



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Influence d'un progestagène (FGA) et de la PMSG sur la croissance des follicules ovariens chez la brebis Suffolk

PIERQUIN, Bertrand

*Award date:*  
1991

*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.

## Influence d'un progestagène (FGA) et de la PMSG sur la croissance des follicules ovariens chez la brebis Suffolk

PIERQUIN Bertrand

### Résumé

Le but de ce mémoire est d'étudier fondamentalement les effets de divers traitements hormonaux sur des mécanismes ovariens et endocriniens qui interviennent au cours du cycle chez la brebis Suffolk en période de reproduction.

L'étude a porté sur les effets d'un traitement à la progestérone seule (FGA), à la PMSG seule, et d'un traitement couplant les deux hormones. Les résultats sont comparés à un lot témoin.

Nous avons caractérisé le profil de différentes sécrétions hormonales ( $P_4$ ,  $E_2$ , LH et FSH) au cours d'un cycle et nous avons suivi par la technique d'endoscopie l'évolution parallèle de la croissance et de la maturation folliculaire.

Le progestagène FGA :

- avance les mécanismes de recrutement, de sélection et de dominance en phase lutéale;
- diminue légèrement le taux moyen d'ovulation;
- entraîne une décharge significative d' $E_2$  en phase folliculaire.

La PMSG :

- accroît le nombre de follicules recrutés, atténue la sélection et accentue la dominance;
- augmente significativement le pic préovulatoire d' $E_2$  et le taux d'ovulation.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1991

Promoteur : R. Paquay

Co-promoteur : J.L. Bister

*Au terme de cette année de travail, je tiens à remercier mon promoteur, le professeur R. PAQUAY, qui m'a permis de réaliser ce mémoire dans son département. Ses remarques durant la rédaction furent constructives et toujours très judicieuses.*

*Je remercie également le Dr. J.L. BISTER pour ses nombreux conseils et son aide durant la totalité de l'expérience sur le terrain.*

*Je tiens à remercier tout spécialement Mademoiselle Bénédicte NOEL dont la disponibilité, l'efficacité et la rigueur me furent d'une très grande utilité tout au long de cette année.*

*Que tout le personnel du Centre de Recherches Ovines de Faulx-les-Tombes ainsi que les membres du laboratoire de Physiologie Animale, en particulier Madame M.A. BOUCKOMS pour la réalisation des analyses et Madame P. TREFOIS pour la dactylographie, soient remerciés pour leur sympathique assistance et l'accueil qu'ils m'ont réservé.*

*Enfin, je manifeste ma gratitude envers mes parents qui m'ont permis de mener à bien ces études, mon frère ainsi qu'à mes très nombreux amis et amies pour leur aide et leur soutien constant au cours de la réalisation de ce mémoire.*

**TABLE**  
**DES**  
**MATIERES**

<b>REVUE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>1</b>
<b>A. Aspects généraux de la reproduction chez la brebis.....</b>	<b>1</b>
<b>B. Cycle oestral.....</b>	<b>2</b>
1. Déroulement .....	2
2. Croissance et maturation folliculaire .....	2
2.1. Ovogenèse .....	2
2.2. Folliculogenèse basale.....	3
2.3. Folliculogenèse tonique .....	4
2.3.1. Recrutement.....	4
2.3.2. Sélection.....	5
2.4. Atrésie .....	5
3. Ovulation.....	6
3.1. Mécanismes hormonaux de l'ovulation.....	6
3.2. Mécanismes biochimiques de l'ovulation .....	7
3.3. Moment d'ovulation .....	8
3.4. Taux d'ovulation .....	8
3.4.1. T.O. en fonction de la race.....	8
3.4.2. T.O. en fonction de facteurs hormonaux.....	9
3.4.3. T.O. en fonction du poids.....	9
3.4.4. T.O. en fonction de la saison .....	9
4. Formation et maintien du corps jaune.....	10
5. Lutéolyse.....	10
<b>C. La progestérone .....</b>	<b>12</b>
1. Structure générale .....	12
2. Origine et biogenèse .....	13
3. Propriétés physico-chimiques .....	14
3.1. Demi-vie.....	14
3.2. Circulation et catabolisme .....	15
3.3. Renaissance spécifique des récepteurs et activation transmembranaire .....	15
3.4. Immunogénicité .....	17
4. Effets de la progestérone .....	17
4.1. Actions au niveau cérébral .....	17
4.1.1. Encéphale .....	17
4.1.2. Hypothalamus .....	18
4.1.3. Hypophyse.....	18
4.2. Actions sur le tractus génital .....	18
4.2.1. Ovaire.....	18
4.2.2. Oviducte.....	19

4.2.3. Utérus .....	19
4.2.4. Cervix utérin.....	20
4.2.5. Vagin .....	20
4.3. Actions sur la glande mammaire.....	20
4.4. Actions sur le comportement.....	20
<b>D. La PMSG .....</b>	<b>22</b>
1. Structure.....	22
1.1. Structure hydrocarbonée .....	23
1.2. Structure polypeptidique .....	23
2. Propriétés physico-chimiques .....	24
2.1. Activité biologique .....	24
2.2. Demi-vie et catabolisme .....	25
2.3. Reconnaissance spécifique des récepteurs et activation transmembranaire....	25
2.4. Immunogénicité .....	26
3. Effets des traitements à la PMSG .....	27
3.1. Effets au niveau ovarien.....	27
3.1.1. Recrutement.....	27
3.1.2. Moment de l'ovulation.....	28
3.1.3. Taux d'ovulation .....	28
3.2. Effets au niveau hormonal .....	29
3.3. Facteurs de variabilité.....	29
3.3.1. Période de l'année.....	29
3.3.2. Génotype.....	30
3.3.3. Variabilité individuelle.....	31
<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>32</b>
<b>A. Rappel des objectifs .....</b>	<b>32</b>
<b>B. Plan expérimental .....</b>	<b>33</b>
1. Conditions expérimentales .....	33
2. Plan expérimental .....	33
<b>C. Méthodes utilisées .....</b>	<b>35</b>
1. Techniques et traitements utilisés in vivo.....	35
1.1. Synchronisation des cycles .....	35
1.1.1. Traitement aux prostaglandines.....	35
1.1.2. Traitement à la progestérone .....	35
1.2. Traitement à la PMSG .....	36
1.3. Prélèvements sanguins .....	36
1.4. Endoscopies .....	36

2.	Dosages hormonaux .....	38
2.1.	Principe du dosage radioimmunologique.....	38
2.2.	Calcul des résultats.....	39
2.3.	Dosage de la progestérone .....	39
2.4.	Dosage de l'oestradiol .....	40
2.5.	Dosage de la LH.....	41
2.6.	Dosage de la FSH.....	42
<b>RESULTATS .....</b>		<b>43</b>
<b>A.</b>	<b>Population folliculaire.....</b>	<b>43</b>
1.	Existence de trois vagues de croissance folliculaire.....	43
2.	Caractérisation de différents paramètres de la croissance folliculaire terminale.....	45
2.1.	Effet du progestagène (FGA).....	46
2.2.	Effet de la PMSG .....	47
<b>B.</b>	<b>Profils de sécrétion des différentes hormones.....</b>	<b>49</b>
1.	Progestérone.....	49
2.	Oestradiol .....	50
3.	LH.....	51
3.1.	Groupe témoin.....	51
a.	Phase lutéale.....	51
b.	Phase folliculaire.....	52
3.2.	Effet du progestagène.....	52
a.	Phase lutéale.....	52
b.	Phase folliculaire.....	53
3.3.	Effet de la PMSG .....	53
4.	FSH.....	55
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>56</b>
<b>A.</b>	<b>Population folliculaire.....</b>	<b>56</b>
1.	Existence de trois vagues de croissance folliculaire.....	56
2.	Caractérisation de différents paramètres de la croissance folliculaire terminale.....	57
2.1.	Taux d'ovulation .....	58
2.2.	Effet du progestagène (FGA).....	58
2.3.	Effet de la PMSG .....	59
<b>B.</b>	<b>Profils de sécrétion des différentes hormones.....</b>	<b>62</b>
1.	Progestérone.....	62
2.	Oestradiol .....	62

3. LH .....	63
3.1. Brebis témoin.....	63
a. Emission tonique .....	63
b. Emission cyclique .....	64
c. Emission de l'émission de LH pendant le cycle.....	65
3.2. Effet de la P <sub>4</sub> .....	65
a. Emission tonique .....	65
b. Emission cyclique .....	66
3.3. Groupe PMSG .....	66
3.4. Groupe P <sub>4</sub> + PMSG .....	66
4. FSH.....	67
4.1. Groupe témoin.....	67
4.2. Effet du progestagène.....	67
4.3. Effet de la PMSG .....	67
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>69</b>
<b>A. Population folliculaire.....</b>	<b>69</b>
<b>B. Sécrétions hormonales.....</b>	<b>69</b>



# INTRODUCTION

A l'heure actuelle, aborder des questions concernant l'avenir de l'élevage des animaux domestiques ne peut se faire sans prendre en considération le point de vue économique.

En effet, les préoccupations majeures sont devenues depuis longtemps la productivité et la rentabilité des animaux domestiques. Cette rentabilité de l'élevage est largement conditionnée par la capacité de maîtriser les mécanismes de la reproduction.

Beaucoup de recherches actuelles tendent à augmenter les taux d'ovulation qui sont parfois relativement faibles, notamment chez la brebis de race Suffolk.

C'est dans ce contexte que se situe notre étude. Nous avons essayé de visualiser divers mécanismes ovariens et endocriniens qui interviennent au cours du cycle chez des brebis traitées uniquement avec un progestagène (Acétate de Fluorogestone, FGA), avec de la PMSG seule et avec un progestagène et de la PMSG.

Il s'agit de caractériser le profil des différentes hormones au cours du cycle et de suivre par la technique d'endoscopie l'évolution parallèle de la croissance et de la maturation folliculaire.

Ce travail est divisé en deux parties. La première est théorique, c'est une revue bibliographique qui comprend la description des phénomènes liés à la reproduction du mouton. La seconde est pratique et reprend le travail personnel réalisé au cours de cette année.

REVUE

BIBLIOGRAPHIQUE

## **A. ASPECTS GENERAUX DE LA REPRODUCTION CHEZ LA BREBIS**

La brebis est un animal qui présente un polyoestrus saisonnier, c'est-à-dire qu'elle ne se reproduit que pendant une période bien précise de l'année.

La saison de reproduction de la race Suffolk débute en photopériode décroissante (août / septembre) et se termine lorsque la durée des jours augmente (février / mars; Malpaux, 1988). Il est possible de modifier la période d'activité sexuelle si on place les brebis dans des conditions de luminosité correspondant à celles de la saison de reproduction (Bister et Paquay, 1983).

On distingue trois états physiologiques différents chez la brebis :

- l'activité cyclique,
- la gestation,
- l'anoestrus.

Le cycle oestral est divisé en deux périodes correspondant à deux phases différentes de l'activité ovarienne :

- la phase folliculaire pendant laquelle les follicules mûrissent et libèrent leurs ovules;
- la phase lutéale au cours de laquelle les follicules rompus se transforment en corps jaunes. En absence de gestation, le corps jaune régresse après une douzaine de jours : c'est la lutéolyse permettant la maturation de nouveaux follicules. Des modifications morphologiques et sécrétoires apparaissent au niveau du système hypothalamus-hypophyse-ovaire-utérus pendant ce cycle.

La gestation est définie comme la période s'étendant de la fécondation à la parturition et est caractérisée par l'absence de cycle sexuel. Elle dure de 140 à 150 jours.

L'anoestrus est caractérisé par l'absence du comportement d'oestrus et par un état de moindre activité de l'ovaire. Pendant cette période, la croissance folliculaire est ralentie. L'anoestrus a trois causes majeures : l'âge (anoestrus prépubertaire), la saison (anoestrus saisonnier) et la lactation (anoestrus de lactation).

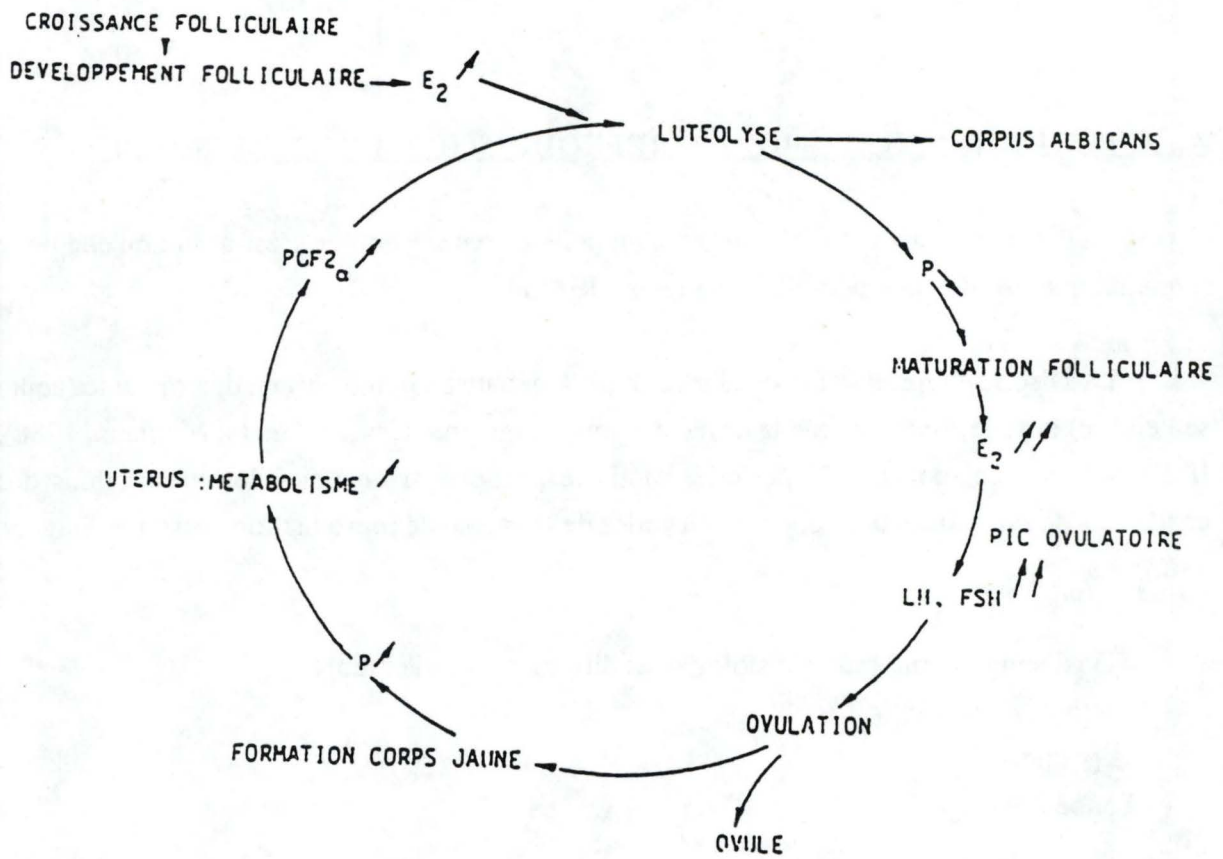


FIGURE 1 : Représentation schématique du cycle oestral de la brebis (BISTER, 1989).

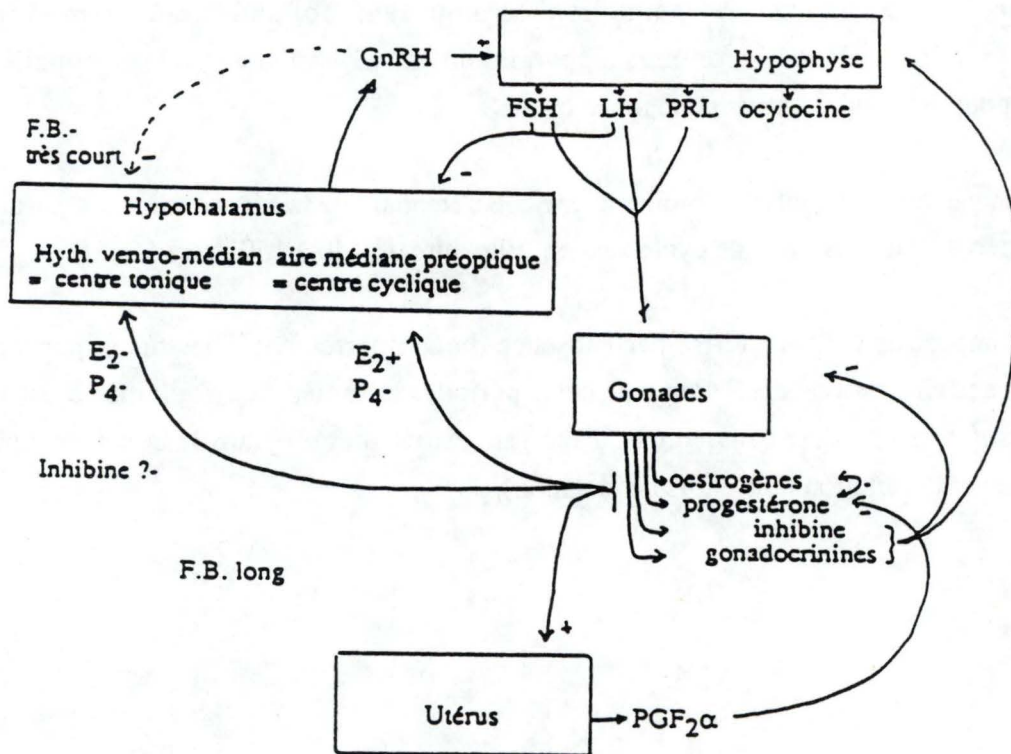


FIGURE 2 : Contrôle endocrinien du cycle sexuel (BISTER, 1989).

## **B. CYCLE OESTRAL**

Les principales sources bibliographiques utilisées afin de réaliser cette première partie de la revue bibliographique sont : Robertson (1977), Collignon (1984), Driancourt (1984), Derivaux et Ectors (1986), Bister (1989) et Paquay (1989).

### **1. DEROULEMENT**

Il faut signaler que, par convention, les physiologistes considèrent l'ovulation comme le début du cycle, c'est-à-dire le jour 0, quelle que soit l'espèce domestique considérée.

Le cycle de la brebis dure en moyenne 16,5 jours (14 à 20). Le prooestrus s'étend sur 2 à 3 jours et l'oestrus sur 1 à 2 jours (24 à 28 heures en moyenne). Les ovulations se produisent 16 à 24 heures après le début des chaleurs et libèrent 1 à 4 ovocytes.

Les événements qui se manifestent au niveau de l'ovaire sont influencés par des facteurs hormonaux sécrétés par l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire-utérus (fig. 1), qui interagissent l'un sur l'autre par différents mécanismes rétroactifs (fig. 2).

Chez les mammifères femelles, la gamétogenèse est un phénomène discontinu. L'ovogenèse, 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. Certains follicules sont alors sélectionnés et la plupart régressent tandis que les autres se développent jusqu'à ovuler. Cette étape ultime est sous contrôle étroit des hormones gonadotropes.

## **2. CROISSANCE ET MATURATION FOLLICULAIRE**

### **2.1. Ovogenèse**

Chez les femelles, les cellules germinales se multiplient rapidement et uniquement pendant la vie foetale, et le nombre d'ovocytes atteint déjà son maximum après une centaine de jours chez le mouton. Les cellules précurseurs des ovocytes, les ovogonies sont originaires de

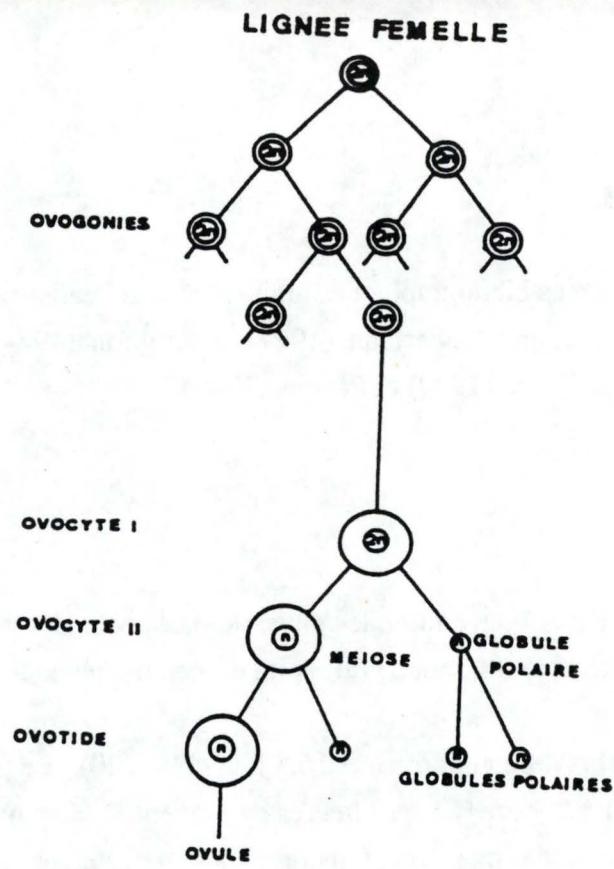


FIGURE 3 : Ovogenèse (TITECA, 1987).

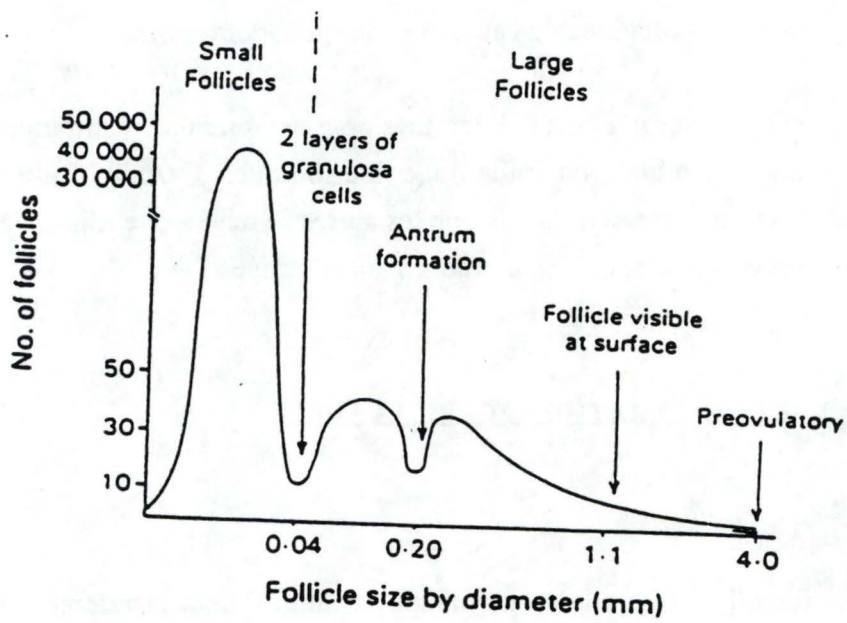


FIGURE 4 : Structure de la population folliculaire chez la brebis (JACQUES, 1988).

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 ovulation (fig. 3).

## 2.2. Folliculogenèse basale

Le nombre de follicules présents à la surface d'un ovaire à un moment donné dépend :

- du nombre de follicules quittant la réserve de follicules primordiaux et entrant en phase de croissance;
- de la vitesse de croissance de ces follicules;
- du taux d'atrésie des follicules en croissance.

Ces trois paramètres sont relativement constants à l'intérieur d'une même race et pour un âge donné (Jacques, 1989).

A l'âge adulte, l'ovaire de la brebis contient de 12.000 à 86.000 follicules primordiaux et de 100 à 400 follicules en croissance (fig. 4). Seuls 10 à 40 de ceux-ci sont visibles à la surface de l'ovaire (Cahill et al., 1979).

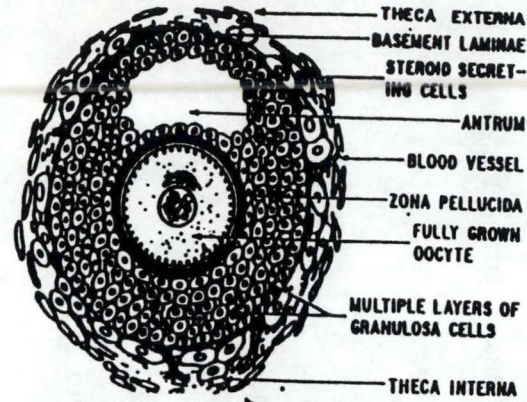
La folliculogenèse basale est contrôlée par un mécanisme hormonal à action prolongée et lente (Dufour et al., 1979).

Les follicules sont disposés dans le stroma du cortex de l'ovaire et on observe selon leur état de développement (fig. 5) :

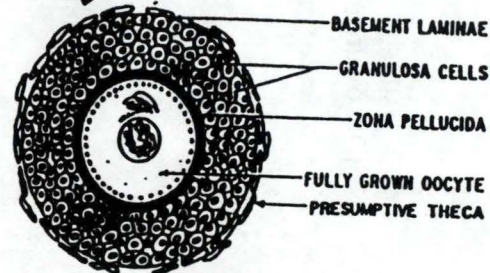
- les follicules primordiaux ( $\leq 0,5$  mm) contenant un ovocyte entouré d'une zone pellucide (glycoprotéines acellulaires) et d'une assise de cellules folliculaires aplaties. Ces follicules primordiaux, de 0,5 mm de diamètre, vont accroître leur taille jusqu'à atteindre 2 mm de diamètre. Cette phase de croissance dure environ 6 mois chez la brebis.
- les follicules primaires dont l'unique couche de cellules folliculaires devient cubique. Une membrane basale, la membrane de Slaviansky le sépare du stroma environnant.
- les follicules secondaires qui sont entourés de plusieurs couches de cellules formant la granulosa; ces cellules sont riches en récepteurs à la FSH (Follicle Stimulating Hormone). Le stroma ovarien entourant le follicule se modifie pour former les thèques folliculaires.
- les follicules tertiaires qui comprennent une thèque interne à cellules cubiques ayant une fonction endocrine, et une thèque externe faite de tissus conjonctif et ayant un rôle de soutien et de protection. On note la présence d'une membrane basale séparant les deux thèques. La croissance du follicule tertiaire se marque par une augmentation du nombre et

# CLASSIFICATION AND ARCHITECTURE OF DEVELOPING FOLLICLES

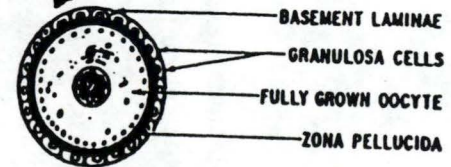
EARLY TERTIARY FOLLICLE



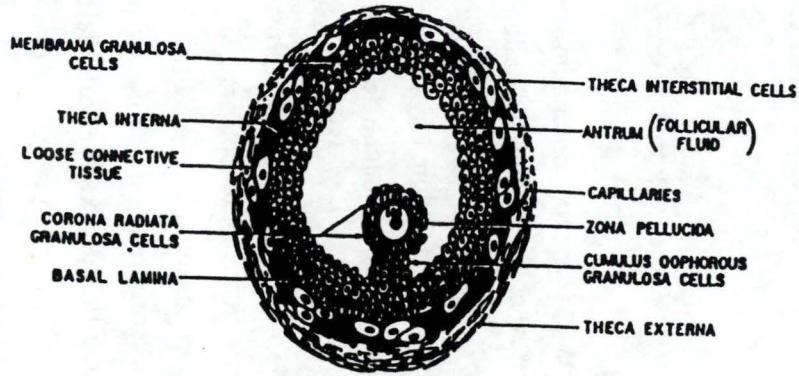
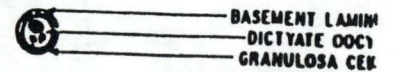
SECONDARY FOLLICLE



PRIMARY FOLLICLE



PRIMORDIAL FOLLICLE



GRAAFIAN FOLLICLE

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



de la taille des cellules de la granulosa, et s'accompagne d'une accumulation de liquides riches en acide hyaluronique et sécrétés par les cellules granulosales.

- les follicules de de Graaf qui ont atteint le stade ultime de la croissance folliculaire; ils deviennent mûrs histologiquement. Les cavités (corps de Call-Exner) contenant le liquide folliculaire confluent en une seule que l'on nomme antrum folliculaire.

### 2.3. Folliculogenèse tonique

La folliculogenèse tonique consiste en la croissance finale du follicule précédant l'ovulation. Elle est sous la dépendance directe des gonadotropines (fig. 6) et concerne des follicules de diamètre supérieur à 2 mm (Jacques, 1989).

La baisse de sécrétion d'oestradiol suite à l'atrésie de follicules antérieurs et la chute du taux de progestérone consécutive à la lutéolyse permettent l'augmentation de l'émission de FSH et le démarrage de la troisième vague de croissance folliculaire qui dure en moyenne 3 à 4 jours chez la brebis.

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

Au début de la troisième vague de croissance folliculaire, le taux d'oestradiol augmente alors à nouveau. Cette hormone présente normalement une action inhibitrice sur la production d'hormones hypophysaires, mais lorsque son émission atteint une certaine valeur, le phénomène de feedback s'inverse. Il devient positif et stimule le centre cyclique d'émission de GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone).

#### 2.3.1. Recrutement

Le recrutement est l'objet de nombreuses recherches car il est à l'origine du nombre de follicules ovulants. Il faut signaler qu'on ne distingue pas encore très bien l'influence des hormones gonadotropes (LH, Luteinizing Hormone et FSH) sur ce phénomène.

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.

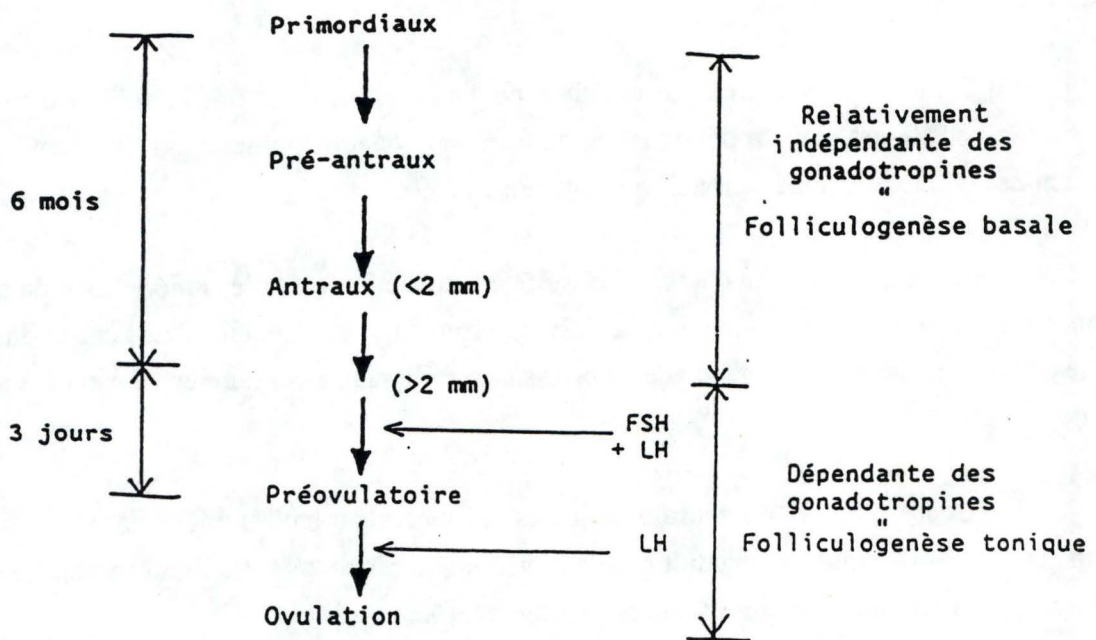


FIGURE 6 : Résumé des principales étapes de la folliculogénèse chez la brebis (JACQUES, 1989).

Une injection de LH seule en anoestrus profond est incapable d'induire l'ovulation, tandis que, couplée à une injection de 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.

L'action de la LH se marque suite à des libérations brutales qui constituent les pics préovulatoires. Ces pics provoquent de profondes modifications dans les follicules. Ils stoppent les mitoses et stimulent les cellules de la thèque interne à sécréter différents facteurs dont une collagénase qui attaquera plus tard la paroi.

### 2.3.2. Sélection

La sélection est le mécanisme par lequel le ou les quelques gros follicules (4 mm de diamètre au moins chez la brebis) qui vont jusqu'à l'ovulation sont choisis.

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 tentent d'élucider le mode de sélection.

L'hypothèse de la stabilité suppose que le(s) follicule(s) destiné(s) à ovuler serait(ent) protégé(s) de la diminution de FSH par de fortes concentrations en oestradiol dans le fluide antral.

L'hypothèse de l'élimination est basée sur le fait que le(s) follicule(s) qui va (vont) ovuler peut(peuvent) contribuer directement à l'élimination des autres par la sécrétion de substances paracrines inhibitrices ou anti-aromatisantes de type FSH.RBI (FSH Receptor Binding Inhibitor) ou de type FRP (Follicular Regulatory Protein).

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

### 2.4. Atrésie

L'atrésie est un processus involutif qui est le lot d'une grande majorité des follicules. Elle se caractérise par une perte de vascularisation de la thèque, l'arrêt des mitoses des cellules

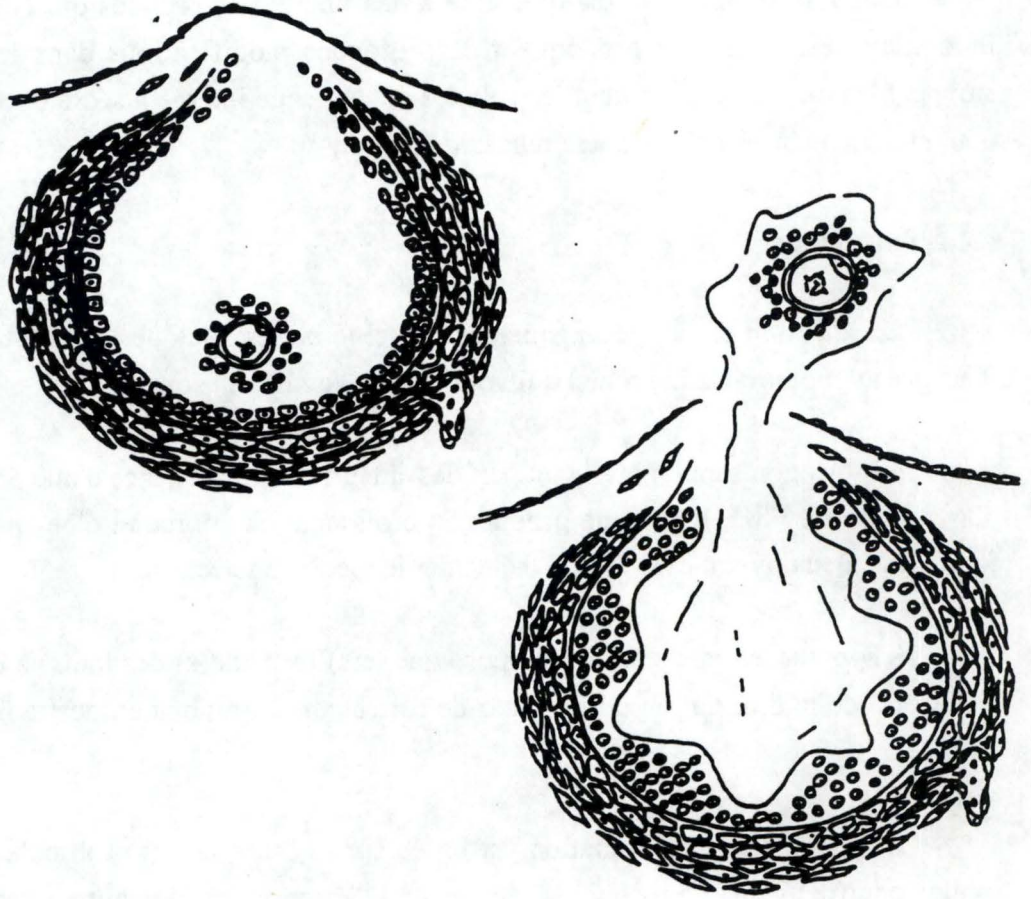


FIGURE 7 : Ovulation (DERIVAUX et ECTORS, 1986).

folliculaires, la pycnose de leur noyau, la séparation des cellules de la membrane basale et la mort de l'ovocyte.

Quand le follicule est arrivé au stade cavitaire, la cavité antrale se trouve envahie par des fibroblastes, et seule subsiste encore quelque temps la membrane de Slaviansky.

L'atrésie folliculaire est un phénomène fonctionnel en plus d'être histologique. 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.

Une faible pulsativité de LH et la présence d'EGF (Epidermal Growth Factor) sont aussi des événements favorables à l'atrésie.

### **3. 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 le comportement d'oestrus qui consiste principalement en la recherche et l'acceptation du mâle.

L'ovulation se caractérise (fig. 7) :

- 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,...);
- par une ischémie locale et une modification de la pression intra-folliculaire.

#### **3.1. Mécanismes hormonaux de l'ovulation**

En raison du fait que les follicules se développent jusqu'à une taille proche de la taille préovulatoire même en période d'anoestrus saisonnier, les mécanismes contrôlant l'ovulation sont différents de ceux contrôlant la croissance folliculaire.

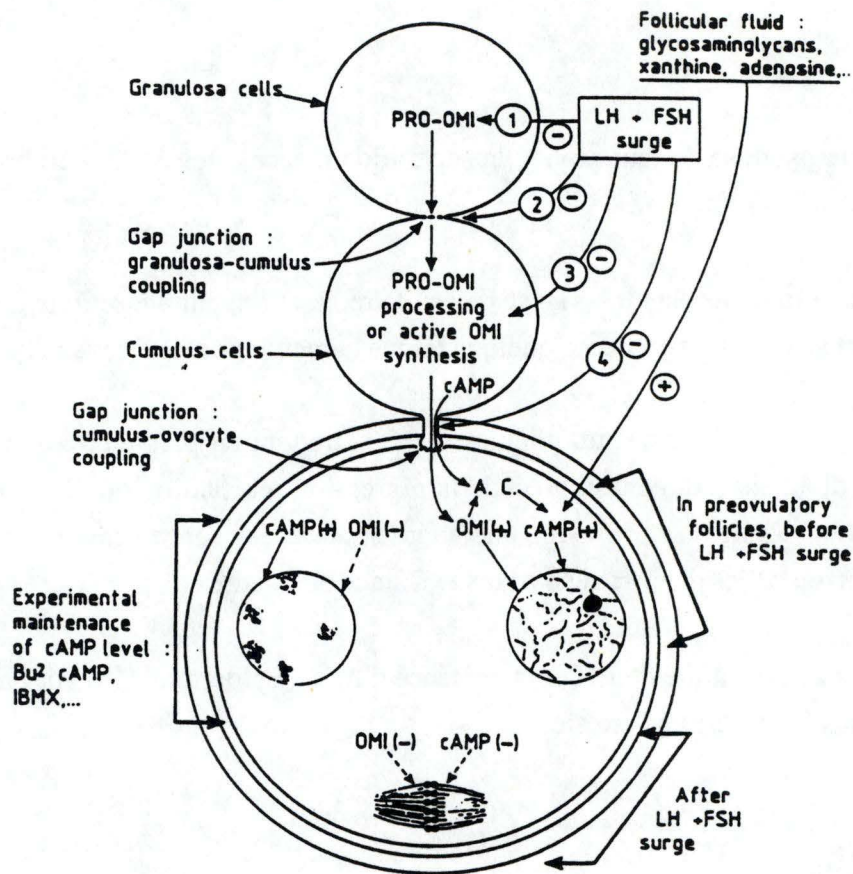


FIGURE 8 : Mécanisme d'action du pic de LH sur la maturation de l'ovocyte (THIBAUT et al., 1987).

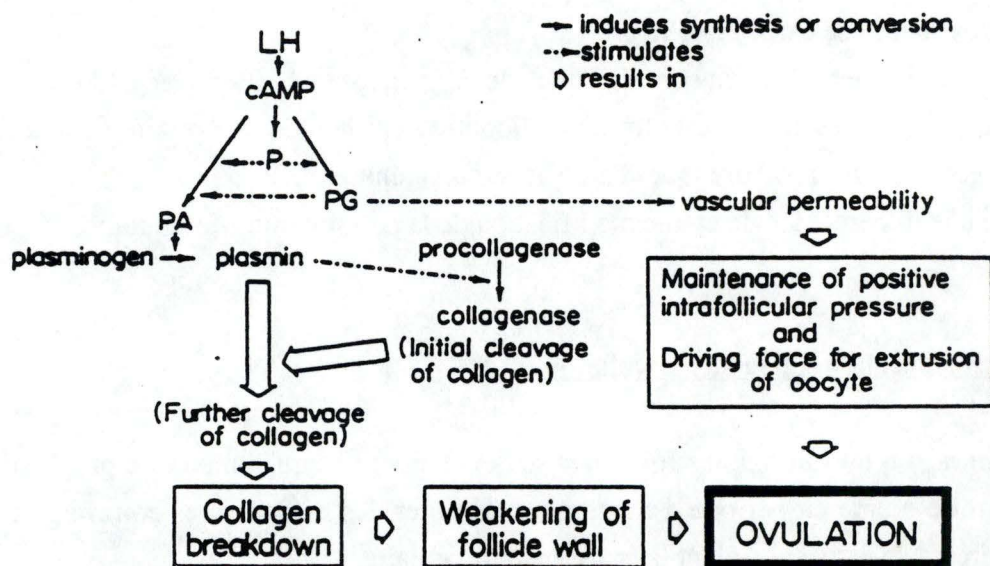


FIGURE 9 : Modèle simplifié du processus ovulatoire (BRANNSTROM, 1988).

L'ovulation est le résultat de l'action des gonadotropines hypophysaires au niveau ovarien. Dufour et al. (1979) ont montré qu'une hypophysectomie de la brebis adulte entraîne une réduction de la population et du taux de croissance folliculaire ainsi qu'une inhibition de l'ovulation.

La LH est considérée comme étant le facteur principal déclenchant l'ovulation (Brännström, 1988), mais l'émission simultanée de FSH semble être cruciale pour le recrutement des follicules (fig. 8 et 9).

Le rôle du pic préovulatoire de LH a été confirmé par différents types d'expériences. L'ovulation peut être bloquée *in vivo* chez la ratte par de l'antisérum contre la LH. Et en immunisant des rattes contre la GnRH, Koch et al. (cités par Philippon, 1988) suppriment la LH et la FSH et bloquent l'ovulation; mais une injection de LH seule suffit à rétablir l'ovulation.

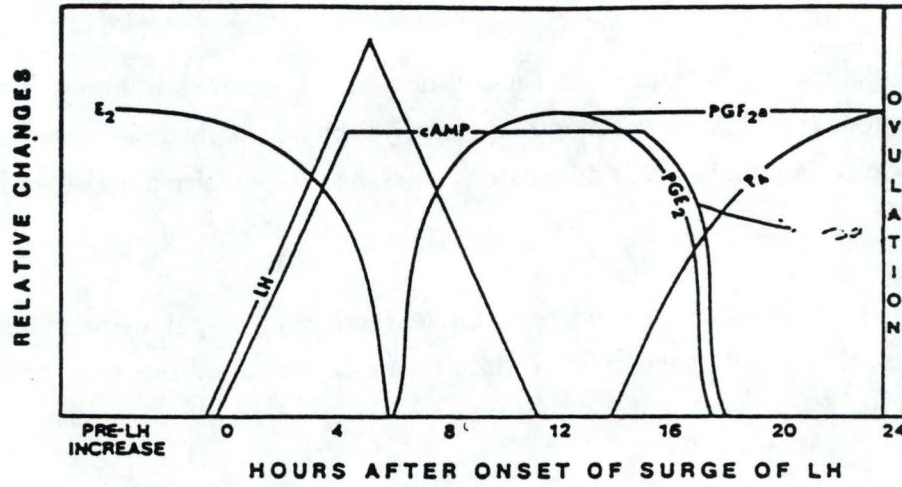
Cependant, il existe une période où l'injection de LH seule ne peut pas induire l'ovulation. Cette période dite d'anoestrus profond est associée à une faible sécrétion endogène de FSH (Oussaid, 1982).

### 3.2. Mécanismes biochimiques de l'ovulation

Le pic préovulatoire de LH induit au niveau du follicule une cascade de phénomènes biochimiques qui conduisent à l'ovulation. Cette cascade ovulatrice fait intervenir l'AMP cyclique, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (prostagnandines F2a), la progestérone et la collagénase comme médiateurs essentiels (Brännström et al., 1987; fig. 10).

La liaison de la LH à ses récepteurs active un système de messagers secondaires qui, par leurs modifications, sont responsables de l'activation cellulaire (fig. 11).

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).



Relative follicular changes with respect to the surge of LH in estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>), progesterone (P), cAMP, PGE<sub>2</sub>, and PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .

FIGURE 10 : Schéma décrivant les modifications hormonales avant l'ovulation (TITECA, 1987).

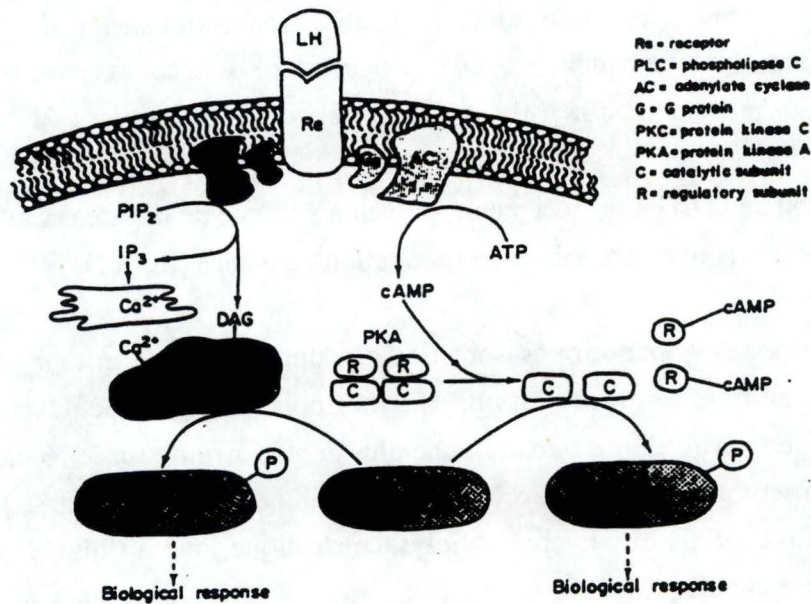


FIGURE 11 : Systèmes de messages secondaires impliquées dans la transmission du signal de la LH (BRANNSTROM, 1988).



### 3.3. Moment d'ovulation

En général, l'ovulation se produit 16 à 24 heures après le début de l'oestrus chez la brebis. C'est à ce moment précis que la deuxième mitose s'achève et que 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.

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 (Cognié et al., 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 (Cognié et al., 1970).

Il est important de savoir aussi que la présence d'un bélier dans le troupeau de brebis avance le moment d'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).

### 3.4. Taux d'ovulation

Il y a de nombreuses causes à l'origine des variations du taux d'ovulation (T.O.) chez la brebis. Ce sont principalement des facteurs physiologiques et environnementaux. Il existe une grande variabilité au sein d'une même race, les T.O. peuvent même fluctuer d'un cycle à l'autre car les brebis ne sont pas capables de maintenir des T.O. de 2 ou 3 (Montgomery et al., 1988).

#### 3.4.1. T.O. en fonction de la race

Il existe des différences très nettes entre les T.O. des différentes races (Booroola : 2,86 et Ile-de-France : 1,12). Chez la Suffolk, il serait de l'ordre de 1,2 en pleine saison de reproduction (novembre; Noël, communication personnelle).

Chez les races prolifiques, différentes stratégies aboutissent à des T.O. 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).

### 3.4.2. T.O. en fonction de facteurs hormonaux

Les études faites sur le rôle exact d'une hormone sur le T.O. se basent sur une corrélation entre un T.O. élevé et un taux plasmatique hormonal important sans pour autant démontrer une relation de cause à effet.

Etant donné que le T.O. 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 T.O.

Le grand nombre de follicules disponibles, lors de la stimulation ovulatoire chez des races prolifiques, est dû, selon Cahill et al. (1979), à une influence plus importante de la LH et de la FSH sur la population folliculaire.

Une plus grande sensibilité à la FSH des cellules granulosales pourrait expliquer une modulation de la FSH sur le T.O. 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.

Mais selon Cahill et al. (1979), le T.O. est indépendant de la concentration maximale de LH lors du pic préovulatoire car la sélection des follicules se fait bien avant la décharge de LH.

### 3.4.3. T.O. en fonction du poids

Selon Scaramuzzi et Radford (1983), la relation entre le poids vif d'une brebis et son taux d'ovulation serait linéaire. Cette relation pourrait s'expliquer par un recrutement normal suivi d'une moindre sélection chez les brebis lourdes.

### 3.4.4. T.O. en fonction de la saison

Dès le début de la saison de reproduction, les T.O. s'accroissent jusqu'à des maxima avant les jours les plus courts de l'année, puis diminuent lorsqu'approche la fin de la période sexuelle (Montgomery et al., 1988).

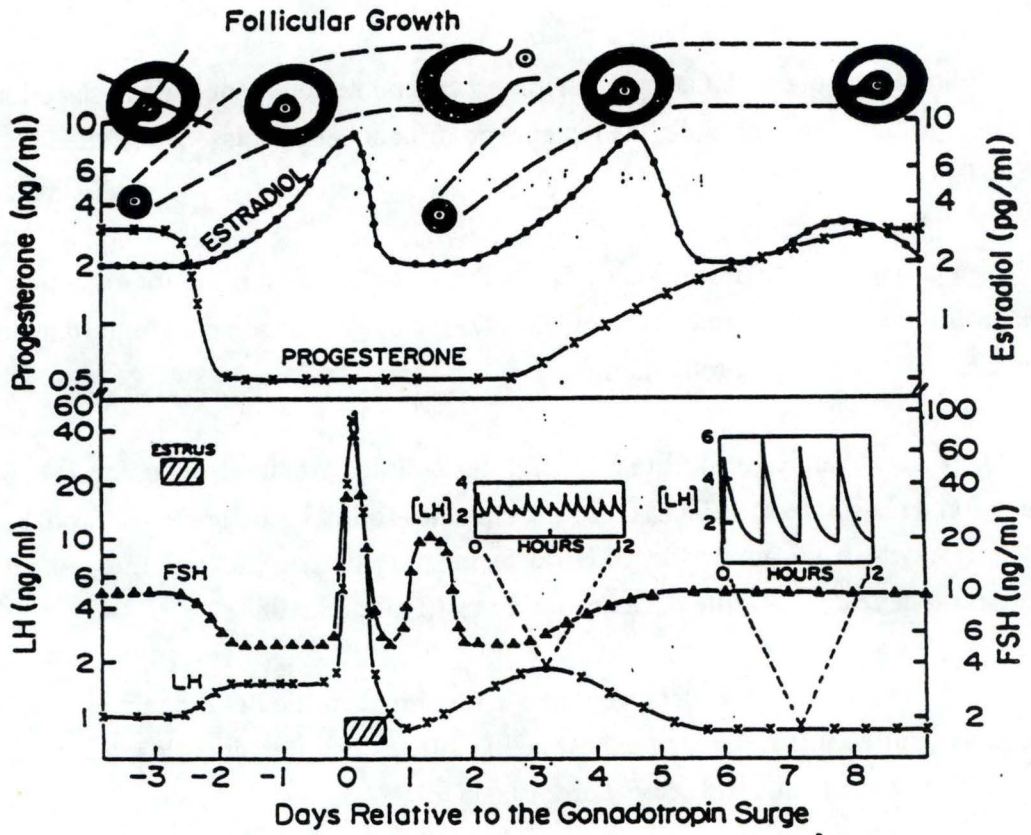


FIGURE 12 : Représentation schématique des changements folliculaires et endocriniens de la régression lutéale au rétablissement du corps jaune chez la brebis (HANSEL, 1983).

#### **4. FORMATION ET MAINTIEN DU CORPS JAUNE**

Dans le trou laissé béant par l'ovulation et grâce à une multiplication des cellules de la thèque interne et de la granulosa, le corps jaune se développe. Il atteint sa croissance maximale vers le 10<sup>ème</sup> jour du cycle chez la brebis.

Il synthétise des quantités croissantes de progestérone (fig. 12) qui, grâce à une protéine spécifique, est stockée dans des granules en même temps que la relaxine. Le corps jaune libère aussi de l'ocytocine et des prostaglandines.

La fonction du corps jaune est d'autant plus efficace que la LH (principalement), la FSH et les oestrogènes sont abondants dans l'ovaire (Mc Natty et Thurkey, 1974; cités par Collignon, 1984). Enfin, la progestérone elle-même une fois émise en quantité suffisante, stimule la survie du corps jaune.

#### **5. LUTEOLYSE**

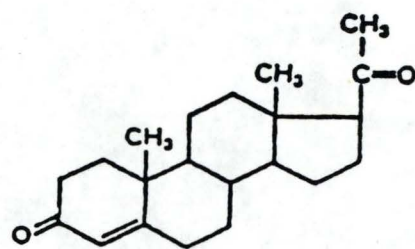
La lutéolyse se produit normalement, soit en fin de cycle s'il n'y a pas eu fécondation (corps jaune périodique), soit plus ou moins tard en gestation si la fécondation a lieu (corps jaune gestatif).

Les processus de dégénération se produisent lentement et progressivement et le corps jaune dégénératif peut être observé au niveau de l'ovaire bien après la fin du cycle (corpus albicans).

La lutéolyse se manifeste par une inhibition de la synthèse de la progestérone, par une striction vasculaire, par des modifications au niveau cellulaire et par un développement du tissu conjonctif.

La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  libérée par des cellules utérines suite à l'intervention des oestrogènes, est certainement le facteur lutéolytique chez la plupart des espèces domestiques. Elle est capable d'agir directement sur les cellules lutéales et d'y provoquer des modifications biochimiques, d'y diminuer le débit sanguin et la synthèse de progestérone, peut-être en détruisant les récepteurs à la LH.

Le nombre de récepteurs à l'ocytocine augmente en fin de cycle sur les cellules de l'utérus de la brebis, ce qui stimule l'émission de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ . L'ocytocine a peut-être aussi un effet inhibiteur direct sur la synthèse de  $\text{P}_4$  et sur le débit sanguin dans le corps jaune.



Progesterone

FIGURE 13 : Structure tétracyclique de la progestérone (DEBECKER, 1984).

## C. LA PROGESTERONE

C'est Prenant, en 1898, qui attire l'attention des physiologistes sur la structure endocrine du corps jaune. Cette formation de l'ovaire fut observée de nouveau par Kein (1934), mais considérée jusque là comme une simple cicatrice folliculaire.

Dans les années 1904-1912, Bouin et Ancel découvrent un test de l'action de l'hormone du corps jaune. Ils montrent, par l'artifice de la pseudo-grossesse obtenue chez une lapine couverte par un mâle à canaux déférents ligaturés, que la transformation utérine observée au cours d'une grossesse normale n'est pas la conséquence de l'action de l'embryon, mais celle de la présence de corps jaunes. D'ailleurs, l'involution brutale de la dentelle utérine après destruction des corps jaunes confirme les résultats obtenus auparavant (Kayser, 1970).

Corner s'attacha à isoler l'hormone contenue dans l'extrait de corps jaunes et l'appela d'abord progestine.

### 1. STRUCTURE GENERALE

La molécule de progestérone (P4) a une structure tétracyclique proche de celle des corticostéroïdes. La progestérone comporte en effet une chaîne latérale à deux atomes de carbone fixée en C<sub>17</sub>. D'autre part, elle présente un groupement 3-cétonique (fig. 13).

La spécificité biologique de la molécule de progestérone n'est pas très élevée; la molécule peut subir un certain nombre d'altérations sans que pour cela les actions progestatives disparaissent. D'ailleurs, deux autres composés naturels ont une action progestative, les isomères 4-prégnène-20 $\alpha$  (ou 20 $\beta$ ) ol - 3 one (Kayser, 1970; Derivaux et Ectors, 1986).

La progestérone est une substance cristalline blanche, très peu soluble dans l'eau mais soluble dans l'huile. Elle se présente sous la forme de 2 isomères :  $\alpha$  avec un point de fusion de 127°C et  $\beta$  avec un point de fusion de 121°C (Debecker, 1984).

La parenté de structure des différentes hormones stéroïdes explique par ailleurs que certains progestagènes puissent avoir des actions ambivalentes. L'action androgène est particulièrement nette pour la prégnénone qui possède à la fois des propriétés progestatives, androgéniques et oestrogéniques (Williams, 1972; Webb, 1987).

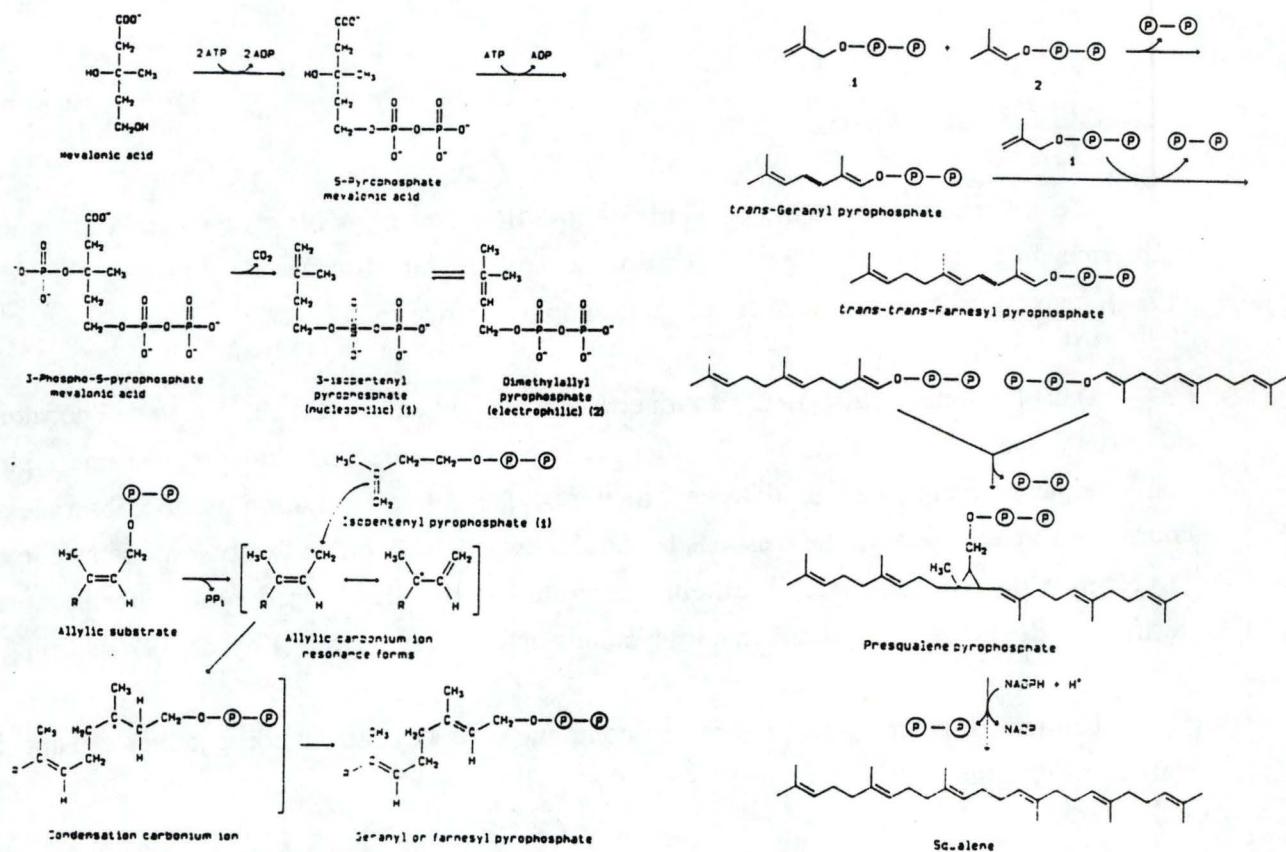


FIGURE 14 : Biosynthèse du squalène (NORMAN, 1987).

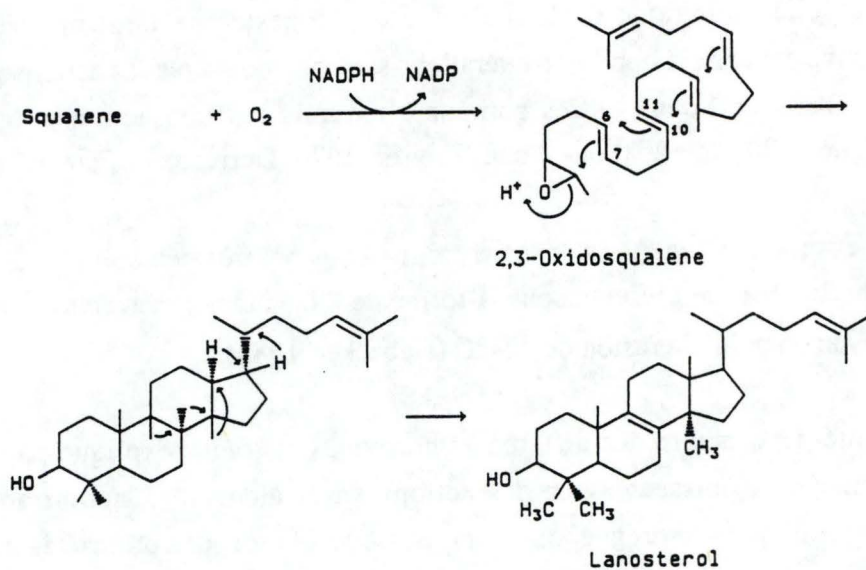


FIGURE 15 : Mécanisme proposé pour la cyclisation du 2,3-oxidosqualène avant de produire le lanostérol (NORMAN, 1987).



Il est à noter que, durant ces dernières années, un certain nombre de substances progestagènes synthétiques sont sorties des laboratoires; elles sont utilisées essentiellement comme anti-ovulatoires (cfr ci-après).

L'unité internationale de la progestérone est égale à un milligramme de l'hormone cristalline.

## **2. ORIGINE ET BIOGENESE**

Il semble bien que chaque glande endocrine, productrice de stéroïdes, développe les mêmes étapes initiales de la biosynthèse de la progestérone, les différences étant, essentiellement quantitatives. Cette voie synthétique commune passe par le cholestérol.

Au départ, le maillon à deux atomes de carbone de l'acétate est activé par couplage avec le coenzyme A (acétyl-CoA), ce qui conduit à l'unité isoprénique biologique, dite l'isopentényl pyrophosphate.

Ces unités isopréniques, en se condensant, donnent naissance au squalène qui se cyclise en lanostérol qui deviendra le cholestérol (Norman, 1987; fig. 14 et 15).

Le cholestérol subit 2 hydroxylations, puis se clive par l'action d'une desmolase, ce qui aboutit à la formation d'aldéhyde isocaproïque et d'un stéroïde à 21 atomes de carbone, la prégnénolone qui va constituer le pool disponible pour la synthèse des divers stéroïdes actifs : progestérone-corticostéroïdes-androgènes-oestrogènes (Beckers, 1975; fig. 16).

Le passage de la prégnénolone à la progestérone suppose d'abord une oxydation de l'hydroxyle situé en C<sub>3</sub> et le transport de la double liaison de 5-6 à 4-5, ce qui signifie l'intervention d'une oxydo-réductase et d'une isomérase (Norman, 1987). Selon Webb (1987), c'est le système de la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase du cortex surrénalien qui catalyse la conversion de la prégnénolone en progestérone.

La progestérone apparaît comme la véritable plaque tournante vers les autres composés actifs que sont les corticostéroïdes, les androgènes, les oestrogènes. Les stéroïdes subissent dans l'organisme une série de transformations relevant de l'action de systèmes enzymatiques divers dans lesquels interviennent des déshydrogénases, des réductases, des hydrolases, des liases et des transférases (fig. 17). Ces transformations métaboliques se produisent

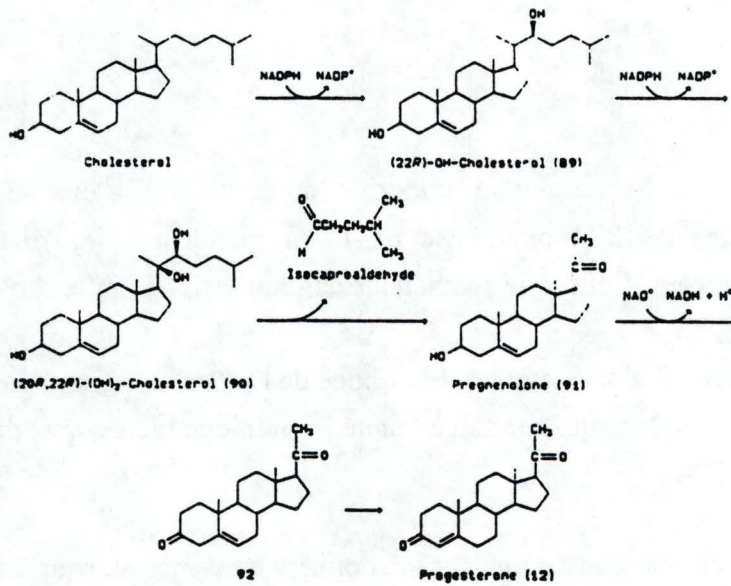


FIGURE 16 : Biosynthèse de la pregnonolone et de la progestérone (NORMAN, 1987).

principalement au niveau du foie mais également au niveau des tissus périphériques et des glandes (Debecker, 1984).

Le principal tissu producteur de progestérone est le corps jaune ovarien, mais le placenta en produit aussi, comme le prouve Knight (1990). En effet, après avoir mis en culture *in vitro* un placenta de truie, cet auteur observe des sécrétions de progestérone constantes tout au long de la gestation.

Chez certaines espèces, la sécrétion de progestérone semble débiter avant la rupture folliculaire et avant toute métaplasie progestative visible des cellules folliculeuses (Williams, 1972). La fonction sécrétoire paraît donc précéder la différenciation morphologique du corps jaune.

Le métabolisme endocrinien de l'ovaire a été étudié en explorant le sort d'hormones et de précurseurs au contact de la granulosa et de la thèque cultivées *in vitro*. La conversion de la prégnénolone en progestérone est beaucoup plus intense dans la granulosa que dans la thèque (Norman, 1987).

Il faut encore signaler que la spécialisation topographique de l'ovaire dans telle ou telle fonction sécrétoire résulte essentiellement d'un équipement enzymatique différent du stroma, de la thèque, de la granulosa ou du corps jaune. Cet équipement permet de pousser plus ou moins loin les synthèses à partir de certains précurseurs de sorte que des anomalies de la sécrétion ovarienne peuvent résulter de carences enzymatiques bloquant les synthèses à un certain niveau (Leymarie, 1988; Fukuoka, 1989).

### **3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES**

#### **3.1. Demi-vie**

Greep (1973) rapporte que la demi-vie de la progestérone est, chez deux femmes non-enceintes, de 25 et 29 minutes respectivement. La plupart des auteurs ayant réalisé des études sur ce sujet affirment que la demi-vie plasmatique de la progestérone est comprise entre 20 et 30 minutes chez les femelles non-gestantes.

Greep (1973) signale aussi que cette demi-vie peut diminuer chez des femelles ovariectomisées (10,7 minutes), chez des femelles gestantes (3-6 minutes), et qu'elle est approximativement de 15,8 minutes chez le mâle humain.



### 3.2. Circulation et catabolisme

De même que les hormones protéiques, la progestérone est transportée dans le sang principalement (90 %) après fixation sur une protéine vectrice, et un équilibre s'établit entre la forme libre et la forme liée.

La fixation de la progestérone, ainsi que des corticostéroïdes, se fait principalement sur deux protéines spécifiques du plasma. Il s'agit de la corticosteroid binding globulin (CBG) aussi appelée transcortine, et d'une  $\alpha_1$ -acid-glycoprotein (AAG) aussi appelée orosomucoïde, qui sont toutes deux capables de transporter les stéroïdes sexuels dont la progestérone (Paquay, 1989). La serum-albumine est aussi un transporteur de la progestérone (Derivaux et Ectors, 1986).

La production de la progestérone est continue du fait de la brièveté de sa demi-vie plasmatique (25 minutes chez la brebis). La concentration plasmatique de la progestérone, chez une femme normale, atteint 0,14  $\mu\text{g}$  pour 100 ml durant la phase folliculaire du cycle et environ 1,05  $\mu\text{g}$  pour 100 ml durant la phase lutéale. Après ovariectomie, la progestérone plasmatique diminue de façon considérable (Williams, 1972).

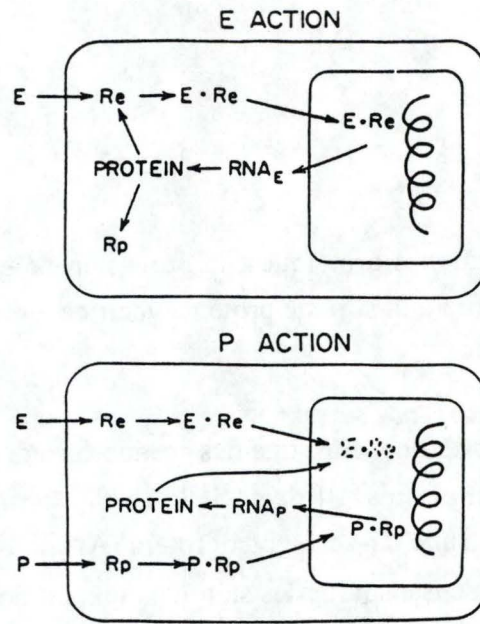
L'étude du catabolisme de la progestérone permet de voir que son élimination se fait par voie urinaire ou fécale (bile), soit sans modification préalable, soit le plus souvent après transformation métabolique dans le tissu-cible ou dans un autre organe (surtout le foie; Paquay, 1989). Derivaux et Ectors (1986) soulignent que le lieu principal de dégradation de la progestérone est le foie, mais que le rein et l'utérus peuvent y prendre une part non négligeable.

La progestérone, suite à l'action de déshydrogénases et de réductases, se trouve transformée en prégnonediol et en 17- $\alpha$ -hydroxyprogestérone. Ces métabolites, solubles dans l'eau, sont alors éliminés par les urines en grande partie, et par voies fécale et respiratoire (sous forme de  $\text{CO}_2$ ) dans des proportions beaucoup moindres.

### 3.3. Reconnaissance spécifique des récepteurs et activation transmembranaire

- Dans l'utérus, on a mis en évidence un récepteur spécifique de la progestérone, dont les caractéristiques d'interaction avec la  $\text{P}_4$  ainsi qu'avec les progestagènes de synthèse sont tout à fait en accord avec leurs effets biologiques (Vallery-Rodot et al., 1972).

Le taux de récepteurs de progestérone est difficile à mesurer, non seulement du fait de la contamination fréquente des tissus par le plasma contenant à certains moments du cycle



Proposed mechanism of progesterone (P) regulation of the nuclear levels of the estrogen (E) receptor (Re). During estrogen secretion the estradiol-receptor complex interacts with chromatin to stimulate estrogen-dependent RNA ( $RNA_E$ ) and protein synthesis, two products of which are progesterone and estrogen receptors. Progesterone action is mediated by the progesterone receptor (Rp) system, resulting in a progesterone-dependent RNA ( $RNA_P$ ) and protein synthesis. A product of progesterone action is proposed to be the estrogen receptor regulating factor which is responsible for the degradation of estrogen-receptor complex in the target cell nucleus. Modified from R. W. Evans and W. W. Leavitt, Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor: Dependence on RNA and protein synthesis.

FIGURE 18 : Mécanisme proposé pour la régulation, par la progestérone, des niveaux nucléaires de récepteurs oestrogéniques (NORMAN, 1987).

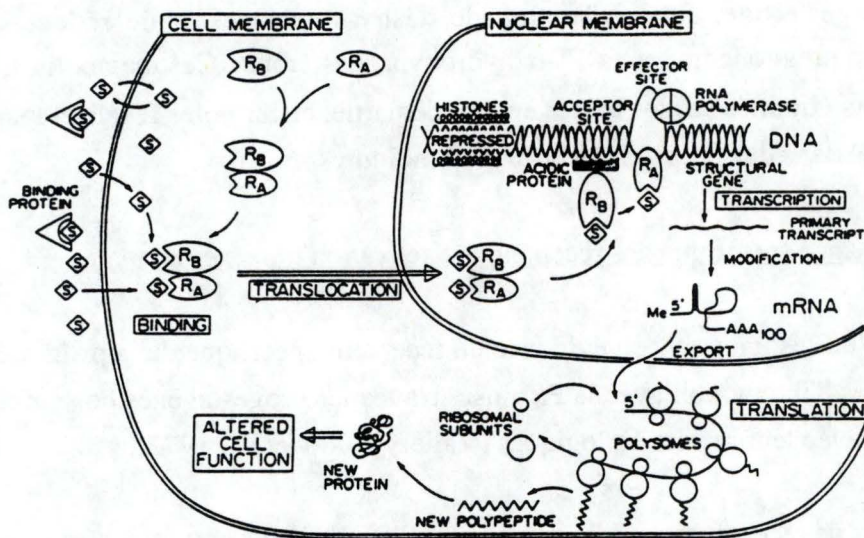


FIGURE 19 : Modèle proposé pour l'action de la progestérone au niveau de l'oviducte de poulet (NORMAN, 1987).

beaucoup de progestérone, mais aussi parce que la concentration de transcortine (CBG), protéine du plasma qui lie le cortisol et la progestérone, peut littéralement "masquer" la liaison au récepteur (Norman, 1987). C'est pourquoi on utilise souvent un ligand hormonal synthétique, se liant spécifiquement au récepteur et peu à la protéine du plasma (R-5020), pour réaliser ce genre de dosage.

Les oestrogènes augmentent la synthèse du récepteur de la progestérone (fig. 18), constituant un système de régulation positif qui explique en particulier l'augmentation importante, chez la brebis, de la concentration du récepteur en prooestrus, conséquence attendue de l'augmentation du taux d'oestradiol circulant (Zuckerman, 1977; Derivaux et Ectors, 1986).

De récentes observations faites par Sumida et Pasqualini (1989) montrent qu'un facteur de croissance, l'EGF, peut augmenter les taux de récepteurs à progestérone dans les cellules fœtales de l'utérus chez le cochon d'Inde, *in vitro*, et dans la même proportion que l'oestradiol.

D'autre part, Vallery-Rodot et al. (1972) ont montré que la progestérone accélère la disparition de son propre récepteur, sans que l'on ait véritablement défini s'il s'agit d'un mécanisme d'inactivation, de protéolyse ou autre. Cette régulation négative ou "down-regulation" est difficile à mettre en évidence, mais elle est appliquée à l'heure actuelle aux récepteurs des hormones polypeptidiques.

- Le récepteur de la progestérone est une protéine cytoplasmique thermolabile, d'un poids moléculaire de 225.000  $\delta$  et divisée en deux sous-unités ( $\alpha = 110.000 \delta$  et  $\beta = 115.000 \delta$ ) avec chacune un rôle particulier (Derivaux et Ectors, 1986).

Norman (1987) résume et illustre le mécanisme d'activation des récepteurs à la progestérone dans l'oviducte de poule de la manière suivante (fig. 19 et 20) :

- fixation sur le récepteur cytoplasmique et formation du complexe stéroïde-récepteur ou "complexe cytosolique";
- transfert de ce complexe vers le noyau;
- fixation sur l'accepteur nucléaire, notamment à la faveur de la sous-unité de la protéine et formation du complexe néo-nucléaire;
- réactions complexes comportant l'activation d'ARN polymérase avec comme résultat final la formation d'ARNm;
- passage de ces ARN dans le cytoplasme cellulaire et synthèse des protéines spécifiques.

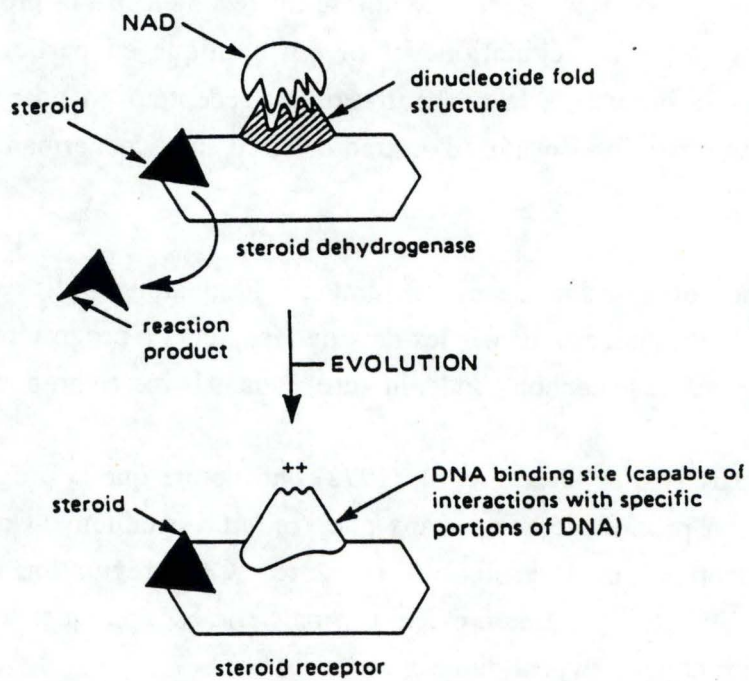


FIGURE 20 : Possibilité que les récepteurs stéroïdes dépendent des enzymes stéroïdes déshydrogénases (NORMAN, 1987).



### 3.4. Immunogénicité

Un traitement des brebis avec un inhibiteur 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 $\beta$ -HSD) procure une augmentation significative à la fois du taux d'ovulation et du nombre moyen d'agneaux par brebis gestante (Webb, 1987). En fait, le traitement des brebis avec l'inhibiteur 3 $\beta$ -HSD engendre une diminution importante des concentrations périphériques en progestérone. S'il y a eu pose, sur les brebis, d'une éponge de progestagène avant l'injection de l'inhibiteur, la diminution des concentrations en P<sub>4</sub> est encore plus marquée (Webb, 1987).

De nombreuses expériences utilisant des anti-progestagènes ont été réalisées par Brann et al. (1988) afin de montrer l'inhibition par la P<sub>4</sub> de l'action des oestrogènes, dans la synthèse des protéines utérines, dans la sécrétion de prolactine,...

Récemment, Remohi (1988) a mis en évidence un anti-progestérone (RU 486) qui agit en se liant aux récepteurs de la progestérone sans induire d'activité progestagène. Il est utile, dans les études menées chez les singes, pour l'obtention d'informations sur le rôle joué par la progestérone dans le cycle oestral.

Une immunisation dirigée contre la progestérone a permis à Rosenberg (1990) d'observer une augmentation de la concentration plasmatique en progestérone chez des brebis traitées. Ces taux de P<sub>4</sub> élevés chez les animaux traités sont la conséquence d'une production tardive d'anticorps contre la P<sub>4</sub> et/ou d'une stimulation de la synthèse progestéronique.

## 4. EFFETS DE LA PROGESTERONE

### 4.1. Actions au niveau cérébral

#### 4.1.1. Encéphale

Dans l'encéphale, la progestérone pourrait être impliquée dans les mécanismes de différenciation sexuelle vers la féminisation (Derivaux et Ectors, 1986). Il faut savoir en effet que vers la moitié de la vie foetale, plus tôt chez le mâle que chez la femelle, les gonades sont sous le contrôle des gonadotropines hypophysaires, elles-même régulées négativement par la P<sub>4</sub> (Paquay, 1989).

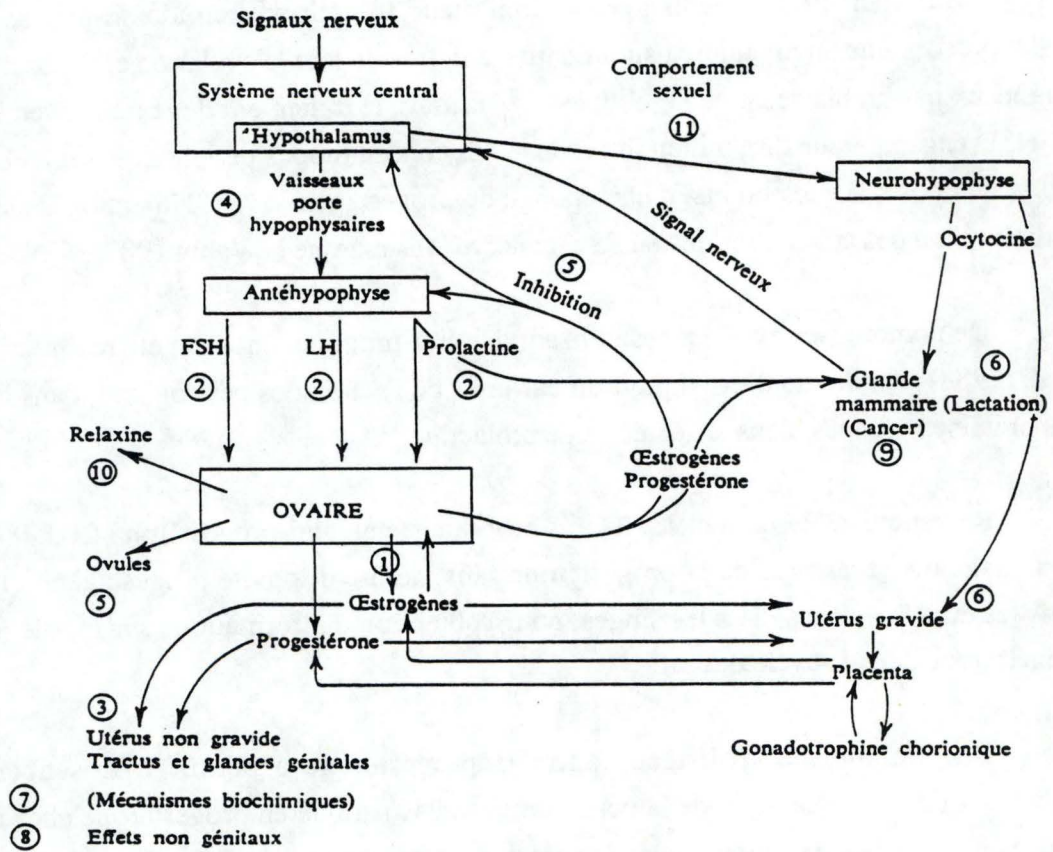


FIGURE 21 : Schéma du contrôle neuroendocrinien de la reproduction chez la femme. Action de la progestérone aux différents niveaux (NORMAN, 1987).

### 4.1.2. Hypothalamus

Chez la femelle en cycle, la progestérone a, quand elle est émise en concentration importante (phase lutéale), un effet inhibiteur marqué sur le centre cyclique d'émission de la GnRH et des hormones gonadotropes. Pour le centre tonique, les effets peuvent être variables.

En gestation, la progestérone a une influence négative sur le centre cyclique avec une interruption des cycles comme conséquence (Leymarie, 1988).

### 4.1.3. Hypophyse

Dans l'hypophyse, la progestérone inhibe généralement l'émission des hormones gonadotropes, en tout cas de LH, pouvant ainsi bloquer le cycle (fig. 21). Pour des brebis ovariectomisées, la progestérone est un faible inhibiteur de LH (Zuckerman, 1977).

Wheaton et Mullet (1982) ont traité des brebis postparturientes et des brebis ovariectomisées avec de la progestérone puis avec de la LHRH (LH Releasing Hormone). Le traitement à la P<sub>4</sub> diminue la concentration plasmatique de LH chez les postparturientes et augmente celle-ci chez les ovariectomisées. Le traitement à la LHRH modère la diminution de l'émission de LH chez les postparturientes; cette réponse reste constante chez les ovariectomisées. Les auteurs concluent que la progestérone agit sur l'hypophyse chez les brebis postparturientes, mais que cet effet demande la présence d'une autre hormone ovarienne, probablement l'oestradiol. Par contre, chez les ovariectomisées, ils constatent un manque d'effet de la P<sub>4</sub> dans la réponse hypophysaire.

## 4.2. Actions sur le tractus génital

### 4.2.1. Ovaire

Dans l'ovaire, la progestérone a comme rôle essentiel de favoriser le maintien du corps jaune. La durée du cycle oestral est contrôlée par le corps jaune. Si on prolonge les effets du corps jaune par des progestagènes exogènes, l'oestrus et l'ovulation apparaissent comme une conséquence non plus de la lutéolyse, mais de la cessation du traitement (Robertson, 1977).

Il apparaît que, si les progestagènes sont inhibiteurs de la maturation folliculaire et de l'ovulation, ils sont au contraire des stimulateurs via l'hypothalamus du comportement oestral et








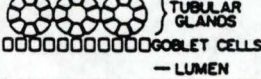
HORMONAL STATE	OVIDUCT GROWTH	OVIDUCT WEIGHT	STATE OF DIFFERENTIATION	HORMONE-INDUCED PROTEINS	
				ESTROGEN	PROGESTIN
UNSTIMULATED	 P ↓ NO GROWTH ↓ E	0.01g	 UNDIFFERENTIATED CELLS	NONE	NONE
PRIMARY STIMULATION	 DISCONTINUE ESTROGEN ↓	2g	 TUBULAR GLANDS } GLOBLET CELLS } — LUMEN	{ OVALBUMIN OTHERS	NONE AVIDIN
WITHDRAWAL	 P ↓ OR ↓ E	0.25g	 REGRESSED STRUCTURE	NONE	NONE
SECONDARY STIMULATION		0.5g	 TUBULAR GLANDS } GLOBLET CELLS } — LUMEN	{ OVALBUMIN OTHERS	{ OVALBUMIN OTHERS AVIDIN

FIGURE 22 : Modèle schématique décrivant le mode d'action de l'oestrogène et de la progestérone dans l'oviducte de poulet (NORMAN, 1987).

des fonctions de reproduction. Les progestagènes agissent notamment en augmentant le nombre de récepteurs à LH. Une administration de progestérone ou de dérivés est capable d'induire une maturation folliculaire après l'arrêt du traitement, et un comportement oestral souvent accompagné d'ovulations. Pour parfaire cette action, la stimulation ovarienne est réalisée par administration de PMSG (Bister, 1989).

Goodman et al. (1981) ont posé des implants de progestérone pour produire une phase lutale artificielle chez les brebis. Après retrait de l'implant, ils observent le pic de LH et, par la suite, ovulation et formation du corps jaune, mais le taux d'oestradiol diminue chez la plupart des brebis. S'ils injectent de la LH après le retrait de P<sub>4</sub>, une augmentation significative du taux d'oestradiol en résulte.

#### 4.2.2. Oviducte

Dans l'oviducte, la progestérone est sûrement impliquée dans les contractions de la partie distale et dans le relâchement de l'isthme (fig. 22). La descente de l'oeuf en est la conséquence (Paquay, 1989), pour qu'il arrive au moment idéal afin d'assurer la survie du blastocyte et l'implantation. On peut dire aussi que la progestérone fournit un milieu défavorable pour la capacitation et la fertilisation des spermatozoïdes (Martin, 1976).

#### 4.2.3. Utérus

Dans l'utérus, la progestérone poursuit en cycle oestral, l'action des oestrogènes en déclenchant la sécrétion des substances trophiques accumulées dans les cellules épithéliales.

En gestation, la P<sub>4</sub> agit en synergie avec les oestrogènes pour provoquer l'hyperplasie et l'hypertrophie des cellules épithéliales et musculaires. Ces actions permettent la survie et le développement de l'embryon (Paquay, 1989).

La progestérone intervient ensuite, chez certaines espèces, pour favoriser l'implantation de l'embryon. Elle inhibe la libération de PGF<sub>2α</sub> et diminue le nombre de récepteurs aux oestrogènes et à l'ocytocine; elle provoque ainsi l'immobilisation du myomètre en phase lutéale du cycle et en gestation (Norman, 1987). Ces actions semblent être importantes afin d'éviter une expulsion prématurée de l'oeuf.

La parturition est toujours précédée d'un rapide faiblissement des taux de progestérone au niveau de l'endomètre (Leymarie, 1988).

#### 4.2.4. Cervix utérin

La progestérone provoque d'abord une relaxation de la musculature du cervix utérin. Ensuite, ses actions sur les glandes, stimulées auparavant par les oestrogènes, conduisent à la sécrétion cervicale d'une substance très visqueuse, riche en acide sialique et en ions hydrogènes, et qui est hostile à la mobilité des spermatozoïdes (Derivaux et Ectors, 1986).

De plus, l'orientation des composants fibrillaires empêche le passage des spermatozoïdes et provoque par conséquent une diminution de leur survie (Margalioth, 1988).

#### 4.2.5. Vagin

La progestérone contrecarre les influences oestrogéniques sur la prolifération des couches superficielles de l'épithélium vaginal, mais agit en synergie avec les oestrogènes dans l'action sur les couches intermédiaires.

Plus tard dans le cycle ovarien, la progestérone provoque la décomposition des cellules périphériques et favorise la sécrétion d'un mucus vaginal (Margalioth, 1988).

### 4.3. Actions sur la glande mammaire

La progestérone agit sur le développement de la glande mammaire quand celle-ci a été stimulée auparavant par des oestrogènes (fig. 21). Elle favorise en effet le développement du système lobulaire des alvéoles pour la sécrétion du lait. De plus, une chute du taux de progestérone à la parturition semble nécessaire pour l'initiation de la lactation (Martin, 1976).

La progestérone a en fait, en fin de gestation, un double effet inhibiteur sur la lactogénèse. Elle empêche en effet l'augmentation de l'émission de prolactine (PRL) et l'action de cette hormone, et elle inhibe directement la synthèse de l' $\alpha$ -lactalbumine et du lactose (Paquay, 1989).

### 4.4. Actions sur le comportement

Si un effet "primeur" a eu lieu auparavant par les oestrogènes, la progestérone peut à elle seule déclencher le comportement sexuel (Martin, 1983). La progestérone participe aussi de

diverses manières au déclenchement et à la maintenance du comportement maternel, en association avec d'autres hormones (fig. 22).

Des recherches faites par Mandiki (1991) sur l'influence de la supplémentation en P<sub>4</sub> et en E<sub>2</sub> sur les niveaux hormonaux, le retour en cycle et la fertilité chez des brebis Texel tarées et allaitantes pendant la saison de reproduction, ont permis de tirer les renseignements suivants :

- La P<sub>4</sub> exogène permet de reproduire artificiellement, chez la brebis postparturiente, une phase lutéale dont le niveau de P<sub>4</sub> est comparable à celui atteint au cours d'un cycle normal;
- Cette phase lutéale induite entraîne une diminution de la sécrétion pulsatile de LH, mais celle-ci augmente rapidement après la fin du traitement;
- Il en découle une reprise précoce de l'activité ovarienne et oestrale, une fonction lutéale normale, et une meilleure croissance folliculaire témoignée par des concentrations plasmatiques en E<sub>2</sub> plus élevées chez les brebis traitées que chez les témoins.

Mandiki (1991) a aussi observé qu'une activité ovarienne et oestrale précoce suite aux traitements à la P<sub>4</sub> et à l'E<sub>2</sub> paraît permettre une fécondation avant le 40<sup>ème</sup> jour postpartum, mais la fertilité est nulle. Après le 50<sup>ème</sup> jour, celle-ci est meilleure et ne semble pas être influencée défavorablement par l'allaitement.

Une influence stimulatrice sur l'appétit, après un "priming" par les oestrogènes, a été décrite par Derivaux et Ectors (1986). Et récemment, Pirke (1988) a diagnostiqué qu'une diminution de la concentration en progestérone durant le cycle oestral, ou bien qu'un amoindrissement des intensités des pics sécrétoires de cette hormone, peut conduire à des maladies de type "boulimie nerveuse".

Certaines femmes, prenant d'importantes quantités de progestagènes synthétiques pour la contraception, se sont plaintes de dépression psychologique. Dans certains cas, on a pu y remédier en allégeant le dosage de certains progestagènes (Martin, 1976).

Il faut signaler que des sécrétions endogènes de progestérone débutant au moment de l'ovulation et l'administration de petites doses de cette même hormone sont reconnues comme indicatrices d'une élévation sensible de la température corporelle (entre 0,4 et 1,0°F) chez la femme. Aucun traitement antérieur à l'oestradiol n'est nécessaire pour cet effet (Martin, 1976).

## **D. LA PMSG**

C'est dans les années 30 que Cole et Hart ont découvert la PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropine), aussi appelée Equine Chorion Gonadotropin (ECG). Cette hormone est sécrétée au niveau des "endometrials cups" chez la jument gravide (Derivaux et Ectors, 1986).

Les "endometrials cups" sont des formations particulières, rencontrées en début de gestation vers les 36<sup>ème</sup> et 38<sup>ème</sup> jours, qui se présentent sous forme de surélévations circulaires entourant le sac vitellin. Elles sont constituées de cellules trophoblastiques uni- ou binuclées avec un cytoplasme pâle envahissant l'endomètre maternel (Derivaux et Ectors, 1986).

La PMSG se retrouve dans le sang entre le 40<sup>ème</sup> et le 150<sup>ème</sup> jours 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.

## **I. STRUCTURE**

La PMSG est une glycoprotéine constituée de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , dont l'association est indispensable à l'activité biologique. Elle a un poids moléculaire total de 64.000  $\delta$  (Derivaux et Ectors, 1986). Pour Gospodarowicz (1972), le poids moléculaire serait d'environ 53.000  $\delta$ . Cet auteur a montré également qu'une alkylation et une réduction de la PMSG changent de façon drastique le profil électrophorétique, obtenant ainsi un poids moléculaire de 23.000  $\delta$ , ce qui suppose qu'on a bien à faire à un oligomère composé de deux monomères. De fait, l'analyse des groupes terminaux de la protéine par la technique de Dansyl révèle qu'il existe deux acides aminés différents, la phénylalanine et la sérine à l'extrémité N-terminale. Chaque sous-unité  $\alpha$  et  $\beta$ , liée de façon non-covalente, possède une ou plusieurs parties d'hydrates de carbone (Gospodarowicz, 1972; Papkoff, 1981; Combarous, 1987).

D'importantes similarités de structure existent entre, d'une part, la PMSG et, d'autre part, la LH et la FSH. C'est tellement vrai que la combinaison de sous-unités de la PMSG avec des sous-unités de la LH ou de la FSH produit des molécules hybrides dotées d'une certaine activité (Papkoff, 1990). Toutes ces constatations font penser que les trois hormones pourraient provenir d'une seule gonadotropine ancestrale (Gosling et al., 1979).





### 1.1. Structure hydrocarbonée

La PMSG est particulièrement riche en hydrates de carbone qui représentent 41 à 45 % de la glycoprotéine, ce qui est un pourcentage nettement supérieur à celui de la LH ou de la FSH. En fait, la majorité des hydrates de carbone de la PMSG sont associés à la sous-unité  $\beta$ ; celle-ci en comprend 55,3 % pour 18,6 % à la sous-unité  $\alpha$  (Papkoff, 1990).

La PMSG contient essentiellement des sucres neutres (4 % de mannose, 13 % de galactose et 1,6 % de fucose; fig. 23), des hexosamines (14,6 % d'acétylglucosamine et 2,9 % d'acétylgalactosamine), et une forte teneur en acide sialique (10 à 13,5 %; Gospodarowicz, 1972; Derivaux et Ectors, 1986).

C'est l'acide sialique qui est responsable du caractère "acide" de la PMSG et de sa longue demi-vie.

### 1.2. Structure polypeptidique

La PMSG a une composition en acides aminés qui est typique des hormones glycoprotéiques, à savoir une teneur élevée en cystéine et en proline, et une teneur relativement faible en histidine, méthionine et tyrosine (Papkoff, 1990), comme l'illustre le tableau 1.

La chaîne polypeptidique  $\alpha$  de la glycoprotéine est produite par un seul gène (Boutkby et al., 1981; cités par Combarous, 1987). La sous-unité  $\beta$ , constituée de 145 acides aminés, présente également une grande similitude avec la sous-unité  $\beta$  de la LH humaine. En effet, 115 acides aminés sont identiques, les 30 acides aminés supplémentaires se situent du côté du carboxy-terminal de la séquence. Elle comporte 3 chaînes hydrocarbonées additionnelles liées à la sérine (Derivaux et Ectors, 1986).

Des études sur la structure des gonadotropines montrent qu'elles ont une faible teneur en hélices  $\alpha$  et qu'elles se trouvent principalement sous forme de feuillets  $\beta$  (Combarous, 1987).

Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  contiennent 5 à 6 ponts disulfures dont les positions semblent identiques, quelle que soit la gonadotropine à laquelle on se réfère. Il faut noter cependant que dans la sous-unité  $\alpha$ , les ponts disulfures seraient fort proches les uns des autres tandis que dans la sous-unité  $\beta$ , ils seraient distribués tout au long de la séquence en acides aminés (Combarous, 1987). De plus, autour du noyau central, le polypeptide sans cystéine forme trois boucles.

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
Tyrosine	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).

TABLEAU 1 : Composition en acides aminés de la PMSG (PAPKOFF, 1981).

Cette configuration spatiale est liée aux liaisons non-covalentes des sous-unités. D'ailleurs, l'association de celles-ci est nécessaire à l'expression de l'activité gonadotrope spécifique. Toute forme libre est totalement dépourvue d'activité.

## 2. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

### 2.1. Activité biologique

La PMSG interfère profondément avec l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire ainsi qu'avec les mécanismes de régulation intraovariens. Ceci est dû essentiellement à sa longue-vie d'une part et, d'autre part, au fait que la PMSG a des effets comparables à la FSH et la LH.

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. Combarous (1987) a montré qu'un retrait important de l'acide sialique diminue significativement l'activité "in vivo" en affectant la liaison hormone-récepteur.

La double activité de la PMSG (LH et FSH) 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), bien qu'il soit difficile d'établir précisément les causes de cette activité. Cependant, la composition en acides aminés de la PMSG par rapport à celles de la LH et de la FSH montre une similitude très importante de la teneur en lysine, proline, tyrosine, thréonine et acide aspartique entre la PMSG et la LH, alors que seules les compositions en histidine et en phénylalanine sont fort semblables entre la PMSG et la FSH (Papkoff, 1990). Combarous (1987) a d'ailleurs montré que la PMSG a la même affinité que la LH pour les récepteurs à LH, mais quatre fois moins d'affinité que la FSH pour les récepteurs à FSH.

Si on compare la composition des sous-unités de la PMSG à celle de leurs équivalents chez la LH et la FSH, on note que (tab. 2) :

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

Preparation	LH Potency (%)	FSH Potency (%)
PMSG	100	100
PMSG- $\alpha$	3.6	2.5
PMSG- $\beta$	6.2	5.0
PMSG- $\alpha$ + PMSG- $\beta$	27.4	33.6
PMSG- $\alpha$ + oLH- $\beta$	20.6	--
PMSG- $\alpha$ + oFSH- $\beta$	--	16.0
PMSG- $\alpha$ + hCG- $\beta$	33.2	--

TABLEAU 2: Résumé de l'activité LH et FSH des sous-unités de la PMSG et des sous-unités recombinantes (PAPKOFF, 1981).

Il est à noter aussi que les acides aminés terminaux de la PMSG sont identiques à ceux de la LH équine. Il n'y a pas de donnée sur ceux de la FSH.

## 2.2. Demi-vie et catabolisme

Il a été montré quasi unanimement que c'est l'acide sialique qui est responsable de la longue demi-vie (5 à 6 jours) de la PMSG dans la circulation (Gospodarowicz, 1972; Gosling et al., 1979; Papkoff, 1981). Cette demi-vie extraordinairement longue pour une gonadotropine est en rapport avec l'observation de la demi-vie de la HCG (Human Chorionic Gonadotropine) qui est de 8 heures (important), alors que sa composition en acide sialique est aussi relativement élevée ( $\pm 10\%$ ; tab. 3; Derivaux et Ectors, 1986).

Les gonadotropines sont dégradées principalement dans le foie et les reins. 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).

Le même auteur signale que l'acide sialique augmenterait le temps de demi-vie par une action sur les résidus galactoses, empêchant de la sorte la capture des glycoprotéines par les lectines hépatiques.

Pour Derivaux et Ectors (1986), chez la jument, ce n'est pas dans l'urine que la PMSG est excrétée. Mais Combarnous (1987) signale que Lefort et al. (1986) ont réussi à suivre par immunoassay sur de l'urine, l'évolution de la PMSG intra-corporelle chez la brebis. Pour ces auteurs, l'élimination via les urines de la PMSG a lieu très rapidement sans qu'elle soit fort dégradée.

## 2.3. Reconnaissance spécifique des récepteurs et activation transmembranaire

Les glycoprotéines hypophysaires circulent dans le sang sous forme libre, et lorsqu'elles arrivent au niveau de la cellule cible, elles se lient à un récepteur membranaire spécifique. Tout le monde admet que les complexes hormone-récepteur sont des structures oligomériques, mais il a été montré que des gonadotropines presque complètement déglycosylées sont toujours capables de se lier spécifiquement à leurs récepteurs (Combarnous, 1987). Ceci indique que leur partie polypeptidique est entièrement responsable de la reconnaissance au récepteur.

	<u>PM</u>	<u>pHi</u>	<u>%glucides</u>	<u>%ac.sialique</u>	<u>demi-vie</u>
FSH	32.000	3,3 à 4,8	25 %	5 %	6 heures
LH	30.000	6,5 à 9,8	10 %	1 à 2%	12 à 50 minutes
PMSG	64.000	-	46,7%	10 à 13,5%	4 à 6 jours
hCG	38.400	3,8 à 5,1	30 %	9 à 12 %	8 heures

N.B. Ces données varient légèrement d'une espèce à l'autre.

TABLEAU 3 : Composition approximative et demi-vie des différentes gonadotropines (DERIVAUX et ECTORS, 1986).

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

- la spécificité de l'hormone est déterminée par la charge électrique d'une boucle faite par un pont disulfure. Cette charge pourrait changer suite à une désamination d'un acide aminé et entraîner le passage d'une activité à l'autre;
- Combarnous (1987) propose que les glycoprotéines ont un site de haute affinité commun mais aussi des sites d'inhibition spécifique 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.

Comme pour la LH, la transmission intracellulaire du message de la PMSG se fait par la voie de l'AMPC. La liaison hormone-récepteur membranaire entraîne l'activation de l'adénylate-cyclase qui transforme l'ATP en AMP cyclique. Cette dernière stimule des protéines kinases qui, par phosphorylation de différentes protéines, entraînent la réponse biologique (Gosling et al., 1979). Il est possible que ce soit un noyau interne de la chaîne hydrocarbonée qui soit impliqué dans la stimulation de l'adénylate-cyclase (Combarnous, 1987).

Les récepteurs membranaires peuvent être extraits des tissus cibles après destruction des membranes, et être utilisés pour le dosage des glycoprotéines réceptrices.

Il est important de signaler que bien que les effets des messages 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).

#### 2.4. Immunogénicité

L'immunogénicité de la PMSG soulève encore des controverses à l'heure actuelle. La PMSG n'est pas immunogène selon Debecker (1984), alors que Mauléon (1975, cités par Heins et al., 1986) affirme que des traitements rapprochés, tous les 17 jours, provoquent la formation d'anticorps à la PMSG.

L'étude des effets des anticorps monoclonaux contre la PMSG a permis de voir après injection que la concentration en PMSG tombe rapidement à des valeurs non détectables moins de deux heures après le début du traitement (Dieleman et Bevers, 1987). Ceci montre que la PMSG est neutralisée au moment de la maturation folliculaire finale. Ces mêmes auteurs ont



constaté que les ovulations, après traitement contre la PMSG, étaient plus rapides sur l'ensemble des brebis traitées et plus serrées dans le temps.

### 3. EFFETS DES TRAITEMENTS A LA PMSG

Un traitement à la PMSG est souvent envisagé chez les éleveurs lorsque ceux-ci souhaitent stimuler la croissance folliculaire des brebis ou avancer le début des chaleurs et augmenter le taux d'ovulation (Cognié, 1970). Les injections de PMSG suivent très souvent un traitement progestatif, surtout en dehors de la période de reproduction.

La plupart des auteurs sont d'accord pour affirmer que la PMSG augmente la prolificité et différentes expériences ont tenté de visualiser une relation entre la dose de PMSG et la prolificité (Cognié, 1970; Evans et Robinson, 1980; Bister et al., 1986).

Cependant, 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 œufs fécondés (Quirke et al., 1987). Selon Heins et al. (1986), l'injection de doses élevées (600 ou 900 UI) de PMSG après synchronisation des cycles permet de conclure que chez la brebis Texel :

- la fertilité des brebis n'est pas altérée par le traitement,
- les effets sur la prolificité sont aléatoires,
- les performances de reproduction lors des retours en chaleur ne sont pas diminuées.

#### 3.1. Effets au niveau ovarien

##### 3.1.1. Recrutement

Lorsque l'on étudie les effets des traitements hormonaux sur l'ovaire, il faut tenir compte du nombre de follicules dans la phase de croissance et de la vitesse de croissance de ces follicules (Cahill et Dufour, 1979).

La PMSG permet de recruter des follicules d'un diamètre de 0,8 à 2 mm, c'est-à-dire plus petits que lors de la lutéolyse d'un cycle naturel (Tsonis et al., 1984; Driancourt, 1987).

Selon Whyman et Moore (1980), la réponse ovarienne à la PMSG est caractérisée par une augmentation du poids des ovaires, par des ovulations multiples et par l'apparition de follicules kystiques (perdurant à la surface de l'ovaire sans ovuler).

### 3.1.2. Moment de l'ovulation

Chez les brebis traitées à la PMSG, une diminution de l'intervalle moyen "arrêt du traitement à la P<sub>4</sub> - apparition de l'ovulation" est observée. L'étalement de l'apparition des ovulations est également réduit (Cognié et al., 1970). Toutefois, il n'existe pas une approbation générale des auteurs sur cette observation : avancement de plus de 15 heures du moment d'ovulation par rapport au début de l'oestrus.

Cognié (1970) montre qu'il n'existe pas de différence pour le moment de l'ovulation entre deux doses de PMSG (400 UI et 800 UI) chez des brebis Ile-de-France.

De même, Noël (1989), chez la brebis Suffolk, n'a pas observé de différence significative dans le moment d'ovulation pour des doses de 500 UI et 800 UI. Cependant, Lambert (1990) montre que la dose de 800 UI est préférable à celle de 500 UI pour induire l'ovulation en saison de reproduction chez la brebis Suffolk (juillet à octobre).

### 3.1.3. Taux d'ovulation

Saumande et al. (1978, cités par Driancourt, 1987) ont observé que le taux d'ovulation après une injection de PMSG est plus élevé si l'ovaire possède beaucoup de petits follicules. L'explication à ce phénomène peut être que la PMSG sauve les follicules en début d'atrésie et empêche les follicules antraux de dégénérer (Moore et al., 1981; cités par Jacques, 1989).

Cependant, une étude de la population folliculaire chez des brebis à taux d'ovulation variable explique les constatations précédentes. Selon Bindon et al. (1979) et Smith (1976; cité par Cahill et Dufour, 1979), les brebis à haut taux d'ovulation répondent mieux à une stimulation par la PMSG que des brebis à faible taux d'ovulation. Ceci s'explique par le fait que les premières semblent avoir plus de follicules dans la phase de croissance et donc plus de follicules susceptibles d'être stimulés.

Lambert (1990) montre que les doses de 500 UI et 800 UI de PMSG ne permettent pas de mettre en évidence un réel effet superovulatoire chez la brebis Suffolk.

Heins et al. (1986) signalent que ce genre de traitement ne semble pas augmenter de façon significative la fertilité du troupeau en saison de reproduction.

Chez la brebis ou la vache, la PMSG pourrait induire une meiose prématurée chez certains follicules, produisant 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.

### 3.2. Effets au niveau hormonal

En fait, la PMSG est une hormone qui mime l'action d'un "facteur de décharge" hypophysaire, soit en agissant directement au niveau hypothalamique, soit indirectement en stimulant la croissance folliculaire des ovaires et les sécrétions oestrogéniques (Cognié, 1970).

Les follicules à antrum sont dépendants des gonadotropines; le retrait de ce support conduit à l'atrésie. Les follicules pré-antraux sont plus stables; ils sont certainement aussi influencés par les gonadotropines mais peut-être à plus long terme.

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 l'environnement hormonal ne serait plus favorable à la survie et au développement des embryons.

### 3.3. Facteurs de variabilité

L'arrêt et l'induction des cycles oestriques par des modifications de la photopériode et par le recours aux traitements hormonaux utilisant la PMSG sont des techniques possibles pour activer la maturation folliculaire, le moment et le taux d'ovulation. Différents paramètres sont à l'origine des variations observées dans les résultats obtenus; ce sont la période de l'année, le génotype, l'individualité,...

#### 3.3.1. Période de l'année

La période de l'année a une influence sur l'intervalle fin du traitement à la PMSG - début observé de l'ovulation. Cette influence de la saison sur l'apparition plus rapide de l'ovulation peut être reliée à la variation saisonnière de sensibilité du système nerveux central aux oestrogènes (Reardon et Robinson, 1961; cités par Cognié, 1970). Une variation dans la sécrétion stéroïdienne de l'ovaire n'est cependant pas à rejeter. Cette influence du rythme nyctéméral est accentuée lorsqu'une injection de PMSG est faite à la fin du traitement progestatif. Le taux d'ovulation est maximum avant les jours les plus courts de l'année

(photopériode décroissante), puis diminue lorsqu'on approche de la fin de la période de reproduction (Montgomery et al., 1988).

L'intervalle entre l'injection de PMSG et l'ovulation est plus court en période de reproduction qu'en anoestrus (Cognié, 1970). Le moment d'ovulation est avancé de 6,4 heures, quelle que soit la dose de PMSG, en automne par rapport au printemps chez les brebis Border, Leicester et Merinos (Evans et Robinson, 1980). Noël (1989) a observé chez la brebis Suffolk un avancement des ovulations en octobre (pleine saison de reproduction) par rapport aux mois de juillet, janvier et avril.

Lambert (1990) observe, chez la brebis Suffolk, que l'ovulation devient de plus en plus précoce au début de la saison de reproduction (juillet à octobre) tandis que le 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, septembre).

### 3.3.2. Génotype

Le génotype dépend de l'effet des gènes (additivité, dominance, épistasie), des liaisons des gènes entre eux (linkage), des ruptures des liaisons des gènes et de bien d'autres facteurs aléatoires.

Lorsqu'on examine l'anatomie et la physiologie d'un animal, on constate que certaines caractéristiques sont fortement héréditaires (couleur) et d'autres moins, dépendantes alors principalement du milieu. Il est important de savoir que, selon Craplet et Thibier (1980), tous les caractères de fécondité ainsi que ceux dirigeant la physiologie de la reproduction sont d'une "héritabilité" basse. Cet auteur suppose que la sélection naturelle a depuis longtemps "standardisé" le génotype des ovins placés dans un milieu déterminé.

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

Une expérience de Bindon et al. (1975; cités par Heins et al., 1986) montre que la PMSG est trois fois plus efficace pour élever le taux d'ovulation d'une partie d'un troupeau de brebis Merinos sélectionnées pendant plusieurs générations, en comparaison avec le reste du troupeau non sélectionné.

Il est à noter que la réponse ovulatoire à des injections de PMSG est comparable chez diverses races prolifiques (Finnish, Landrace, D'Man et Booroola), bien que les génotypes soient fort différents. Par contre, la même réponse est plus disparate chez des brebis de races non prolifiques (Timhadite, Galway et Romney; Quirke et al., 1987).

### 3.3.3. Variabilité individuelle

La variabilité individuelle s'ajoute aux variabilités temporelles et génotypiques pour influencer les conséquences dans les traitements à la PMSG. La notion de "stress" est souvent à l'origine de ces variations entre différents animaux d'une même race.

C'est Cognié (1970) qui a mis en évidence les différences de sensibilité, pour quelques brebis, à l'injection d'une hormone protéique (PMSG). La sensibilité importante de certaines brebis à un tel stress n'est pas à rejeter, même si les injections de doses égales ont été faites par voie intramusculaire (Cognié, 1970; Evans et Robinson, 1980; Bister et al., 1986).

De plus, il a été montré qu'il existe chez la femme, la vache et la brebis, une variabilité individuelle importante dans la stéroïdogénèse avant, durant et après le pic préovulatoire de LH (Callesen et al., 1986). 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.

MATERIEL

ET

METHODES

## **A. RAPPEL DES OBJECTIFS**

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons étudié fondamentalement les effets de divers traitements hormonaux sur des mécanismes ovariens et endocriniens qui interviennent au cours du cycle chez la brebis Suffolk en période de reproduction.

L'étude a porté sur les effets d'un traitement à la progestérone seule, à la PMSG seule, et d'un traitement couplant les deux hormones : progestérone et PMSG.

Toutes les expériences ont été faites avec des brebis préalablement synchronisées. De plus, un lot de brebis non traitées nous a servi de référence pour comparer les effets des différents traitements.

Nous avons caractérisé le profil de différentes sécrétions hormonales (P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>, LH et FSH) au cours d'un cycle et nous avons suivi par la technique d'endoscopie l'évolution parallèle de la croissance et de la maturation folliculaire.

TABLEAU 1 : Dates de naissance des brebis incluses dans l'expérience.

Lot	N° brebis	Date de naissance	Lot	N° brebis	Date de naissance
Témoin	9	20-Déc-82	PMSG	42	25-Mar-84
	47	20-Déc-82		51	3-Avr-84
	55	3-Jan-85		63	13-Jan-85
	92	20-Jan-86		82	17-Déc-85
	94	21-Jan-86		86	18-Déc-85
	102	7-Fév-86		89	19-Déc-85
	114	4-Jan-87		115	4-Jan-87
	122	4-Jan-87		349	8-Jan-88
	321	16-Déc-87		118	18-Déc-86
	388	12-Avr-88		380	30-Mar-88
P4	2	20-Déc-82	P4 + PMSG	48	28-Mar-84
	69	18-Déc-85		57	6-Jan-85
	74	9-Avr-85		68	13-Jan-85
	97	8-Mar-86		70	3-Fév-85
	120	4-Jan-87		73	30-Mar-85
	131	8-Jan-87		95	21-Jan-86
	331	20-Déc-87		109	27-Fév-86
	339	1-Jan-88		112	23-Déc-86
	364	20-Jan-88		345	5-Jan-88
	421	19-Déc-88		379	23-Mar-88



## **B. PLAN EXPERIMENTAL**

### **1. CONDITIONS EXPERIMENTALES**

Les brebis Suffolk utilisées font partie du troupeau du Centre de Recherches Ovines de Faulx-les-Tombes. Pendant toute la durée de l'expérience, les brebis sont restées en bergerie et ont reçu des rations adaptées à leur besoin d'entretien. Les conditions de photopériode naturelle sont toujours respectées.

Les manipulations "in vivo" ont été effectuées au Centre de Recherches Ovines de Faulx-les-Tombes (CRO). Les dosages hormonaux et les traitements de données ont été réalisés au Laboratoire de Physiologie Animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur.

### **2. PLAN EXPERIMENTAL**

Avant de détailler le plan expérimental, il est nécessaire d'apporter l'explication suivante: afin de permettre les comparaisons, il était nécessaire que toutes les brebis soient au même stade du cycle au début de l'expérience. Ceci n'est possible que par une synchronisation des cycles. Pour éviter que certaines brebis subissent deux traitements successifs à la P<sub>4</sub> (ce qui risquait de fausser les résultats), nous avons choisi de les "pré"-synchroniser grâce à deux injections de PGF<sub>2α</sub>.

L'expérience débute le 5 novembre 1990 et se termine le 6 décembre 1990 avec 40 brebis Suffolk dont les dates de naissance sont mentionnées dans le tableau 1.

Les cycles des brebis sont synchronisés grâce à deux injections de prostaglandines (PGF<sub>2α</sub>) distantes de 11 jours (le 7 et le 17 novembre).

Afin de vérifier l'efficacité de cette première synchronisation, nous avons réalisé un dosage des quantités de P<sub>4</sub> plasmatiques sur des prélèvements recueillis les 5, 7, 9, 12, 14 et 17 novembre.

Les 40 brebis sont ensuite divisées en 4 lots (A, B, C et D) de 10, les différents traitements étant administrés au cours du cycle suivant la synchronisation.

- Les brebis du lot A servent de témoin et ne reçoivent donc aucun traitement.

- Les brebis du lot B reçoivent une éponge vaginale de Fluorogestone Acétate (FGA 40 mg) durant 14 jours, c'est-à-dire du 19/11/90 au 03/12/90.
- Les brebis du lot C reçoivent une injection de 800 UI de PMSG le 14<sup>ème</sup> jour du cycle, c'est-à-dire le 3 décembre 1990.
- Les brebis du lot D reçoivent le traitement complet (éponge de FGA pendant 14 jours et injection de 800 UI de PMSG au retrait).

Des endoscopies quotidiennes pendant 18 jours (du 19 novembre au 6 décembre) sont réalisées sur 5 des 10 brebis de chaque lot.

Pendant toute la durée des endoscopies, des prises de sang sont réalisées sur les 40 brebis deux fois par jour (à 8 heures et à 16 heures) afin de déterminer l'évolution des profils de sécrétion de la FSH et de l'E<sub>2</sub>. Les prélèvements recueillis à 8 heures serviront également pour l'analyse des taux plasmatiques de P<sub>4</sub>.

Des prises de sang sériées (toutes les 20 minutes pendant 12 heures) sont également réalisées afin d'étudier la pulsativité de l'émission de la LH en phase lutéale (le 27/11/90) et en phase folliculaire (le 04/12/90).

Le calendrier de l'expérience peut donc se résumer de la façon suivante :

05/11/90	:	Prises de sang aux 40 brebis.
07/11/90	:	Prises de sang et injections de prostaglandines aux 40 brebis.
09/11/90	:	Prises de sang aux 40 brebis.
12/11/90	:	Prises de sang aux 40 brebis.
14/11/90	:	Prises de sang aux 40 brebis.
17/11/90	:	Prises de sang et injections de prostaglandines aux 40 brebis.
19/11/90	:	Poses des éponges aux brebis des lots B et D.
27/11/90	:	Prises de sang sériées aux 40 brebis.
03/12/90	:	Retrait des éponges aux brebis des lots B et D. Injection de 800 UI de PMSG aux brebis des lots C et D.
06/12/90	:	Prises de sang sériées aux 40 brebis.
Du 19/11 au 06/12	:	. Endoscopies sur 5 brebis de chaque lot . Prises de sang à 8 heures et à 16 heures aux 40 brebis.

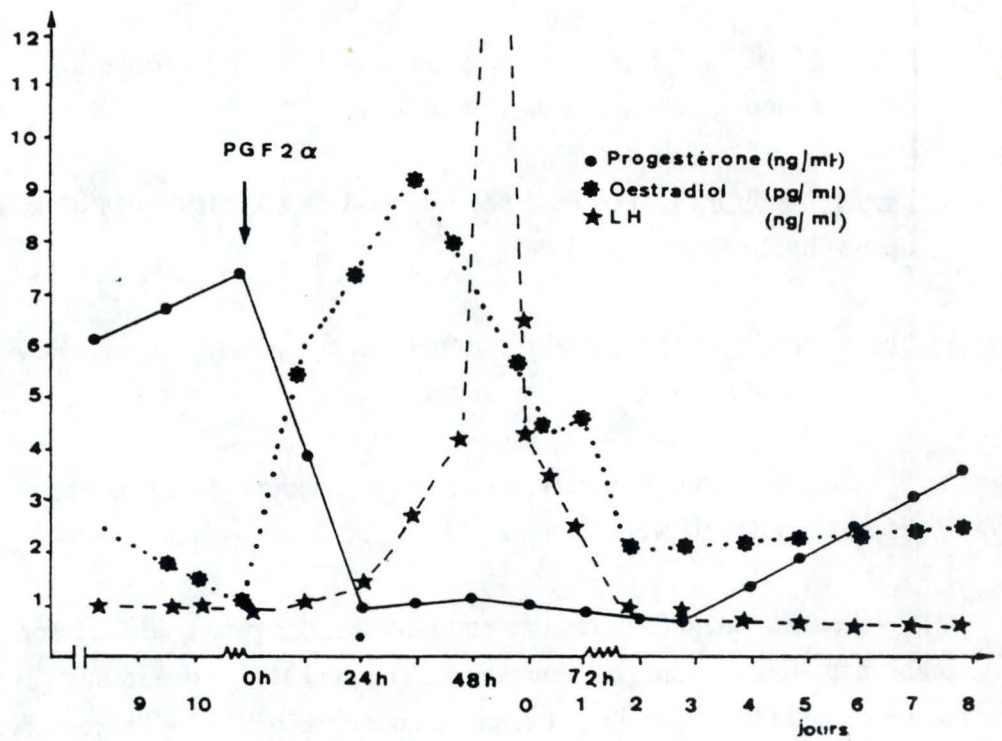


FIGURE 1 : Variations du taux du 17 $\beta$ -oestradiol, de la progestérone et de la LH après injection de PGF $_{2\alpha}$  (DERIVAUX et ECTORS, 1986).



FIGURE 2 : Pose d'éponge.

## C. METHODES UTILISEES

### I. TECHNIQUES ET TRAITEMENTS UTILISES IN VIVO

#### 1.1. Synchronisation des cycles

##### 1.1.1. Traitement aux prostaglandines

Pour la première synchronisation, nous avons utilisé une prostaglandine synthétique. Cette prostaglandine, proche de la structure de la  $PGF_{2\alpha}$  et commercialisée sous le nom d'Estrumate® par la firme Coopers, est injectée par voie intramusculaire au niveau des muscles fessiers. Deux injections à 11 jours d'intervalle sont nécessaires pour parfaire l'efficacité du traitement.

L'Estrumate® est un agent lutéolytique puissant qui provoque la régression fonctionnelle et morphologique du corps jaune très rapidement. L'oestrus réapparaît 2 à 4 jours après le traitement, il est suivi d'une ovulation normale et de la formation d'un nouveau corps jaune (fig. 1).

##### 1.1.2. Traitement à la progestérone

Le traitement à la progestérone se fait via la pose d'éponges de polyuréthane imprégnées de 40 mg d'un dérivé de la progestérone, la fluorogestone-acétate (FGA) commercialisée par Intervet, Searle, sous le nom de Chronogest®.

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.

Après chaque pose d'éponge, l'applicateur est soigneusement lavé et désinfecté dans du Dettol®.

Le retrait de l'éponge se fait 14 jours après la pose, en tirant légèrement vers le bas la ficelle dépassant de la vulve et à laquelle est fixée l'éponge (fig. 2).

## 1.2. Traitement à la PMSG

Le traitement à la PMSG se fait par une injection intramusculaire dont la dose est 800 UI.

La PMSG est commercialisée par la firme Intervet sous le nom de Folligon®. La gonadotropine est présentée sous forme lyophilisée et est mise en solution extemporanément.

## 1.3. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins sont réalisés par ponction de la veine jugulaire, après qu'elle ait été gonflée au moyen d'un garrot à la base du cou.

Après introduction d'une fine aiguille, le sang est recueilli dans des tubes en cristal de polystyrène, préalablement héparinés pour éviter toute coagulation.

Les tubes sont rapidement centrifugés 15 minutes à 3000 tours par minute afin de séparer les éléments figurés du plasma. Celui-ci est recueilli dans de petits tubes de polystyrène et stocké à - 20°C jusqu'au moment du dosage.

Lors des prises de sang sériées, nous avons utilisé des vacutainers Venoject (très fine aiguille appliquée sur un tube sous vide contenant un mélange lithium-héparine), ceci afin de ne pas trop abîmer le tissu de la jugulaire.

A la fin de chaque série, une crème anti-inflammatoire (Hirudoïd®) est appliquée sur la peau du cou.

## 1.4. Endoscopies

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

Une pratique courante est toutefois nécessaire en vue d'une interprétation correcte des observations.

Scheep:

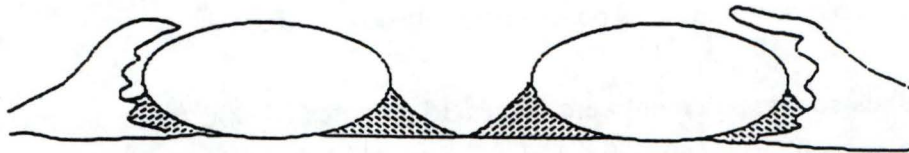
Photo:

Date:

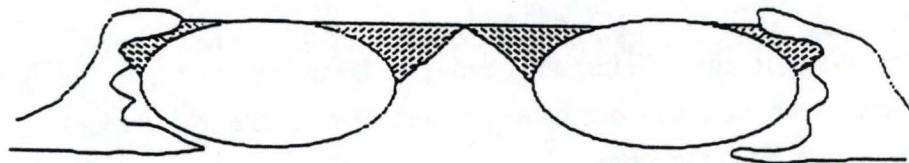
Hour:

	Left	Right
CL.		
LARGEST F.		
SECOND		
THIRD or OTHER		

Outer Side



Inner Side



Observations

FIGURE 3 : Carte d'observation ovarienne.

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

La paroi abdominale est rasée et désinfectée soigneusement (Hibitane® ou Dettol®). Deux anesthésies locales (Xylocaïne® ou Lignocaïne®) sont réalisées aux endroits de perforation prévus pour la pose de la fibre optique et du palpeur, c'est-à-dire à 10 cm de part et d'autre de la ligne médiane et à une quinzaine de centimètres de la naissance du pis, en évitant soigneusement la veine mammaire.

Un endoscope Wolf muni d'une fibre souple le reliant à une source lumineuse de 150 W est introduit dans une des incisions. Dans la seconde incision est introduit un palpeur gradué permettant de manipuler les ovaires et de mesurer la taille de tous les follicules visibles sur chaque ovaire.

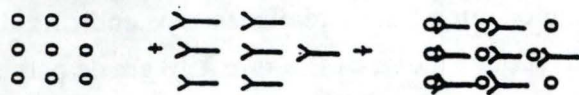
Lors de l'opération, de l'air stérile est insufflé dans la cavité abdominale et le péritoine. Le tractus génital est ainsi livré à l'oeil de l'expérimentateur. Une observation rapide permet de déterminer le type d'ovaire (gauche ou droit) et sa position (externe ou interne). Ensuite, le nombre, la position et la taille des follicules sont consignés sur une carte ovarienne (fig. 3).

L'observateur peut cependant rencontrer différents problèmes et notamment une difficulté d'interprétation qui provient entre autres d'un changement d'apparence de l'ovaire, à un même stade du cycle ovarien, chez une même brebis et entre les brebis. Une difficulté d'estimation visuelle de l'âge du corps jaune ou des follicules est aussi possible car les variations de taille et de forme dépendent fortement de la profondeur des structures ovariennes à l'intérieur du cortex de l'ovaire.

L'observation terminée, les instruments sont retirés et désinfectés à l'alcool, les incisions sont désinfectées avec une poudre antiseptique (Spitalen®) et fermées au moyen d'agraffes de Michel.

Enfin, tous les trois jours de l'expérience, les brebis endoscopées recevaient une injection intramusculaire d'antibiotique (Terramycine®) ainsi qu'une injection intrapéritonéale d'un autre antibiotique (Linco-Spectin®).

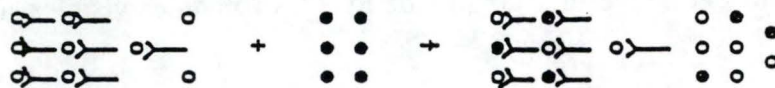
Fixation de l'H<sup>\*</sup> sur l'As



légende

- = H°
- = H\*
- Y = 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.

FIGURE 4 : Principe du dosage par RIA (BISTER, 1980).



## 2. DOSAGES HORMONAUX

### 2.1. Principe du dosage radioimmunologique

La détermination des concentrations plasmatiques en diverses hormones est faite par le dosage radioimmunologique (RIA) selon les techniques décrites par Bister (1980; fig. 4).

Le principe du dosage RIA est basé sur la compétition entre une quantité connue d'hormone marquée, par la fixation d'un ou de plusieurs atomes radio-actifs ( $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $H^3$ ) et une quantité variable et inconnue d'hormone froide se trouvant dans l'échantillon à analyser, vis-à-vis d'un antisérum (As) qui lui est spécifique.

L'hormone froide ( $H^0$ ) peut se lier avec l'antisérum spécifique et la réaction peut s'écrire de la manière suivante :



En ajoutant à ce système de l'hormone marquée ( $H^*$ ), on obtient une nouvelle équation qui est :



On obtient l'hormone en question sous deux formes :

- forme libre :  $H^0$  et  $H^*$
- forme liée à l'anticorps :  $H^0 \cdot As$  et  $H^* \cdot As$

La quantité d'hormone marquée liée à l'antisérum spécifique est d'autant plus faible que la quantité d'hormone froide de l'échantillon est élevée. En séparant l' $H^*$  liée à l'antisérum de l' $H^*$  libre, on peut par mesure de la radioactivité de l'une des fractions, calculer la quantité d' $H^0$ .

Une courbe standard effectuée dans les mêmes conditions avec des quantités connues d'hormone froide sert de référence.

Pour des raisons techniques et financières, nous avons utilisé l' $I^{125}$  pour les hormones hypophysaires (LH et FSH) et le tritium ( $H^3$ ) pour les hormones stéroïdiennes ( $P_4$  et  $E_2$ ).

## TABLEAU 2: Mode opératoire du dosage de la P4

### Extraction:

- 1) Extraction de la P4 contenue dans 200  $\mu$ 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  $\mu$ l de tampon wide.
  - 100  $\mu$ l de P4\*
  - 50  $\mu$ l d'AS
- 2) Incubation 1/2 heure à 37°C et une nuit à 4°C.

### Séparation:

- 1) Addition de 500  $\mu$ l de dextran-charcoal à 4°C.
- 2) Agitation et incubation pendant 10 min à 4°C.
- 3) Centrifugation pendant 10 min à 0°C et à 2800 rpm.

### Comptage:

- 1) Prélèvement de 300  $\mu$ l de surnageant (phase liée) et addition de 3 ml d'Ecoscint A.
- 2) Comptage 4 min à l'analyseur  $\beta$ .

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

## 2.2. Calcul des résultats

Selon le modèle mathématique couramment appliqué aux dosages RIA, la radioactivité de la fraction liée peut être déterminée par l'équation :

$$A = A_0 \frac{C_m}{C_m + C_f} + B G$$

avec : A : radioactivité de la fraction liée (en cpm) pour une certaine concentration d'hormone froide,

$A_0$  : radioactivité maximale (en cpm) de la fraction liée,

BG : radioactivité non spécifique (Back Ground), en l'absence d'Ac,

$C_m$  : concentration en hormone marquée,

$C_f$  : concentration en hormone froide.

Cette équation est ajustée aux données expérimentales de la courbe des standards par la méthode des moindres carrés avec pondération (Bister, 1980). On a donc transformé des valeurs mesurées, en cpm, en concentrations hormonales.

## 2.3. Dosage de la progestérone

Le mode opératoire du dosage de la progestérone est résumé au tableau 2.

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  $KH_2PO_4$  (PM = 136,09) et 77,9 g de  $NaH_2PO_4$  (PM = 141,96) par litre d'eau distillée.

La progestérone radioactive est tritiée (1-2-6-7  $H^3 P_4$ ), d'activité spécifique de 110 Ci/mmole (4,07 TBq/mmole) et de concentration radioactive 1m Ci/ml toluène.

### TABLEAU 3: Mode opératoire du dosage de l'E<sub>2</sub>

#### Extraction:

- 1) Extraction de l' E<sub>2</sub> contenue dans 200 µl de plasma par 2 ml de diéthyl éther P.A., puis agitation pendant deux minutes au vortex.
- 2) Congélation à -20°C.
- 3) Récupération de la totalité de la phase liquide.
- 4) Evaporation à sec dans une étuve sous vide à 40°C.

#### Fixation Ag-Ac:

- 1) Addition de
  - 50 µl de tampon wide.
  - 100 µl de E<sub>2</sub>\*
  - 50 µl d'AS
- 2) Incubation 1/2 heure à 37°C et une nuit à 4°C.

#### Séparation:

- 1) Addition de 500 µl de dextran-charcoal à 4°C.
- 2) Agitation et incubation pendant 10 min à 4°C.
- 3) Centrifugation pendant 10 min à 0°C et à 2800 rpm.

#### Comptage:

- 1) Prélèvement de 300 µl de surnageant (phase liée) et addition de 3 ml d'Ecoscint A.
- 2) Comptage 4 min à l'analyseur β.

La courbe standard est réalisée à partir de 100 µl de solutions contenant 0; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 200; 500; 1000; 2000 et 3000 pg de E<sub>2</sub>/ml.

A partir de cette solution, nous avons préparé un stock (50  $\mu$ l dans 5 ml de solution toluène-éthanol, 9/1) qui sert à préparer la solution de progestérone radioactive pour le dosage :

- 100  $\mu$ l de la solution stock
- évaporation sous vide
- reprendre par 0,5 ml de tampon Wide de façon à obtenir  $\pm$  7000 cpm pour le Total Count (100  $\mu$ l dans 3 ml de liquide scintillant).

L'antisérum (As) provient du Laboratoire d'Endocrinologie 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'absorber la phase libre et ainsi de la séparer de la phase liée à l'antisérum, on utilise une solution de Dextran-Charcoal (650 mg de Charcoal Norit A Serva et 65 mg de Dextran T70 Pharmacia, dans 300 ml de tampon Wide).

Le comptage se réalise sur 300  $\mu$ l de surnageant (phase liée) mélangés à 3 ml d'Ecoscint A (liquide scintillant produit par la firme National Diagnostics), dans une minifiole de polyéthylène et compté dans un compteur à scintillation (Beckman LS 1801) durant 4 minutes maximum. Le pourcentage d'erreur est de l'ordre de 5 à 10 %.

#### 2.4. Dosage de l'oestradiol

Le mode opératoire complet se trouve au tableau 3.

Toutes les étapes du dosage de l'E<sub>2</sub> sont similaires à celles du dosage de la progestérone. Les quelques variantes sont exposées ci-dessous.

L'oestradiol plasmatique est extrait par du diéthyl éther P.A. (Merck 921) avec un coefficient d'extraction compris entre 90 et 100 %.

L'oestradiol radioactif est tritié (2-4-6-7 H<sup>3</sup> E<sub>2</sub>), d'activité spécifique de 101,3 Ci/mmele (3,75 TBq/mmele) et de concentration radioactive 1 m Ci/ml toluène.

L'antisérum (As) provient du Laboratoire d'Endocrinologie de Marloie.

TABLEAU 4 : Tableau récapitulatif du dosage de la LH.

Rôle	Tube	Nombre d'exemplaires	Composition (µl)				
			LH <sup>o</sup>	As	LH*	ARGG	EW
Mesure de l'activité totale	T.C.	3	-	-	50	-	-
Mesure de l'activité non spécifique	B.G.	3	-	-	50	250	100
Courbe standard	0 ng/ml	3	50	50	50	250	-
	1	3					
	1,6	3					
	2	3					
	4	3					
	6	3					
	12,5	3					
	25	3					
	50	3					
	75	3					
	100	3					
	Pool de plasma	P.1.	3	50	50	50	250
P.2.							
Plasma inconnus	1	3	50	50	50	250	-
	2						
	3						
	n						

## 2.5. Dosage de la LH

Les gonadotropines peuvent être dosées par RIA. On réalise un dosage homologue où la compétition vis-à-vis de l'antisérum se fait entre LH froide et LH marquée à l'I<sup>125</sup>, toutes deux d'origine ovine.

La LH ovine purifiée (NIADDK-oLH-I-3) et l'antisérum spécifique (NIADDK-anti-oLH-1) sont fournis par le National Institute of Hormonology (NIH).

La courbe standard est réalisée en utilisant la LH à des concentrations croissantes de 0; 1; 1,6; 2; 4; 6; 12,5; 25; 50; 75; 100 ng/ml. Les dilutions sont faites dans le tampon Egg-White.

L'antisérum LH est dilué selon les conseils du NIH de manière à atteindre une dilution finale de 1/1.500.000 dans les tubes.

Pour l'obtention de la LH marquée, l'oLH (NIAMDD-oLH-I-1), diluée à raison de 4 µg/40 µl est employée pour le marquage à l'iode<sup>125</sup> par oxydation à la chloramine T. Toute l'opération se passe dans la fiole conique dans laquelle l'iode<sup>125</sup> a été expédiée. On tamponne l'I<sup>125</sup> avec 25 µl de tampon de Wide et on ajoute ensuite 40 µl de LH (4 µg). La réaction est initiée par l'adjonction de 20 µl de chloramine T et arrêtée après 30 secondes grâce à 25 µl de disulfite de sodium. Le contenu de la fiole est prélevé et chromatographié sur une colonne de 10 cm de haut et de 1 cm de diamètre remplie de Séphadex G50 medium tamponé au phosphate 0,06 M, pH 7,55 + 9 g NaCl/litre et préalablement saturé par 2 ml d'albumine bovine, fraction v, Sigma, à 2 %. Des fractions d'un millilitre sont recueillies et leur radioactivité est mesurée de façon à repérer le pic correspondant à l'activité de l'hormone marquée. Ces tubes sont ensuite portés à une dilution finale d'environ 20.000 cpm/50 µl.

Le dosage (tab. 4) est réalisé dans des tubes en cristal de polystyrène d'une contenance de 3 ml. Cinquante µl d'hormone froide de concentration connue pour l'établissement de la courbe standard, ou 50 µl de plasma pour les échantillons à analyser, sont déposés dans les tubes et 50 µl d'antisérum y sont introduits. Le mélange est homogénéisé au vortex. La réaction antigène-anticorps s'équilibre durant un premier temps d'incubation fixé à 4 heures. Cette incubation, comme les suivantes, se fait à température ambiante. Cinquante µl d'hormone marquée sont ensuite ajoutés dans chaque tube. Une nouvelle homogénéisation au vortex est réalisée. Une nuit d'incubation permet au nouvel équilibre de s'établir. L'hormone marquée entre en compétition avec l'hormone froide préalablement fixée sur les anticorps. Finalement, 250 µl d'immunoabsorbant (ARGG) sont additionnés et le tout est incubé pendant 4 heures. La

Tableau 5: Tableau récapitulatif du dosage de la FSH

Rôle	Tube	Nombre d'exemplaires	Composition (µl)				
			FSH°	As	FSH*	ARGG	EW
Mesure de l'activité totale	Ȧ.C.	3	-	-	50	-	-
Mesure de l'activité non spécifique	B.G.	3	-	-	50	250	100
Courbe standard	0 ng/ml	3	50	50	50	250	-
	0,5	3					
	1	3					
	2	3					
	4	3					
	8	3					
	10	3					
	20	3					
	40	3					
	50	3					
Pool de plasma	P.1.	3	50	50	50	250	-
	P.2.						
Plasma inconnus	1	3	50	50	50	250	-
	2						
	3						
	n						



séparation de la fraction liée et de la fraction libre est possible par centrifugation pendant 15 minutes à 3000 rpm. Le surnageant est éliminé au moyen d'une pompe à vide reliée à une pipette pasteur. De plus, chaque dosage est accompagné d'une estimation de l'activité résiduelle due à la fixation spécifique de la LH\* sur l'ARGG (Back Ground : BG). Cette analyse est réalisée comme celle des échantillons mais le plasma et l'antisérum sont remplacés par du tampon. Nous ajoutons aussi au comptage un tube ne contenant que 50 µl d'H\* de façon à mesurer l'activité totale (Total Count : TC).

La mesure de la radioactivité est effectuée par un analyseur gamma à passeur d'échantillons (1277 Gammamaster commercialisé par LKB Wallac). Le comptage des échantillons est programmé d'après les rayonnements qu'ils émettent dans les fenêtres d'énergie 24 à 33 du spectre d'émission obtenu avec l'I<sup>125</sup>. Nous obtenons ainsi un rendement assez élevé (50 %) tout en éliminant au maximum les émissions parasites. Le temps de comptage est fixé à 1 minute, ce qui, en fonction du nombre de coups enregistrés par minute (cpm), donne une précision de comptage suffisante (erreur < 5 %). Les résultats s'inscrivent sur une imprimante Citizen 120 D.

## 2.6. Dosage de la FSH

La FSH ovine purifiée (NIAMDD-oFSH-RP1) et l'antisérum spécifique (NIAMDD-anti-oFSH-1) sont fournis par le NIH.

La courbe standard est réalisée en utilisant l'oFSH à des concentrations croissantes de 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 20; 40; 50 ng/ml. Les dilutions sont faites dans le tampon EW.

L'antisérum FSH est dilué selon les conseils du NIH de manière à obtenir une dilution finale de 1/80.000 dans les tubes.

Pour l'obtention de la FSH marquée, l'oFSH (NIAMDD-oFSH-I-1), diluée à raison de 4 µg/40 µl, est employée pour le marquage à l'I<sup>125</sup> par oxydation à la chloramine T. La méthode de marquage est la même que celle décrite pour la LH. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 20.000 cpm/50 µl.

Le dosage et le comptage sont réalisés selon les mêmes procédures que ceux de la LH (tab. 5).

# RESULTATS

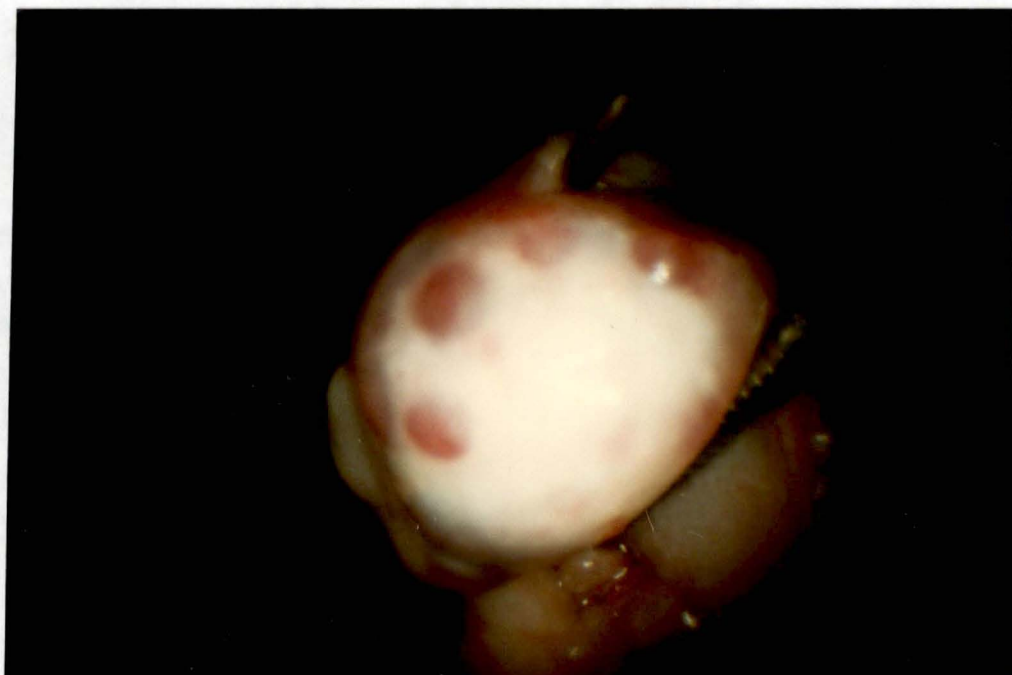


PHOTO 1 : Vue de follicules par endoscopie.

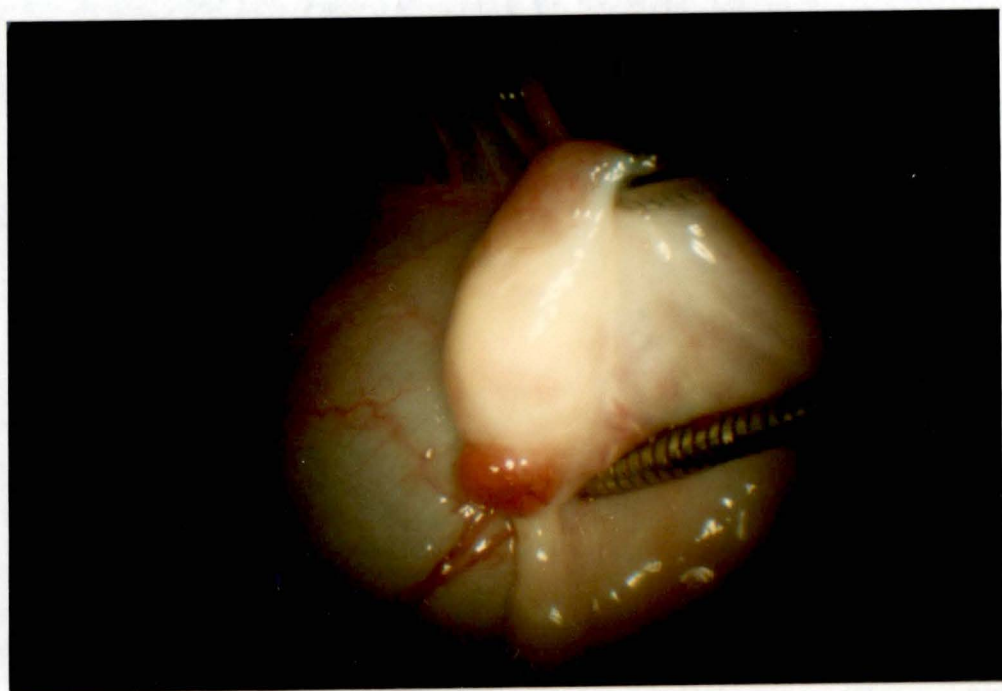


PHOTO 2 : Vue d'une ovulation par endoscopie.

Rappelons que le but de cette expérience est de caractériser le profil des différentes hormones au cours du cycle et de suivre par la technique d'endoscopie l'évolution parallèle de la croissance folliculaire chez des brebis Suffolk recevant de la P<sub>4</sub> seule, de la PMSG seule, de la P<sub>4</sub> et de la PMSG. Les résultats obtenus sont comparés à ceux d'un groupe TEMOIN (sans traitement).

## **A. POPULATION FOLLICULAIRE**

Les résultats obtenus par endoscopies permettent de :

- vérifier l'existence de vagues de croissance folliculaire;
- caractériser différents paramètres de la croissance folliculaire terminale.

Avant d'entamer la description des résultats, il est sans doute important de définir les termes utilisés. Nous avons considéré comme :

- follicules recrutés, les follicules qui grandissent au-delà de 2 mm pendant au moins deux jours consécutifs;
- follicules sélectionnés, les follicules qui atteignent une taille minimale de 4 mm;
- follicules dominants, les follicules qui atteignent une taille minimale de 4 mm et qui ne régressent pas pendant au moins deux jours consécutifs;
- taux d'ovulation, le nombre d'ovulations observées divisé par le nombre de brebis ayant ovulé.

Les endoscopies ont été réalisées sur 5 brebis de chaque lot, mais nous ne considérons pour la présentation des résultats que 4 brebis par traitement. En effet, des infections péritonéales ont empêché la poursuite des endoscopies chez deux brebis, et une troisième est morte le 16<sup>ème</sup> jour de l'expérience. Ces 3 brebis faisaient partie de 3 groupes différents. Nous avons choisi une brebis au hasard dans le quatrième groupe et nous n'avons pas tenu compte des résultats qu'elle nous avait procuré afin d'avoir un nombre égal de brebis par groupe pour les analyses statistiques. Les photos 1 et 2 illustrent l'aspect de l'ovaire vu par endoscopie.

### **1. EXISTENCE DE TROIS VAGUES DE CROISSANCE FOLLICULAIRE**

Les mesures relevées au cours des endoscopies quotidiennes ont permis de tracer l'évolution individuelle de chaque follicule. La figure 1 représente à titre d'exemple cette évolution pour les quatre brebis du lot témoin.

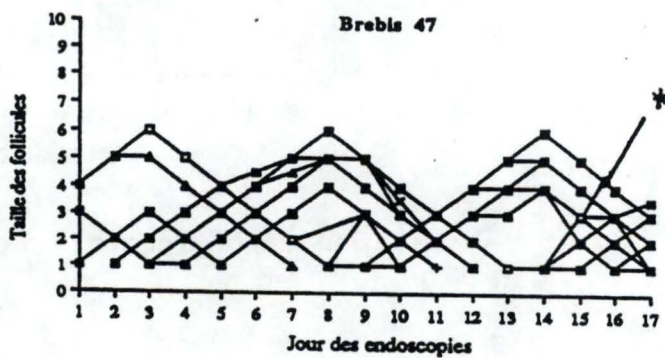
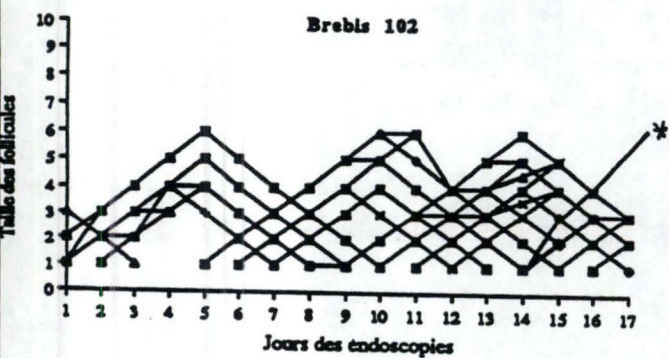
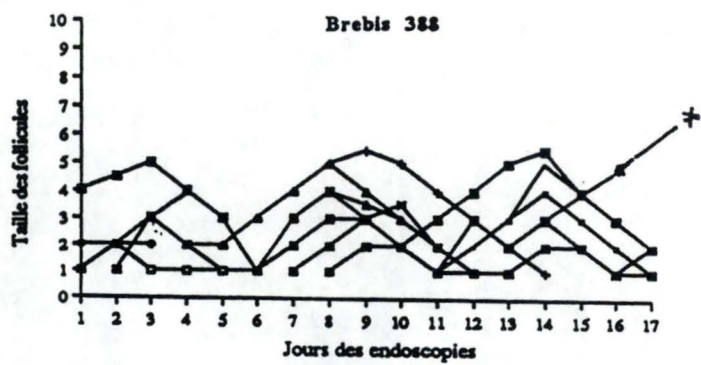
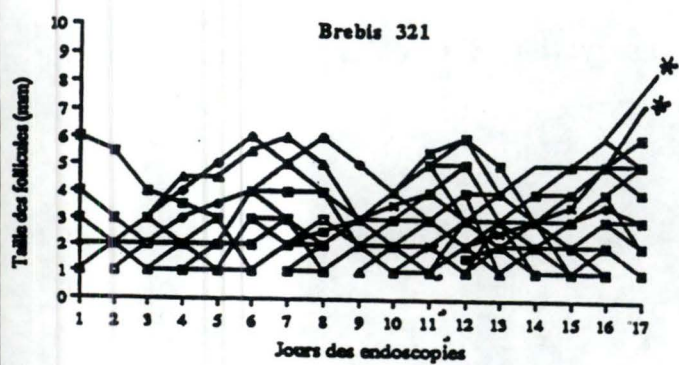
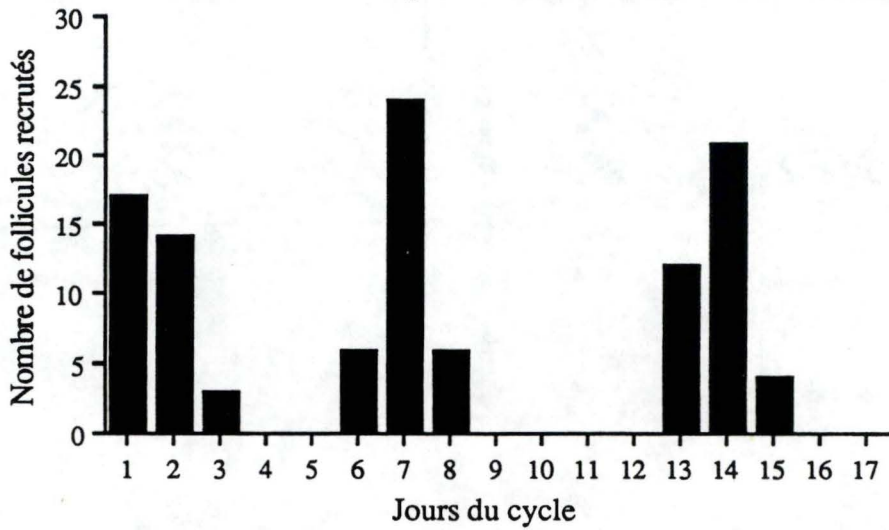
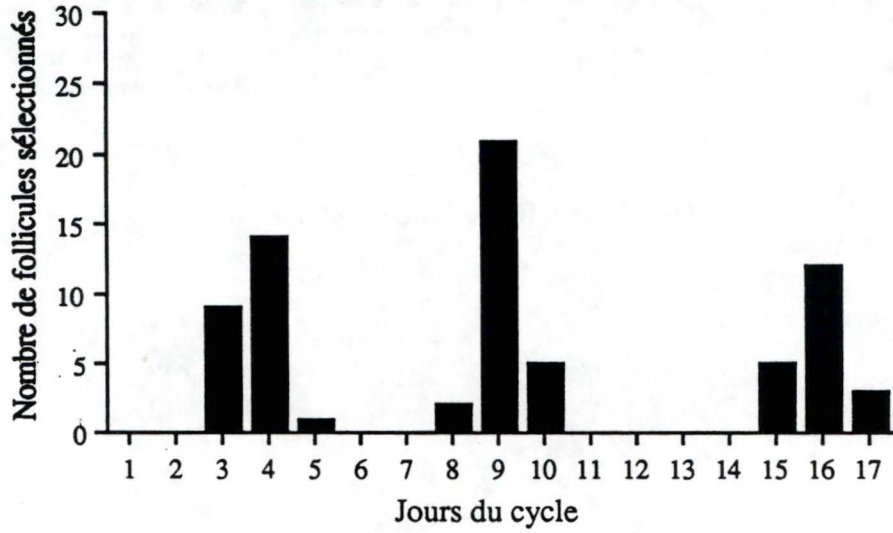


FIGURE 1: Profil individuel de la croissance folliculaire terminale au cours du cycle pour les 4 brebis du lot témoin.

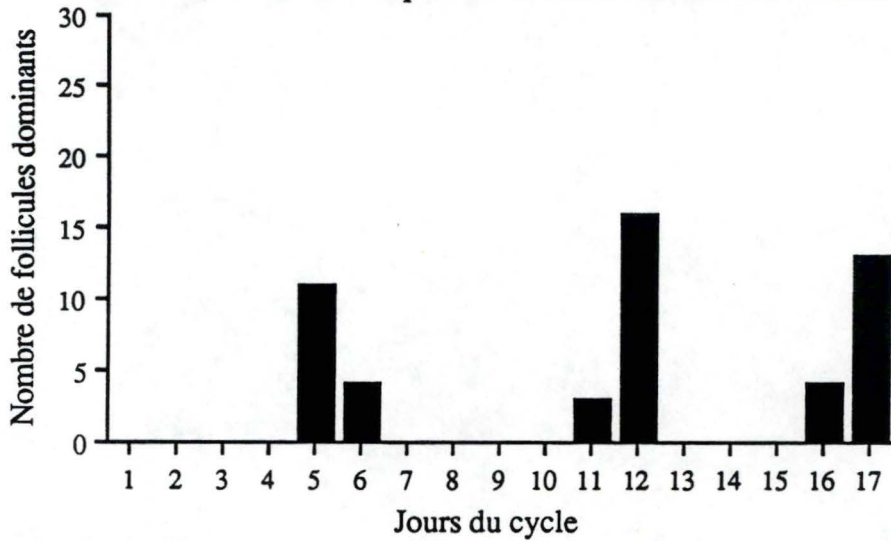
**Distribution de la fréquence d'observation des follicules recrutés**



**Distribution de la fréquence d'observation des follicules sélectionnés**



**Distribution de la fréquence d'observation des follicules dominants**



**FIGURE 2:** Distribution trimodale de la fréquence d'observation des follicules recrutés, sélectionnés et dominants au cours du cycle (J17 = jour de l'ovulation) pour le groupe témoin.

L'observation des courbes suggère l'existence chez tous les individus de 3 périodes de développement folliculaire au cours du cycle : 2 en phase lutéale et 1 en phase folliculaire. Chaque vague dure en moyenne 6 jours. Les follicules provenant des deux vagues de la phase lutéale sont voués à l'atrésie, tandis que certains follicules de la phase folliculaire sont destinés à ovuler. L'évolution d'un follicule, à la surface de l'ovaire, se manifeste par une croissance puis par une régression; mais que ce soit l'une ou l'autre, cela se passe à une vitesse constante qui est de  $\pm 1$  mm par 24 heures.

Les données des endoscopies nous ont également permis de calculer les distributions de fréquence d'apparition des follicules recrutés, sélectionnés et dominants pour les 4 lots envisagés (figures 2 à 5).

L'analyse globale effectuée sur les 4 brebis du lot témoin (fig. 2) révèle une distribution trimodale de la fréquence des follicules recrutés avec un synchronisme dans le démarrage de la croissance folliculaire, soit 31 follicules sur 34 aux jours 1 et 2, 24 follicules sur 36 au jour 7 et 33 follicules sur 37 aux jours 13 et 14. On constate que le recrutement des follicules parmi lesquels se trouve(nt) celui (ou ceux) qui ovulera(ont), s'étale du jour 13 au jour 15 avec un maximum au jour 14.

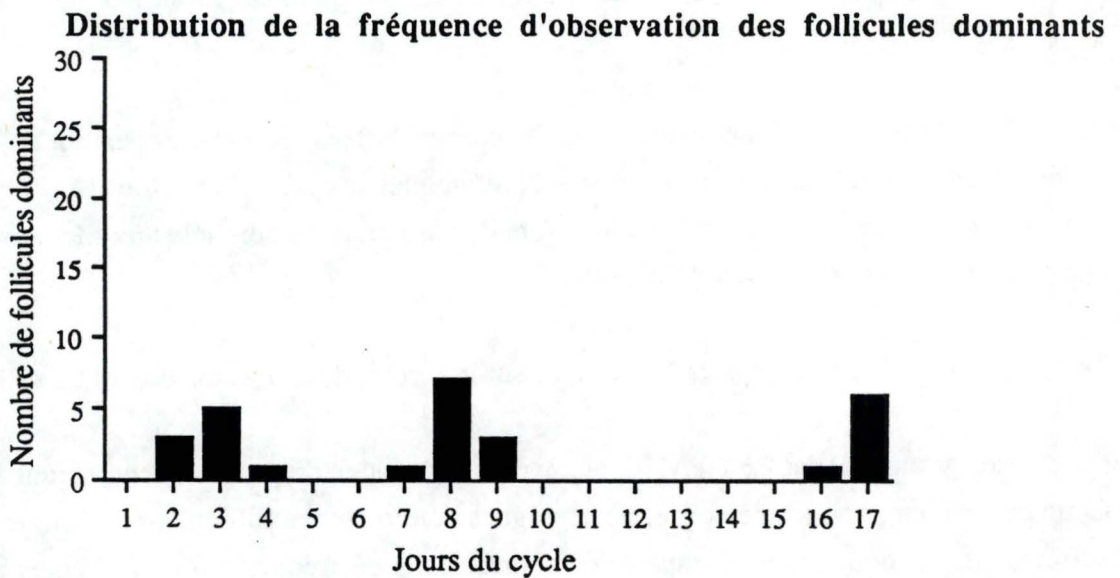
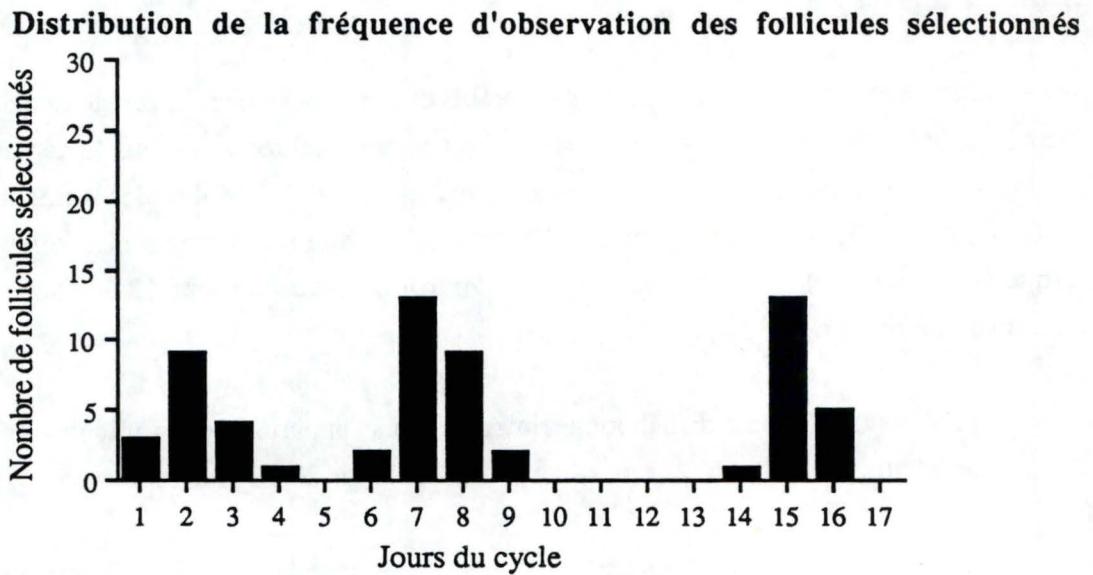
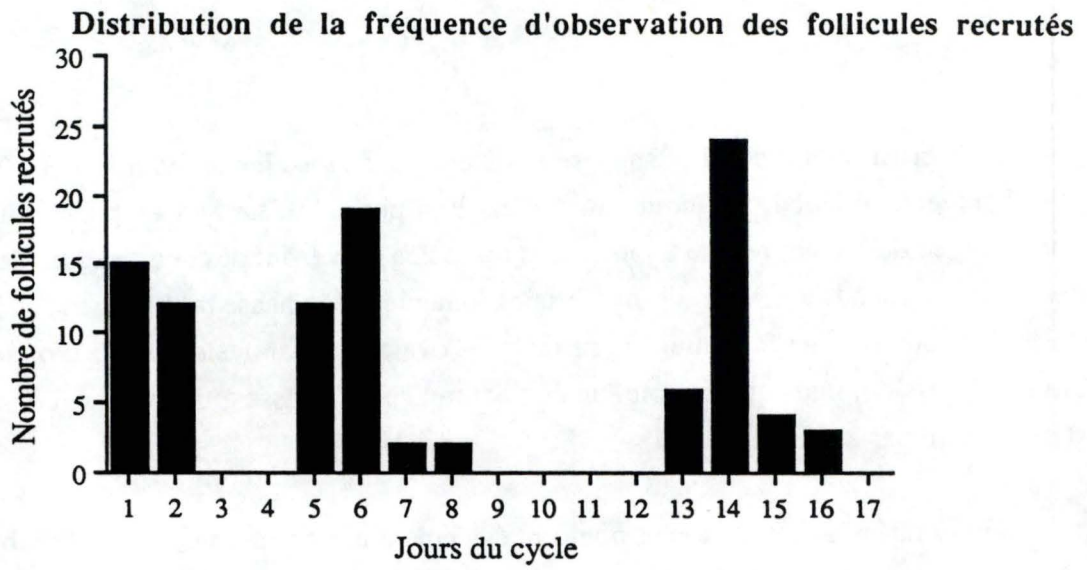
On observe aussi une distribution trimodale dans l'apparition des follicules sélectionnés, soit 23 sur 24 aux jours 3 et 4, 21 sur 28 au jour 9 et 12 sur 20 au jour 16.

La distribution en 3 vagues s'observe également pour les follicules dominants, avec un démarrage de la croissance de 11 follicules sur 15 au jour 5, 16 sur 19 au jour 12 et 13 sur 17 au jour 17.

Il semble donc évident que, pour la brebis Suffolk, le développement folliculaire s'effectue en trois vagues avec un démarrage préférentiel aux jours 1 et 2, 7 et 14. Au cours de chaque vague de croissance, les follicules sont d'abord recrutés puis sélectionnés et un certain nombre d'entre eux deviennent dominants.

Le même type d'analyse a été effectué sur les brebis des 3 lots expérimentaux.

Les groupes P<sub>4</sub> et P<sub>4</sub> + PMSG reçoivent une éponge de progestagène durant 14 jours. Cette période englobe les deux premières vagues de croissance folliculaire. Afin de dégager l'effet de la P<sub>4</sub>, nous avons comparé les distributions de fréquence des follicules recrutés, sélectionnés et dominants des deux premières vagues aux distributions obtenues dans le groupe témoin.



**FIGURE 3:** Distribution trimodale de la fréquence d'observation des follicules recrutés, sélectionnés et dominants au cours du cycle (J17 = jour de l'ovulation) pour le groupe P<sub>4</sub>.



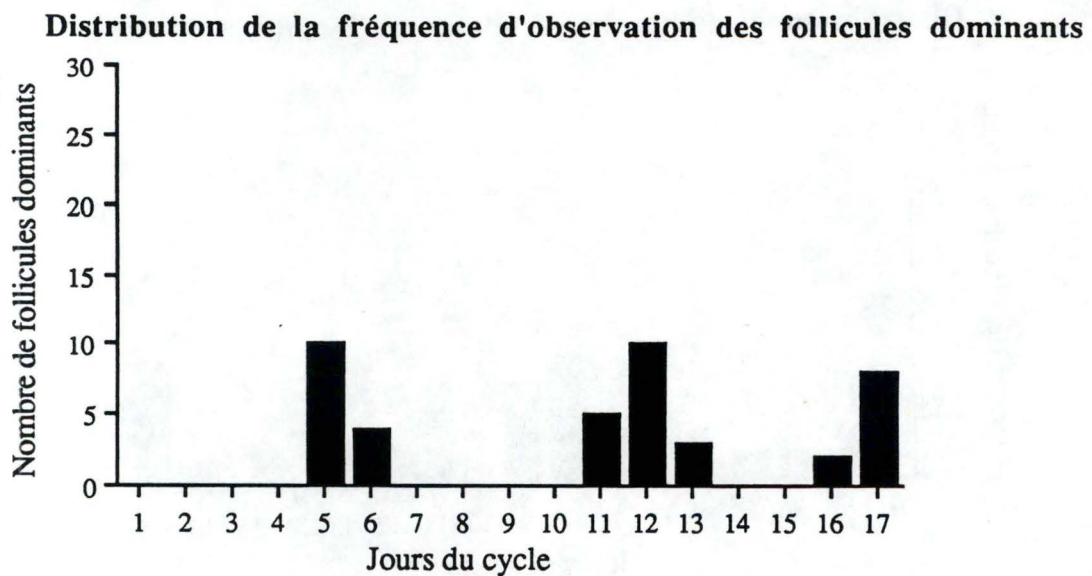
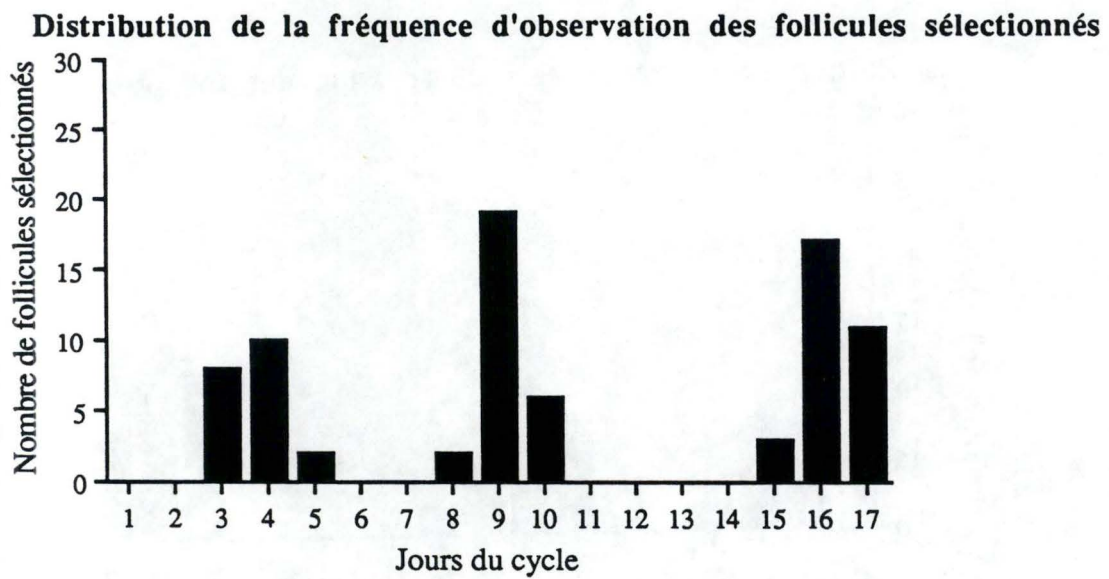
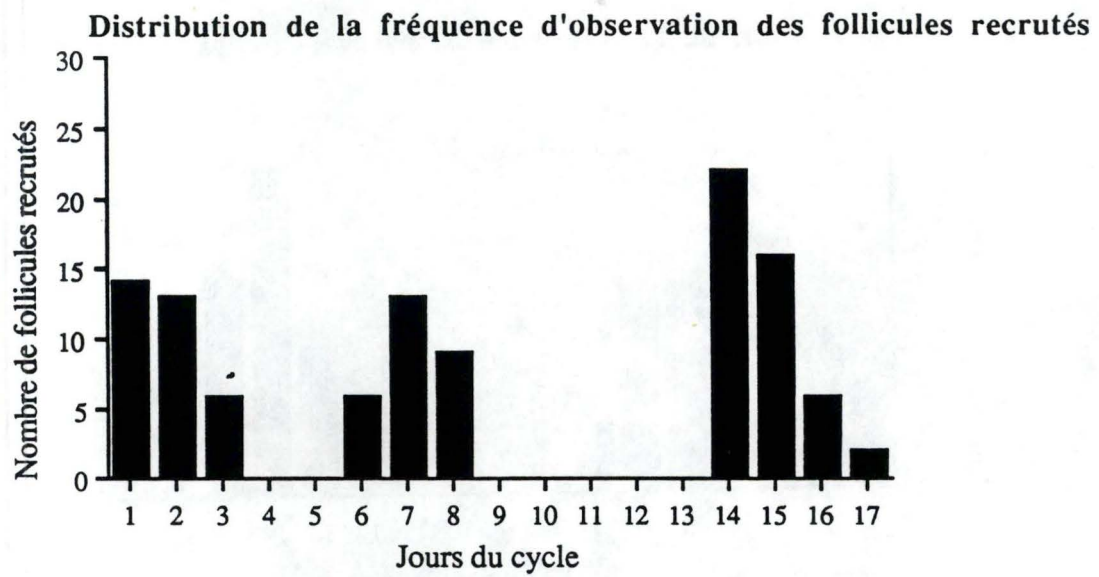
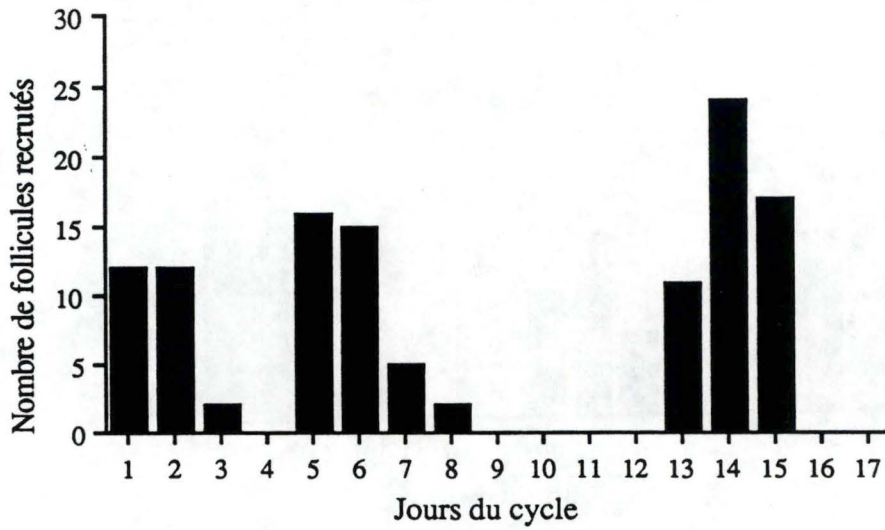
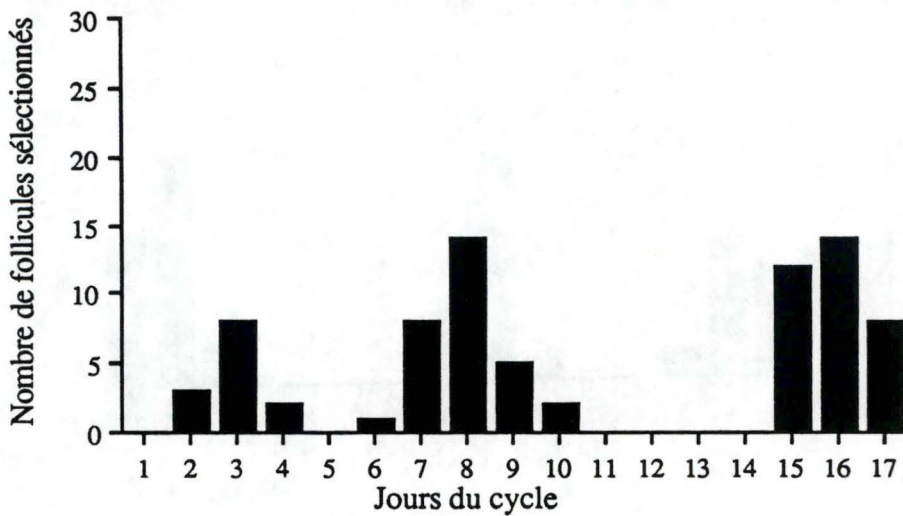


FIGURE 4: Distribution trimodale de la fréquence d'observation des follicules recrutés, sélectionnés et dominants au cours du cycle (J17 = jour de l'ovulation) pour le groupe PMSG.

Distribution de la fréquence d'observation des follicules recrutés



Distribution de la fréquence d'observation des follicules sélectionnés



Distribution de la fréquence d'observation des follicules dominants

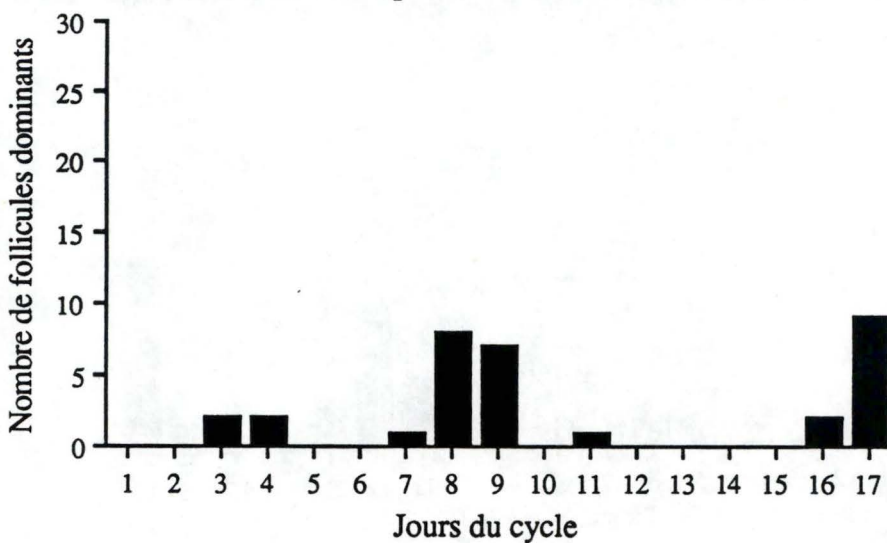


FIGURE 5: Distribution trimodale de la fréquence d'observation des follicules recrutés, sélectionnés et dominants au cours du cycle (J17 = jour de l'ovulation) pour le groupe P<sub>4</sub> + PMSG.

Nous observons (fig. 3 et 5) :

- Pour le recrutement, le démarrage de la croissance de la seconde vague semble se faire légèrement plus tôt, à savoir aux jours 5 et 6. De plus, cette vague est plus étalée; elle va du jour 5 au jour 8;
- La sélection s'effectue plus rapidement; elle commence en effet au jour 1 (P<sub>4</sub>) ou au jour 2 (P<sub>4</sub> + PMSG) pour la première vague et aux jours 6 et 7 pour la seconde vague. Cette sélection s'effectue de manière plus diffuse, s'étalant des jours 1 à 4 et 6 à 10. L'observation nous laisse supposer que le recrutement de certains follicules se fait déjà au cours du cycle précédent; cela se justifie par la présence de follicules sélectionnés dès le premier jour de l'expérience.

Il semblerait donc qu'en phase lutéale, la P<sub>4</sub> ait comme effet principal d'accélérer progressivement les mécanismes de recrutement, de sélection et de dominance.

La P<sub>4</sub> semble ne pas avoir d'influence sur les distributions de fréquence d'observation des follicules de la troisième vague.

L'action de la PMSG (fig. 4 et 5) se manifeste sur la troisième vague de croissance folliculaire puisque l'injection se fait au jour 14. Nous avons comparé les mécanismes de recrutement, de sélection et de dominance de la troisième vague des groupes PMSG et P<sub>4</sub> + PMSG à ceux du groupe témoin.

Nous observons un recrutement important de follicules au jour 15, ce qui est sans doute une conséquence directe de la stimulation faite au jour 14.

## **2. CARACTERISATION DE DIFFERENTS PARAMETRES DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE TERMINALE**

Les endoscopies réalisées sur les 4 individus de chaque groupe permettent également de calculer différents paramètres pour les 3 vagues de croissance folliculaire.

Nous avons considéré le nombre moyen de follicules recrutés, sélectionnés et dominants, la taille moyenne des follicules dominants, ainsi que le taux d'ovulation (T.O.) et les pourcentages d'atrésie. Les résultats obtenus pour les 4 groupes sont consignés dans le tableau 1 (a, b, c et d).

TABLEAU 1: Caractéristiques des différents paramètres morphologiques de la croissance folliculaire terminale au cours de cycle oestral chez la brebis Suffolk pendant chacune des 3 vagues de croissance folliculaire. Les résultats représentent des moyennes avec écart-type (n=4).

a) pour le groupe témoin

b) pour le groupe P<sub>4</sub>

c) pour le groupe PMSG

d) pour le groupe P<sub>4</sub> + PMSG

a)

	phase lutéale		phase folliculaire
	vague I	vague II	vague III
No. de follicules recrutés	8,5 ± 1,3	9,0 ± 1,6	9,2 ± 0,5
No. de follicules sélectionnés	6,0 ± 2,2	7,0 ± 2,2	5,0 ± 0,8
No. de follicules dominants	3,7 ± 2,4	4,7 ± 0,9	4,2 ± 0,5
Taille moyenne des follicules dominants (mm)	5,1 ± 0,5	5,1 ± 0,3	5,4 ± 0,5
Taux d'ovulation (TO)	/	/	1,2 ± 0,5
% d'atrésie dû à la sélection	29%	22%	46%
% d'atrésie dû à la dominance	38%	33%	16%
% d'atrésie entre le nombre de follicules dominants et le TO	100%	100%	70%

b)

	phase lutéale		phase folliculaire
	vague I	vague II	vague III
No. de follicules recrutés	6,7 ± 2,8	8,7 ± 1,9	9,2 ± 1,5
No. de follicules sélectionnés	4,2 ± 2,2	6,5 ± 1,7	4,7 ± 0,9
No. de follicules dominants	2,2 ± 1,3	2,7 ± 1,5	1,7 ± 0,5
Taille moyenne des follicules dominants (mm)	5,1 ± 0,3	5,1 ± 0,3	5,6 ± 0,5
Taux d'ovulation (TO)	/	/	1,0 ± 0,0
% d'atrésie dû à la sélection	37%	25%	49%
% d'atrésie dû à la dominance	48%	58%	64%
% d'atrésie entre le nombre de follicules dominants et le TO	100%	100%	41%

En ce qui concerne le groupe témoin, l'analyse du nombre de follicules recrutés, sélectionnés et dominants (tels qu'ils ont été définis) pour chaque période considérée ne révèle aucune différence significative ( $P > 0,05$ ).

La sélection s'opère de façon plus prononcée en phase folliculaire; nous observons en effet un pourcentage d'atrésie due à la sélection (calculé entre les nombres de follicules recrutés et sélectionnés) plus important en phase folliculaire qu'en phase lutéale, avec respectivement pour les 3 vagues 29, 22 et 46 %.

Par contre, la dominance s'exerce de façon moins prononcée en phase folliculaire avec des pourcentages d'atrésie due à la dominance (calculés entre les nombres des follicules sélectionnés et dominants) qui sont de 38, 33 et 16 % pour les vagues 1, 2 et 3.

De plus, nous constatons que sur les  $4,2 \pm 0,5$  follicules dominants de la vague 3, seulement  $1,2 \pm 0,5$  aboutissent à l'ovulation, ce qui correspond à un pourcentage d'atrésie de 70 %. Les follicules dominants des deux premières vagues sont tous voués à l'atrésie.

En ce qui concerne la taille moyenne des follicules dominants, elle est significativement ( $P > 0,05$ ) plus élevée en phase folliculaire ( $5,4 \pm 0,5$ ) qu'en phase lutéale ( $5,1 \pm 0,5$  et  $5,1 \pm 0,3$ ).

Une analyse de la variance à 3 critères de classification (traitement, vague, brebis) nous a permis d'analyser les résultats obtenus pour les groupes traités et de les comparer avec le groupe témoin. En cas d'effet significatif d'un ou de deux critères (traitement et/ou vague), des contrastes ont été réalisés afin de déterminer à quel niveau du critère l'effet significatif se fait sentir.

### 2.1. Effet du progestagène (FGA)

Les effets attribués au progestagène sont :

- une diminution du nombre de follicules recrutés et sélectionnés en vague 1 et des follicules dominants lors des 2 vagues de la phase lutéale;
- un pourcentage d'atrésie due à la sélection, plus important en vague 1 avec 37 % et 51 % respectivement pour les groupes P<sub>4</sub> et P<sub>4</sub> + PMSG contre 29 % pour les témoins;
- un pourcentage d'atrésie due à la dominance, supérieur pour les vagues 1 et 2, avec respectivement 48 % et 58 % pour le groupe P<sub>4</sub>, 69 et 44 % pour le groupe P<sub>4</sub> + PMSG; contre 38 % et 33 % chez les témoins.

c)

	phase lutéale		phase folliculaire
	vague I	vague II	vague III
No. de follicules recrutés	8,2 ± 1,9	7,0 ± 1,4	11,5 ± 2,1
No. de follicules sélectionnés	5,0 ± 1,4	6,7 ± 0,9	7,7 ± 0,5
No. de follicules dominants	3,5 ± 2,0	4,2 ± 1,3	2,5 ± 0,6
Taille moyenne des follicules dominants (mm)	5,3 ± 0,5	5,3 ± 0,5	5,5 ± 0,5
Taux d'ovulation (TO)	/	/	1,7 ± 0,5
% d'atrésie dû à la sélection	39%	4%	33%
% d'atrésie dû à la dominance	30%	37%	67%
% d'atrésie entre le nombre de follicules dominants et le TO	100%	100%	30%

d)

	phase lutéale		phase folliculaire
	vague I	vague II	vague III
No. de follicules recrutés	6,5 ± 2,6	9,5 ± 1,7	13,0 ± 3,6
No. de follicules sélectionnés	3,2 ± 1,3	7,5 ± 2,6	8,5 ± 2,6
No. de follicules dominants	1,0 ± 1,1	4,2 ± 1,5	2,7 ± 0,5
Taille moyenne des follicules dominants (mm)	5,0 ± 0,0	5,1 ± 0,2	5,5 ± 0,5
Taux d'ovulation (TO)	/	/	1,7 ± 0,5
% d'atrésie dû à la sélection	51%	21%	35%
% d'atrésie dû à la dominance	69%	44%	68%
% d'atrésie entre le nombre de follicules dominants et le TO	100%	100%	35%

Le progestagène semble donc diminuer le nombre de follicules dominants et augmenter le pourcentage d'atrésie pour les deux vagues de la phase lutéale.

L'effet du progestagène se fait aussi sentir sur la troisième vague. On observe en effet une diminution du nombre de follicules dominants et un pourcentage d'atrésie due à la dominance, nettement plus élevé (64 %) que pour le groupe témoin (16 %). Suite à cette atrésie importante, on ne retrouve que  $1,7 \pm 0,5$  follicules dominants dont un seul va ovuler.

## 2.2. Effet de la PMSG

Les effets attribués à la PMSG sont :

- un nombre significativement plus important de follicules recrutés et sélectionnés (respectivement  $11,5 \pm 2,1$  et  $7,7 \pm 0,5$  pour le groupe PMSG;  $13,0 \pm 3,6$  et  $8,5 \pm 2,6$  pour le groupe P<sub>4</sub> + PMSG, par rapport à  $9,2 \pm 0,5$  et  $5,0 \pm 0,8$  pour le groupe témoin). Il faut également remarquer des écarts-types importants pour les groupes traités à la PMSG.
- les pourcentages d'atrésie due à la sélection sont moins importants pour les groupes traités (33 % pour PMSG et 35 % pour P<sub>4</sub> + PMSG contre 46 % chez les témoins).
- les pourcentages d'atrésie due à la dominance, par contre, sont nettement supérieurs (67,5 % et 68 %) à celui du groupe témoin (16 %).  
Suite à cette atrésie importante, on n'observe plus qu'un faible nombre de follicules dominants ( $2,5 \pm 0,6$  et  $2,7 \pm 0,5$  pour PMSG et P<sub>4</sub> + PMSG par rapport à  $4,2 \pm 0,5$  pour le groupe témoin).
- les taux d'ovulation sont de  $1,7 \pm 0,5$  pour les deux groupes traités, ce qui est significativement supérieur au taux d'ovulation du groupe témoin ( $1,2 \pm 0,5$ ).
- la dominance s'exerce de façon très intense, mais également de façon très efficace puisque seulement 30 et 35 % des follicules dominants deviennent atrétiques avec la PMSG contre 70 % dans le groupe témoin.

Les brebis traitées à la PMSG ont donc une croissance folliculaire caractérisée par le recrutement d'un grand nombre de follicules, suivi d'une sélection atténuée mais d'une phase de dominance accentuée.

Il est à noter que le pourcentage d'atrésie due à la sélection est anormalement bas pour la deuxième vague du groupe traité à la PMSG (4 %), alors que les résultats devraient être normalement similaires à ceux du groupe témoin (22 %).

En conclusion, on peut dire que :

- En phase lutéale, le progestagène a comme effet d'accélérer progressivement les mécanismes de recrutement, de sélection et de dominance; il augmente les pourcentages d'atrésie pour les deux vagues.
- En phase folliculaire, la progestagène ne semble pas avoir d'effet sur la fréquence d'observation des follicules recrutés et sélectionnés. Par contre, il diminue le nombre de follicules dominants et accroît le pourcentage d'atrésie due à la dominance.
- En phase lutéale, la PMSG n'a aucune influence puisque le traitement se fait au 14ème jour.
- En phase folliculaire, la PMSG semble favoriser le recrutement d'un grand nombre de follicules, atténuer la sélection et accentuer la phase de dominance.



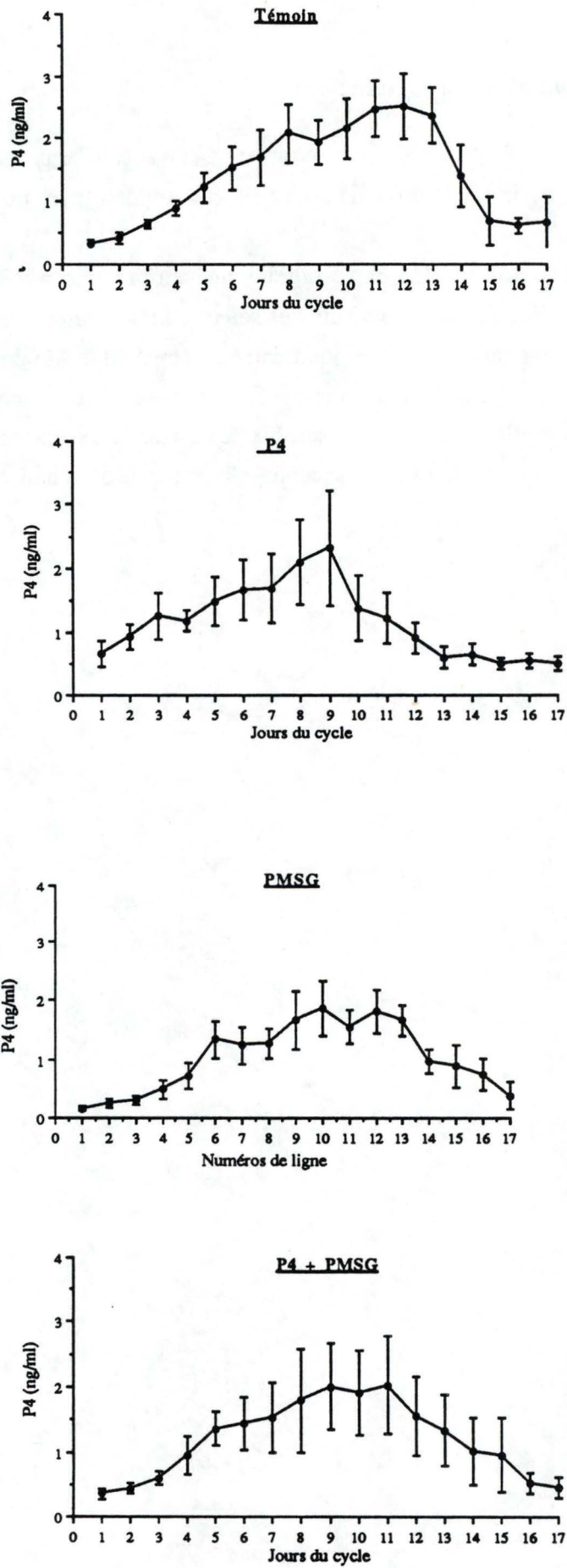


FIGURE 6: Taux plasmatiques moyens de P4 ( $X \pm SE$ ) au cours du cycle pour les 4 groupes.

## **B. PROFILS DE SECRETION DES DIFFERENTES HORMONES**

### **1. PROGESTERONE**

La progestérone a été dosée sur un prélèvement sanguin quotidien fait à 8 heures et ce, durant les 18 jours de l'expérience pour toutes les brebis de chaque lot (9).

Les dosages permettent de tracer les profils moyens de concentrations plasmatiques de P<sub>4</sub> pour chaque groupe (fig. 6).

L'évolution des taux moyens de P<sub>4</sub> du groupe témoin est la suivante. La concentration en P<sub>4</sub> dans le sang augmente progressivement dès le jour 2 et atteint un plafond entre les jours 11 et 12. Le taux diminue brutalement à partir du jour 14 pour atteindre son niveau basal au jour 15.

La concentration en P<sub>4</sub> plasmatique est de l'ordre de 0,5 ng/ml en phase pré-ovulatoire tandis que les taux moyens atteints en phase lutéale sont de l'ordre de 2,5 ng/ml. Cette différence est bien sûr hautement significative ( $P < 0,01$ ).

Pour le groupe P<sub>4</sub>, nous observons un taux moyen de sécrétion qui augmente jusqu'au jour 9 puis diminue brutalement pour atteindre un taux basal de 0,5 ng/ml dès le jour 13.

L'allure générale du profil moyen du groupe PMSG est comparable à celle du groupe témoin. Le plafond de la phase lutéale est cependant inférieur (2 ng/ml) à celui du groupe témoin.

Pour le groupe P<sub>4</sub> + PMSG, contrairement à la logique qui aurait voulu qu'on retrouve un profil similaire à celui du groupe P<sub>4</sub>, on observe une courbe semblable à celle des groupes témoin et PMSG. Nous pouvons avancer, après vérification des graphes individuels, que ce phénomène se retrouve chez la majorité des brebis de ce groupe.

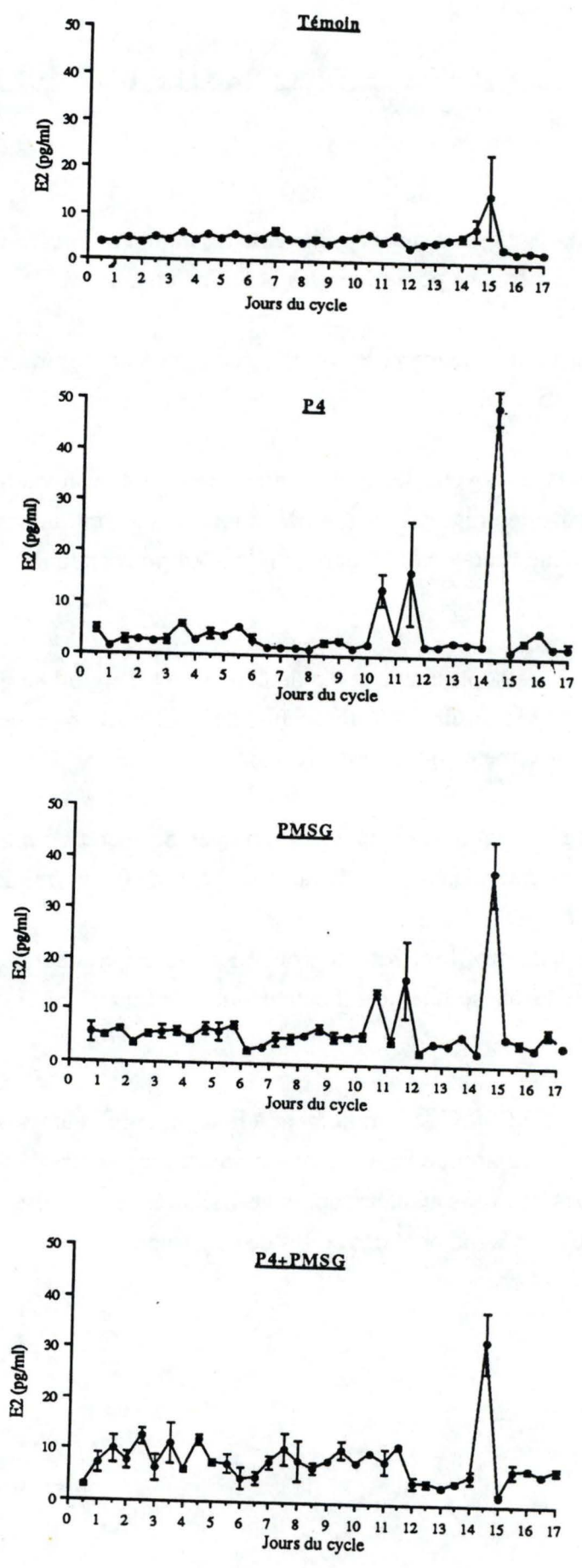


FIGURE 7: Taux plasmatiques moyens d' E<sub>2</sub> (X ± SE) au cours du cycle pour les 4 groupes.

## 2.OESTRADIOL

L'oestradiol a été dosé sur deux prélèvements sanguins quotidiens faits à 8 heures et à 16 heures, pour les brebis des différents groupes durant toute la durée de l'expérience.

Les profils moyens des concentrations plasmatiques d'oestradiol pour les 4 groupes sont illustrés à la figure 7.

Pour le groupe témoin, la concentration fluctue autour de 3 pg/ml jusqu'aux jours 14 et 15, où l'on observe un léger pic de l'ordre de 15 pg/ml. Le graphe ne paraît pourtant pas être représentatif de l'évolution normale de la concentration plasmatique en E<sub>2</sub>.

Si on considère le profil moyen du groupe PMSG comme témoin jusqu'au jour 14, puisque le traitement appliqué n'a lieu qu'à ce jour, on constate que le taux de base semble refléter la croissance folliculaire car on observe des valeurs fluctuant sous forme d'onde d'une durée de 6 jours (J1 à J6, J7 à J12). Le maximum atteint pour la seconde vague ( $\pm 18$  pg/ml) est significativement ( $P < 0,05$ ) supérieur au taux de la première vague ( $\pm 6$  pg/ml).

On n'observe pas d'effet précis du progestagène sur le profil de sécrétion d'E<sub>2</sub> dans les deux premières vagues. Par contre, l'élévation du jour 15 est significativement ( $P < 0,05$ ) plus importante que celle du groupe témoin.

L'action de la PMG est également d'accroître significativement ( $P < 0,05$ ) le pic du jour 15 par rapport au lot témoin.

TABLEAU 2 a et b: Caractéristiques des profils de sécrétion de la LH en phase lutéale et en phase folliculaire

Lot	N° brebis	Phase lutéale			phase folliculaire
		Taux basal moyen de LH (ng/ml)	Nombre de pulses	Amplitude des pulses de LH (ng/ml)	Taux basal moyen de LH (ng/ml)
<b>Témoin</b>	9	0,93	1	1,80	1,22
	47	0,72	0	/	1,62
	55	0,83	1	2,91	1,11
	94	0,74	1	1,03	1,08
	102	0,62	3	0,40	0,95
				0,79	
				0,38	
	114	0,74	2	0,80	1,37
				0,61	
	122	0,89	3	0,29	1,35
				0,47	
				0,46	
	321	0,77	0	/	3,06
388	0,62	2	0,46	0,95	
			0,47		
	<b>X ± SD</b>	<b>0,76 ± 0,11</b>	<b>1,44 ± 1,13</b>	<b>0,83 ± 0,74</b>	<b>1,41 ± 0,65</b>
<b>P4</b>	2	0,74	1	0,83	1,12
	69	0,74	1	0,49	0,82
	74	0,69	1	0,50	1,01
	120	0,68	3	0,32	0,80
				0,38	
				0,39	
	131	0,64	2	0,39	0,87
				0,35	
	331	0,63	0	/	1,64
	339	0,65	2	0,41	1,08
				0,36	
	364	0,60	4	0,63	0,96
				0,34	
			0,36		
			0,22		
421	0,61	2	1,38	2,66	
			1,19		
	<b>X ± SD</b>	<b>0,66 ± 0,05</b>	<b>1,78 ± 1,20</b>	<b>0,53 ± 0,33</b>	<b>1,22 ± 0,60</b>

### **3. LH**

Rappelons que la LH a été dosée sur des prises de sang sériées (toutes les 20 minutes) réalisées chez toutes les brebis pendant 12 heures (de 8 à 20 heures), à deux moments de l'expérience : au jour 9 du cycle (phase lutéale) et au jour 16 (phase folliculaire).

Nous avons estimé le taux plasmatique de base de LH, la fréquence et l'amplitude des pulses de LH, en conformité avec les considérations de Gauthier et Berbigier (1982).

Le taux de base est estimé par la moyenne des 10 concentrations les plus faibles sur les 37 prélèvements sériés. Un pulse de LH représente une augmentation transitoire du niveau tonique supérieur à la moyenne de tous les prélèvements sériés plus deux fois la valeur de l'écart-type. Ces considérations théoriques ont été modulées par une analyse des graphiques.

L'amplitude d'un pulse de LH est la différence entre le pic du pulse et le taux de base.

Les trois paramètres précités ont été analysés pour chaque brebis en phase lutéale. En phase folliculaire, nous n'avons pris en considération que les taux de base. Il est en effet impossible de tenir compte des pulses car certaines brebis ont déjà présenté, présentent ou vont présenter le pic préovulatoire de LH au moment des prises de sang sériées effectuées au jour 16.

L'ensemble des résultats obtenus est donné dans le tableau 2 (a et b). Les profils individuels de sécrétion en phases lutéale et folliculaire sont représentés sur les figures 8, 9, 10, 11 et 12, 13, 14, 15 pour les quatre lots.

#### **3.1. Groupe témoin**

##### **a. Phase lutéale**

Le taux plasmatique basal moyen de LH est relativement faible et varie peu entre brebis ( $0,76 \pm 0,11$ ).

On observe cependant un nombre variable de pulses entre les brebis (fig. 8). En effet, sur les 12 heures de prises de sang sériées, certaines brebis ne présentent pas de pulses (brebis 47 et 321) alors que d'autres en présentent un (brebis 9, 55 et 94), deux (brebis 114 et 388) ou

b)

Lot	N° brebis	Phase lutéale			phase folliculaire
		Taux basal moyen de LH (ng/ml)	Nombre de pulses	Amplitude des pulses de LH (ng/ml)	Taux basal moyen de LH (ng/ml)
<b><u>PMSG</u></b>	42	0,72	0	/	1,31
	51	0,67	1	0,52	1,13
	63	0,69	1	2,09	1,05
	82	0,66	3	2,15	0,88
				3,80	
				1,97	
	86	0,65	3	0,33	0,87
				0,34	
				0,55	
	89	0,64	1	1,09	1,32
	115	0,58	2	1,39	2,27
				0,78	
	118	0,62	2	1,04	1,12
			0,75		
380	0,61	1	0,57	1,25	
	<b>X ± SD</b>	<b>0,65 ± 0,04</b>	<b>1,55 ± 1,01</b>	<b>1,24 ± 1,01</b>	<b>1,24 ± 0,42</b>
<b><u>P4 + PMSG</u></b>	48	0,70	2	0,43	1,57
				0,58	
	57	0,74	0	/	1,43
	68	1,15	2	0,62	1,61
				0,62	
	70	1,21	1	0,78	1,73
	73	1,02	1	1,38	1,77
	95	0,93	2	0,54	1,27
				0,69	
	109	0,94	4	0,62	1,86
				0,54	
				1,12	
				0,67	
112	0,77	0	/		
345	0,77	2	1,09	1,27	
			0,85	1,29	
	<b>X ± SD</b>	<b>0,91 ± 0,18</b>	<b>1,55 ± 1,24</b>	<b>0,75 ± 0,27</b>	<b>1,53 ± 0,23</b>

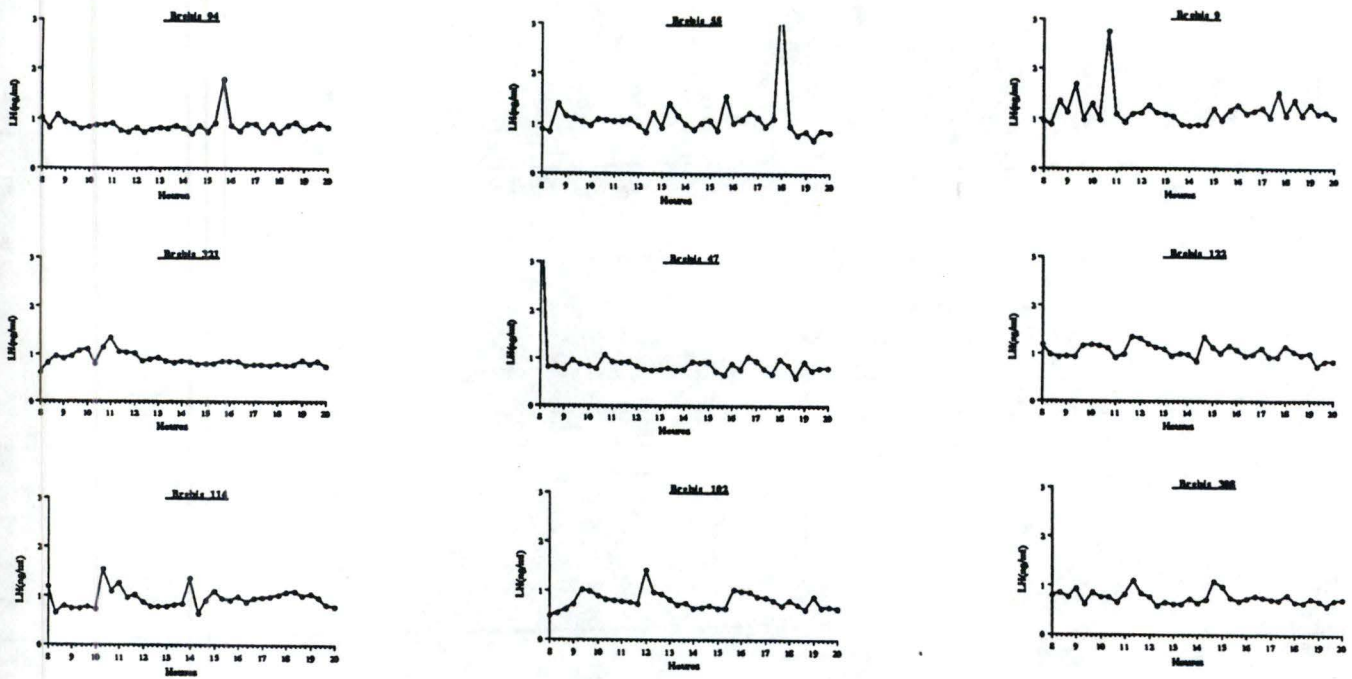


FIGURE 8: Taux plasmatiques de LH au cours des 12 heures de prises de sang sériées chez les brebis du lot témoin en phase lutéale.

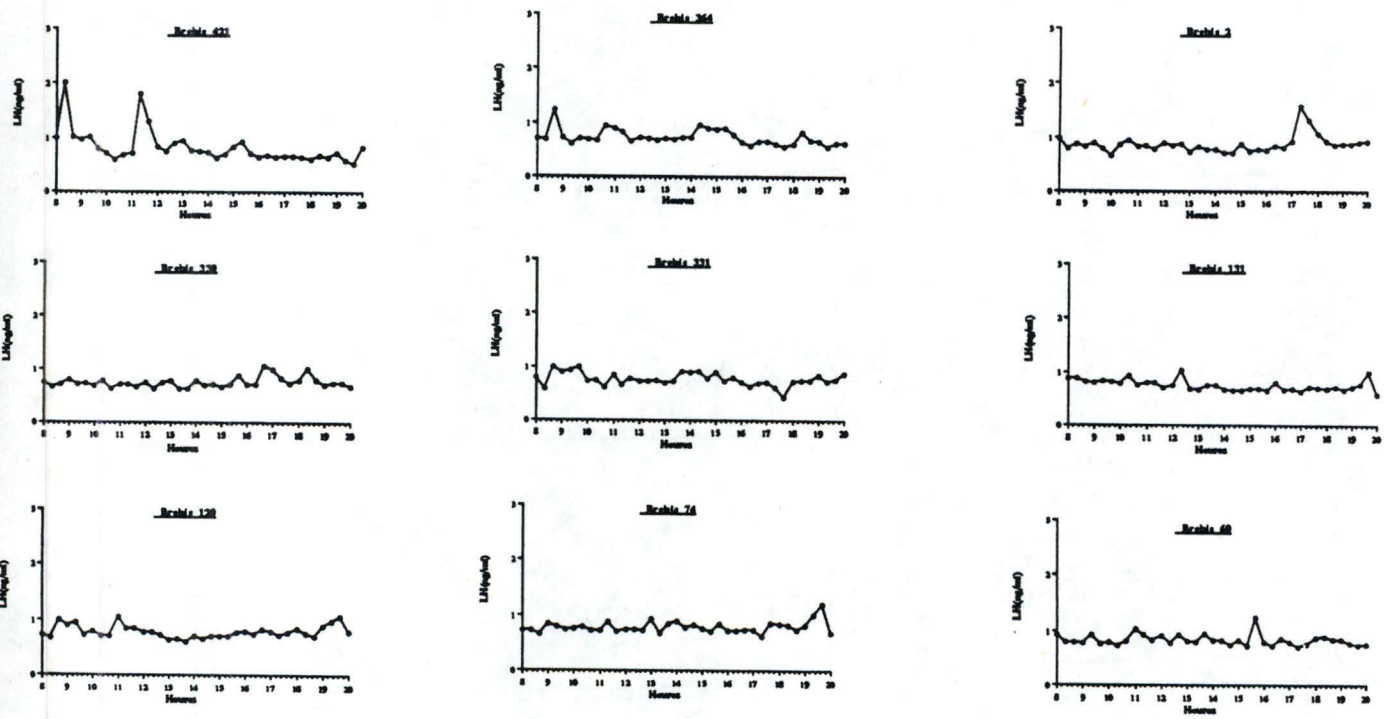


FIGURE 9: Taux plasmatiques de LH au cours des 12 heures de prises de sang sériées chez les brebis du lot P4 en phase lutéale.



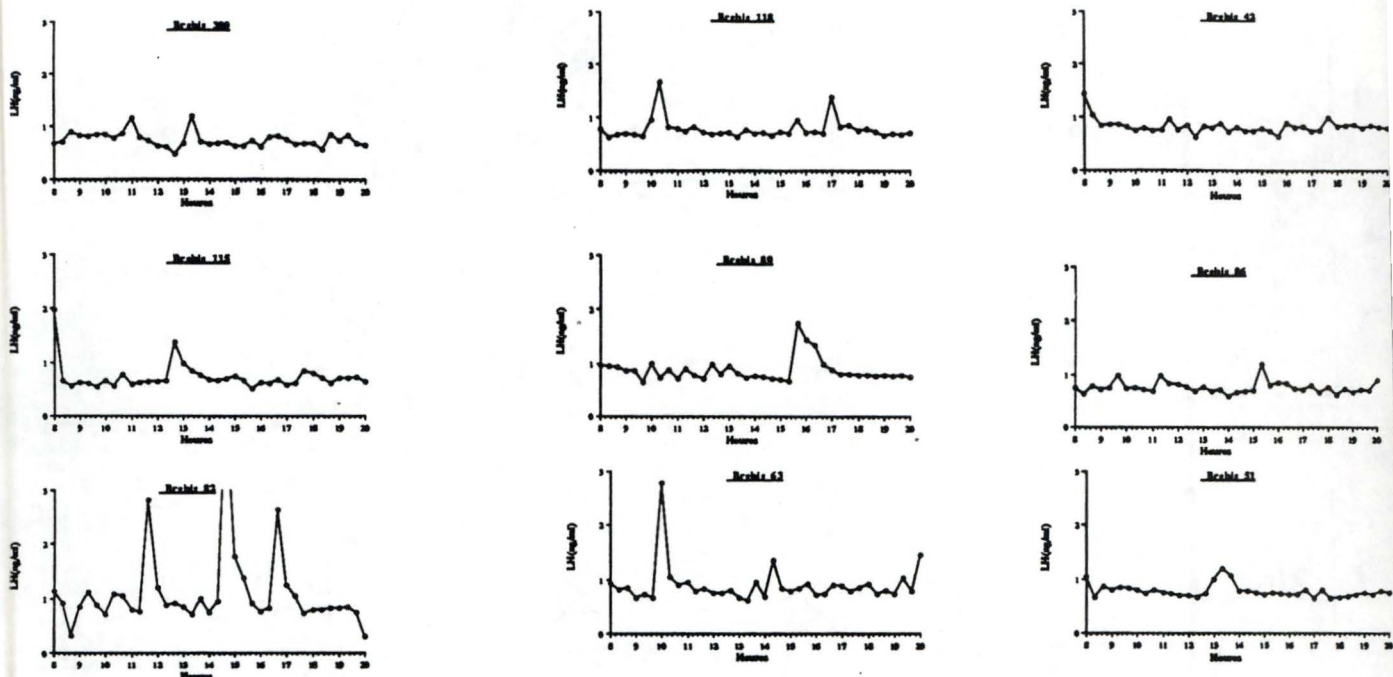


FIGURE 10: Taux plasmatiques de LH au cours des 12 heures de prises de sang s eries chez les brebis du lot PMSG en phase lut ale.

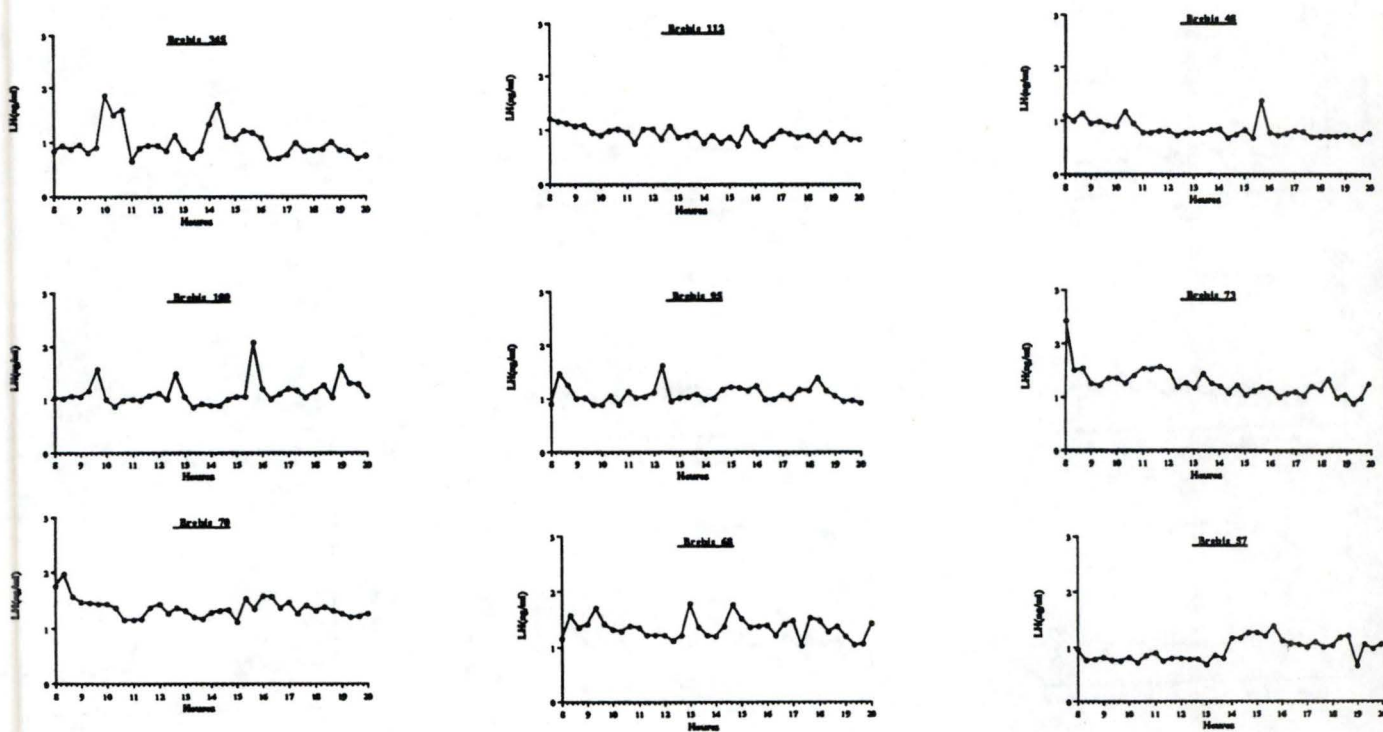


FIGURE 11: Taux plasmatiques de LH au cours des 12 heures de prises de sang s eries chez les brebis du lot P4 + PMSG en phase lut ale.

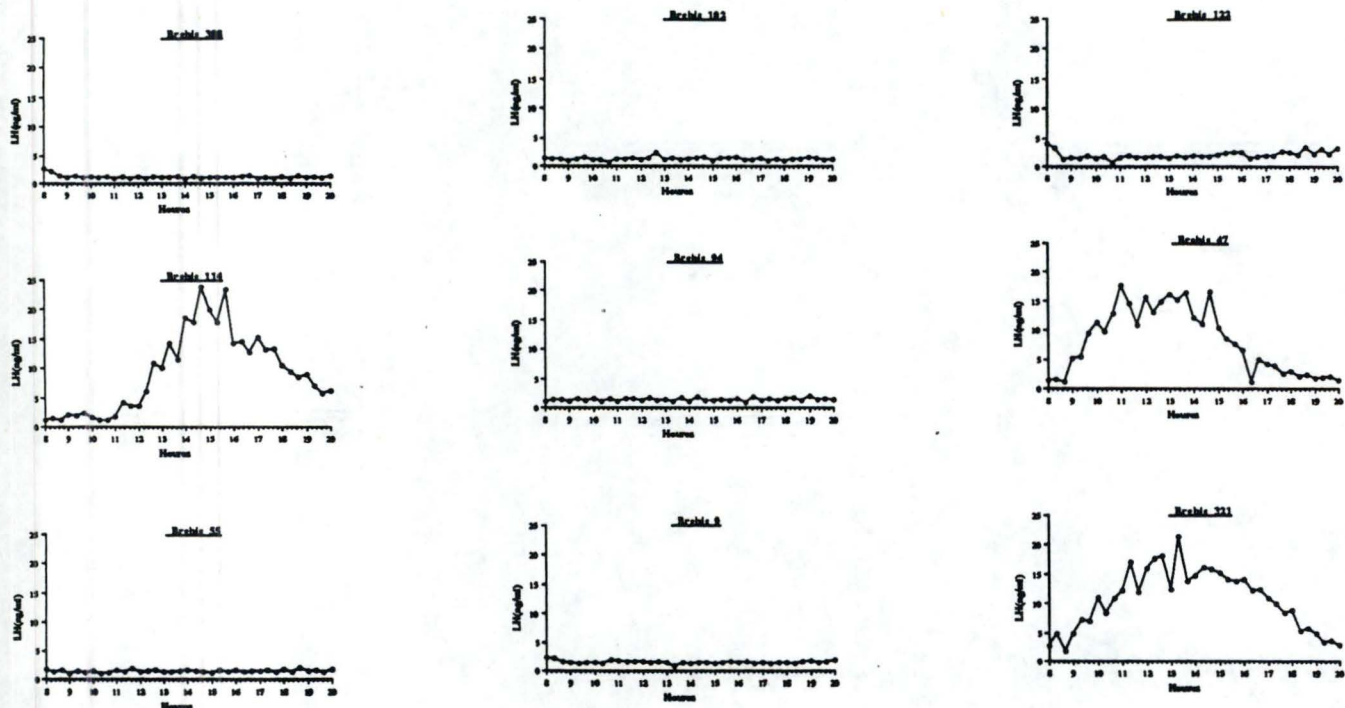


FIGURE 12: Taux plasmatiques de LH au cours des 12 heures de prises de sang s riees chez les brebis du lot t moin en phase folliculaire.

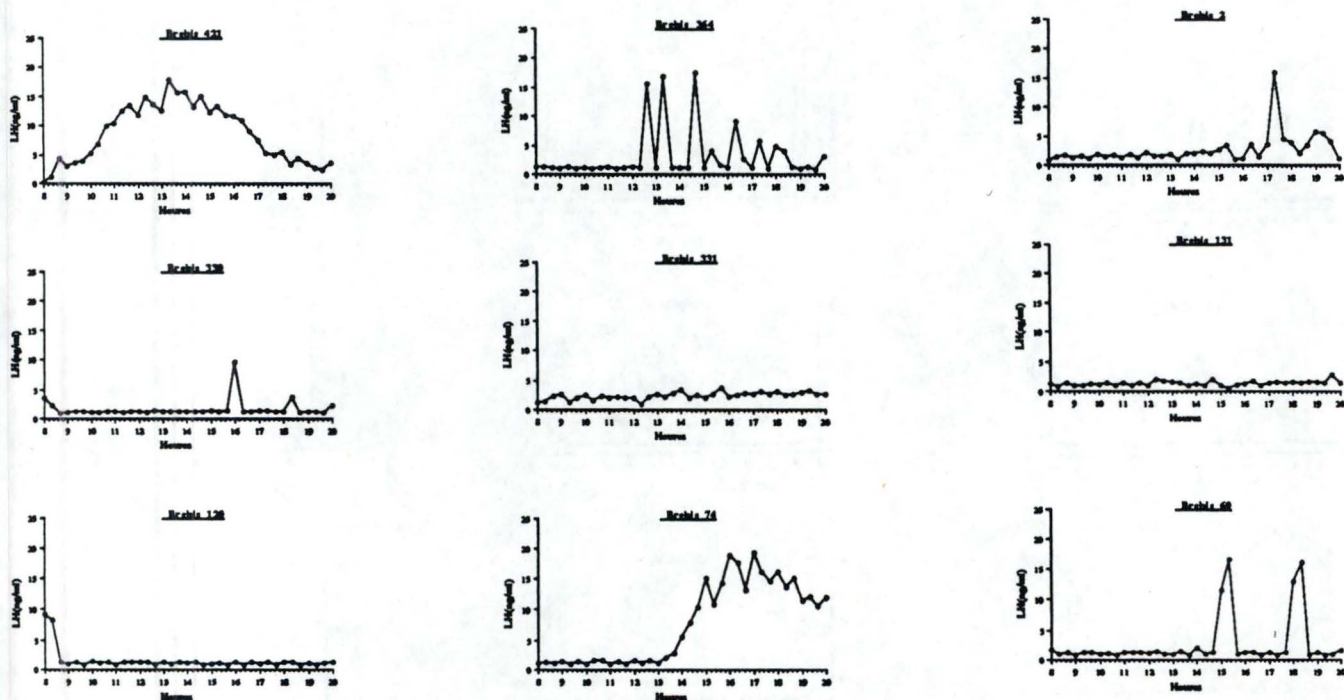


FIGURE 13: Taux plasmatiques de LH au cours des 12 heures de prises de sang s riees chez les brebis du lot P4 en phase folliculaire.

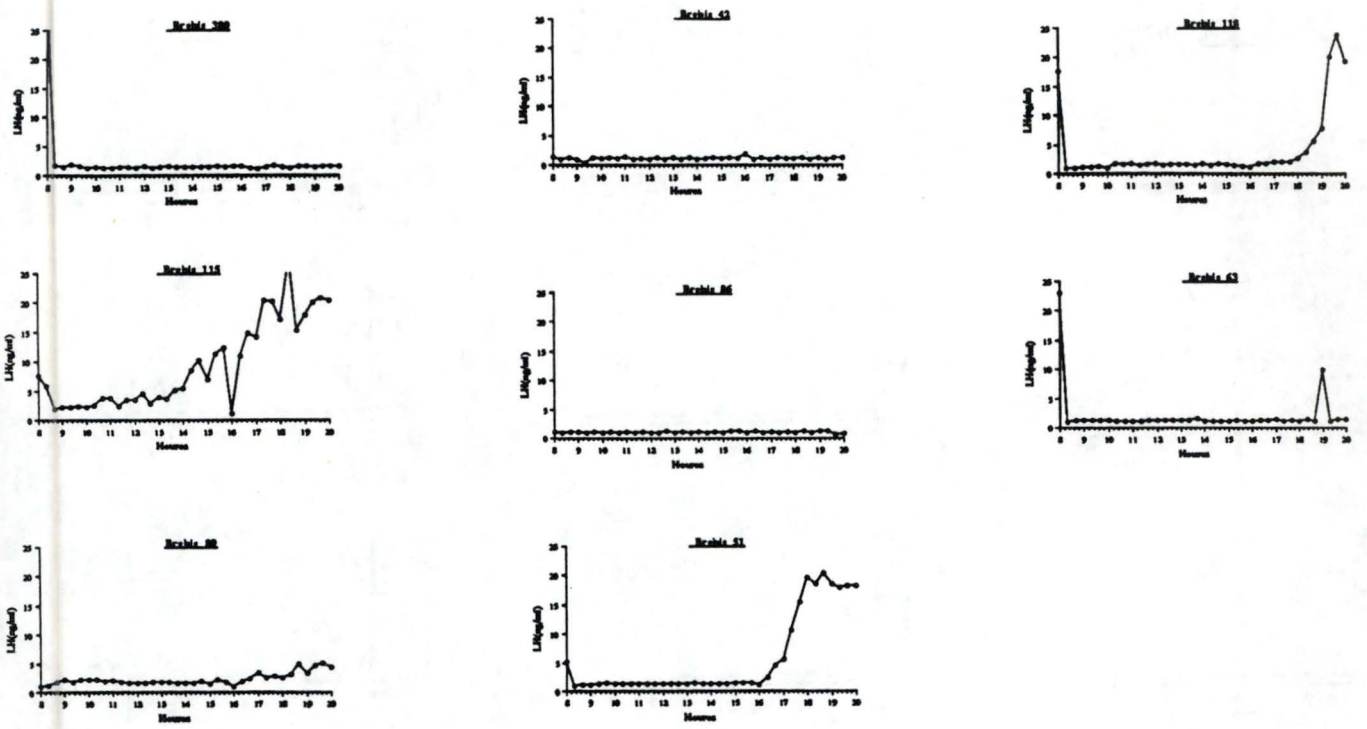


FIGURE 14: Taux plasmatiques de LH au cours des 12 heures de prises de sang s eries chez les brebis du lot PMSG en phase folliculaire.

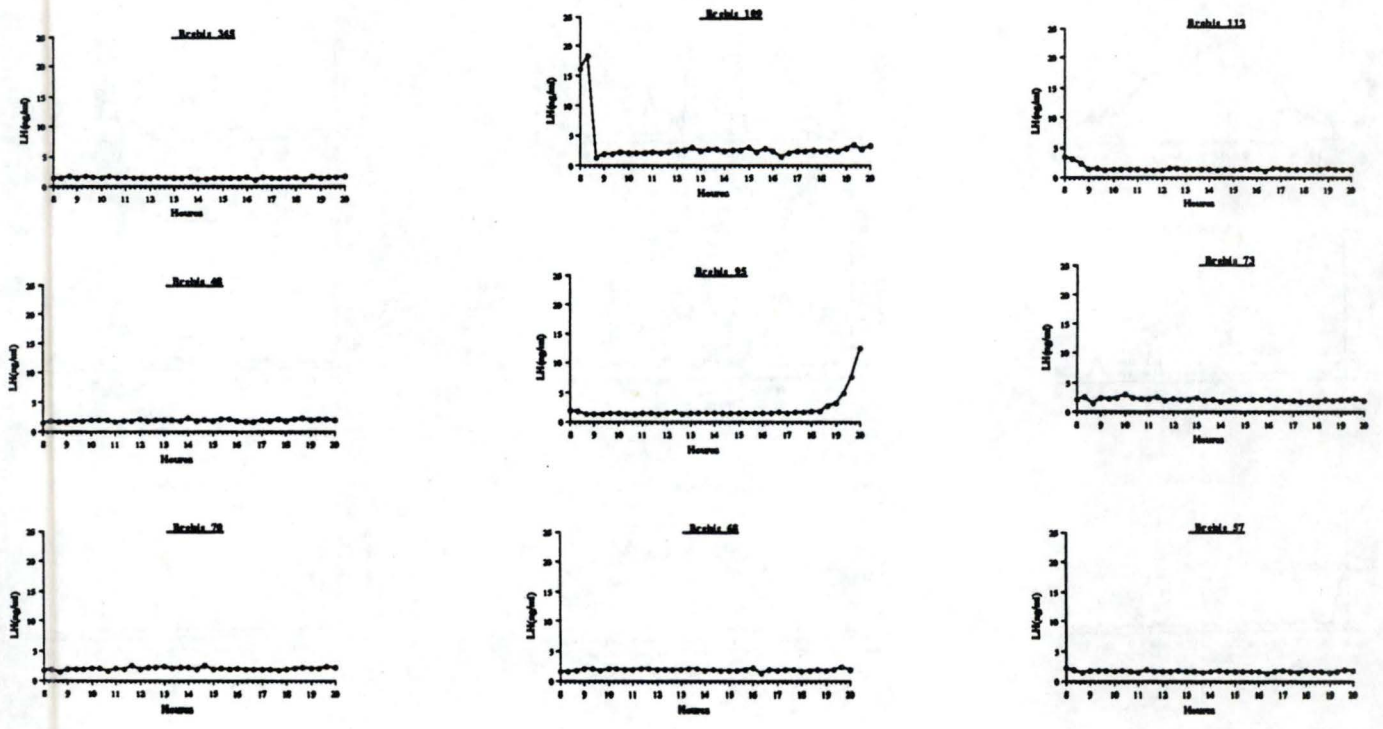


FIGURE 15: Taux plasmatiques de LH au cours des 12 heures de prises de sang s eries chez les brebis du lot P4 + PMSG en phase folliculaire.

trois (brebis 102 et 12). Le nombre moyen est donc de  $1,44 \pm 1,13$  et l'amplitude vaut  $0,83 \pm 0,74$  ng/ml.

### b. Phase folliculaire

Le taux basal moyen est significativement plus élevé ( $P < 0,05$ ) en phase folliculaire ( $1,41 \pm 0,65$  ng/ml) qu'en phase lutéale ( $0,76 \pm 0,11$  ng/ml).

Pour certaines brebis (fig. 12), la période de prises de sang sériées nous a permis de couvrir l'entièreté du pic de LH (brebis 47, 114 et 321). Ces pics sont caractérisés par une durée de sécrétion de 8 à 12 heures et un taux maximal jusqu'à 20 fois supérieur au taux de base.

Les profils de sécrétion des autres brebis fluctuent autour du taux de base. On peut alors envisager deux possibilités :

- soit le pic préovulatoire a déjà eu lieu. Ceci semble être le cas pour les brebis 388, 122 et 9, la première valeur mesurée est en effet supérieure aux autres;
- soit le pic préovulatoire n'a pas encore eu lieu, ce qui semble être le cas pour les brebis 94 et 55. On observe en effet une accélération de la fréquence d'émission de la LH qui pourrait amener la décharge préovulatoire. Pour la brebis 102, rien ne nous permet de trancher.

Les pics préovulatoires des brebis témoins ne sont donc pas parfaitement synchronisés; il est en effet connu que la durée du cycle est assez variable d'une brebis à l'autre.

## 3.2. Effet du progestagène

### a. Phase lutéale

L'apport de progestagène exogène n'a aucun effet significatif ( $P > 0,05$ ) sur les taux de base qui sont respectivement de  $0,66 \pm 0,05$ ;  $0,91 \pm 0,18$  et  $0,76 \pm 0,11$  ng/ml pour les groupes P<sub>4</sub>, P<sub>4</sub> + PMSG et témoin. De même, aucun effet n'a été mis en évidence sur la fréquence des pulses ( $1,78 \pm 1,2$  et  $1,55 \pm 1,24$  pour les lots P<sub>4</sub> et P<sub>4</sub> + PMSG contre  $1,44 \pm 1,13$  pour le lot témoin), ni sur l'amplitude de ces pulses ( $0,53 \pm 0,33$  et  $0,75 \pm 0,27$  contre  $0,46 \pm 0,40$  ng/ml respectivement pour ces mêmes lots).

### b. Phase folliculaire

Nous considérons uniquement le lot P<sub>4</sub> puisque pour le lot P<sub>4</sub> + PMSG, les résultats peuvent également être influencés par l'action de PMSG.

Le taux basal moyen ( $1,22 \pm 0,60$  ng/ml) ne diffère pas significativement ( $P > 0,05$ ) de celui du lot témoin ( $1,41 \pm 0,65$ ). Bien que toutes les brebis aient été synchronisées par le progestagène, on observe une hétérogénéité très marquée dans le profil d'évolution des concentrations de LH :

- Les brebis 421 et 74 présentent des pics comparables à ceux observés dans le groupe témoin.
- Le pic préovulatoire de la brebis 20 semble se terminer juste au début des prises de sang sériées.
- Les brebis 2, 69, 339 et 364 présentent de brèves décharges d'intensité et de fréquence variable (2 élévations pour les brebis 2, 69 et 336 et 6 pour la brebis 364).
- Les brebis 131 et 331 présentent des profils de sécrétion qui fluctuent autour du taux de base.

Il semble donc que le traitement à la progestérone, non suivi d'un traitement superovulatoire, engendre des modifications profondes dans la rythmicité des pulses.

### 3.3. Effet de la PMSG

La PMSG injectée au jour 14 ne peut pas avoir d'effet sur la LH en phase lutéale. Seule la phase folliculaire sera donc prise en considération.

Le taux basal moyen ne varie pas significativement ( $P > 0,05$ ), entre les groupes PMSG ( $1,24 \pm 0,42$  ng/ml), P<sub>4</sub> + PMSG ( $1,53 \pm 0,23$  ng/ml) et le groupe témoin ( $1,41 \pm 0,65$  ng/ml).

Pour les pics préovulatoires, on peut par contre faire les constatations suivantes :

- Pour le groupe PMSG (fig. 14) :
  - . les brebis 42, 51, 89, 115 et 118 montrent un début de pic préovulatoire à la fin des prises de sang sériées.
  - . les brebis 63 et 380 présentent un profil de fin du pic préovulatoire au début des prises de sang sériées (8 heures).

- . les brebis 82 et 86 présentent des profils de sécrétion qui fluctuent autour du taux de base: le pic préovulatoire n'a pas encore ou a déjà eu lieu.
- Pour le groupe P<sub>4</sub> + PMSG (fig. 15) :
  - . on constate que le pic préovulatoire de la brebis 109 se termine au cours des 40 premières minutes des prises de sang.
  - . par contre, la brebis 95 présente un début de pic en fin de prises de sang sériées.
  - . les profils de sécrétion des autres brebis fluctuent autour du taux de base.

Etant donné que pour le groupe P<sub>4</sub> + PMSG (et uniquement pour ce groupe), nous avons observé des cicatrices d'ovulation lors des endoscopies réalisées le 17ème jour (ce qui prouve que l'ovulation avait déjà eu lieu). Il est vraisemblable de penser que ces brebis ont toutes déjà présenté le pic préovulatoire.

En résumé, on peut dégager les conclusions suivantes :

- Le progestagène seul a comme effet principal d'altérer la rythmicité de l'émission de la LH.
- Notre expérience ne nous a pas permis de montrer un effet de la PMSG sur les sécrétions de LH.
- Le traitement complet (P<sub>4</sub> + PMSG) permet d'avancer l'apparition des pics préovulatoires de LH.

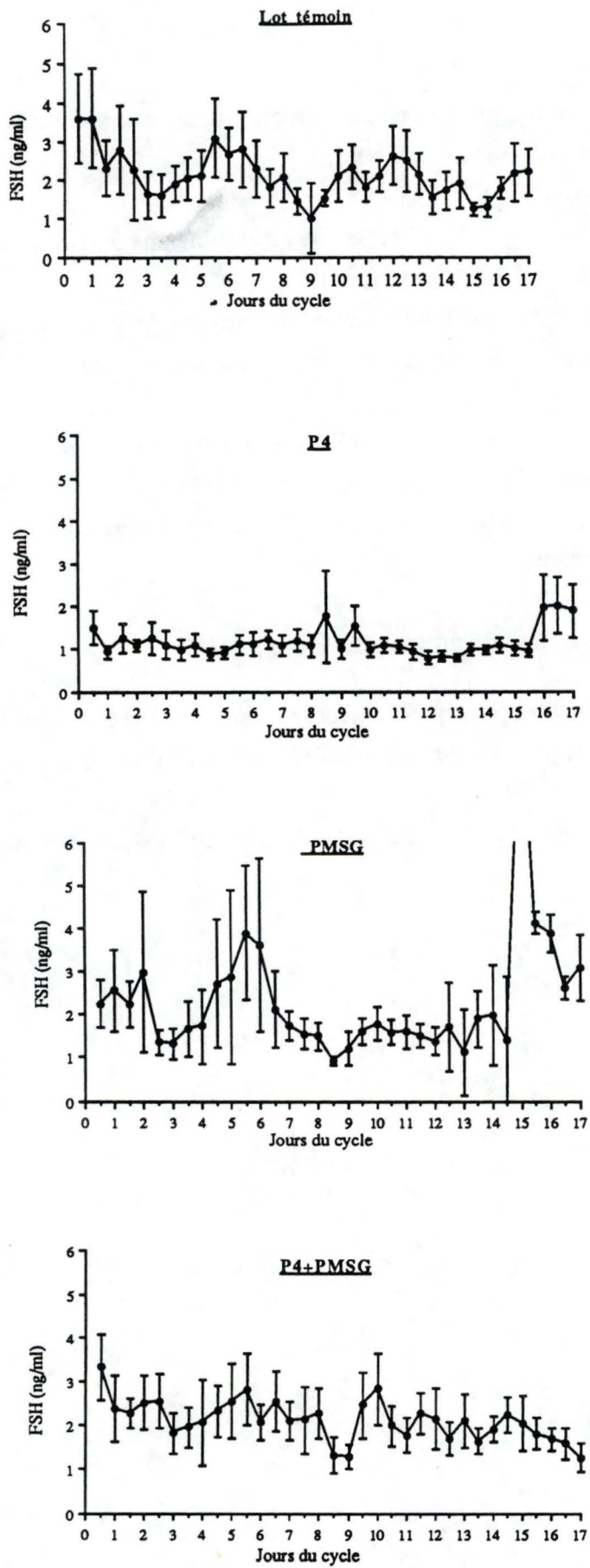


FIGURE 16: Taux plasmatiques moyens de FSH ( $X \pm SE$ ) au cours du cycle pour les 4 groupes.

#### 4. FSH

L'évolution des concentrations plasmatiques de FSH au cours du cycle des brebis a été déterminée sur deux prélèvements sanguins quotidiens (8 heures et 16 heures) pendant toute la durée de l'expérience et ce sur les 9 brebis de chaque lot.

Etant donné la variabilité individuelle élevée au sein d'un même groupe, nous n'avons pas pu faire d'analyse statistique précise. Nous nous contenterons donc d'une description et d'une comparaison des graphiques de sécrétion moyenne de FSH (fig. 16).

Les brebis du groupe témoin présentent une évolution moyenne des taux de sécrétion de FSH durant le cycle sous forme de vagues avec des maxima aux jours 1, 5 et 12. La troisième vague est cependant moins marquée.

Les brebis du groupe P<sub>4</sub> ont un taux de base moyen beaucoup plus faible. On observe seulement une petite élévation au jour 16.

Pour le groupe PMSG, par contre, on observe une élévation brutale au jour 15 pouvant aller jusqu'à 10 ng/ml. On met aussi en évidence pour ce groupe trois vagues de sécrétion, avec des maxima aux jours 1 et 5.

Pour les brebis du groupe P<sub>4</sub> + PMSG, nous observons un profil de sécrétion moyen comparable à celui du groupe témoin avec des maxima aux jours 1 et 5. La troisième vague de sécrétion est présente mais peu marquée.

Il est impossible de tirer des conclusions quant aux rôles de la P<sub>4</sub> et de la PMSG étant donné le manque de similitude entre les 14 premiers jours des graphiques P<sub>4</sub> et P<sub>4</sub> + PMSG, ainsi qu'entre les jours 15, 16 et 17 des graphes PMSG et P<sub>4</sub> + PMSG.



# DISCUSSION

## **A. POPULATION FOLLICULAIRE.**

### **1. EXISTENCE DE TROIS VAGUES DE CROISSANCE FOLLICULAIRE**

Les endoscopies quotidiennes ont permis d'observer la présence de follicules de taille variable à la surface des ovaires quels que soient le jour du cycle et le traitement utilisé. Les follicules peuvent être sains ou atrétiques.

L'analyse de la dynamique de la croissance des follicules antraux supérieurs à 2 mm a permis de démontrer l'existence d'un "turn-over" régulier qui se manifeste sous forme de "vagues" au cours du cycle oestral de la brebis.

Chez tous les individus, quel que soit le traitement reçu, trois périodes successives de développement ont été mises en évidence (2 en phase lutéale et 1 en phase folliculaire).

Cette étude concernant la dynamique de croissance folliculaire terminale au cours d'un cycle complet est la première réalisée chez la brebis Suffolk. Une étude similaire a été réalisée sur la brebis Texel par Jacques (1989).

Nos résultats concernant l'existence de vagues de croissance folliculaire sont en accord avec ceux obtenus chez la brebis Texel par Smeaton et Robertson (1971) ainsi que par Jacques (1989). Le même phénomène a également été décrit chez les bovins (Ireland et Roche, 1987) en se basant sur la quantité d'E<sub>2</sub> présente dans la veine ovarienne à différents moments du cycle et chez les caprins (Ginther et al., 1989) par ultrasonographie.

Nos conclusions s'opposent par contre au concept de croissance continue et aléatoire émis par Savio et al. (1988) chez les bovins, par Turnbull et al. (1977), Lahlou-Kassi et Mariana (1984) et Yenikoye et al. (1989) chez les ovins. Ces auteurs préconisent la présence de gros follicules sains à n'importe quel jour du cycle. Cependant, leurs informations proviennent d'études effectuées soit par histologie, soit par méthode chirurgicale : ce qui signifie qu'elles ne concernent qu'un moment précis ou une période limitée dans le temps (maximum 6 jours).

Le nombre de vagues observées (3) est en accord avec celui proposé par Smeaton et Robertson (1971) ainsi que par Jacques (1989).

Fortune et al. (1988) ont observé la croissance folliculaire sur 10 vaches et ont constaté que 8 sur 10 présentaient 3 vagues de croissance folliculaire tandis que 2 sur 10 n'en présentaient que deux.

Cette dernière observation est en accord avec celle de Brand et de Jong (1973) sur les brebis.

## 2. CARACTERISATION DE DIFFERENTS PARAMETRES DE LA CROISSANCE FOLLICULAIRE TERMINALE

Rappelons que nous avons considéré le nombre de follicules recrutés, sélectionnés, dominants ainsi que la taille moyenne des follicules dominants quels que soient la vague de croissance folliculaire et le traitement reçu.

Les critères de taille (décrits dans le chapitre "Résultats") employés pour différencier les follicules recrutés, sélectionnés et dominants correspondent à des changements physiologiques bien précis définis par Driancourt et Cahill (1984).

Le recrutement concerne la population de follicules supérieurs à 2 mm de diamètre; il correspond à un changement de sensibilité des follicules vis-à-vis des gonadotropines (Driancourt et Cahill, 1984).

La preuve que la sélection s'opère, se remarque par :

- la présence d'un gros follicule qui sécrète suffisamment d'E<sub>2</sub> pour induire une asymétrie des concentrations de ce stéroïde au niveau de la veine ovarienne et qui est capable de fixer la LH au niveau des récepteurs des cellules de la thèque et de la granulosa;
- le pouvoir inhibiteur qu'exerce un follicule sur ses congénères, ce qui se traduit visuellement par la régression de leur diamètre et par le temps de latence, particulièrement long, observé entre l'ablation de ce follicule et l'ovulation (Driancourt et Fry, 1988).

Une étude effectuée par Driancourt et Cahill (1984) chez la brebis indique que ce processus s'exerce sur une période très variable selon les individus. Cependant, en raison des critères exposés ci-dessus, il est justifiable de considérer que la sélection chez cette espèce a lieu dès la taille de 4 mm.

Un follicule devient dominant lorsqu'il exerce une inhibition active affectant la réponse des autres follicules à une stimulation gonadotrope et entraînant l'atrésie.

## 2.1. Taux d'ovulation

Selon les résultats de notre expérience, le T.O. naturel de la brebis Suffolk est de l'ordre de 1,2. Cette valeur est en accord avec celle obtenue par Noël (communication personnelle, 1991).

Les brebis du lot P<sub>4</sub> présentent un T.O. ( $1,0 \pm 0,0$ ) plus faible que le lot Témoin. Chez des brebis immunisées contre la P<sub>4</sub>, Scaramuzzi et Radford (1983) ont observé une augmentation du T.O. causé par une élévation des sécrétions des hormones gonadotropes. La P<sub>4</sub> semble donc avoir un effet inhibiteur sur le T.O. Ceci pourrait justifier la diminution du T.O. pour le groupe de brebis traité à la P<sub>4</sub> ( $1,0 \pm 0,0$ ).

Les traitements PMSG et P<sub>4</sub> + PMSG permettent d'augmenter significativement le T.O. à  $1,7 \pm 0,5$ . Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Noël (1989) et Lambert (1990) sur la brebis Suffolk. Nous avons donc mis en évidence un effet superovulatoire de la PMSG avec la dose utilisée (800 UI). Ceci a également été montré pour la brebis Texel, autre race belge de grand gabarit et fortement saisonnée (Heins et al., 1986; Bister et al., 1987).

## 2.2. Effet du progestagène (FGA)

Rappelons que la P<sub>4</sub> a comme effet d'avancer et d'étaler les phénomènes de recrutement, de sélection et de dominance des deux premières vagues de croissance folliculaire. De plus, les pourcentages d'atrésie due à la sélection et à la dominance sont plus importants que ceux du groupe témoin.

L'effet de la P<sub>4</sub> exogène se fait aussi sentir sur la troisième vague de croissance folliculaire, c'est-à-dire après cessation du traitement. On observe un pourcentage d'atrésie due à la dominance nettement plus élevé (64 %) que pour le groupe témoin (16 %).

A notre connaissance, notre expérience est la seule réalisée en vue de connaître les effets d'un progestagène exogène sur les mécanismes de la croissance folliculaire. Il nous est donc difficile de comparer nos résultats avec ceux d'autres auteurs.

Jacques (1989) a réalisé une étude au cours de différents états physiologiques qui indique l'existence de croissances folliculaires régulées par des mécanismes de recrutement, de sélection et de dominance, quel que soit le stade considéré. Or ces différents états physiologiques (anoestrus saisonnier et de lactation, en phase folliculaire et en phase lutéale)

sont caractérisés par des milieux hormonaux fondamentalement différents entre eux. Il paraît donc vraisemblable d'observer des croissances folliculaires chez des brebis traitées avec un progestagène.

Selon Fortune et Vincent (1983), la P<sub>4</sub> peut engendrer in vivo l'atrésie des follicules recrutés en inhibant l'activité aromatasase des cellules de la granulosa. La même constatation a été effectuée in vitro par Armstrong et al. (1987). Ceci paraît expliquer les pourcentages d'atrésie importants que nous avons observés.

### 2.3. Effet de la PMSG

L'action de la PMSG se manifeste sur la troisième vague de croissance folliculaire puisque l'injection est réalisée au jour 14.

Les brebis traitées à la PMSG ont une croissance folliculaire du type "recrutement" d'un grand nombre de follicules, suivie d'une sélection atténuée et d'une atrésie due à la dominance accrue.

L'effet de la PMSG sur le recrutement est net mais également très variable d'une brebis à l'autre (écart-type très important).

Le phénomène de dominance élimine efficacement les follicules qui ne sont pas aptes à ovuler puisque 65 à 70 % des follicules dominants de la troisième vague aboutissent à l'ovulation par rapport à 30 % pour le groupe témoin.

L'effet de la PMSG sur la croissance folliculaire terminale a été beaucoup étudié mais les effets obtenus sont souvent contradictoires.

Byskov (1978) ainsi que Moore et al. (1981; cités par Titeca, 1987) ont observé que la PMSG sauve les follicules en début d'atrésie. Par contre, selon les expériences de Hay et al. (1979) chez les ovins et de Hirshfield (1989) sur les rats, la PMSG ne recrute que les follicules sains. Le rôle de "sauveur" attribué à la PMSG devrait être plutôt interprété comme un rôle de prévention.

Turnbull et al. (1977) observent que la PMSG augmente la vitesse de croissance des follicules antraux. Cependant, Driancourt (1987) ne relève aucune corrélation entre la population des follicules antraux et le T.O. obtenu après traitement à la PMSG. En effet, après

réduction du nombre de follicules susceptibles de répondre à la stimulation de la PMSG par ovariectomie unilatérale, le taux d'ovulation ne varie pratiquement pas (3,7 et 3,9 respectivement pour 1 et 2 ovaires de brebis Romanov).

Driancourt (1987) montre toutefois une corrélation très étroite entre le nombre de follicules sains de 0,8 à 2 mm de diamètre présents sur l'ovaire au moment de l'injection et le taux d'ovulation. Ceci suggère donc que les follicules recrutés par la PMSG sont plus petits que ceux recrutés à la lutéolyse d'un cycle normal (2 mm).

Nos résultats sont en accord avec cette dernière observation. On observe en effet une seconde période de recrutement au jour 15, ce qui implique que la PMSG injectée au jour 14 induit la croissance de follicules qui atteindront le stade de 2 mm au jour 15. La PMSG agit donc sur les follicules de diamètre inférieur à 2 mm.

Selon Whyman et Moore (1980), la réponse ovarienne à la PMSG est caractérisée par une augmentation du poids des ovaires, par des ovulations multiples et par l'apparition de follicules kystiques (perdurant à la surface des ovaires sans ovuler).

Nous avons en effet observé pour 3 des 4 brebis des ovulations doubles. Par contre, aucun follicule kystique n'a été observé.

Nous avons observé une atrésie due à la dominance très importante. Aucun élément de la littérature ne nous permet d'expliquer le phénomène si ce n'est le travail de Callesen et al. (1986). Ils constatent en effet que chez la brebis et la vache, la PMSG induit une méiose prématurée chez certains follicules, produisant ainsi des ovocytes de piètre qualité. On peut donc vraisemblablement penser que le phénomène de dominance élimine tous les follicules anormaux.

Nous avons également observé une variabilité individuelle très importante, phénomène souvent évoqué dans la littérature. Une partie de cette variabilité peut être attribuée au nombre total de follicules présents sur l'ovaire avant le traitement, phénomène incontrôlable et dépendant de l'individu (Monniaux et al., 1983). Mais un effet inhérent à la PMSG peut aussi être évoqué.

La qualité des lots de production de PMSG pourrait être inégale mais Schams et al. (1978) ont analysé la quantité d'acide sialique et l'activité LH et FSH de 5 lots différents de PMSG et n'ont obtenu aucune différence significative.

La très longue demi-vie de la PMSG soulève inévitablement la question de l'existence d'anticorps anti-PMSG, surtout chez des animaux traités plusieurs fois.

Selon Mauléon (1975), lorsqu'on effectue des traitements rapprochés (tous les 17 jours) par exemple, il y a production d'anticorps contre la PMSG, ce qui explique une dispersion des réponses.

Baril et al. (1991, communication personnelle) ont également observé que l'utilisation répétée de PMSG durant la vie de la chèvre ou au cours d'une même année, est suivie d'une augmentation du niveau d'anticorps anti-PMSG.

Les brebis utilisées pour notre expérience avaient déjà été traitées plusieurs fois avec de la PMSG au cours des années antérieures. Il est donc probable que ces brebis présentent des anticorps contre la PMSG.

## **B. PROFILS DE SECRETION DES DIFFERENTES HORMONES**

### **1. PROGESTERONE**

Les profils moyens des groupes témoin et PMSG sont identiques à ceux décrits dans la littérature (Bister, 1980; Derivaux et Ectors, 1986).

Le groupe P4 présente un profil de type accroissement du taux de P4 jusqu'au jour 9, puis décroissance rapide. Par contre, le groupe P4 + PMSG présente un profil de sécrétion identique à celui du groupe témoin.

Les éponges ont été conçues de manière telle que, en raison de leur taille et de leur texture, elles puissent être maintenues dans le vagin et permettre une libération journalière du progestagène capable de bloquer l'ovulation.

On a établi qu'une éponge libère 5 % du produit par jour (Derivaux et Ectors, 1986), ce qui donne une courbe de libération en forme d'exponentielle décroissante. Ce progestagène exogène inhibe normalement la sécrétion de progestérone endogène par le corps jaune. Nous devrions donc observer des profils de sécrétion montrant une croissance jusqu'au jour 5, puis une décroissance progressive.

Le groupe P4 présente un profil de ce type, cependant le taux de P4 croît jusqu'au jour 9, c'est-à-dire 4 jours de plus que le modèle. Le groupe P4 + PMSG, par contre, ne présente absolument pas ce type de profil.

On peut envisager 2 explications:

- La FGA n'inhibe pas de façon efficace la sécrétion endogène de P4;
- La FGA interagit avec l'anti-progestérone utilisé pour les dosages. Dans ce cas, nous ne pourrions pas faire la distinction entre la progestérone et le progestagène exogène. Une expérience est actuellement en cours pour essayer de clarifier ce point !

### **2. OESTRADIOL**

En phase lutéale, les profils de sécrétion de l'oestradiol, pour les groupes P4, PMSG, P4 + PMSG, sont constitués de 2 vagues bien marquées, ceci est en accord avec la littérature. Ces vagues sont par contre nettement moins marquées pour le groupe témoin.



En phase folliculaire, on observe une 3<sup>ème</sup> vague de sécrétion d'E<sub>2</sub> caractérisée par un pic de sécrétion bien marqué pour les lots P<sub>4</sub>, PMSG, P<sub>4</sub> + PMSG et moins prononcé pour le lot témoin.

L'oestradiol est produit par la granulosa et sa production dépend de la disponibilité en androgènes fournis par la thèque. Un facteur limitant la production d'E<sub>2</sub> semble être la conversion dans les cellules de la thèque de la P<sub>4</sub> en androstènedione (Bogowitch et Richards, 1982; cités par Brännström, 1988). Donc, quand on fournit de grandes quantités de P<sub>4</sub> à la brebis (groupe P<sub>4</sub>), il n'y a pas de facteur limitant et on peut observer une augmentation importante du taux de sécrétion d'E<sub>2</sub>.

Par opposition à cela, selon Fortune et Vincent (1983), la P<sub>4</sub> peut supprimer le développement des follicules ovulatoires en inhibant l'aromatase des cellules de la granulosa.

La PMSG agit sur les sécrétions d'E<sub>2</sub> comme une "FSH-like", à savoir qu'elle produit une stimulation de la croissance folliculaire et qu'elle augmente le taux d'E<sub>2</sub> dans le sang (Sherwood et Mc Shan, 1977). Elle induit et maintient la synthèse de l'aromatase dans les cellules de la granulosa (Chan et Tan, 1987). Cet effet pourrait expliquer l'élévation du taux d'E<sub>2</sub> observée pour le groupe PMSG.

Les 2 explications peuvent être évoquée pour le groupe P<sub>4</sub> + PMSG.

### **3. LH**

#### **3.1. Brebis témoin.**

Les profils obtenus pour la LH sont ceux décrits par un grand nombre d'auteurs :

- une émission tonique qui est le résultat d'une sécrétion pulsatile avec chaque fois retour au niveau de base, en phase lutéale;
- une décharge cyclique, dite préovulatoire, de courte durée (8 à 12 heures) et de grande amplitude, en phase folliculaire.

#### **a. Emission tonique.**

Les valeurs de taux de base que nous avons enregistrées présentent de faibles variations individuelles entre les animaux. Elles sont de 0,62 ng/ml chez les brebis 102 et 388 et 0,93 ng/ml chez la brebis 9.

Bien que ces valeurs soient assez basses par rapport à celles données par certains auteurs (Thibier, 1981, cité par Martin, 1984, observe un taux de base de 3 à 5 ng/ml; Bister, 1980, de 4 ng/ml), elles se trouvent dans la norme de celles données par d'autres. Foster et al. (1984) décrivent un taux inférieur à 1 ng/ml; Martin (1984) donnent une valeur de 1,5 ng/ml.

Il faut aussi noter que le dosage RIA s'appuie sur des préparations hormonales de référence dont le degré de purification varie vraisemblablement d'un laboratoire à l'autre, ce qui introduit un facteur supplémentaire de variabilité.

Nous avons observé en moyenne  $1,44 \pm 1,13$  pulses sur une période de 12 heures. Ceci est très faible, en effet, Baird et al. (1981) observent que la fréquence des pulses est de 1 par 3 heures 33' en phase lutéale. Par contre, Martin (1984) note que le nombre de pulses est de 4,33 par 10 heures pour cette même phase.

Le critère de détermination du pulse pourrait expliquer partiellement la variabilité existant entre les différents nombres de pulses chez les différents auteurs. Cependant, Thibier (1981, cité par Martin, 1984) note que divers paramètres encore mal appréciés (facteurs génétiques et de milieu, race, latitude,...) sont également capables d'interférer avec cette fréquence.

Les pulses que nous observons ont une amplitude moyenne de  $0,46 \pm 0,40$  ng/ml. Nos résultats sont nettement inférieurs à ceux obtenus par Martin (1984). Cet auteur observe une amplitude moyenne de 1,2 à 7 ng/ml à mi-cycle, c'est-à-dire en phase lutéale.

### b. Emission cyclique

En phase préovulatoire (J16), nous avons observé une augmentation significative du taux basal de LH. Selon certains auteurs (Martin, 1984; Baird et Mc Neilly, 1981; Legan et Karsch, 1979), cette augmentation correspond à une fréquence de pulses plus élevée. Cependant, d'autres auteurs n'observent pas cette élévation du taux basal en phase préovulatoire (Bindon et al., 1979; Pelletier et Thimonier, 1969).

L'émission cyclique observée en phase folliculaire est caractérisée par une décharge éphémère de LH; la durée du pic est de 8 à 12 heures. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Bister (1980) ainsi que par Jacques (1983) sur la brebis Texel. Le pic est constitué par la sommation de pulses de plus en plus rapprochés conformément aux observations de Baird et Mc Neilly (1981).

### c. Contrôle de l'émission de LH pendant le cycle

Le contrôle de l'émission de LH pendant le cycle n'est pas totalement élucidé et paraît variable selon les espèces. La GnRH joue un rôle central. Chaque pulse de GnRH est suivi d'un pulse de LH (Piroux, 1990).

La sécrétion tonique de LH est soumise au contrôle de deux stéroïdes : l'oestradiol et la progestérone (Karsch et Legan, 1980; Pelletier et Thimonier, 1969). Goodman et Legan (1980) et Williams et Lipner (1982) décrivent la nature de cette interaction où la P<sub>4</sub> agit en réduisant la fréquence des pulses alors que l'E<sub>2</sub> en réduit seulement l'amplitude. De plus, Goodman et Legan (1980) signalent que la P<sub>4</sub> détermine le profil de la LH circulante entre les pulses de LH au cours des cycles successifs tandis que l'E<sub>2</sub>, agissant seul pendant la phase folliculaire et de concert avec la P<sub>4</sub> pendant la phase lutéale, établit les limites supérieures et inférieures entre lesquelles la LH fluctue.

Beaucoup d'auteurs s'accordent pour affirmer que la fréquence des pulses de LH change au cours du cycle (Rahe et al., 1980; cités par Martin, 1984). Elle est très variable selon les auteurs et selon les animaux utilisés. Cependant, l'ensemble des constatations vont dans le sens d'une diminution du nombre de pulses en phase lutéale.

### 3.2.Effet de la P<sub>4</sub>

#### a. Emission tonique

Nous n'avons observé aucune différence significative entre les taux de base, la fréquence et l'amplitude des pulses entre les brebis traitées à la P<sub>4</sub> et les témoins en phase lutéale. L'apport de P<sub>4</sub> exogène n'a donc aucun effet. Ceci n'est pas en accord avec les données de la littérature.

Wheaton et Mullet (1983) et Wright et al. (1978) montrent que la P<sub>4</sub> diminue la fréquence des pulses de LH en réduisant la sensibilité de l'hypophyse à la LHRH. Reeves et al. (1971) ont également montré que l'hypophyse est moins sensible à la LHRH pendant la phase lutéale.

Karsch et al. (1987) chez la brebis en cycle ovariectomisée, ainsi que l'Anson et Legan (1988) chez la brebis en anoestrus saisonnier ont suggéré que l'augmentation transitoire de la P<sub>4</sub> pourrait agir sur l'axe hypothalamo-hypophysaire en altérant la sécrétion tonique de LH.

### b. Emission cyclique

Malgré l'arrêt du traitement, on observe un effet du progestagène sur la rythmicité des pulses de LH en phase folliculaire. On peut envisager l'explication suivante: les progestagènes inhibent le fonctionnement de l'axe hypophyso-ovarien durant toute la durée de leur administration en agissant au niveau de l'hypothalamus (Derivaux et Ectors, 1986). La P<sub>4</sub> inhibe la sécrétion de LHRH mais pas sa synthèse (Paquay, 1989). On pourrait donc penser que lors de la cessation du traitement, la LHRH est sécrétée de façon massive et perturbe la cyclicité de l'émission de LH.

### 3.3. Groupe PMSG

Les effets observés pour ce groupe montrent une grande variabilité dans l'apparition du pic préovulatoire. Chez certaines brebis le pic a déjà eu lieu tandis chez d'autre il apparaît en fin de prises de sang sériées ou n'apparaît pas du tout.

La rétroaction de l'E<sub>2</sub> sur la sécrétion de LHRH par l'hypothalamus et donc de LH par l'hypophyse est un équilibre compliqué entre la stimulation et l'inhibition qui n'a pas été complètement clarifié. Une modification de cet équilibre par des hautes concentrations en E<sub>2</sub> entraînerait la suppression de la fréquence des pulses et une accélération de l'apparition du pic préovulatoire de LH (Bever et al., 1989, chez la vache).

Par contre, Bever et al. (1984) ont observé une absence du pic préovulatoire de LH pour 20 % des vaches traitées à la PMSG. Il est possible qu'un facteur inhibiteur du pic préovulatoire, comme celui trouvé chez la truie (Danforth et al., 1987), soit aussi sécrété par les follicules ovins et bovins en développement.

### 3.4. Groupe P<sub>4</sub> +PMSG

Le traitement complet P<sub>4</sub> + PMSG semble avoir comme effet principal d'avancer le pic préovulatoire de LH. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Cognié et al. (1970) et pourraient être expliqués par les hautes concentrations en E<sub>2</sub> résultant de l'augmentation du nombre de follicules préovulatoires induite par la PMSG.

Cependant, si on prend en considération les observations de Bever et al. (1989) décrites ci-dessus, il se pourrait que les pics préovulatoires soient totalement absents.

## 4. FSH

### 4.1. Groupe témoin.

Le profil de sécrétion du lot témoin montre une émission sous forme de vagues (3) d'intensité identique. Bister (1980) a mis en évidence une rythmicité de la FSH au cours du cycle oestral de la brebis. La période de sécrétion est de 5 à 6 jours, ce qui partage le cycle en 3 vagues à peu près identiques.

Une relation existe entre les vagues de FSH et les vagues de croissance folliculaire observées au cours du cycle en accord avec les propriétés folliculo-stimulantes de l'hormone (Jacques, 1989).

Bister et Paquay (1983) ont mis en évidence un aspect particulier de la sécrétion de FSH en période préovulatoire. Ils observent une diminution du taux sanguin 48 heures avant l'oestrus puis une élévation accompagnant le pic préovulatoire de LH. Ce pic préovulatoire d'une douzaine d'heures est suivi d'une nouvelle hausse postovulatoire s'étalant sur 24 à 36 heures. Aucun phénomène de ce genre n'a été observé pour le lot témoin.

### 4.2. Effet du progestagène.

Le profil de sécrétion moyen du groupe P4 présente un niveau basal beaucoup moins élevé que celui du lot témoin. Par contre aucune différence n'est observée entre les profils des lots P4 + PMSG et témoin

Selon Bister (1989), la P4 inhibe la sécrétion au niveau hypothalamique (GnRH) et hypophysaire (LH + FSH) et empêche la maturation folliculaire. Cette explication est en accord avec le profil du groupe P4.

Par contre, Ruger et Rawlings (1985) ainsi que Smith et al. (1987) ont montré que l'immunisation contre la P4 n'a aucun effet sur les sécrétions de FSH. Ceci pourrait expliquer le fait que l'on n'observe pas de différence entre le groupe Témoin et le groupe P4 + PMSG pour les 14 premiers jours de l'expérience.

### 4.3. Effet de la PMSG.

La PMSG injectée au jour 14 engendre une brusque élévation du taux de FSH au jour 15 pour le lot PMSG par contre pour le groupe P4 + PMSG cet effet n'est pas observé.

La PMSG interfère profondément avec l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire ainsi qu'avec les mécanismes de régulation intraovariens, d'une part, à cause de sa longue demi-vie et, d'autre part, par ses effets comparables à ceux de la FSH et de la LH (Schams et al., 1978).

La sécrétion basale ainsi que l'amplitude et la fréquence des pics de FSH sont diminuées par le traitement à la PMSG (Martin et al., 1988, chez la brebis; Bevers et al., 1989, chez la vache). Ces auteurs ont également démontré que l'augmentation importante des concentrations en oestradiol et en inhibine provoquée par le nombre plus important de follicules préovulatoires est responsable du feedback négatif sur la sécrétion de FSH. Ceci nous permet d'expliquer le profil observé pour les jours 14, 15, 16 et 17 du groupe P<sub>4</sub> + PMSG.

# CONCLUSIONS

## **A. POPULATION FOLLICULAIRE.**

Les endoscopies quotidiennes nous ont permis de mettre en évidence l'existence de 3 vagues de développement folliculaire au cours du cycle chez la brebis Suffolk (deux en phase lutéale et une en phase folliculaire).

Nous avons également observé une distribution trimodale de la fréquence d'observation des follicules recrutés, sélectionnés et dominants.

Le taux d'ovulation moyen est de  $1,2 \pm 0,5$  pour des brebis non traitées.

Le traitement avec le progestagène (FGA) s'est fait par pose d'éponges vaginales durant les 14 premiers jours du cycle. Il a comme effet :

- d'avancer les mécanismes de recrutement, de sélection et de dominance en phase lutéale;
- de diminuer le nombre de follicules dominants et d'augmenter le pourcentage d'atrésie due à la dominance en phase folliculaire;
- de diminuer légèrement le taux moyen d'ovulation ( $1,0 \pm 0,0$ ).

Le traitement à la PMSG s'est fait par une injection de 800 UI au 14ème jour du cycle. Il a comme effet :

- d'accroître le nombre de follicules recrutés en agissant sur les follicules de diamètre inférieur à 2 mm;
- d'atténuer la sélection et d'accentuer la dominance;
- d'augmenter significativement le taux d'ovulation ( $1,7 \pm 0,5$ ).

## **B. SECRETIONS HORMONALES**

Les sécrétions hormonales déterminées chez les brebis non traitées montrent :

- pour la P<sub>4</sub>, une augmentation du taux plasmatique en phase lutéale, suivie d'une brusque diminution en phase folliculaire;
- pour la LH, une émission pulsatile durant la phase lutéale, suivie d'une décharge importante (pic préovulatoire) en phase folliculaire (J15);
- pour l'E<sub>2</sub>, une émission sous forme de vagues comparable au modèle de la croissance folliculaire, avec un léger pic durant la troisième vague;
- pour la FSH, une émission sous forme de vagues.



### Le progestagène (FGA):

- a un effet ambigu qui n'a pas encore été clarifié sur les sécrétions de P<sub>4</sub>;
- n'a aucun effet sur le profil de sécrétion d'E<sub>2</sub> des deux vagues de la phase lutéale et entraîne par contre une décharge significativement plus importante au jour 15, c'est-à-dire en phase folliculaire;
- n'a aucun effet ni sur les taux de base, ni sur l'amplitude et la fréquence des pulses de LH en phase lutéale; cependant, il engendre des modifications profondes dans la rythmicité des pulses en phase folliculaire;

Nos résultats ne nous permettent pas de tirer de conclusions au sujet des sécrétions de FSH.

### La PMSG:

- n'a aucun effet sur les sécrétions de P<sub>4</sub>;
- augmente significativement le pic préovulatoire d'E<sub>2</sub>;
- notre expérience ne nous a pas permis de mettre en évidence un effet de la PMSG sur l'apparition des pics préovulatoires de LH
- nos résultats ne nous permettent pas de tirer de conclusions au sujet des sécrétions de FSH.

# BIBLIOGRAPHIE

- ARMSTRONG D.T., DANIEL S.A.J. et GORE-LONGTON R.E. (1987). Intra-ovarian actions of steroids in regulation of follicular steroid biosynthesis. Dans : "Endocrinology and Physiology of Reproduction", Eds. Leung P.C.K., Armstrong D.T., Ruf K.B., Moger W.H. et Friesen M.G., p. 177-195, Plenum Press, New York.
- BAIRD D.T. et Mc NEILLY A.S. (1981). Gonadotrophic control of follicular development and secretion in the sheep oestrous cycle. *J. Reprod. Fertil.*, suppl. 30, 119-133.
- BAIRD D.T., SWANSTON I.A. et Mc NEILLY A. (1981). Relationship between LH, FSH and the secretion of androgens and estrogens by the preovulatory follicles in the ewe. *Biol. Reprod.*, 24, 1013-1025.
- BECKERS J.F., BALLMAN P., ECTORS F. et DERIVAUX J. (1975). Aperçu sur les méthodes de dosage des stéroïdes. *Ann. Méd. Vét.*, 119, 37-50.
- BEVERS M.M., DIELEMAN S.J., van TOL H.T.M., BLANKENSTEIN D.M. et van den BROEK J. (1989). Changes in pulsatile secretion patterns of LH, FSH, progesterone, androstenedione and oestradiol in cows after superovulation with PMSG. *J. Reprod. Fertil.*, 87, 745-754.
- BINDON B.M., BLANC M.R., PELLETIER J., TERQUI M. et THIMONIER J. (1979). Perioovulatory gonadotrophin and ovarian steroid patterns in sheep of breeds with differing fecundity. *J. Reprod. Fertil.*, 55, 15-25.
- BISTER J.L. (1980). Influence de la photopériode sur la physiologie de la reproduction de la brebis Texel. Thèse, Facultés Universités N.-D. de la Paix, Namur.
- BISTER J.L. et PAQUAY R. (1983). Fluctuations in the plasma levels of the Follicle-Stimulating-Hormone during oestrus cycle, anoestrus, gestation and lactation in the ewe : evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology*, 25, 53-70.
- BISTER J.L., HEINS T. et PAQUAY R. (1986). PMSG and fertility of the Texel ewe. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, 95 (2), P27-P28.
- BISTER J.L., CALUS A.C. et PAQUAY R. (1987). Accélération des processus de reproduction. *Revue de l'Agriculture* n° 3, vol. 40, p. 675-684.

- BISTER J.L. (1989). Cours de première licence en Biologie : Physiologie Animale. FUNDP, Namur.
- BRAND A. et de JONG W.H.R. (1973). Qualitative and quantitative micromorphological investigations of the tertiary follicle population during the oestrus cycle in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 33, 431-439.
- BRANN D.W., RAO I.M. et MAHESH V.B. (1988). Antagonism of Estrogen - Induced Prolactin release by Progesterone. *Biol. Reprod.*, 39, 1067-1073.
- BRANNSTROM M., KOOS R.D., LEMAIRE W.J. et JANSON P.O. (1987). Cyclic adenosine 3',5' monophosphate-induced ovulation in the perfused rat ovary and its mediation by prostaglandins. *Biol. Reprod.*, 37, 1047-1053.
- BRANNSTROM M. (1988). Mechanism of ovulation : studies using the in vitro perfused rat ovary. Department of Physiology, University of Göteborg.
- BYSKOV A.G.X. (1978). Follicular atresia. Dans "The Vertebrate Ovary". Ed. Jones R.C., p. 553-562, Plenum Press, New York.
- CAHILL L.P. et DUFOUR J. (1979). Follicular populations in the ewe under different gonadotrophin levels. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 19 (5), 1475-1481.
- CALLESEN H., TORBEN G. et POOL H. (1986). Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology*, 25 (21), 71-85.
- CHAN W.K. et TAN C.H. (1987). Induction of aromatase activity in porcine granulosa cells by FSH and cyclic AMP. *Endocr. Res.*, 13, 285-299.
- 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 (1), 15-24.
- COGNIE Y., SCHIRAR A., MARTINET J., POULIN N. et MIRMAN B. (1984). Activité reproductrice et maîtrise de l'ovulation chez la brebis. 9èmes Journées de la Recherche Ovine et Caprine.
- COLLIGNON J.L. (1984). L'effet bélier. Mémoire, FUNDP, Namur.

- COMBARNOUS Y. (1987). Structure and structure-function. Relationships in gonadotropins. 26ème Colloque de la Société française pour l'étude de la fertilité, Paris.
- CRAPLET C. et THIBIER M. (1980). Le mouton. Eds. Vigot, Tome IV.
- DANFORTH D.R., SINOSICH M.S., ANDERSON T.L., CHENG C.Y., BARDIN C.W. et HODGEN G.D. (1987). Identification of gonadotrophin surge-inhibiting factor in follicular fluid and its differentiation from inhibin. *Biol. Reprod.*, 37, 1075-1082.
- DEBECKER F. (1984). *Hormonologie vétérinaire. Lexique*, Intervet.
- DERIVAUX J. et ECTORS F. (1986). *Reproduction chez les animaux domestiques*. CABAY, Louvain-la-Neuve, 55-71 et 131-175.
- DIELEMAN S.J. et 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. Fertil.*, 81, 533-542.
- DRIANCOURT M.A. et CAHILL (1984). Preovulatory follicular events in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 71, 205-211.
- 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. (1987). Ovarian features contributing to the variability of PMSG-induced ovulation rate in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 80, 207-212.
- DUFOUR J., CAHILL L.P. et MAULEON P. (1979). Short and long term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on follicular populations in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 57, 301-309.
- 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.
- FORTUNE J.E. et VINCENT S.E. (1983). Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *Reprod.*, 29, 1078-1089.

- FORTUNE J.E., SIROIS J. et QUIRK S.M. (1988). The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine oestrus cycle. *Theriogenology*, 29 (1), 95-109.
- FOSTER D.L., RYAN K.D. et PAPKOFF H. (1984). Hourly administration of luteinizing hormone induces ovulation in prepubertal female sheep. *Endocrinology*, 115, 1179-1185.
- FUKUOKA M., YASUDA K., TAI S., TAKAKURA K. et MORI T. (1989). Interleukin-1 stimulates growth and inhibits progesterone secretion in cultures of porcine granulosa cells. *Endocrinology*, 124 (2), 884-890.
- GINTHER O.J., KNOPP L. et KASTELIC J.P. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.*, 87, 223-230.
- GOODMAN R.L. et LEGAN S.J. (1980). Two effects of oestradiol that normally contribute to the control of tonic LH secretion in the ewe. *Biol. Reprod.*, 23, 415-422.
- GOODMAN R.L., REICHERT L.E., LEGAN S.J., RYAN K.D., FOSTER D.L. et KARSCH F.J. (1981). Role of gonadotropins and progesterone in determining the preovulatory estradiol rise in the ewe. *Biol. Reprod.*, 25, 134-142.
- 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 physicochemical properties of the Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG). *Endocrinology*, 91 (1), 101-106.
- GREEP R.O. (1973). *Handbook of Physiology - Endocrinology : female reproductive system.* Amer. Physiol. Soc., Washington, II (1), 560-593.
- HANSEL W. et CONVEY E.M. (1983). Physiology of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 57 (2), 404-424.
- HAY M.F., MORR R.M., CRAN D.G. et DOTT M.M. (1979). Regeneration of atretic sheep ovarian follicles in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 55, 195-207.

- HEINS T., BISTER J.L., ARTOISENET P. et 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.
- HIRSHFIELD A.N. (1989). Resure of atretic follicles in vitro and in vivo. *Biol. Reprod.*, 40, 181-190.
- JACQUES E. (1984). La croissance folliculaire chez la brebis Texel. Mémoire, FUNDP, Namur.
- JACQUES E. (1989). Contrôle de la croissance terminale et de la maturation des follicules ovariens de la brebis. Thèse, FUNDP, Namur.
- KARSCH F.J. et LEGAN S.J. (1980). Importance of E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> in regulating LH secretion and oestrus behavior during the sheep oestrus cycle. *Biol. Reprod.*, 23, 404-413.
- KARSCH F.J., CUMMINS J.T., THOMAS G.B. et CLARKE J.J. (1987). Steroid feedback inhibition on pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biol. Reprod.*, 36, 1207-1218.
- KAYSER C. (1970). *Physiologie - Les grandes fonctions* (3ème édition). Flammarion, vol. 3, p. 778-811.
- KNIGHT J.W. et KUKOLY C.A. (1990). In vitro release of progesterone and estrone by the porcine placenta throughout gestation. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 7 (4), 497-508.
- LALHOU-KASSI A. et MARIANA J.C. (1984). Ovarian follicular growth during the oestrus cycle in two breeds of ewes of different ovulation rate. *J. Reprod. Fertil.*, 72, 301-310.
- LAMBERT (1990). Contrôle de l'ovulation chez la brebis Suffolk. Mémoire, FUNDP, Namur.
- LEFORT G.P., STOLK J.M. et NISULA B.C. (1986). Renal metabolism of the  $\beta$  subunit of human choriogonadotropin in the rat. *Endocrinology*, 119, 924-931.
- LEGAN S.J. et KARSCH F.J. (1979). Neuroendocrine regulation of the oestrus cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biol. Reprod.*, 20, 74-85.

- LEYMARIE P. et BENHAIM A. (1988). Notions récentes concernant le corps jaune. *Reprod. Nutr. Develop.*, 28 (6B), 1673-1680.
- MALPAUX B., WAYNE N.L. et KARSCH J. (1988). Termination of breeding season in the Suffolk ewe. Involvement of an endogenous rhythm of reproduction. *Biol. Reprod.*, 39, 254-263.
- MANDIKI S.N.M. (1991). Allaitement et reprise de l'activité reproductrice chez la brebis Texel. Thèse, FUNDP, Namur.
- MARGALIOTH E.J., BRONSON R.A., COOPER G.W. et ROSENFELD D.L. (1988). Luteal phase sera and progesterone enhance sperm penetration in the hamster egg assay. *Fertil. Steril.*, 50 (1), 117-122.
- MARTIN C. (1984). La pulsativité de la LH au cours du cycle chez la brebis Texel. Mémoire, FUNDP, Namur.
- MARTIN C.R. (1976). *Textbook of Endocrine Physiology*. Williams et Wilkins Eds., p. 265-295.
- MARTIN G.B., SCARAMUZZI R.J. et HENSTRIDGE J.D. (1983). Effects of oestradiol, progesterone and androstenedione on the pulsatile secretion of luteinizing hormone in ovariectomized ewes during spring and autumn. *J. Endocrinol.*, 96, 181-193.
- MARTIN G.B., PRICE C.A., THIERY J.C. et WEBB R. (1988). Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 82, 319-328.
- MAULEON P. (1975). L'utilisation de la PMSG. Dans "Maîtrise des cycles sexuels chez les ovins. Etat actuel et perspectives. p. 165-169. *Comptes rendus*, Searle, Paris.
- Mc NEILLY A.S., FRASER H.M. et BAIRD D.T. (1984). Effect of immunoneutralization of LH releasing hormone on LH, FSH and ovarian steroid secretion in the preovulatory phase of the oestrus cycle of the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 101, 213-219.
- MONNIAUX D., CHUPIN D. et SAUMANDE J. (1983). Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology*, 19, 55-80.



- MONTGOMERY G.W., SCOTT I.C. et JOHNSTONE P.D. (1988). Seasonal changes in ovulation rate in Coopworth ewes maintained at different liveweights. *Anim. Reprod. Sci.*, 17, 197-205.
- NOEL B. (1989). Etude de l'action de la PMSG sur les mécanismes d'ovulation chez la brebis Suffolk. Mémoire, FUNDP, Namur.
- NORMAN A.W. et LITWACK G. (1987). Hormones. Academic Press London, 50-99 et 516-563.
- OUSSAID B. (1982). Etude de l'activité ovarienne et de la stimulation pendant l'anoestrus chez la brebis Ile-de-France. Thèse, 3<sup>ème</sup> cycle, Paris VI.
- PAPKOFF H. (1981). Variations in properties of equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, 15 (1), 1-11.
- PAPKOFF H. (1990). Relationship of PMSG to the pituitary gonadotropins. Hormone Research Laboratory and Reproductive Endocrinology Center, University of California, San Francisco.
- PAQUAY R. (1989). Physiologie spéciale 2: Physiologie du système endocrinien-Physiologie du système digestif. Cours FUNDP, Namur.
- PELLETIER J. et THIMONIER J. (1969). Etude de la décharge ovulante par dosage radioimmunologique de la LH plasmatique chez la brebis normale ou traitée par un progestagène. *C.R. Acad. Sci.*, 268, 573-576.
- PHILIPON P. (1988). 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. (1991). Etude de la prolactine durant les différentes phases de l'activité sexuelle chez la brebis Texel. Thèse, FUNDP, Namur.
- PIRKE K.M., DOGS M., FICHTER M.M. et TUSCHL R.J. (1988). Gonadotrophins, oestradiol and progesterone during the menstrual cycle in Bulimia Nervosa. *Clin. Endocrinol.*, 29, 265-270.

- QUIRKE J.F., MEYER H.H., LAHLOU-KASSI A., HANRAHAN J.P., BRADFORD G.E., STABENFELDT G.H. (1987). Natural and induced ovulation rate in prolific and non-prolific breeds of sheep in Ireland, Morocco and New Zealand. *J. Reprod. Fertil.*, 81, 309-316.
- REEVES J.J., ARIMURA A. et SCHALLY A.V. (1970). Serum levels of prolactin and luteinizing hormone in the ewe at various stages of the estrous cycle. *Proc. Soc. Exp. Med. Biol.*, 134, 938-942.
- REMOHI J., BALMACEDA J.P., ROJAS F.J. et ASCH R.H. (1988). The role of pre-ovulatory progesterone in the midcycle gonadotrophin surge, ovulation and subsequent luteal phase : studies with RU 486 in Rhesus Monkeys. *Hum. Reprod.*, 3 (4), 431-435.
- ROBERTSON H.A. (1977). Reproduction in the ewe and the goat. Dans : "Reproduction in domestic Animals". Ed. Cole H.H. et Cupps E.T., Academic Press, New York, p. 477-496.
- ROSENBERG M. et FOLMAN Y. (1990). Progesterone production and clearance in cyclic ewes passively immunized against progesterone. *Theriogenology*, 34 (2), 259-272.
- SAVIO J.D., KEENAN L., BOLAND M.P. et ROCHE J.F. (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 83, 663-671.
- SCARAMUZZI R.J. et RADFORD H.M. (1983). Factors regulating ovulation rate in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 69, 353-367.
- SCHAMS D., MENZER C., SCHALLENBERG E., HOFFMAN B. et HAHN R. (1978). Some studies on Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulatory in cattle. Dans "Control of Reproduction in the Cow", Eds. Sreenan J.M., Martinus Nijhoff, The Hague.
- SHERWOOD O.D. et Mc SHAN W.H. (1977). Gonadotropins. Dans "Reproduction in Domestic Animals", Eds. Cole H.H. et Cupps E.T., p. 17-43, Academic Press, New York.
- SMEATON T.C. et ROBERTSON M.A. (1971). Studies on the growth and atresia of Graafian follicles in the ovary of the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 25, 243-252.

- SUMIDA C. et PASQUALINI J.R. (1989). Antiestrogens antagonize the stimulatory effect of epidermal growth factor on the induction of progesterone receptor in fetal uterine cells in culture. *Endocrinology*, 124 (2), 591-597.
- THIBAUT C., SZOLLOSI D. et GERARD M. (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod. Nutr. Develop.*, 865-896.
- TITECA E. (1987). Etude des effets de l'immunisation active contre l'androstènedione sur l'activité ovarienne de la brebis Texel. Mémoire, FUNDP, Namur.
- TSONIS C.G., CARSON R.S. et FINDLAY J.K. (1984). The relationships between aromatase activity, follicular fluid oestradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations and diameter and atresia of individual ovine follicles. *J. Reprod. Fertil.*, 72, 153-163.
- TURNBULL K.E., BRADEN A.W.H. et MATTNER P.E. (1977). The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci.*, 30, 229-241.
- VALLERY-RADOT P., HAMBURGER J. et LHERMITTE F. (1972). La Pathologie Médicale: Glandes endocrines (3ème édition). Flammarion Médecine-Sciences, Paris, vol. 10, 32-35.
- 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., Masson, p. 21-31.
- WEBB R. (1987). Increasing ovulation rate and lambing rate in sheep by treatment with a steroid enzyme inhibitor. *J. Reprod. Fertil.*, 79, 231-240.
- WHEATON J.E. et MULLET M.A. (1982). Effect on progesterone treatment on basal and LH-RH induced plasma concentrations in anoestrus and ovariectomized sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 64, 325-328.
- WHYMAN D. et 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. Fertil.*, 60, 267-272.
- WILLIAMS R.H. (1972). Traité d'endocrinologie. Flammarion Médecine-Sciences, Paris VIème, 504-519.

WILLIAMS A.F. et LIPNER H. (1982). The contribution of gonadostatin (inhibin F) to the control of gonadotropin secretion in a stimulated oestrus cycle in steroid-treated ovariectomized rat. *Endocrinology*.

ZUCKERMAN H., REISS U., ATAD J., LAMPERT I. et BEN EZRA S. (1977). The effect of indomethacin on plasma levels of prostaglandin F<sub>2α</sub> in women in labour. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.*, 84, 339-343.