables à partir de courbes standards. Trois tests ont été réalisés afin d'optimiser le dosage, chaque prélèvement de plasma étant fait en double.

	TEST A	TEST B	TEST C
PLASMA	500 $\mu\lambda$	500 $\mu\lambda$	500 $\mu\lambda$
MEL*	50 $\mu\lambda$	50 $\mu\lambda$	50 $\mu\lambda$
AS	100 $\mu\lambda$	100 $\mu\lambda$	50 $\mu\lambda$

Dosage des prélèvements sanguins

Afin de mesurer les concentrations plasmatiques de MEL des brebis, nous avons suivi le protocole appliqué au test C.

Le seuil de sensibilité de notre dosage est de 20 pg/ml et la reproductibilité intra-dosage est de 7%.

TABLEAU 3: pourcentage de brebis ovulant déterminé par endoscopies.

DOSE PMSG	JUILLET	AOUT	SEPTEMBRE	OCTOBRE	
500	57% n=7	89% n=9	57% n=7	63% n=8	67% n=31
800	83% n=12	89% n=9	84% n=12	86% n=7	85% n=40
	74% n=19	89% n=18	74% n=19	74% n=15	77% n=71

D. Résultats.

D.1. Etude de la PMSG.

Rappelons que l'étude des effets de la PMSG sur le mécanisme de l'ovulation a été réalisée lors des mois de juillet, août, septembre et octobre suite à un traitement de synchronisation des cycles par une éponge intravaginale de progestagènes.

Nous avons effectué des prélèvements sanguins à partir de la 32^{ème} heure suivant l'injection de PMSG et des endoscopies à partir de la 55^{ème} heure.

Il est nécessaire de signaler dès à présent qu'il n'a pas toujours été possible d'utiliser des modèles statistiques très élaborés afin de traiter tous les résultats de cette expérience étant donné le faible effectif d'animaux expérimentaux et le nombre variable de données d'un mois à l'autre (certaines brebis ont perdu leur éponge vaginale et ont dû être retirées de l'expérience). C'est pourquoi, nous avons analysé les résultats par test d'homogénéité des proportions, par calculs de corrélation entre deux variables et, dans les cas où cela était possible, par analyse de la variance.

Il ne nous a pas été possible de réaliser les dosages hormonaux des prélèvements sanguins du mois d'octobre suite à une mauvaise manipulation des tubes au cours de leur transport.

a. Entrée en cycles des brebis.

Avant les premières synchronisations des cycles, nous avons procédé à des prélèvements sanguins réguliers au cours du mois de juillet afin de doser la progestérone plasmatique. Les résultats de ce dosage renseignent sur la présence d'une phase lutéale ($P_4 > 0,4$ ng/ml; JACQUES, 1989) et donc sur l'état cyclique des brebis.

Les résultats obtenus montrent que 8 brebis sur 20 présentent une phase lutéale avant le 31 juillet, soit un pourcentage de 40%. Ces phases lutéales correspondent probablement aux premiers cycles de la saison de reproduction chez les SUFFOLK.

b. Induction et synchronisation des cycles.

Les pourcentages de brebis ovulant ont d'abord été déterminés par endoscopies réalisées au moment de l'ovulation; ils sont présentés dans le tableau 3.

TABLEAU 4: pourcentage de brebis ovulant déterminé par dosages hormonaux (LH).

DOSE PMSG	JUILLET	AOUT	SEPTEMBRE	
500 UI	57% n=7	77% n=9	57% n=7	65% n=23
800 Ui	83% n=12	55% n=9	92% n=12	78% n=33
	74% n=19	66% n=18	79% n=19	73% n=56

TABLEAU 5: Taux d'ovulation moyens.

DOSE PMSG	JUILLET	AOUT	SEPTEMBRE	OCTOBRE	
500 UI	$\bar{X}=1,75$ S=0,96 n=4	$\bar{X}=2$ S=0,75 n=8	$\bar{X}=2,25$ S=1,26 n=4	$\bar{X}=1$ S=0 n=5	$\bar{X}=1,76$ S=0,88 n=21
800 UI	$\bar{X}=2$ S=0,47 n=10	$\bar{X}=1,5$ S=0,53 n=8	$\bar{X}=1,4$ S=0,7 n=10	$\bar{X}=1,5$ S=0,55 n=6	$\bar{X}=1,61$ S=0,6 n=34
	$\bar{X}=1,93$ S=0,61 n=14	$\bar{X}=1,75$ S=0,68 n=16	$\bar{X}=1,64$ S=0,92 n=14	$\bar{X}=1,27$ S=0,55 n=11	$\bar{X}=1,67$ S=0,72 n=55

En moyenne, sur l'ensemble des 4 mois, 77% des brebis ont répondu au traitement. Nous avons observé que 74% de brebis ovulaient chaque mois à l'exception du mois d'août (89%).

On remarque aussi que le nombre de brebis ayant répondu au traitement est plus élevé (85%) avec 800 UI de PMSG qu'avec 500 UI (67%).

Les analyses statistiques par test d'homogénéité des proportions, ne semblent pas montrer d'influence du mois (X^2 obs = 1,81) sur le pourcentage de brebis ovulant. Par contre, ce pourcentage dépend de façon très significative (X^2 obs = 12,83) de la dose de PMSG utilisée.

L'efficacité des traitements de synchronisation et d'induction des ovulations peut aussi être déterminé par dosages hormonaux. Chaque ovulation est précédée d'une décharge préovulatoire de LH qui, dans notre expérience, avait une durée de 6 à 8 heures.

Les résultats présentés au tableau 4 diffèrent légèrement de ceux obtenus par endoscopies; en août, quatre brebis ont eu des pics de LH trop précoces que pour en détecter le moment d'apparition (une à 500 UI et trois à 800 UI). Cela explique les pourcentages plus faibles observés avec 500 UI (77%) et avec 800 UI (55 %) par rapport à ceux observés par endoscopies. Au mois de septembre, une brebis ayant reçu une injection de 800 UI de PMSG a probablement eu une ovulation en dehors des heures d'observation par endoscopies.

Néanmoins, l'ensemble des résultats confirme que la dose de 800 UI provoque des ovulations chez un plus grand nombre de brebis qu'avec 500 UI.

c. Taux d'ovulation.

Les taux d'ovulation ont été déterminés chaque mois et pour chaque dose de PMSG par endoscopies (tableau 5). Ils ne tiennent pas compte des brebis n'ayant pas ovulé.

Le taux moyen d'ovulation au cours de ces quatre mois est de 1,67. Il est plus élevé avec 500 UI (1,76) qu'avec 800 UI (1,61).

Nous remarquons aussi que le taux d'ovulation diminue constamment au fil du temps: il passe de 1,93 à 1,75; 1,64 et 1,27 respectivement pour les mois de juillet, août, septembre et octobre. Ceci nous paraît tout à fait anormal.

Une analyse de la variance tenant compte de l'influence du mois, du traitement, de la répartition des brebis dans les groupes et des animaux, ne nous permet pourtant pas d'affirmer que le taux d'ovulation évolue au cours des mois de juillet à octobre ($\alpha=0,05$).

Il n'est pas possible de distinguer un effet réel de la dose de PMSG ($\alpha=0,05$) sur le taux d'ovulation.

Au cours de nos observations, nous avons remarqué une grande variabilité entre les individus; en général, les brebis ayant beaucoup d'ovulations, sont souvent les mêmes d'un mois à l'autre. Nous avons fait une constatation semblable pour les brebis n'ayant pas d'ovulation.

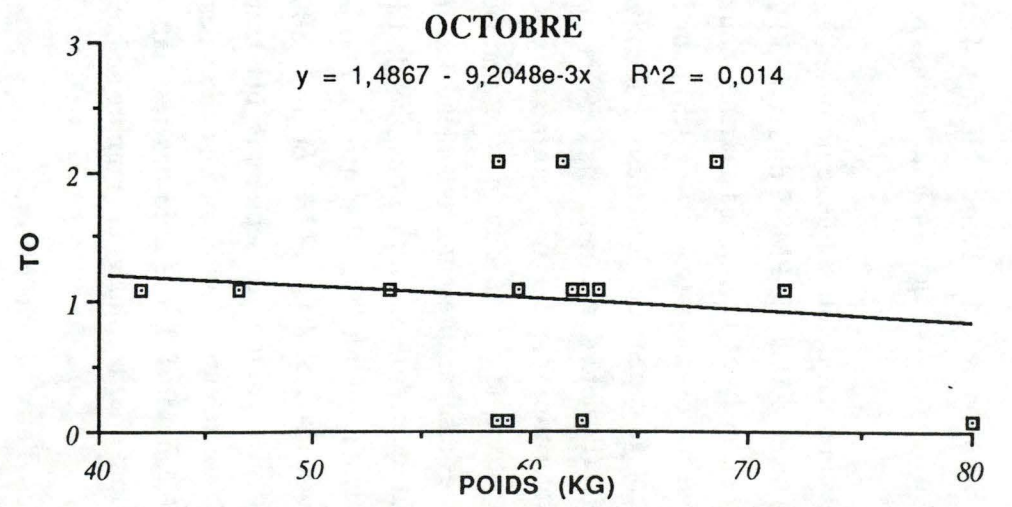
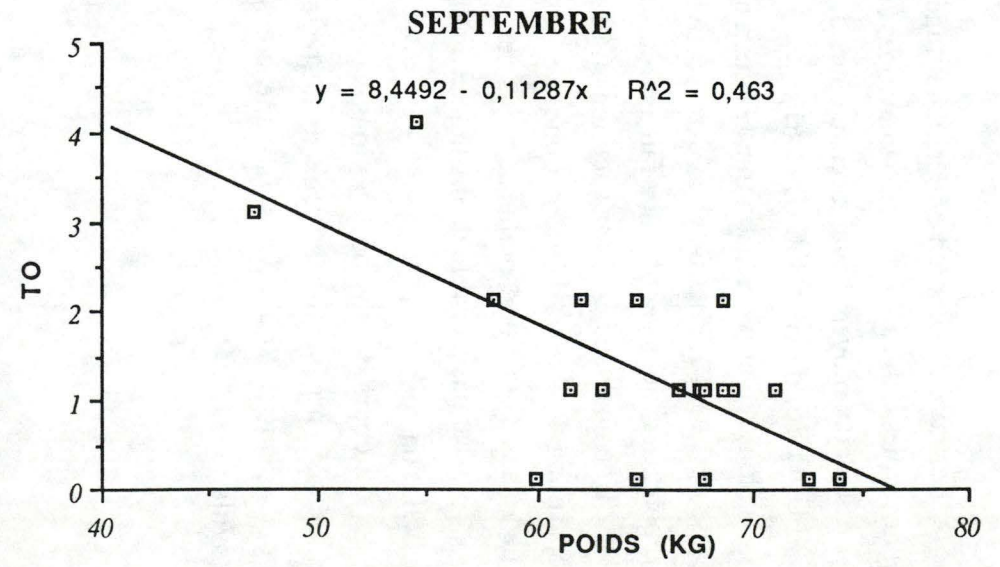
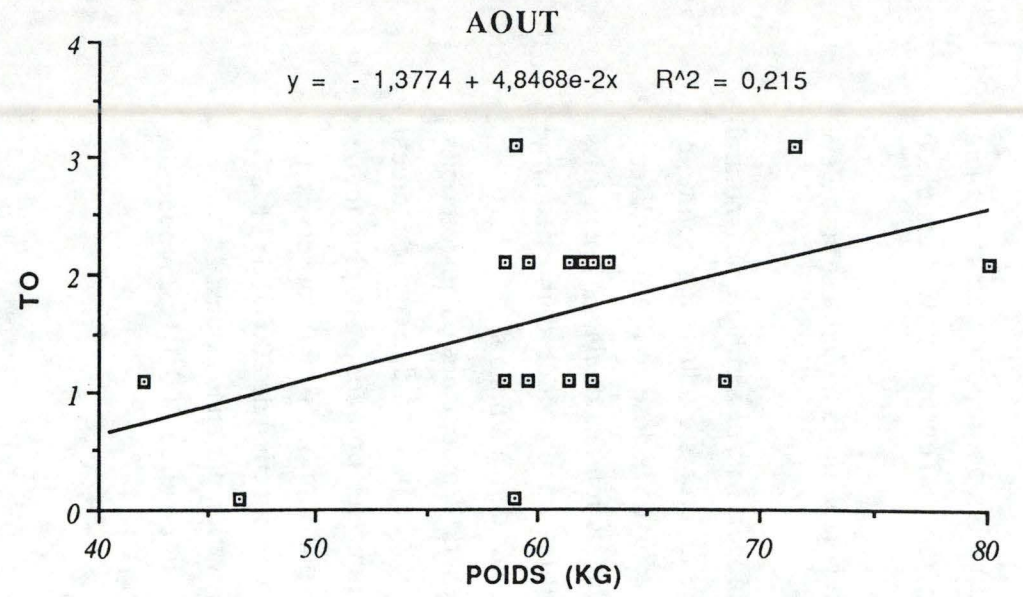
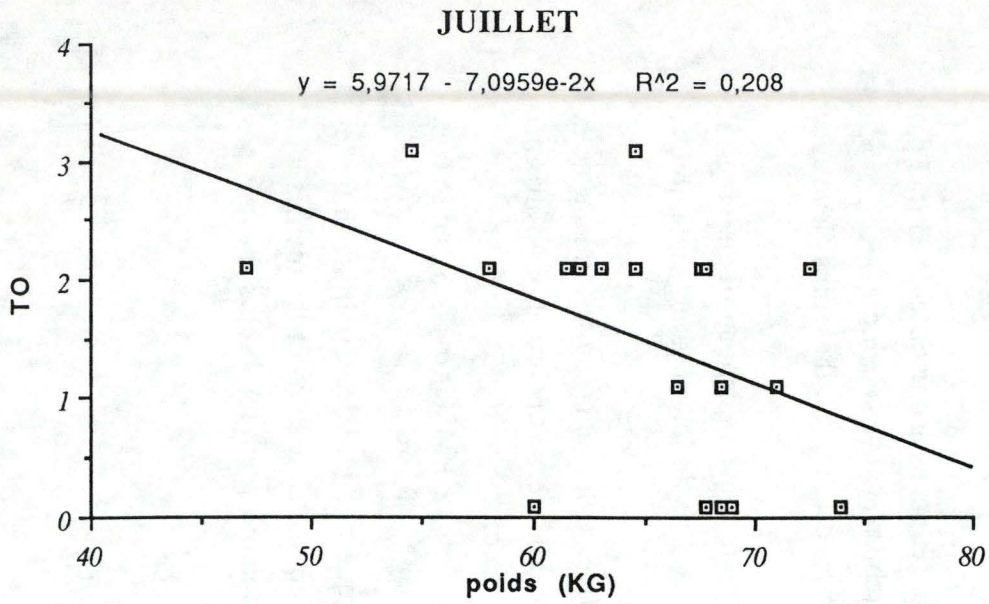


FIGURE 2: Relations entre le taux d'ovulation et le poids corporel de la brebis.

Relation entre le taux d'ovulation et le poids des brebis

Les relations entre les taux d'ovulation et les poids relevés au cours des périodes d'observation par endoscopies sont présentées sur la figure 2.

Les coefficients de corrélation sont faibles et variables pour les quatre mois ($r=0,45$; $0,46$; $-0,68$; $-0,12$ respectivement pour juillet, août, septembre et octobre).

L'analyse de la régression nous permet de déterminer la signification réelle de chaque corrélation établie:

JUILLET: $P = 0,049$

AOUT: $P = 0,052$

SEPTEMBRE: $P = 0,001$

OCTOBRE: $P = 0,669$

Bien que certaines corrélations soient significatives, nous observons une grande variabilité individuelle et la relation entre les deux variables étudiée est tantôt positive, tantôt négative.

Relation entre le taux d'ovulation et l'âge des brebis

Les coefficients de corrélation établis pour chaque mois entre le taux d'ovulation et l'âge des brebis sont:

JUILLET: $r = 0,33$

AOUT: $r = 0,09$

SEPTEMBRE: $r = 0,15$

OCTOBRE: $r = 0,07$

Ils ne permettent pas de mettre en évidence une influence de l'âge sur le taux d'ovulation pour les quatre mois d'expérimentation.

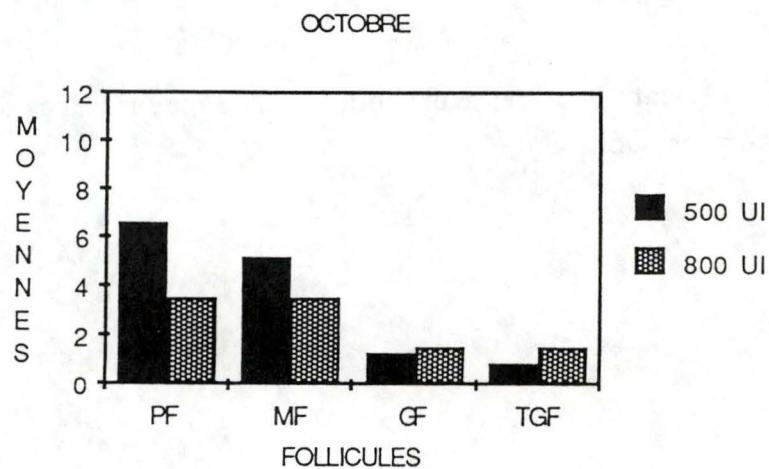
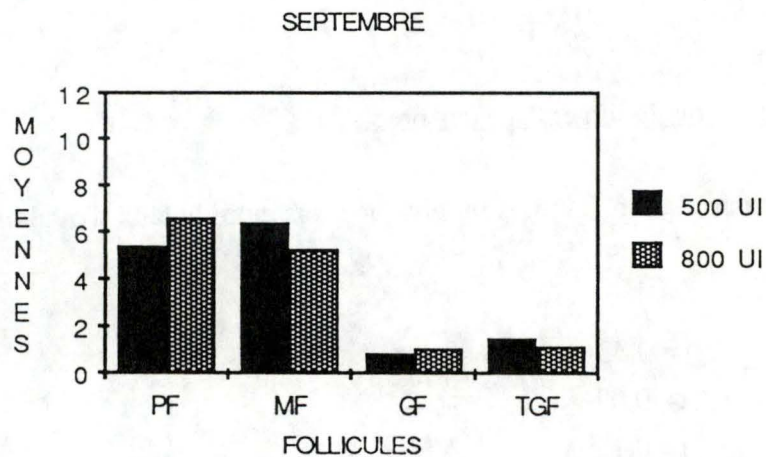
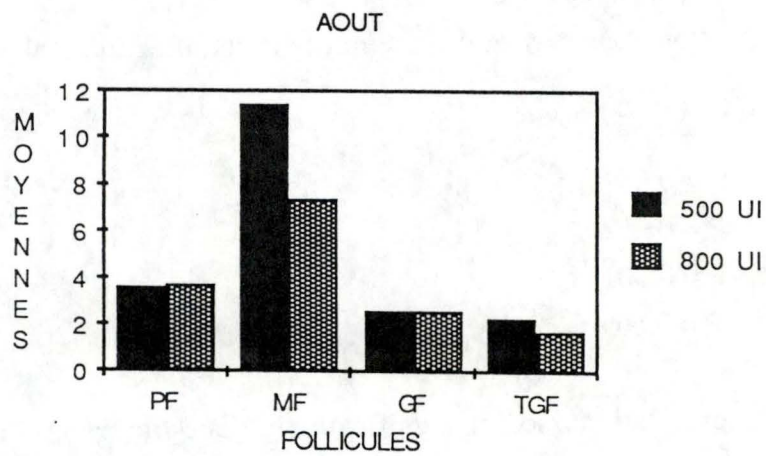
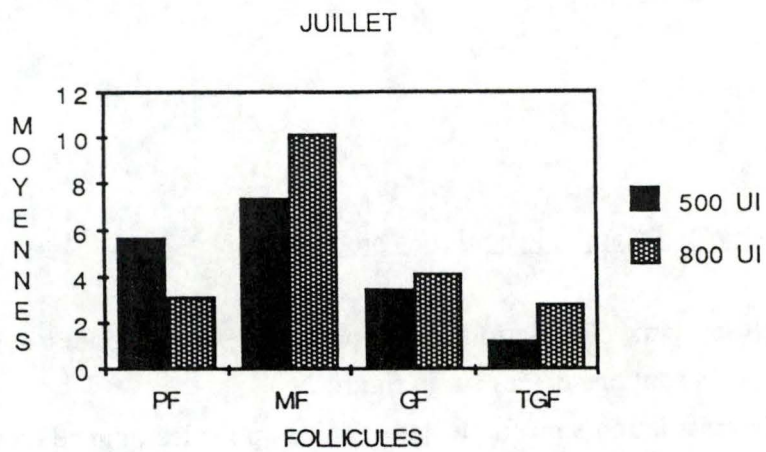


FIGURE 3: Structure de la population des follicules présents à la surface des ovaires selon la dose de PMSG pendant 4 mois consécutifs (juillet à octobre).

Relation entre le taux d'ovulation et le pic de LH

Nous avons aussi recherché une éventuelle relation entre le TO et différents paramètres du pic préovulatoire de LH:

- l'amplitude du pic
- la surface du pic
- la précocité du pic

Les coefficients de corrélation sont repris dans le tableau 6. Aucune relation significative n'a pu être établie.

d. Population folliculaire.

Les endoscopies réalisées au moment de l'ovulation, ont aussi permis d'établir un recensement des follicules à la surface des ovaires. Les follicules ont été répartis en fonction de leur taille en quatre classes déterminées arbitrairement.

- Les petits follicules (PF), de diamètre inférieur à 2mm
- Les moyens follicules (MF), de diamètre compris entre 2 et 4mm
- Les gros follicules (GF), de diamètre compris entre 4 et 6mm
- Les très gros follicules (TGF), de diamètre supérieur à 6mm, comprenant les follicules ayant ovulé.

La figure 3 représente les histogrammes de fréquence des 4 classes de follicules selon le mois et la dose de PMSG.

Nous pouvons distinguer des fréquences plus faibles de gros et très gros follicules, ce qui correspond bien à la notion d'atrésie progressive de certains follicules au cours de leur développement.

Il est frappant de constater une similitude dans la structure des populations folliculaires des mois de juillet et août d'une part (premier traitement P4+PMSG pour chaque groupe de brebis) et de septembre et octobre d'autre part (deuxième traitement P4+PMSG). Nous remarquons que le nombre de moyens follicules est supérieur au nombre de petits follicules en juillet et en août tandis qu'il est égal ou inférieur en septembre et en octobre.

Il semble donc que le traitement de synchronisation et d'induction des ovulations influence les cycles ultérieurs.

TABLEAU 6: Coefficients de corrélations entre différents paramètres du pic préovulatoire de LH et le taux d'ovulation.

	TO et amplitude du pic	TO et surface du pic	TO et précocité du pic
JUILLET	R = 0,42	R = 0,42	R = -0,39
AOUT	R = -0,15	R = -0,07	R = 0,34
SEPTEMBRE	R = 0,14	R = 0,14	R = -0,24

TABLEAU 7: Délais moyens (en heures) entre l'injection de PMSG et le moment de l'ovulation.

DOSE PMSG	JUILLET	AOUT	SEPTEMBRE	OCTOBRE
500 UI	$\bar{X} = 60,13$ S = 1,53 n = 4	$\bar{X} = 59,37$ S = 1,21 n = 8	$\bar{X} = 58,45$ S = 2,28 n = 4	$\bar{X} = 58,48$ S = 1,37 n = 5
800 UI	$\bar{X} = 62$ S = 1,56 n = 10	$\bar{X} = 59$ S = 1,32 n = 8	$\bar{X} = 59,16$ S = 1,87 n = 10	$\bar{X} = 58,36$ S = 1,34 n = 6
	$\bar{X} = 61,49$ S = 1,74 n = 14	$\bar{X} = 59,19$ S = 1,24 n = 16	$\bar{X} = 58,96$ S = 1,93 n = 14	$\bar{X} = 58,4$ S = 1,28 n = 11

TABLEAU 8: Délais moyens (en heures) entre le pic de LH et le moment de l'ovulation.

	JUILLET	AOUT	SEPTEMBRE
DELAIS MOYENS (heures)	$\bar{X} = 21,73$	$\bar{X} = 22,47$	$\bar{X} = 22,8$
ECARTS-TYPES	S = 2,94	S = 3,95	S = 2,52
NOMBRE DE BREBIS	n = 12	n = 12	n = 11

TABLEAU 9: Délais moyens (en heures) entre l'injection de PMSG et l'apparition du pic de LH.

JUILLET	AOUT	SEPTEMBRE
$\bar{X} = 40,5$ S = 2,84 n = 13	$\bar{X} = 37$ S = 3,67 n = 12	$\bar{X} = 36,82$ S = 1,94 n = 12

e. Moment de l'ovulation.

Moment de la première ovulation

Les délais moyens entre l'injection de PMSG et la première ovulation ont été déterminés par endoscopies (tableau 7). Nous n'avons tenu compte que de la première ovulation de façon à avoir un nombre constant de données pour l'analyse statistique et parce que c'est le moment de cette ovulation qui est intéressant pour l'insémination artificielle.

Le délai entre l'injection de la PMSG et le moment de la première ovulation est de 61,5 heures en juillet, 59,2 heures en août, 59 heures en septembre et 58,4 heures en octobre. La majorité des brebis ovulent entre la 56^{ème} heure et la 64^{ème} heure après l'injection et la dispersion des ovulations est peu importante chez une même brebis ou entre les brebis.

L'analyse de la variance réalisée de la même façon que pour le taux d'ovulation montre que seul le mois a un effet significatif ($\alpha=0,05$) sur le délai entre l'injection et la première ovulation. Nous n'avons pu établir une droite de régression entre les délais et les mois car notre protocole expérimental comprend deux lots de brebis étudiés l'un à la suite de l'autre (juillet, septembre et août, octobre). Néanmoins, on peut déceler dans ces résultats une précocité croissante des ovulations au fur et à mesure que l'on s'approche du milieu de la saison de reproduction, la différence la plus sensible se situe entre juillet et août.

Par contre, nous n'avons pas pu mettre en évidence une influence de la dose de PMSG sur le délai entre l'injection et la première ovulation.

Moment du pic de LH

La détection du pic de LH a été réalisée par prises de sang bihoraires, le jour précédant l'ovulation. Elle nous a permis de constater que le délai moyen entre le pic de LH et le moment de l'ovulation (tableau 8) est d'environ 22 heures et ne varie apparemment pas d'un mois à l'autre. Par contre, l'intervalle entre l'injection de PMSG et l'apparition du pic de LH (tableau 9) montre une tendance à la diminution d'un mois à l'autre, surtout entre juillet et août.

Ces résultats ont une valeur indicative mais doivent être considérés avec une certaine circonspection étant donné l'absence d'analyse statistique élaborée.

f. Taux plasmatiques de P4 et taux d'ovulation.

Nous avons aussi voulu vérifier la corrélation parfois présentée dans la littérature entre la quantité de progestérone produite par les corps jaunes et le nombre de ceux-ci.

L'analyse de la corrélation liant les taux plasmatiques de P4 au nombre de corps jaunes observés a été effectuée pour chaque mois (Fig.4). Elle confirme en partie les observations

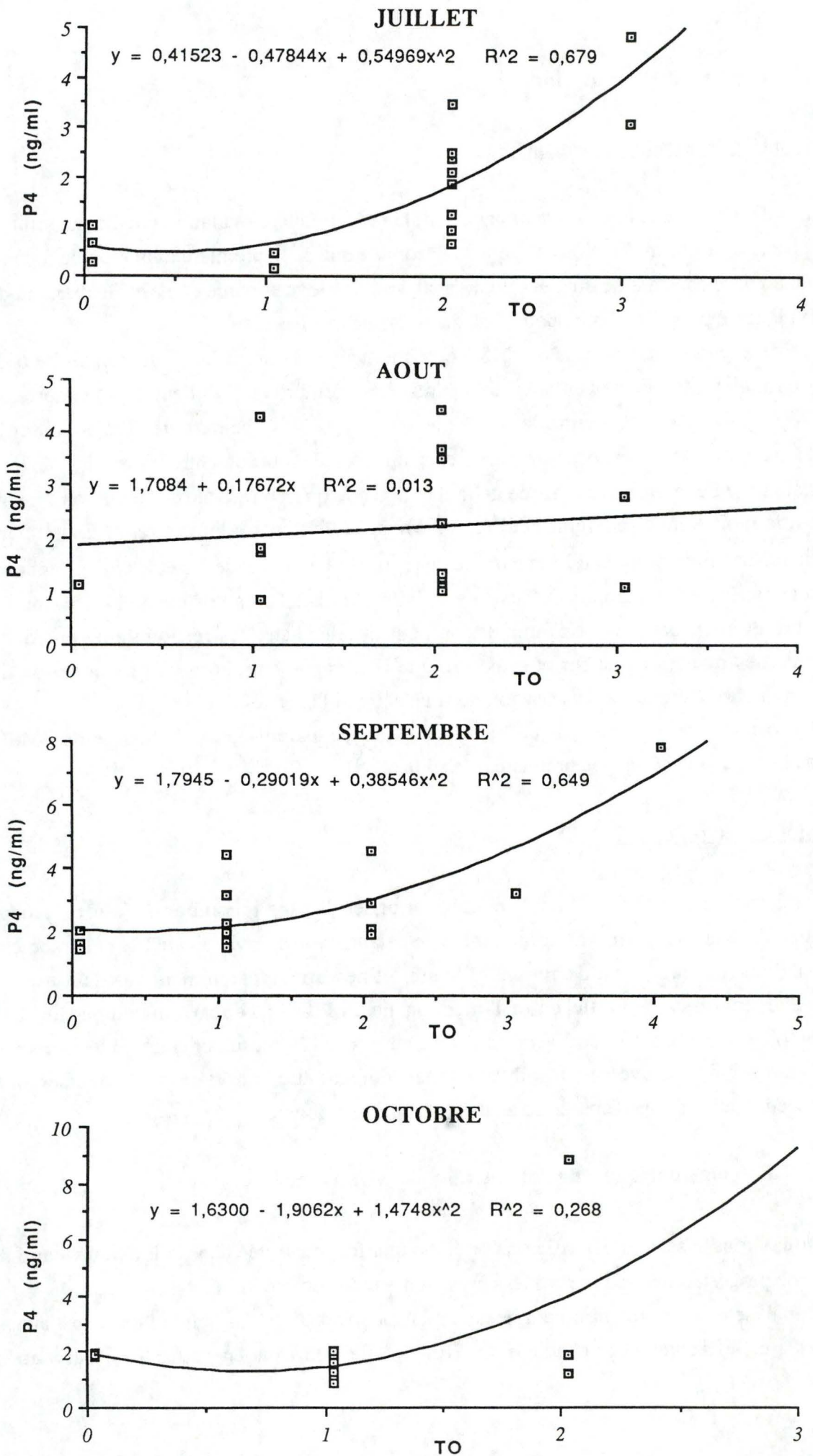


FIGURE 4: Relations entre les concentrations plasmatiques moyennes de P4 produite par le(s) corps jaune(s) et le taux d'ovulation.

antérieures; nous n'observons de relation significative entre les deux variables que pour les mois de juillet et septembre.

JUILLET	r= 0,82	P= 0,001
AOUT	r= 0,11	P= 0,69
SEPTEMBRE	r= 0,80	P= 0,001
OTOBRE	r= 0,51	P= 0,21

Il est étonnant de constater que la corrélation entre le taux de P4 et le taux d'ovulation est significative avec les brebis du groupe A (juillet et septembre) et non avec les brebis du groupe B (août et octobre).

D.2. Etude de la MELATONINE

Rapellons qu'un traitement par injection sous-cutanée de mélatonine dissoute dans de la graisse de boeuf a été réalisé le 13 juin 1989 sur la moitié d'un troupeau de 74 brebis adultes, l'autre moitié servant de lot témoin. Des prélèvements sanguins ont été effectués puis les cycles des brebis ont été induits et synchronisés par le placement d'une éponge vaginale et une injection de PMSG. Ensuite, les animaux ont été inséminées artificiellement selon deux techniques: l'insémination exocervicale et l'insémination intra-utérine. Les brebis non gestantes après l'insémination artificielles ont été présentées au bélier lors de leurs retours en chaleur.

a. Efficacité du traitement.

L'administration de mélatonine (MEL) cristalline suspendue dans de la graisse de boeuf par injection sous-cutanée devait entraîner une hausse rapide de la concentration plasmatique de MEL, mais nous ignorions la durée pendant laquelle cet effet se ferait sentir.

Les dosages de la mélatonine plasmatique ont été effectués sur des prélèvements sanguins réalisés l'après-midi des 7, 22 et 27^{èmes} jours après l'injection.

Les concentrations plasmatiques moyennes de mélatonine aux jours 7, 22 et 27 après l'injection (tableau 10) sont respectivement de 246,5 ; 46,7 et 46 pg/ml dans le groupe traité et de 99,6 ; 51,9 et 50,4 pg/ml dans le groupe contrôle.

La figure 5 représente l'évolution de ces concentrations au cours du temps. Nous pouvons constater que les concentrations plasmatiques moyennes de MEL sont supérieures à celles du groupe contrôle 7 jours après l'injection mais qu'au 22^{ème} jour, il n'est plus possible

TABLEAU 10: Concentrations plasmatiques diurnes moyennes de **mélatonine** (\bar{X}) en pg/ml et leur valeur de dispersion (SE).

	MELATONINE		CONTROLE	
	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE
19/6/89	246,46	68,88	99,62	36,59
5/7/89	46,68	12,38	51,95	20,79
11/7/89	46,03	10,61	50,36	12,59

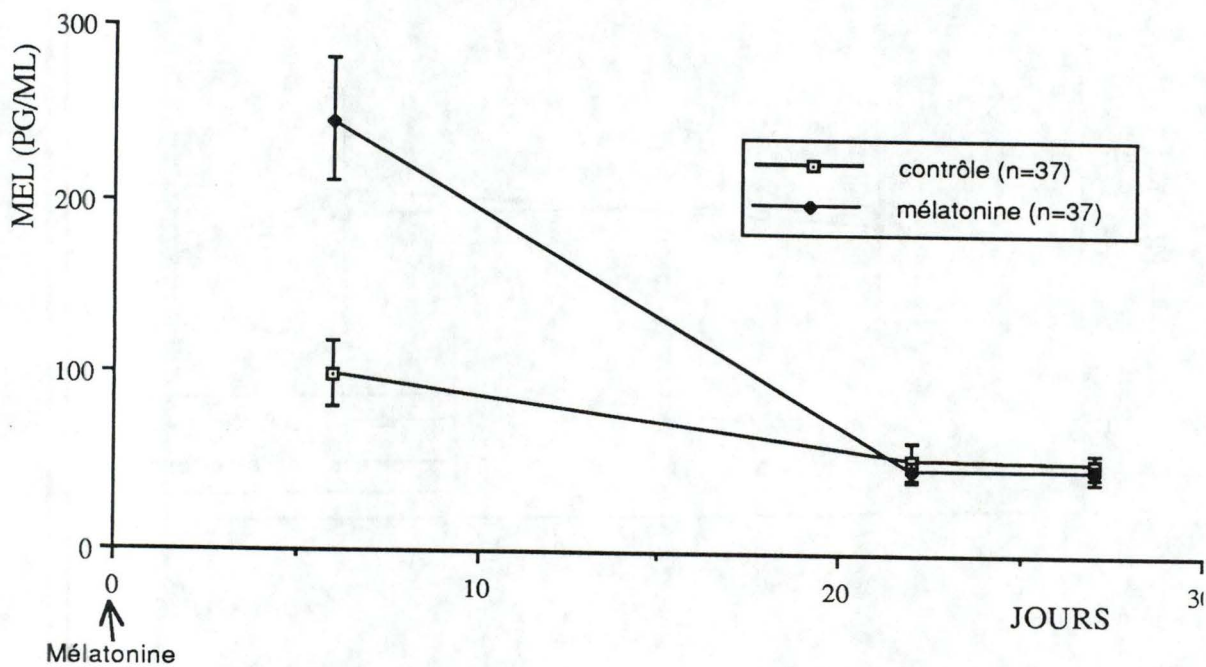


FIGURE 5: Evolution des concentrations plasmatiques diurnes de **mélatonine** après injection de MEL sous-cutanée dans de la graisse de boeuf, le 13 juin 89.

TABLEAU 11: Concentrations plasmatiques diurnes moyennes de prolactine (\bar{X}) en ng/ml et leur valeur de dispersion (SE).

	MELATONINE		CONTROLE	
	\bar{X}	SE	\bar{X}	SE
19/6/89	31,95	21,1	34,46	22,55
5/7/89	36,75	29,02	34,07	30
11/7/89	29,6	27,3	29,41	18,58

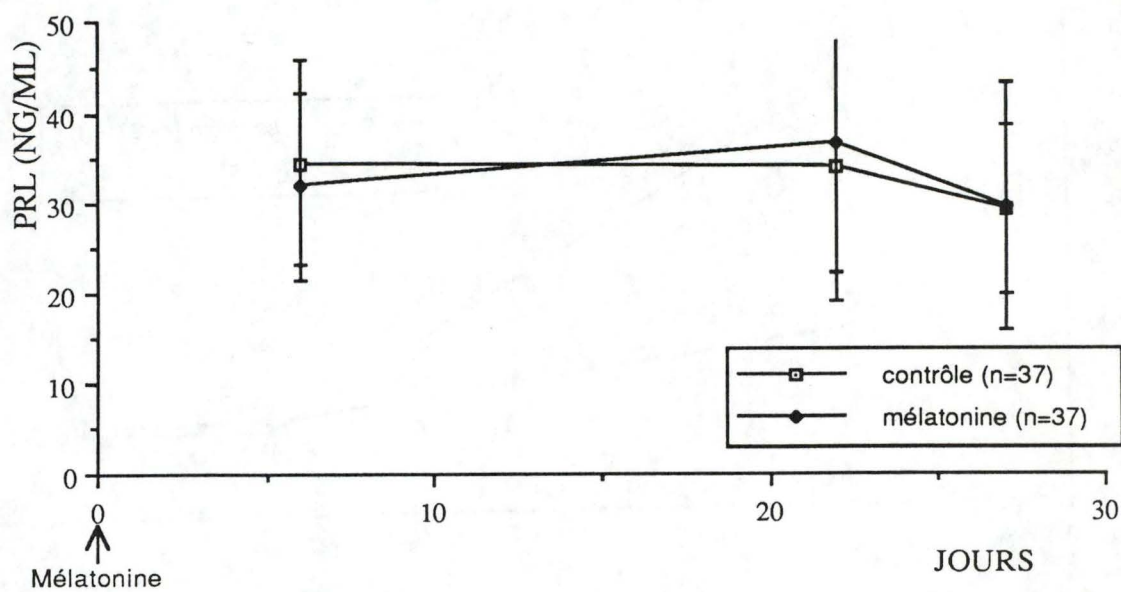


FIGURE 6: Evolution des concentrations plasmatiques diurnes de prolactine après injection de MEL sous-cutanée dans de la graisse de boeuf, le 13 juin 89.

de distinguer de différence entre les deux groupes. Ces résultats apportent la preuve que l'injection de MEL dans de la graisse de boeuf permet de maintenir des concentrations diurnes élevées en MEL pendant plus d'une semaine.

Signalons aussi que les taux de MEL plasmatiques peuvent varier de façon importante d'un individu à l'autre au sein du même groupe. C'est ainsi que des valeurs de 25 à 600 pg/ml ont été observées dans le groupe mélatonine au 7^{ème} jour.

b. Influence du traitement sur le taux plasmatique de PRL.

La figure 6 représente les résultats du dosage de la PRL effectué à partir des échantillons de plasma qui ont servi au dosage de la MEL. Les concentrations plasmatiques de PRL (tableau 11) aux jours 7, 22 et 27 sont respectivement de 31,9 ; 36,7 et 29,6 ng/ml dans le groupe traité et de 34,5 ; 34 et 29,4 ng/ml dans le groupe témoin.

Il n'est pas possible de distinguer de différence entre les taux plasmatiques moyens de PRL du groupe MEL et du groupe contrôle. La variabilité individuelle dans les taux de PRL observés est relativement importante et masque peut-être un effet des taux plasmatiques de mélatonine élevés.

c. Entrée en cycles des brebis.

L'étude de l'entrée en cycles des brebis avant le 11 juillet 89, date de la pose des éponges, a été faite sur la base du dosage de P4, dont les teneurs supérieures à 0,4 ng/ml sont indicatrices de la présence d'un corps jaune actif à la surface de l'ovaire. Les résultats obtenus montrent que 16% des brebis (n=74) sont en cycle au début du mois de juillet.

Les pourcentages de brebis en cycle à l'intérieur de chaque groupe sont de 19% dans le lot témoin et de 13% dans le lot mélatonine.

On peut constater que le traitement à la MEL réalisé le 13 Juin 89 n'a pas permis d'accélérer l'entrée en saison de reproduction puisqu'il y a un nombre comparable de brebis en cycle dans les 2 lots.

D'autre part, le faible pourcentage (16%) de brebis en cycle à ce moment de l'année indique que cette époque constitue probablement le début de la saison de reproduction pour une partie du troupeau.

TABLEAU 12: Fertilité en fonction du traitement à la mélatonine et en fonction du type d'insémination.

	MELATONINE	CONTROLE	MOYENNES
IAu	14/19= 73,6%	11/19= 57,9%	25/38= 65,8%
IAc	5/18= 27,7%	5/18= 27,7%	10/36= 27,7%
MOYENNES	19/37= 51,3%	16/37= 43,2%	35/74= 47,3%

TABLEAU 13: Prolifictés moyennes des brebis en fonction du traitement à la mélatonine et en fonction du type d'insémination.

	MELATONINE	CONTROLE	MOYENNES
IAu	20/14= 1,43	13/11= 1,18	33/25= 1,32
IAc	7/5= 1,40	6/5= 1,20	13/10= 1,30
MOYENNES	27/19= 1,42	19/16= 1,18	46/35= 1,31

d. Effet du traitement sur le taux d'ovulation.

Un éventuel effet favorable du traitement à la MEL sur le taux d'ovulation a été testé par détection du nombre de corps jaunes s'étant développés suite à l'induction de l'ovulation par la PMSG. Pour ce faire, nous avons pratiqué des endoscopies 8 jours après l'insémination artificielle, sur deux lots de 10 brebis, l'un représentant le groupe MEL l'autre, le groupe contrôle.

Nous avons observé un taux d'ovulation moyen de 2,7 parmi les brebis ayant été traitées à la MEL et de 1,3 chez les brebis témoins.

Une comparaison de moyennes par le test t de Student montre un effet hautement significatif du traitement sur le taux d'ovulation ($\alpha=0,01$).

e. Fertilité et prolificité.

Après l'insémination artificielle

Les tableaux 12 et 13 synthétisent les fertilités et prolificités calculées à partir des résultats des agnelages.

La fertilité globale du troupeau est de 47,3% et la prolificité moyenne est de 1,31.

Le **traitement à la mélatonine** semble avoir augmenté légèrement la fertilité (51,3% contre 43,2%) et la prolificité (1,42 contre 1,18). Mais les analyses statistiques ne nous permettent pas de montrer que la mélatonine a une influence sur la fertilité ($X^2_{\text{obs}} = 0,49$) ou sur la prolificité ($P=0,28$).

Le **mode d'insémination artificielle** a une forte influence sur la fertilité; celle-ci est de 65,8% par insémination intra-utérine pour 27,7% par insémination exocervicale.

Par contre, la prolificité est semblable pour les deux modes d'insémination: 1,32 en intra-utérine et 1,30 en exocervicale.

Les analyses statistiques confirment que la fertilité dépend du mode d'insémination ($X^2_{\text{obs}} = 10,72$) tandis que la prolificité n'est pas différente ($P = 0,98$).

Lors des retours en chaleur

La **fertilité** étudiée sur toutes les brebis non gestantes suite à l'insémination artificielle est de 69%.

Elle est de 67 % chez les brebis issues du groupe traité à la mélatonine et de 71,5% chez les autres. Nous pouvons donc constater qu'il n'y a pas de différence de fertilité entre les deux groupes lors des retours en chaleur ($X^2_{\text{obs}} = 1,95$).

La **prolificité** moyenne de toutes les brebis étant revenues en chaleur est de 1,2. Elle est plus faible parmi les brebis originaires du groupe mélatonine (1,08) que parmi les brebis issues du lot témoin (1,33).

On peut donc constater que si la mélatonine avait éventuellement eu un effet sur la fertilité et la prolificité à l'insémination, il ne se manifeste plus lors des retours en chaleur.

E. Discussion.

E.1. L'entrée en saison de reproduction.

Dans nos régions, les brebis SUFFOLK sont fréquemment inséminées naturellement ou artificiellement en juillet ou en août. Mais les résultats obtenus dans ces conditions sont souvent médiocres malgré le placement d'éponges et les injections de PMSG qui permettent d'induire les chaleurs chez la majorité des brebis au cours de la saison de reproduction (BISTER et al., 1987).

Les pourcentages de brebis en cycle observés avant le 11 juillet (16,2 %; étude de la mélatonine) et avant le 31 juillet (40 %; étude de la PMSG) nous permettent peut-être d'expliquer ces mauvais résultats. Le mois de juillet semble être le commencement de la saison de reproduction chez une partie des brebis. Mais pour la majorité, la rentrée en cycle n'a lieu qu'au cours des mois suivants.

POULTON (1988) n'observe pas de rentrée naturelle en cycle de brebis croisée SUFFOLK avant le mois de septembre. Mais il est possible qu'à force d'utiliser chaque année la SUFFOLK pour d'obtenir des "agneaux de Pâques", des brebis ayant une saison de reproduction précoce aient été sélectionnées dans nos troupeaux .

E.2. La PMSG.

La dose de PMSG semble importante dans la réussite de **l'induction et de la synchronisation des ovulations**; La dose de 800 UI serait préférable à celle de 500 UI afin de provoquer l'ovulation chez un plus grand nombre de brebis (85 % pour 67 %), que l'on soit en tout début (juillet) ou en pleine saison de reproduction (octobre). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux de NOEL (1989) qui, ayant de meilleurs résultats avec 500 UI en octobre a suggéré que la dose de PMSG soit diminuée en saison de reproduction.

D'autre part, nous n'avons pas pu mettre en évidence une influence du mois sur l'efficacité du traitement de synchronisation et d'induction des ovulations. Le pourcentage de brebis répondant au traitement est semblable pour les quatre mois (74 %) à l'exception du mois d'août (89 %).

La PMSG est utilisée afin de mieux synchroniser les ovulations mais aussi afin de stimuler l'ovaire de façon à obtenir un **taux d'ovulation (TO)** élevé.

Le TO naturel chez la SUFFOLK est de l'ordre de 1,5 en saison de reproduction (NOEL, communication personnelle). Nous avons effectivement obtenus des TO supérieurs à 1,5 mais certains étaient inférieurs (septembre avec 800 UI et octobre avec 500 UI). Il semble donc que les doses de PMSG utilisées ont un effet superovulatoire relativement limité. Des résultats similaires avaient déjà été obtenus par NOEL (1989).

L'importance de ces doses ne semble pas influencer le taux d'ovulation. WEBB et al. (1989) suggèrent d'ailleurs, que le contrôle du taux d'ovulation n'est pas lié à des facteurs hypophysaires mais dépend plutôt de régulations intra-ovariennes malgré un contrôle des hormones gonadotropes sur la croissance et la maturation folliculaire.

Notons aussi que le TO varie grandement d'un individu à l'autre; la brebis 58 a eu 3 et 4 ovulations respectivement en juillet et septembre alors que la brebis 42 n'a jamais répondu au traitement. Plusieurs auteurs soulignent l'importante disparité dans les réponses individuelles de brebis non-prolifiques à la PMSG (BISTER et al., 1983; HEINS et al., 1986; QUIRCKE et al., 1987).

Selon la littérature, le TO moyen augmente au fur et à mesure que l'on s'approche du milieu de la saison de reproduction (MONGOMERY et al., 1988).

Nos résultats ne nous permettent pas de conforter cette hypothèse et seraient même en désaccord, étant donné la diminution progressive des TO enregistrés du mois de juillet (1,93) à octobre (1,27). Une explication de ce phénomène serait que le premier traitement à la PMSG influence les cycles ultérieurs en modifiant l'environnement hormonal, en induisant la formation d'anti-corps contre la PMSG ou en entraînant une perte de réceptivité et une désensibilisation des cellules ovariennes aux hormones gonadotropes, provoquées par la longue demi-vie de la PMSG (HEINS et al., 1986). Pourtant, la PMSG a une demi-vie de 5 à 6 jours et l'intervalle entre les deux séries d'endoscopies est de 2 mois. DRIANCOURT (1987) observe aussi une diminution des taux d'ovulation lors de stimulations répétées à la PMSG.

Les relations contradictoires entre les TO et les poids corporels rendent plutôt compte d'une variabilité individuelle très importante dans la réponse à la PMSG que d'une réelle influence du poids sur le TO. Nous ne pouvons donc comparer nos résultats avec ceux de SCARAMUZZY et RADFORD (1983) et de MONGOMERY et al. (1988) qui considèrent que la relation est linéaire et positive.

Le moment de l'ovulation est important car c'est lui qui détermine le moment auquel seront injectés les spermatozoïdes lors de l'insémination artificielle.

Bien que COGNIE et al. (1970) aient observé un raccourcissement de l'intervalle entre l'injection de PMSG et l'heure d'ovulation avec une augmentation de la dose de PMSG, notre

expérience ne montre pas de différence significative entre les deux doses dans le moment d'ovulation. Une expérience similaire à la notre, réalisée par NOEL (1989) aboutissait à la même conclusion. Par contre, le pic de LH et l'ovulation sont plus précoces lorsqu'on se rapproche du milieu de la saison de reproduction. Ces effets ont déjà été observés par COGNIE et al. (1970) qui a montré que seul, le moment d'apparition de l'oestrus était modifié en fonction de la saison. La diminution des délais d'ovulation est liée à la variation saisonnière de sensibilité du système nerveux central au feed-back négatif des oestrogènes (EVANS et ROBINSON, 1980).

L'analyse des histogrammes représentant **les populations folliculaires moyennes** est rendue difficile par une variabilité importante entre les mois et pour chaque dose de PMSG. Cette variabilité est probablement à imputer aux réponses individuelles divergentes suite à la synchronisation et à l'induction des ovulations. Mais aussi à l'imprécision même de la technique d'observation qui est fort subjective dans la répartition en catégories de tailles.

Le nombre plus important ou équivalent de moyens follicules par rapport aux petits follicules pourrait peut-être s'expliquer par un recrutement de très petits follicules (0,8 à 2mm) par la PMSG (DRIANCOURT, 1987) . Par contre, JACQUES (1989) pense que seuls les follicules ayant une taille supérieure à 2 mm sont sensibles à l'action des gonadotropines. La PMSG pourrait aussi sauver les follicules en début d'atrésie et empêcher les follicules antraux de dégénérer (MOORE et al., 1981; cités par NOEL, 1989).

On note une différence nettement marquée dans le nombre de moyens follicules entre les populations folliculaires de la première (juillet, août) et de la deuxième (septembre, octobre) séries d'endoscopies. Celle-ci s'explique peut-être par la perte de réceptivité et la désensibilisation des cellules ovariennes aux hormones gonadotropes provoquées par la PMSG. Cette désensibilisation empêcherait le recrutement de très petits follicules par la PMSG.

Il aurait été probablement souhaitable de pratiquer des endoscopies sur de "nouvelles" brebis chaque mois, mais il nous était impossible de disposer d'un aussi grand nombre d'animaux.

E.3. La MELATONINE

L'injection à des ovins de mélatonine placée dans de la graisse de boeuf n'avait encore jamais été pratiquée.

L'efficacité de l'injection, afin de laisser diffuser de la MEL, semble bien avoir été prouvée par nos résultats, confirmant en cela, ceux déjà obtenus par SHARPE (1986) sur des bovins. Cet auteur a injecté 500 mg de MEL par vache et observe des concentrations diurnes en MEL plus élevées que chez les témoins pendant 2 semaines.

L'objectif principal de ce traitement était d'avancer **la saison de reproduction** des brebis. D'après les résultats enregistrés avant la pose des éponges, cet effet n'a pas été observé.

Il se pourrait que les concentrations plasmatiques en MEL, le temps d'exposition à des taux de MEL élevés ou le délai d'attente n'aient pas été suffisants. Pour NOWACK et RODWAY (1987), le temps d'exposition doit être d'au moins 5 semaines pour être efficace. PIRAUX (1990) observe que des brebis TEXEL traitées par implants de mélatonine le 2 juin, rentrent en cycle 10 semaines plus tard. Le traitement effectué par cet auteur a permis d'avancer la saison de reproduction de 3 semaines par rapport à un lot témoin.

L'intervalle de temps entre l'injection de MEL et le début du traitement de synchronisation (4 semaines) semble court pour observer une avance significative des cycles dans le groupe traité. Mais il ne faut pas oublier que le traitement à la MEL ne peut être effectué avant une exposition préalable des brebis aux jours longs (NETT et NISWENDER, 1982; ENGLISH et al., 1986).

Ce traitement à la MEL devrait dès lors être réalisé aux environs de la mi-mai pour avoir un effet stimulateur sur l'entrée en saison de reproduction des brebis SUFFOLK dans nos régions.

Les endoscopies réalisées après l'induction et la synchronisation des ovulations nous a permis de déterminer **le taux d'ovulation**.

Nos résultats montrent une très nette différence ($P < 0,01$) entre les deux groupes (2,7 dans le groupe MEL pour 1,3 dans le groupe témoin). KOUIMTZIS et al. (1989) avaient déjà observé des TO plus élevés chez des brebis traitées à la MEL que chez les témoins, sans pour autant que les différences soient significatives.

L'augmentation des taux d'ovulation pourrait difficilement s'expliquer uniquement par l'hypothèse de WIGZELL et al. (1986) qui suggèrent que les TO lors des oestrus avancés par la MEL peuvent atteindre des niveaux comparables à ceux du milieu de la saison de reproduction. Il se pourrait par contre, que la MEL s'étant trouvée à des concentrations diurnes et nocturnes

élevées pendant plus d'une semaine, ait facilité la libération de GnRH ou le feed-back positif des stéroïdes sur la libération de LH lors du pic préovulatoire. Une telle influence de faibles doses de MEL exogène a déjà été montrée par MOGUILEVSKY et al. (1979) chez le rat. Mais SYMONS et al. (1983) n'observent pas chez le mouton, de différence entre le jour et la nuit dans la réponse de la LH à la GnRH.

L'absence de différence dans **les taux de PRL** entre les brebis traitées à la mélatonine et les témoins ne correspond pas aux résultats généralement publiés dans la littérature. KENNAWAY et al. (1982) ont montré que la MEL exogène provoque une diminution des concentrations plasmatiques de PRL. SYMONS et al. (1983) ainsi que POULTON et al. (1986) aboutissent à la même conclusion. PIRAUX (1990) observe aussi que des implants de MEL placés le 2 juin et le 27 juillet sur des brebis TEXEL provoquent de nettes diminutions des taux plasmatiques de PRL.

Nos résultats nous font penser que notre traitement à la MEL n'a pas d'influence sur les taux plasmatiques de PRL mais il serait utile de réaliser d'autres essais afin de confirmer ou d'infirmer ce fait car une diminution des taux de PRL peut être masquée par la variabilité individuelle importante.

Les analyses statistiques de nos résultats ne permettent pas d'affirmer que **la fertilité et la prolificité** sont influencées par le traitement à la MEL, néanmoins, on observe des prolificités supérieures dans le groupe mélatonine ($\bar{X}=1,42$) que dans le groupe témoin ($\bar{X}=1,18$). Comme nous, KOUIMTZIS et al. (1989) avaient déjà relevé des prolificités plus élevées chez des brebis traitées à la MEL, sans pour autant que les différences soient statistiquement significatives.

La fertilité semble elle aussi être légèrement augmentée par le traitement à la mélatonine bien que les différences ne soient pas significatives (51,3% dans le lot traité et 43,2% dans le lot témoin).

Les prolificités que nous avons observées sont à mettre en relation avec la nette différence de taux d'ovulation entre les 2 groupes (2,7 et 1,3). L'écart entre les taux d'ovulation et les prolificités est probablement dû en grande partie, à la mortalité embryonnaire précoce. Il semble que celle-ci soit plus conséquente si le nombre d'embryons est plus élevé. Cela est probablement dû à la capacité limitée de l'utérus à accueillir plusieurs embryons. Une mauvaise maturation ovocytaire ou un environnement hormonal défavorable suite à la synchronisation par l'éponge de progestagènes peuvent également intervenir mais ces deux derniers facteurs agissent de la même manière pour les deux lots de brebis. La glaire cervicale, par une modification du rapport oestrogènes/progestérone au cours du traitement hormonal, provoque un ralentissement de la pénétration des spermatozoïdes et s'oppose à l'établissement et au maintien d'une population de gamètes vivants et mobiles.

Lors des retours en chaleurs, nous n'observons plus d'effet favorable du traitement à la MEL. En effet, nous avons de meilleurs résultats de fertilité et de prolificité dans le groupe témoin bien que les différences avec le groupe mélatonine demeurent faibles.

E.4. Le mode d'insémination.

Il ressort clairement de nos résultats que l'insemination artificielle intra-utérine (IAu) présente un net avantage sur l'insémination exo-cervicale (IAC); la prolificité est semblable mais la fertilité est plus que doublée par l'IAu. Les avantages indéniables de l'IAu sont de court-circuiter le passage du cervix, défavorable à la pénétration des gamètes surtout après un traitement aux progestagènes et de diminuer la quantité de spermatozoïdes injectés. Cette technique qui se développe en Australie et en Angleterre est plus lourde et plus traumatisante car elle nécessite une petite opération chirurgicale sous anesthésie locale mais elle semble très prometteuse.

Il se pourrait que l'on puisse encore améliorer les résultats en pratiquant l'IAu non pas 55 à 60 heures après l'injection de PMSG, mais bien 60 à 66 heures après, de façon à ce que les manipulations du tractus génital se passent juste après l'ovulation et n'interfèrent pas avec la capture des ovules par l'oviducte.

F. Conclusions.

Les études d'entrée en saison de reproduction des brebis permettent de considérer le mois de juillet comme étant le tout début de la saison de reproduction des brebis suffolk dans nos régions et de constater qu'il existe une variabilité individuelle importante à ce niveau.

L'étude de la PMSG permet d'établir que:

- le traitement hormonal de synchronisation et d'induction des cycles par administration vaginale de progestagènes et injection de PMSG permet de provoquer l'ovulation chez plus de 75% des brebis.
- la dose de 800 UI de PMSG est préférable à celle de 500 UI pour induire l'ovulation en saison de reproduction (juillet à octobre).
- les doses utilisées ne permettent pas de mettre en évidence un réel effet superovulatoire de la PMSG.
- l'ovulation devient de plus en plus précoce au cours du début de la saison de reproduction (juillet à octobre) tandis que délai entre l'apparition du pic de LH et l'ovulation est de 22 heures et semble rester constant au cours des mois envisagés (juillet, août et septembre).

L'étude de la mélatonine permet de conclure que:

- la technique d'injection sous-cutanée de mélatonine cristalline dans de la graisse de boeuf permet de maintenir des concentrations diurnes élevées pendant plus d'une semaine.
- ce traitement tel qu'il a été appliqué est inefficace pour avancer la saison de reproduction des brebis Suffolk.
- suite à une induction et une synchronisation des ovulations, la mélatonine semble avoir un effet superovulatoire et augmenterait peut-être la prolificité et la fertilité du troupeau.
- la MEL exogène ne paraît pas modifier les concentrations diurnes de PRL.

L'étude du mode d'insémination montre que l'insémination intra-utérine aboutit à de meilleurs résultats que l'insémination exocervicale: la fertilité a plus que doublé lors de notre essai.

Bibliographie

- ALEXANDRE A., 1989. Mémoire pour l'obtention du grade de Licencié en biologie: Effets de traitements hormonaux sur le maintien de l'activité cyclique de la brebis Texel. FUNDP, Namur.
- ARENDRT J., 1985. Mammalian pineal rhythms. *Pineal Res. Rev.* 3, 161-213.
- ARENDRT J. and RAVAUULT J-P., 1988. Suppression of melatonin secretion in Ile-de-France rams by different light intensities. *Journal of Pineal Research* 5, 245-250.
- BISTER J.L., 1980. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences: Influence de la photopériode sur la physiologie de la reproduction de la brebis Texel. FUNDP, Namur.
- BISTER J.L., ARTOISENET.P. et PAQUAY R. 1983. Traitements hormonaux et productivité de la brebis Texel en saison normale de reproduction. *Revue de l'Agriculture*, 36(5), 1451-1458.
- BISTER J.L., HEINS T. et PAQUAY R. 1986. PMSG and fertility of the Texel ewe. *Archives internationales de Physiologie et de Biochimie.* 95(2).
- BISTER J.L., CALUS A.C. et PAQUAY R., 1987. Accélération des processus de reproduction. *Revue de l'agriculture* 3(40), 675-684.
- BISTER J.L., 1989. Cours de première licence en Biologie : Physiologie animale, FUNDP, Namur.
- BRÄNNSTRÖM M. 1988. Mechanism of ovulation : studies using the in vitro perfused rat ovary.
- CAHILL L.P. and DUFOUR J., 1979. Follicular populations in the ewe under different gonadotrophin levels. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 19(5), 1474-1481.
- CALLESEN H., TORBEN G. et POOL H., 1986. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 25(21), 71-85.
- CARDINALI D. P., 1981. Melatonin. A mamalian pineal hormone. *Endocrine Reviews*, 327-346.
- COGNIE Y., MARIANA J-C et THIMONIER J, 1970. Etude du moment d'ovulation chez la brebis normale ou traitée par un progestagène associé ou non à une injection de PMSG. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 10(I), 15-24.
- COGNIE Y., SCHIRAR A., MARTINET J., POULIN N. et MIRMAN B., 1984. Activité reproductrice et maîtrise de l'ovulation chez la brebis. 9^{ème} Journées de la recherche ovine et caprine.

- COGNIE Y., 1988. Nouvelles méthodes utilisées pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. *Produc. Anim* 1(2), 83-92.
- COLLIGNON J.L., 1984. Mémoire pour l'obtention du grade de Licencié en sciences biologiques : L'effet bélier, F.N.D.P. Namur.
- COLLIN J-P., ARENDT J., GERN W. A., 1988. Le troisième oeil. *La Recherche* 203, 1154-1165.
- COMBARNOUS Y., 1987. Structure and structure-function. Relationships in gonadotropins. 26^e colloque de la société française pour l'étude de la fertilité. PARIS.
- CRAPLET C. et THIBIER M., 1980., *Le mouton*. Edition Vigot tome IV (p 163).
- DEBECKER F., 1984. *Hormonologie Vétérinaire*. Lexique. Intervet.
- DERIVAUX J. et ECTORS F., 1986. Reproduction chez les animaux domestiques. CABAY, Louvain-la-Neuve. 219-225.
- DERYCKE G., BISTER J.L., PAQUAY R., 1987. Comparison between FGA and MAP impregnated sponges on the fertility and fecundity of the Texel ewe in the breeding season. *Soc. Belge de Physiologie et de Pharmacologie*, Liège 95 (3), 62.
- DIELEMAN S.J. and BEVERS M.M., 1987. Effects of monoclonal antibody against PMSG administered shortly after the preovulatory LH surge on time and number of ovulations in PMSG/PG-treated cows. *J. Reprod. Fert.* 81, 533-542.
- DI ZEREGA G.S. et HODGEN G.D., 1981. Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr. Rev.* 2, 27-49.
- DRIANCOURT M.A., GIBSON W.R. et CAHILL L.P., 1984. Follicular dynamics throughout the oestrus cycle in sheep. A Review. *Reprod. Nutr. Develop.*, 25 (IA), 1-15.
- DRIANCOURT M.A. , GAILD I.K., TERQUI M. et WEBB R., 1986. Variations in patterns of follicle development in prolific breeds of sheep. *J. Reprod. Fert.*, 78, 565-575.
- DRIANCOURT M.A., 1987. Ovarian features contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep. *J. Reprod. Fert.* 80, 207-212.
- EARL C.R., D'OCCHIO M.J., KENNAWAY D.J. and SEAMARK R.F., 1985. Serum melatonin profiles and endocrins responses of ewes exposed to a pulse of light late in the dark phase. *Endocrinology* 117(1), 226-230.
- ENGLISH J., POULTON A.L., ARENDT J. and SYMONS A.M., 1986. A comparaison of the efficiency of the melatonin treatments in advencing oestrus in ewes. *J. Reprod. Fert.* 77, 321-327.
- EVANS G. et ROBINSON T.J., 1980. The control of fertility in sheep : endocrine and ovarian responses to progestagen-PMSG treatment in the breeding season and in anoestrus. *J. Agric. Sci., Camb.*, 94, 69-88.

- GOODMAN R.L. and KARSCH F.J., 1981. A critique of evidence on the importance of steroid feedback to seasonal changes in gonadotrophin secretion. *J. Reprod. Fert.* 30, 1-13.
- GOSLING J.P., RYAN.M. et MORGAN P., 1979. Could hormone induced loss of gonadotrophin receptors reduce the efficiency of superovulations stimulated by PMSG? *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19 (5), 1499-1509.
- GOSPODAROWICZ D., 1972. Purification and physiochemical properties of the Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG). *Endocrinology* 91(1), 101-106.
- GREYLING J.P.C., VAN DER WESTHUYSEN J-M., 1980. The synchronisation of oestrus in sheep. 3. The use of intravaginal progestagen and/or prostaglandin. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 10, 65-68.
- HARDY D., 1989. La Melatonine: effet sur la saison de reproduction et photopériodisme chez le mouton. Travail de troisième candidature vétérinaire. FUNDP, NAMUR.
- HEINS TH., BISTER J.L., ARTOISENET P., PAQUAY R., 1986. Influence d'une dose élevée de PMSG sur la fécondité des brebis Texel en saison naturelle de lutte. *Revue de l'agriculture n°2*, vol 39.
- IRELAND J.J., 1987. Control of follicular growth and development. *J. Reprod. Fert. suppl.*, 34, 39-54.
- JACQUES E., BISTER J-L. and PAQUAY R., 1986. Follicular events during the cycle in ewes with low ovulation rate. *Arch. Int. Physio. Biochim.*, 94(5), 69-70.
- JACQUES E., 1989. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences: Contrôle de la croissance terminale et de la maturation des follicules ovariens de la brebis. FUNDP, NAMUR.
- KARSCH F.J. and LEGAN S.J., 1980. Importance of E2 and P4 in regulating LH secretion and oestrus behavior during the sheep oestrus cycle. *Biol. Reprod.* 23, 404-413.
- KARSCH F.J., ROBINSON J.E., YELLON S.M., WAYNE N.L., OLSTER D.H., KAYNARD A.M., 1984. Loss of response to an inductive melatonin pattern contributes to onset of anoestrus in the ewe. *Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (abstr. 155)*.
- KARSCH F.J., MALPAUX B., WAYNE N.L. and ROBINSON J.E., 1988. Characteristics of the melatonin signal that provide the photoperiodic code for timing seasonal reproduction in the ewe. *Reprod. Nutr. Develop.*, 28(2B), 459-472.
- KENNAWAY D.J., GILMORE T.A., SEAMARK R.F., 1982. Effect of melatonin feeding on serum prolactin and gonadotropin levels and the onset of seasonal oestrus cyclicity in sheep. *Endocrinology* 110(5), 1766-1772.
- KOUMITZIS S.A., BELIBASAKI S. and DONEY J.M., 1989. Melatonin advances and condenses the onset of seasonal breeding in Greek Dairy ewes. *Anim. Prod.* 48, 399-405.

- LEGAN S.J., KARSCH F.J., 1983. Importance of retinal photoreceptors to the photoperiodic control of seasonal breeding in the ewe. *Biol. Reprod.* 29, 316-325.
- MALPAUX B., WAYNE N.L. and KARSCH F.J., 1988(a). Termination of breeding season in the Suffolk ewe. Involvement of an endogenous rhythm of reproduction. *Biology of Reproduction* 39, 254-263.
- MALPAUX, ROBINSON J.E., BROWN M.B. and KARSCH F.J., 1988(b). Importance of changing photoperiod and melatonin secretory pattern in determining the length of the breeding season in the Suffolk ewe. *J. Reprod. Fert.* 83, 461-470.
- MARSH J.M., 1976. The role of cyclic AMP in gonadal steroidogenesis. *Biol. Reprod.* 14, 30-53.
- Mc NATTY K.P., HUDSON N., GIBB M., BALL K., HENDERSON K.M., HEATH D.A., LEEN S. and KIEBOOM L.E., 1985. FSH influences follicle viability, oestradiol biosynthesis and ovulation rate in Romney ewes. *J. Reprod. Fert.* 75, 121-131.
- MOGUILEVSKY J.A., FAIGON M.R., SCACCHI P. and CARDINALI D.P., 1979. Effect of melatonin and superior cervical gangliectomy on lutéinizing hormone release induced by estradiol-progesterone in castrated rats. *Neuroendocrinology* 29, 163-168.
- MONGOMERY G.W., SCOTT I.C. and JOHNSTONE P.D., 1988. Seasonal changes in ovulation rate in Coopworth ewes maintained at different liveweights. *Animals Reproduction Science*, 17, 197-205.
- MUNRO C.J., Mc NATTY K.P. and RENSHAW L., 1980. Circa-annual rhythms of prolactin secretion in ewes and the effect of pinealectomy. *Journal of Endocrinology* 84, 83-89.
- NETT T.M. and NISWENDER G.D., 1982. Influence of exogenous melatonin in seasonality of reproduction in sheep. *Theriogenology*, 17, 645-651.
- NOEL B., 1989. Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en sciences biologiques: étude de l'action de la PMSG sur les mécanismes d'ovulation chez la brebis suffolk. FUNDP, Namur.
- NOWAK and RODWAY, 1987. Length of melatonin exposure and onset of ovarian activity in anoestrus ewes. *J. Reprod. Fert.* 80, 343-347.
- OUSSAID B., 1982. Etude de l'activité ovarienne et de la stimulation pendant l'anoestrus chez la brebis Ile-de-France. Doctorat, 3ème cycle, Paris VI.
- PANG S.F. and Yip P.C.Y., 1988. Secretory patterns of pineal melatonin in the rat. *Journal of Pineal Research* 5, 279-292.
- PAPKOFF H., 1981. Variations in properties of equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology* 15(1), 1-11.
- PEARCE D.T. and OLDHAM C.M., 1988. Ovulation in the Merino ewe in the breeding and anoestrus seasons. *Aust. J. Biol. Sci.* 41, 23-26.

- PEVET P., 1988. The role of the pineal gland in the photoperiodic control of reproduction in different hamster species. *Reprod. Nutr. Develop.* 28(23) , 433-458.
- PHILIPPON P., 1988. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en sciences: Immunisation active contre l'androstènedione et le taux d'ovulation chez la brebis. Analyse physiologique et zootechnique : Université François-Rabelais de Tours, France.
- PIRAUX C., 1990. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences: Etude de la prolactine durant les différentes phases de l'activité sexuelle chez la brebis Texel. FUNDP, NAMUR.
- POULTON A.L., ENGLISH J., SYMONS A.M. and ARENDT J., 1986. Effects of various melatonin treatments on plasma prolactin concentrations in the ewe. *J. Endocr.* 98 , 287-292.
- POULTON A.L., SYMONS A.M., KELLY M.I. and ARENDT J., 1987. Intraruminal soluble glass boluses containing melatonin can induce early onset of ovarian activity in ewes. *J. Reprod. Fert.* 80 , 235-239.
- POULTON A.L., 1988. The proposed use of Melatonin in controlled sheep breeding. *Aust. J. Biol. Sci.* 41 , 87-96.
- RAVAULT J-P, 1986. Thèse présentée pour l'obtention du grade de Docteur Es sciences: Contrôle photopériodique de la sécrétion de prolactine chez les ovins. Université François-Rabelais de Tours.
- QUIRKE J.F., MEYER H.H., LAHLOU-KASSI A., HANRAHAN J.P., BRADFORD G.E. and STABENFELDT G.H., 1987. Natural and induced ovulation rate in prolific and non-prolific breeds of s sheep in Ireland, Morocco and New-Zealand. *J. Reprod. Fert.* 81, 309-316.
- ROLLAG M.D. and NISWENDER G.D., 1976. Radioimmunoassay of serum concentrations of melatonin in sheep exposed to different lighting regimens. *Endocrinology* 98 , 482-489.
- ROLLAG M.D., O' CALLAGAN P.L., NISWENDER G.D., 1978. Serum melatonin concentrations during different stages of the annual reproductive cycle in ewes. *Biol. Reprod.* 18, 279-285.
- RONAYNE E., JORDAN B., QUIRKE J.F. and ROCHE J.F., 1989. The effect of frequency of administration of melatonin on the time of onset of the breeding season in anoestrus ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 18, 13-24.
- SCARAMUZZI R.J. et RADFORD M.M., 1983. Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J. Reprod. Fert.*, 69, 353-367.
- SHARPE P.H., GIFFORD D.R., FLAVEL P.F., NOTTLE M.B. and ARMSTRONG D.T., 1986 . Effect of melatonin on postpartum anoestrus in beef cows. *Theriogenology* 26(5), 621-629.
- SHRESTHA J.N.B. and HEANNEY D.D., 1987. Genetic basis of variation in reproductive performance. 1. Ewe lambs treated with fluorogestone acetate and PMSG in a controlled environment. *Animal Reproduction Science* 14 , 281-291.

- SYMONS A.M., ARENDT J. and LAUD C.A., 1983. Melatonin feeding decreases prolactin levels in the ewe. *Journal of Endocrinology* 99, 41-46.
- STAPLES L.D., Mc PHEE S., REEVES J., KENNAWAY D. and WILLIAMS A., 1986. A novel melatonin treatment to enhance prolificacy in sheep. *Proc. Soc. Study Fert.* 130 (abst).
- THIBAUT C., SZÖLLOSI D., GERARD M., 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Develop.*, 865-896.
- THIBIER M., 1981. Hormonologie de la reproduction, un nouveau concept: la régulation endocrine par modulation de fréquence. *Rec. Med. Vet.*, 157(1), 15-28.
- TITECA E., 1987. Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Licencié en sciences. Etude des effets de l'immunisation active contre l'androstenedione sur l'activité ovarienne de la brebis Texel. FUNDP, NAMUR.
- TSONIS C.G., CARSON R.S. et FINDLAY J.K., 1984. The relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17 β and testosterone concentrations and diameter and atresia of individual ovine follicles. *J. Reprod. Fert.*, 72, 153-163.
- WAYNE L., MALPAUX B. and KARSCH F.J., 1988. How does melatonin code for day length in the ewe. Duration of nocturnal melatonin release or coincidence of melatonin with a light-entrained sensitive period? *Biology of Reproduction* 39, 66-75.
- WEBB R. et GAULD I.K., 1984. Final Maturation of the preovulatory follicle in the ewe. Dans : Période péri-ovulatoire. Ed. Sarat-Baroux J. et Thibault Ch, 21-31, Masson.
- WEBB R., GAULD I.K. and DRIANCOURT M.A., 1989. Morphological and functional characterization of large antral follicles in three breeds of sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fert.* 87, 243-255.
- WHYMAN D. and MOORE R.W., 1980. Effects of PMSG and the prostaglandin F $_{2\alpha}$ analogue, Cloprostenol, on superovulation, fertilization and egg transport in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 60, 267-272.
- WIGZELL S., ROBINSON J.J., AITKEN R.P. and Mc KELVEY W.A.C., 1986. The effect of the oral administration of melatonin at two times of the year on ovarian activity in ewes. *Animal Production* 42, 448-449(abst.).

Annexes

Annexe 1: Synthèse des résultats obtenus lors du mois de juillet.

JUILLET

Brebis	Age (années)	poids (KG)	Dose de PMSG	TO	P4 du CJ (ng/ml)	Délais PMSG pic LH (heures)	Délais PMSG/ ovulation (heures)	Surface du pic LH	Amplitude du pic LH (ng/ml)	Population FOLLICULAIRE			
										< à 2mm	2 à 4 mm	4 à 6 mm	> 6 mm
37	7	68,0	500	1	0,00	40	62,00	32,06	13,33	12	5	2	1
79		70,5	500	1	0,30	42	60,75	53,13		1	6	8	2
48	6	67,3	500	0	0,11					4	5	2	1
51	6	57,5	500	2	0,50	40,5	58,75			16	14	2	2
58	5	54,0	500	3	4,70	38	59,00	97,47	52,47	0	6	7	3
63	5	59,5	500	0	0,51					2	12	3	0
42	6	73,5	500	0						5	4	1	0
70	5	67,3	800	2	2,24	40	63,50	68,47	25,75	9	3	5	2
76	5	67,0	800	2	3,33	40	64,00	124,62	64,68	3	10	3	2
69	4	72,0	800	2	1,10		61,00	61,68	33,92	0	14	2	4
83	4	68,0	800	0						1	4	4	0
92	4	61,0	800	2	1,71	38	62,00	65,92	29,52	6	13	4	2
86	4	61,5	800	2	2,33	38	62,25	80,23	45,44	0	11	2	3
90	4	64,0	800	2	0,77	44	64,52	45,15	17,91	0	5	7	3
103	4	68,5	800	0	0,85	44		62,36	23,96	4	7	4	1
108	3	62,5	800	2	1,95		60,08			1	14	2	4
89	4	64,0	800	3	2,93	38	60,33	90,06	39,09	2	31	2	6
388	2	46,5	800	2		46	60,66	11,41	11,41	1	8	2	6
25	7	66,0	800	1		38	62,00	46,70	17,80	12	2	5	1

Annexe 3: Synthèse des résultats obtenus lors du mois de septembre.

SEPTEMBRE

Brebis	Age (années)	poids (KG)	Dose de PMSG	TO	P4 du CJ (ng/ml)	Délais PMSG /pic LH (heures)	Délais PMSG/ ovulation (heures)	Surface du pic LH	Amplitude du pic LH (ng/ml)	Population FOLLICULAIRE			
										< à 2mm	2 à 4 mm	4 à 6 mm	> 6 mm
25	7	66,0	800	1	1,42		56,66	35,17	13,78	8	6	0	1
69	4	72,0	800	0						10	5	1	0
42	6	73,5	500	0	1,20					0	1	2	0
37	7	68,0	500	2	1,86	38	60,75	50,81	16,78	4	10	0	2
70	4	67,3	800	1	2,92		59,16	79,86	22,26	5	5	0	1
48	6	67,3	500	0	1,40					6	4	2	1
63	5	59,5	500	0						5	3	1	1
76	5	67,0	800	1		38	63,58	73,63	25,65	7	4	1	1
83	4	68,0	800	1	4,17	34	58,50	70,43	27,32	9	8	0	1
58	5	54,0	500	4	7,59	36	58,50	84,67	30,53	1	5	0	4
86	4	61,5	800	2	1,67	34	59,58	60,27	25,16	5	5	1	2
51	6	57,5	500	2	2,66	36	59,21	18,30	11,58	18	14	0	2
108	3	62,5	800	1	2,05	37	60,50	64,30	27,43	5	4	2	2
89	4	64,0	800	2	4,28	37	58,25	89,30	28,44	10	3	2	2
103	4	68,5	800	1	1,76	41	57,84	87,99	41,10	6	2	1	1
388	2	46,5	800	3	3,00		58,28	88,05	31,74	2	8	1	3
92	4	61,0	800	1	1,28	37	59,25	71,45	26,47	6	5	4	1
90	4	64,0	800	0	1,81	37		69,36	22,50	7	9	0	0
79		70,5	500	1	1,76	36	55,33			4	8	1	1

Annexe 4: Synthèse des résultats obtenus lors du mois d'octobre.

OCTOBRE

Brebis	Age (années)	poids (KG)	Dose de PMSG	TO	P4 du CJ (ng/ml)	Délais PMSG /pic LH (heures)	Population FOLLICULAIRE			
							< à 2mm	2 à 4 mm	4 à 6 mm	> 6 mm
47	7	62,8	500	1	0,88	61	4	6	1	1
64	5	62,0	500	1		58	5	7	1	2
3	4	58,0	500	0	1,70		5	10	1	0
9	7	71,0	500	1	1,49	57	12	6	1	1
114	3	58,5	500	0	1,55		10	6	1	0
120	3	62,0	500	0	1,64		11	3	2	1
382	2	41,5	500	1	1,77	59	6	2	1	1
20	7	46,0	500	1	1,02	58	0	2	3	1
55	5	61,0	800	2	1,61	56,5	4	5	2	2
109	3	68,0	800	2	8,61	59,33	9	6	1	2
21	7	79,5	800	0			2	4	4	0
122	3	58,0	800	2	0,93	57,25	0	1	0	2
132	3	59,0	800	1	0,60	60,15	5	1	1	1
349	2	53,0	800	1	1,30	58,25	1	1	3	3
33	7	61,5	800	1	1,33	58,66	4	7	0	1

Perspectives de recherche

La PMSG

Nous avons pu constater que les doses de PMSG utilisées n'apportent pas de grandes satisfactions lorsqu'elles sont appliquées aux brebis SUFFOLK.

Il serait donc peut-être utile d'étudier les effets produits par des doses plus importantes de PMSG (de l'ordre de 1000 UI) et de combiner ce traitement avec d'autres tels que ceux à la mélatonine.

La MELATONINE

Je pense qu'une étude approfondie des effets de traitements à la mélatonine devrait être envisagée en étudiant tout particulièrement:

- différents systèmes de diffusion de la mélatonine (notamment la REGULIN*)
- le moment de l'année auquel est effectué le traitement (entre début mai et mi-juin).
- l'influence de ces traitements sur l'entrée en cycle, le taux d'ovulation, la fertilité et les taux plasmatiques de PRL et de LH.

Il serait aussi intéressant de réaliser une étude plus fondamentale sur les mécanismes d'action de la mélatonine en s'attachant à comprendre les relations entre la photopériode et la sécrétion de mélatonine. Je pense notamment à des traitements photopériodiques combinés à des mesures de concentrations plasmatiques de MEL, PRL et de LH ainsi qu'à des injections de MEL exogène à différents moments des phases d'éclairement et d'obscurité.