

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

La pulsatilité de la LH au cours du cycle chez la brebis texel

Martin, Carine

Award date:
1984

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.

Je tiens à remercier tout particulièrement
Monsieur le Professeur R. PAQUAY qui m'a autorisée à
réaliser ce travail.

Mes remerciements s'adressent également
au Dr. J.L. BISTER pour ses conseils et son aide au
cours de ce mémoire.

Je tiens en outre à remercier tout le per-
sonnel du laboratoire de physiologie animale pour son
aimable collaboration.

I. Introduction.

A. Cycle oestral de la brebis. Généralités.

1. Phase folliculaire.
2. Ovulation et comportement d'oestrus.
3. Phase lutéale.

B. Hormone lutéinisante (LH).

1. Terminologie et structure.
2. Emission.
3. Action.
4. Elimination.
5. Contrôle.
 - a. Contrôle hypothalamique de LH par le facteur de décharge GnRH.
 - b. Régulation de la fonction LH par rétroaction des stéroïdes gonadiques.
 - b₁. Evolution des effets généraux des oestrogènes et de la progestérone.
 - b₂. Effet des oestrogènes et de la progestérone sur l'hypothalamus et l'hypophyse.
 - c. Interventions d'autres substances.

II. Matériel et méthodes.

A. But et plan expérimental.

B. Conditions et animaux expérimentaux.

C. Le dosage radioimmunologique.

1. Principe.
2. Dosage de la LH.
 - a. Description.
 - b. Caractéristiques.
3. Dosage de la progestérone.

D. Méthodes d'interprétation des résultats.

1. Identification des pulses et autres fluctuations.
2. Amplitude et fréquence du pulse.
3. Niveau de base.
4. Temps de demi-vie.

III. Résultats expérimentaux.

- A. Dates d'oestrus.
- B. Evolution générale des concentrations de LH et de progestérone et jour 0 du cycle.
- C. Evolution de l'émission de LH en dehors du pic préovulatoire (émission tonique).
 1. Evolution de la concentration en LH.
 2. Taux de base en fonction du jour du cycle.
 3. Fréquence des pulses en fonction du jour du cycle.
 4. Amplitude des pulses en fonction du jour du cycle.
 5. Variation de fréquence en fonction de l'amplitude.
 6. Variation du taux de base en fonction de la fréquence.
 7. Variation du taux de base en fonction de l'amplitude.
 8. Variation du taux de base en fonction des concentrations en progestérone correspondant au jour du cycle où le taux de base est mesuré.
 9. Variation de la fréquence en fonction des concentrations en progestérone correspondant au jour du cycle où la fréquence est mesurée.
 10. Variation de l'amplitude en fonction des concentrations en progestérone correspondant au jour du cycle où l'amplitude est mesurée.
 11. Etude approfondie de certains pulses.
 - a. Amplitude estimée en fonction du jour du cycle.
 - b. Evolution du temps de demi-vie en fonction du jour du cycle.

IV. Discussion.

- A. Profil hormonal de la LH.
 1. Emission tonique .
 - a. Taux de base.
 - b. Pulse..
 - b₁. Fréquence.
 - b₂. Amplitude
 - c. Autres fluctuations.
 - d. Temps de demi-vie.
 2. Emission cyclique.

B. Profil hormonal de la progestérone.

C. Résumé et conclusions.

I. Introduction.

De nombreux laboratoires utilisent la brebis comme matériel expérimental : de fait, la nature docile du mouton et ses faibles exigences en font un matériel de choix aussi bien dans le domaine de la nutrition que dans celui de la reproduction.

De tous les mécanismes physiologiques, la reproduction est celui où le règne animal montre la plus grande diversité (reproduction asexuée ou sexuée, différenciation plus ou moins prononcée des sexes, variabilité du nombre de cellules germinales, ...).

La reproduction est donc un mécanisme très complexe et dépend, entre autre, de l'effet de différentes hormones et des relations entre ces hormones.

Actuellement, beaucoup de points sont encore obscurs et si l'on veut améliorer le contrôle de la reproduction ainsi que la qualité de l'ovulation, il est nécessaire de connaître avec précision le mode d'émission des hormones.

Dans ce travail, nous nous intéresserons à la sécrétion de la LH au cours du cycle oestral de la brebis.

A. Cycle oestral de la brebis : généralités.

La brebis est un animal polyoestrique saisonnier c'est à dire qu'elle se reproduit pendant une période bien précise de l'année. Cette période débute en fin d'été, lorsque la durée du jour diminue.

La brebis peut donc se trouver dans trois états sexuels différents : cyclicité, gestation, anoestrus. Dans ce travail nous nous limiterons à l'étude du cycle. Ce dernier dure 17 jours, le jour de la décharge lutéinisante est pris conventionnellement comme étant le jour 0. *del*

Le cycle ovarien de la brebis peut être schématisé comme suit : la croissance des follicules se poursuit jusqu'à maturation; il y a alors rupture des follicules et libération de l'ovule (phase folliculaire se terminant au moment de l'ovulation); les follicules rompus se transforment en corps jaune qui secrète la progestérone. Sous l'action lutéolytique de l'utérus, le corps jaune regresse et permet ainsi la maturation de nouveaux follicules (phase lutéale). L'ovulation est précédée par l'apparition du comportement d'oestrus, à savoir la recherche et l'acceptation du mâle en vue de la copulation.

Toutes ces modifications apparaissant lors du cycle sexuel sont dépendantes de l'environnement hormonal (sécrétion hypothalamo-hypophysaire, ovarienne, utérine,...), de l'intervention du système nerveux et des facteurs extérieurs.

1. Phase folliculaire

Dès la vie foetale, la population folliculaire de la brebis est estimée à plusieurs dizaines de milliers de follicules primordiaux par ovaire et à quelques centaines de follicules en croissance.

Il est difficile de tirer de la littérature une image précise de la croissance folliculaire chez la brebis.

Un certain nombre de données se recourent, d'autres semblent contradictoires.

Pour Smeaton et Robertson (1971), 4 à 6 jours seraient nécessaire au développement et à la régression des follicules. Ces auteurs notent au cours d'un même cycle oestral trois phases de croissance et d'atrésie : de gros follicules (5 mm de diamètre) se trouvent dans l'ovaire les jours 6 à 9 et 13 à 15 du cycle; ils sont voués à l'atrésie. Une dernière vague de croissance folliculaire se déroule pendant les 48 heures que dure la régression lutéale, et les gros follicules ainsi formés mûrissent jusqu'à l'ovulation.

Turnball et al (1977), ont trouvé qu'il faut neuf jours pour qu'un follicule passe de 0,5 à 4,5 mm de diamètre, Cahill et Mauleon (1979), 17 jours.

Certains auteurs n'observent que deux vagues de croissance folliculaire (Brand et de Jong, 1973; Krup et Brand, 1975) par cycle.

D'autre part, Cahill et Dufour (1979) ont montré la relation qui unit l'ampleur du pic de FSH apparaissant au jour + 2 du cycle et le nombre de follicules qui ovulent 15 jours plus tard. Cette observation bouleverse les théories de vagues de croissance successives.

Il semble en fait que le passage d'un follicule du stade primaire au stade maturité nécessite plusieurs mois (Cahill et Mauleon, 1979). Au cours des 17 jours précédant l'ovulation le follicule passe d'un diamètre de 0,5 à 4,0 mm.

Mais au cours d'un même cycle, il paraît évident que l'on retrouve à certains moments, trois fois par cycle semble-t-il, un plus grand nombre de gros follicules. Cette observation est renforcée par le fait que trois vagues d'augmentation du taux d'oestrogènes sont mesurées au cours du cycle (Terqui et al ,1973) et que la production d'oestrogènes est due principalement aux gros follicules.

2. Ovulation et comportement d'oestrus

Les oestrogènes, et spécialement l'oestradiol 17 (E_2) sont secrétés par les gros follicules possédant une cavité centrale et passent dans le sang périphérique en quantité plus importante en fin de phase folliculaire. Ils déclenchent la décharge ovulatoire de LH et de FSH qui provoque la rupture du follicule et la libération de l'ovule. L'ovule est recueilli par le pavillon de l'oviducte et entame le parcours qui lui permettra peut-être de rencontrer un spermatozoïde.

Ce processus d'ovulation nécessite un environnement hormonal particulier, caractérisé par des teneurs plasmatiques très élevées en LH et FSH, mais aussi en prolactine (PRL) et en prostaglandines (PGE et PGF) et précédé par un pic d' E_2 .

La synergie de PRL avec LH et FSH perturbe principalement le métabolisme au niveau du follicule. L'activité mitotique est stoppée (Mc Natty et Sarvers, 1975) et un enzyme protéolytique, la collagénase est produit par les cellules de la thèque externe pour attaquer la paroi du follicule (Lipner, 1973)

Les prostaglandines ont probablement un rôle important à jouer dans les mécanismes de l'ovulation, notamment par leur action sur la vascularisation folliculaire, les sécrétions d'oestrogènes, de LH, etc...

Parallèlement, la brebis montre un comportement d'oestrus qui débute entre 7 et 24 heures selon les races avant le pic de LH. Ce temps de latence entre le pic de LH et le début du comportement d'oestrus est en relation avec la prolificité : les races les plus prolifiques ont un temps de latence plus long (Land et al. 1973), et, au sein d'une même race, les individus dont le taux d'ovulation est supérieur montrent également un temps de latence plus long (Thimonier et Pelletier, 1971).

L'oestrus dure environ 48 heures, mais ce temps aussi est fonction de la race et de différences individuelles.

3. Phase lutéale

Après l'ovulation (ou même parfois peu avant), les cellules de la granulosa et de la thèque interne prolifèrent et se lutéinisent : c'est la formation du corps jaune. Ce corps jaune commence à produire de la progestérone (P_4) dont le taux reste élevé jusqu'à la phase folliculaire suivante (jour - 2 du cycle). Mais lorsque la progestérone commence à être produite, elle inhibe fortement la sécrétion de LH dont le taux plasmatique reste faible tout au long de la phase lutéale tandis que le contenu hypophysaire est élevé et même très élevé (Yoshinaga, 1973). La FSH et les oestrogènes qui présentent également un pic au moment de l'ovulation semblent nécessaires à la multiplication mitotique des cellules qui vont former le corps jaune (Mc Natty et al., 1973, Mc Natty et Thurley, 1974).

Le corps jaune se maintient jusqu'au jour 13 ou 14 du cycle suivant : à ce moment la sécrétion de P_4 chute brusquement le corps jaune régresse laissant une cicatrice sur l'ovaire (corpus albicans) : c'est la lutéolyse.

E_2 et PGF (surtout $PGF_{2\alpha}$) sont considérées comme lutéolytiques. Mais il est intéressant de noter que l'action lutéolytique provient principalement de la synergie entre ces deux hormones. En effet, la $PGF_{2\alpha}$ est incapable de provoquer la régression du corps jaune après destruction des follicules (Denamur, 1974; Hixon et al., 1974) et l'action lutéolytique de E_2 est faible si l'animal est hystérectomisé, sauf si on injecte simultanément de la $PGF_{2\alpha}$ (Chakraborty et Stormshak, 1976; Gengenbach et al., 1977).

C'est cette dernière découverte qui a fait supposer que l'utérus est responsable de la lutéolyse. En fin de phase lutéale, l'utérus produit des quantités appréciables de prostaglandines, et notamment de PGF_2 qui est l'agent lutéolytique. Sa sécrétion est stimulée par les oestrogènes des follicules en croissance. En synergie avec les oestrogènes, $PGF_{2\alpha}$ agit spécialement en dissociant les hormones stimulantes

de leurs recepteurs membranaires au niveau des cellules lutéales (Henderson et Mc Natty, 1975). $PGF_{2\alpha}$ provoque ainsi une baisse rapide de la production de progestérone et induit une dégénérescence cellulaire et la lutéolyse (Goding, 1974; Goldberg et Ramwell, 1975,...). A cette action directe de $PGF_{2\alpha}$ sur le métabolisme lutéal s'ajoute un effet de constriction vasculaire qui produit une diminution de l'irrigation sanguine du corps jaune (Nett et al ,1976).

B. Hormone lutéinisante (LH).

1. Terminologie et structure

L'hormone lutéinisante ou LH (luteinizing hormone), encore appelée lutotropine, gonadotrophine ou gonadostimuline , est synthétisée par les cellules de la pars distalis de l'adénohypophyse.

C'est une glycoprotéine qui fait 30.000 de PM chez le mouton et qui est constitué de deux sous-unités : α et β . La sous-unité α est commune à toutes les glycoprotéines, la sous-unité β étant la sous-unité spécifique (Fig.1).

Fig.1 : Formule de la sous-unité LH - β d'après Papkoff

H-Ser-Arg-Gly-Pro-Leu-Arg-Pro-Leu-Cys-Glu-¹⁰
 Pro-Ile-Asn-Ala-Thr-Leu-Ala-Ala-Glu-Lys-²⁰
 Glu-Ala-Cys-Pro-Val-Cys-Ile-Thr-Phe-Thr-³⁰
 Thr-Ser-Ile-Gly-Ala-Tyr-Cys-Cys-Pro-Ser-⁴⁰
 Met-Lys-Arg-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Pro-Leu-⁵⁰
 Ile-Pro-Met-Pro-Gln-Arg-Val-Cys-Thr-Tyr-⁶⁰
 His-Gln-Leu-Arg-Phe-Ala-Ser-Val-Arg-Leu-⁷⁰
 Pro-Gly-Pro-Cys-Pro-Val-Asp-Pro-Gly-Met-⁸⁰
 Val-Ser-Phe-Pro-Val-Ala-Leu-Ser-Cys-His-⁹⁰
 Gly-Pro-Cys-Cys-Arg-Leu-Ser-Ser-Thr-Asp-¹⁰⁰
 Cys-Gly-Pro-Gly-Arg-Thr-Glu-Pro-Leu-Ala-¹¹⁰
 Cys-Asp-His-Pro-Pro-Leu-Pro-Asp-Ile-Leu-OH¹²⁰

Notons que chez le mâle cette hormone est dénommée "hormone stimulatrice des cellules interstitielles" ou I.C.S.H.

(Interstitial cells stimulating hormone), et que son rôle est de favoriser l'émission accrue d'androgène. L'I.C.S.H. est aussi responsable de la descente des testicules.

2. Emission

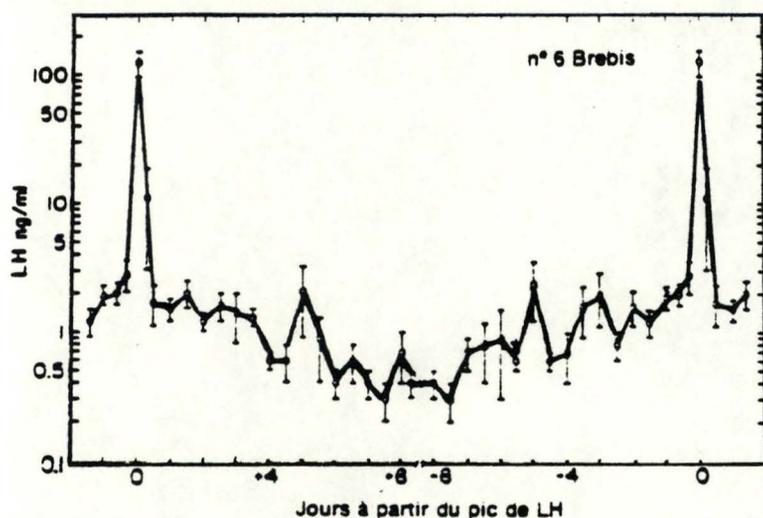


Fig.2 : Évolution de la LH au cours du cycle (Hauger et coll., 1977

Au cours du cycle, la sécrétion de LH présente deux aspects différents : l'émission tonique ou continue et l'émission cyclique, responsable de la décharge ovulatoire (fig.2).

L'émission tonique, se présente sous la forme d'une série régulière de poussées de sécrétion (pulses) non accompagnées de changement morphologique important. Ces pulses sont de courte durée et sont séparés par des périodes de sécrétion faible et constante : le taux de base. L'intensité de ces pulses peut atteindre dix fois le taux de base et la fréquence de leur décharge est de plus ou moins 2 heures.

Le niveau basal se maintient tout au long du cycle excepté pendant une douzaine d'heures lors de la décharge ovulatoire. Foster et al (1974) mesurent un taux de base inférieur à 1 ng/ml, tandis que Pelletier et al (1968) décrivent un taux de sécrétion tonique de 5 ng/ml; Bister (1980) de 1 à 4 ng/ml; Thibier (1981) de 3 à 5 ng/ml.

C'est entre ces taux de 1 et 5 ng/ml que se situent les résultats de la plupart des auteurs (Baird et al., 1976; Nett et al., 1974; Pelletier et Thimonier, 1969;...).

Ce taux de base présente d'assez fortes variations individuelles : chez un animal ce taux est de $1,9 \pm 0,5$ ng/ml et de $4,2 \pm 0,8$ ng/ml chez un autre (Bister, 1980). De plus, la dosage radioimmunologique 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.

En phase folliculaire, Baird (1978) et Mc Natty et al (1981) montrent une augmentation du niveau basal de LH. C'est en phase lutéale que ces niveaux sont les plus bas.

Tous les auteurs s'accordent pour dire que la fréquence et l'amplitude des pulses varient au cours du cycle. La fréquence semble augmenter en phase folliculaire ou au début de la phase lutéale. Selon Yuthastrakosall et coll. (1977), le nombre de pics par 24 heures est de l'ordre de 16 deux à trois jours avant ou après les chaleurs, pour 1 par 24 heures en phase lutéale. Pour Baird (1978), la fréquence des pulses est de 1 par heure en phase folliculaire et seulement de 1 par 3,33 heures en phase lutéale. L'amplitude des pulses est faible en début de phase lutéale mais est élevée à partir de la moitié de la phase lutéale.

L'émission cyclique est caractérisée par une décharge éphémère (8 à 20 heures) mais d'une intensité pouvant atteindre 100 fois le taux de base moyen. Cette décharge qui se produit en période préovulatoire s'accompagne de changements morphologiques importants telle la rupture du follicule (Brinkley, 1981).

Wheatley et Radford (1969) montrent que le pic se produit 19,9 heures avant la fin de l'oestrus et 25,7 heures avant l'ovulation. Mais, dans la plupart des cas, la décharge de LH débute entre 0 et 10 heures après le comportement d'oestrus.

La durée du pic est, selon les races et les individus, de 8 à 20 heures (Land et al., 1973; Pelletier et al., 1977). Pour Niswender et al., 1968; pour Pelletier et Thimonier, 1969, la durée de la décharge est de 10 à 20 heures. Les taux observés lors de la décharge préovulatoire varient selon les individus et selon la fréquence des prises de sang. Les valeurs données se situent le plus fréquemment entre 50 et 150 ng/ml (Niswender et al., 1968; Pelletier et al., 1968-1967). Des valeurs plus importantes ont été aussi observées : de l'ordre de 120 à 175 ng/ml (Pelletier et Thimonier, 1969 ; Bister, 1980), enregistrent des niveaux de l'ordre de 200 ng/ml.

3. Actions

Le pic de LH en oestrus a pour effet de provoquer l'ovulation vraisemblablement grâce à la libération par la cellule de la paroi ovarienne d'une collagénase amincissant cette paroi à l'endroit du développement folliculaire. Cet effet de LH sur l'ovulation est complété par une intervention des oestrogènes, de la prostaglandine $F_{2\alpha}$ et chez certaines espèces, de la FSH et de la prolactine.

Après l'ovulation, la LH aidée selon les espèces par la FSH, les oestrogènes, la $PGF_{2\alpha}$ et la prolactine, provoque le développement du corps jaune et ensuite son maintien avec l'aide de la progestérone synthétisée en quantité accrue. Lorsque le corps jaune vieillit, cette action lutéotrophique de LH paraît diminuer et est largement diminuée par l'effet lutéolytique de la $PGF_{2\alpha}$ agissant en synergie avec les oestrogènes.

4. Elimination

La LH est rapidement éliminée de la circulation par les reins, probablement par filtration glomérulaire, et excrétée dans l'urine. Certains travaux montrent que la LH a une demi-vie de 5 minutes (Ascoli, M et al., 1975).

5. Contrôle

Le contrôle de l'émission des hormones gonadotropes est un phénomène très complexe dont de nombreux aspects sont encore mal connus; il est conditionné par des interactions entre de nombreuses hormones : hypothalamique (GnRH), hypophysaires (FSH, LH, PFL), gonadiques (androgènes, oestrogènes, progestérone, inhibine), épyphysaires (métatonine et antigonadotrophines) et sûrement aussi surrénaliennes et thyroïdiennes. Les recherches sont orientées principalement dans deux directions le contrôle hypothalamique de LH par le facteur de décharge GnRH et la régulation de la fonction LH par rétroaction des stéroïdes.

a. Contrôle hypothalamique de LH par le facteur de décharge GnRH

L'hypothalamus synthétise la gonadolibérine ou gonadotropine releasing hormone (GnRH). Cette hormone est un décapeptide de formule $\text{PYR-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH}_2$. La Fig.3 représente l'émission au cours du cycle; la Fig.4 le schéma de l'hypothalamus et de l'hypophyse.

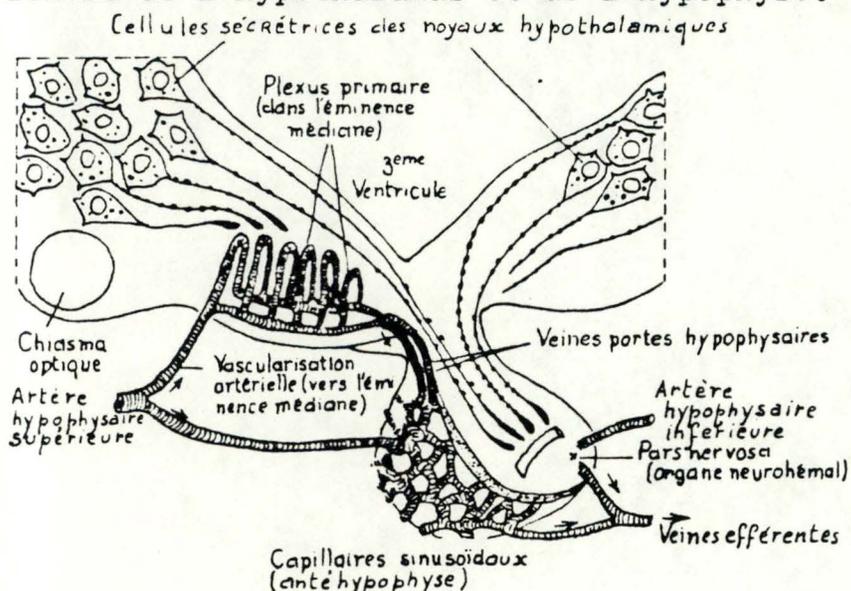


Fig. 4 : Schéma du système hypothalamo-hypophysaire

Le noyau arqué de la région ventromédiane libère cette substance de manière continue (centre tonique) par un processus dopaminergique. Les noyaux préoptique et supra-chiasmatique sont capables de synthétiser et de sécréter cette hormone par un mécanisme noradrénergique, mais uniquement chez la femelle en cycle (centre cyclique).

Ce sont les travaux de Campbell et al (1961) d'une part et ceux de Courvier et al (1961) d'autre part, qui ont été les premiers à démontrer l'existence dans un extrait hypothalamique d'une substance capable de déclencher l'ovulation chez la lapine. Nikitovitch et Winer (1962) obtiennent des résultats identiques chez le rat. Mac Cann et al (1960) confirment ces données en utilisant le test de Parlow (1958) qui permettait le dosage quantitatif de LH circulante et montrent que l'activité de ce médiateur est bloquée par l'administration d'oestrogènes. Ils concluent qu'il s'agit d'une substance spécifique qu'ils appellent LH-releasing factor (LRF) . En 1963, Guillemin et al purifient ce LRF. Par après il a été précisé que le LRF était bien spécifique de la décharge de LH. Divers tests montrent que des préparations de LH variées sont actives chez des espèces hétérologues, ce qui suggère une certaine absence de spécificité zoologique (Pelletier, 1970).

La gonadolibérine a pour action principale d'activer la synthèse et la libération de FSH et LH par l'hypophyse. Mais l'effet n'est pas identique pour les deux hormones. D'une manière générale, LH est libérée plus rapidement en petits pics peu étalés. FSH est libérée plus lentement et d'une manière plus étalée. La sécrétion tonique de LH est réglée par le noyau ventromédian tandis que l'aire préoptique détermine la production cyclique (Flament - Durand, 1966; Szentagothai et al, 1968).

Le contrôle de la libération de la gonadolibérine est assuré par feed back négatif très court (GnRH elle-même), court (FSH et LH) et long (androgènes, oestrogènes). En ce qui concerne le FB court, en 1965, Nallar et Mac Cann ont signalé une augmentation du LRF dans le sang d'un animal hypophysectomisé et en 1966, Baird et al ont montré que des implants de LH au niveau de l'éminence médiane entraînent une diminution de la LH hypophysaire.

Ces FB sont très stricts et continus avant la puberté dans les deux sexes. Ils deviennent moins marqués et restent continus chez le mâle pubère avec comme conséquence une augmentation

des hormones sexuelles. Ils continuent à être stricts chez la femelle pubère, mais lors de chaque cycle oestral, ils sont, en période d'oestrus, interrompus par une période de FB positif. La faible concentration de progestérone observée à ce moment permet aux oestrogènes d'exercer sur le centre cyclique une action stimulatrice qui se traduit par une émission importante de GnRH. La sécrétion de GnRH augmente avec l'âge, avec comme conséquence, une réduction de l'activité du système reproducteur chez le mâle, un arrêt (ménopause) chez la femelle.

b. Régulation de la fonction LH par rétroaction des stéroïdes gonadiques

b₁. Evolution et effets généraux des oestrogènes et de la progestérone

Les oestrogènes et la progestérone sont synthétisés par les cellules folliculaires. Leur émission au cours du cycle est représentée dans la figure 5.

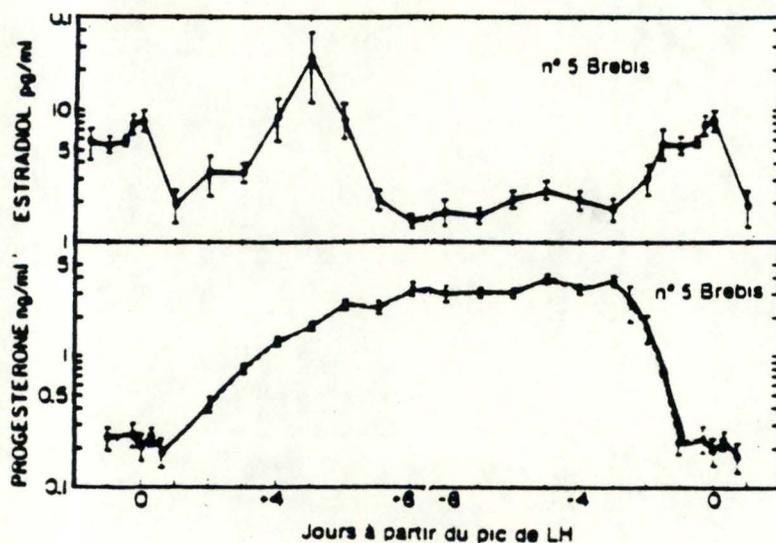


Fig.5 : Emission des oestrogènes et de la progestérone au cours du cycle (Hauger et coll., 1977).

Le cycle sexuel de la brebis comprend sur le plan de sa composante hormonale deux phases successives : la phase oestrogénique courte (concomitante de la croissance folliculaire terminale

précédant l'ovulation et caractérisée par des niveaux croissants d'oestrogènes, essentiellement l'oestradiol 17β), et la phase progestéronique beaucoup plus longue (caractérisée par une élévation progressive de la progestérone).

La sécrétion d'oestrogènes se présente sous formes d'ondes de 1 à 10 ng/ml, atteignant un maximum vers les jours 5, 10 et 15 (Hauger et al, 1977; Legan et Karsch, 1979).

Pour Terqui et al (1973), Niswender et al (1974), la première vague se situe vers le quatrième jour, la seconde vers le huitième ou onzième jour et la troisième entre le jour -3 et le pic pré-ovulatoire.

L'élévation du jour 15 se poursuit pour atteindre des valeurs de 25 ng/ml, pic préovulatoire qui précède de très près celui de LH.

L'émission de progestérone est très faible, inférieure à 0,4 ng/ml, pendant la période préovulatoire. Elle augmente progressivement dans le sang dès le jour 2 du cycle et atteint un plafond entre le neuvième et le douzième jour.

Le taux diminue brutalement à partir du quatorzième jour pour atteindre son niveau basal le jour -1 (Bister, 1981).

Cette chute de progestérone est le reflet de la lutéolyse qui est induite par la $PGF2\alpha$ sécrétée par l'utérus (Goding, 1974; Golberg et Ramwell, 1975 ; Hendersen et Mac Natty, 1975).

b₂. Effets des oestrogènes et de la progestérone

De nombreuses études ont été effectuées pour étudier le rôle des stéroïdes ovariens sur la sécrétion de LH. La technique la plus utilisée est celle de l'ovariectomie : en l'absence d'ovaire, le milieu stéroïdien du cycle oestral est reproduit soit par l'administration d'oestradiol et de progestérone contenus dans des implants sous-cutanés soit par des injections intra-veineuses ou intra-musculaires.

- rôle des oestrogènes

Dès 1934, Hohlweg montra qu'une injection d'oestrogènes induit l'ovulation chez la rate. Cet effet "Hohlweg" fut trouvé plus tard chez la brebis (Hammond, 1945).

L'injection de 50 μ g de benzoate d'oestradiol induit chez la brebis castrée dans 90 % des cas, un pic de LH de même amplitude mais de durée plus longue que celui observé en cycle.

Chez des brebis en anoestrus, l'injection d'oestradiol induit une décharge préovulatoire de LH (Goding et al, 1969; Radford et al, 1971; Beck et Reeves, 1973).

Chez la brebis cyclique en période préovulatoire, une augmentation de l'oestradiol circulant induit la décharge préovulatoire (Goding, 1969; Scaramuzzi et al, 1971; Cumming et al, 1971; Pelletier et Thimonier, 1975).

Travaillant sur des brebis Merinos ovariectomisées, G.B. Martin R.J. Scaramuzzi et J.D. Henstridge (1983) montrent que l'oestradiol est capable de réduire la fréquence des pulses de LH pendant le printemps.

Goodman et coll (1980 et 1981) ont démontré que l'oestradiol peut induire de larges réductions de l'amplitude des pulses de LH pendant la saison de reproduction.

En phase lutéale, l'oestradiol supprime partiellement la sécrétion tonique de LH et rehausse les effets de la P. Hauger et coll (1977) ont montré qu'il y a au cours du cycle une augmentation de la sécrétion de l'oestradiol lorsque le niveau tonique de LH est le plus élevé (dans les quelques jours suivant le pic de LH et ceux le précédant en phase folliculaire). Ceci explique la succession des événements liés par une relation de cause à effet ainsi que l'ont démontré Karsch et coll.: baisse de la progestérone (lutéolyse), augmentation de la production de LH et de celle d'oestradiol.

En prooestrus, les oestrogènes stimulent l'hypophyse en augmentant la réponse hypophysaire à la GnRH. Mais si on augmente les concentrations en oestrogènes dans la circulation hypophysaire, de manière à ce qu'elle soit égale ou supérieure à celle observée en prooestrus, cela ne provoque pas l'émission de LH. Il en ressort qu'un effet des oestrogènes au niveau hypophysaire n'est pas suffisant en lui-même pour rendre compte de l'induction de la décharge de LH. Il semble, en effet que les oestrogènes agissent au niveau

de l'aire préoptique : des implants d'oestrogènes dans cette région de l'hypothalamus provoquent l'émission de LH. En toute autre période du cycle, l'oestradiol exerce un effet inhibiteur. Ces actions inhibitrices s'exercent à l'intérieur de l'unité hypothalamus ventromédian-hypophyse; mais on ne sait pas très bien si la cible est l'hypothalamus et/ou l'hypophyse.

- rôle de la progestérone

Dutt et Cassida (1948) montrèrent que des injections intramusculaires de progestérone empêchent l'ovulation chez la brebis.

La progestérone, bien qu'ayant probablement un effet positif sur la décharge préovulatoire de LH, apparaît essentiellement inhibitrice dans les conditions expérimentales : aucune femelle castrée ne présente un pic de LH soit après une injection de P_4 (25 μ g), soit après une paire d'injections et dans tous les cas la progestérone empêche l'effet positif de l'oestradiol (Pelletier et Thimonier, 1975).

Chez des brebis ovariectomisées, Goodman et Karsch (1980) ont montré que la progestérone peut réduire la fréquence des pulses de LH. Martin et al. (1983) n'obtiennent pas cet effet.

Cependant il faut dire que ces deux groupes ont travaillé dans des conditions expérimentales différentes.

Des études de Baird et Scaramuzzi (1976), Hauger et al (1977), et Karsch et al (1977), ont montré que la progestérone est le principal mais pas le seul stéroïde contrôlant le cycle oestral de la brebis.

Ces deux derniers auteurs ont mis en évidence chez la brebis la variation des concentrations toniques de LH et celle de la progestérone au cours de la phase lutéale. Ainsi après ovulation, alors que le corps jaune est en formation mais ne sécrète encore que de très faibles quantités de progestérone, le niveau tonique de LH est élevé (3 ng/ml) puis décroît au fur et à mesure que la sécrétion de progestérone augmente. Inversément, à la fin de la phase lutéale,

lors de la lutéolyse, le niveau tonique de LH augmente même avant le pic préovulatoire. Ceci milite en faveur d'une rétroaction négative de la progestérone sur le niveau tonique de LH; cela fut ensuite confirmé par des expériences sur brebis ovariectomisées (Baird et Scaramuzzi, 1976; Karsch et al, 1977 et 1979). Cette rétroaction s'exerce en réalité par l'intermédiaire de la fréquence des pics de LH et explique la faible fréquence de ceux-ci en phase lutéale due aux niveaux élevés de progestérone. En revanche lorsque la concentration en progestérone est réduite, la pulsativité de la LH augmente. La chute de la progestérone permet la maturation folliculaire et l'augmentation du taux plasmatique en oestrogène, LH et PRL (Baird et al, 1981).

La progestérone paraît avoir une action essentiellement inhibitrice sur l'hypothalamus. Après la puberté, elle inhibe le centre cyclique de GnRH.

La progestérone apparaît agir sur le noyau ventromédian pour supprimer la sécrétion tonique de LH et sur l'aire préoptique pour bloquer la décharge de LH.

La progestérone a aussi un effet sur l'hypophyse et cet effet, qui est suffisant pour rendre compte d'un petit mais significatif changement dans les niveaux de LH, a lieu pendant la phase lutéale (Greeley et al, 1975).

En phase lutéale, l'hypophyse est moins sensible à la GnRH que pendant l'oestrus (Hooley et al, 1974; Reeves, Arimura et Schalby, 1971).

Les effets des oestrogènes et de la progestérone sur l'émission de LH ne sont pas dissociables : ces deux stéroïdes existent ensemble, bien qu'au cours du cycle leur concentration soit inversée.

Ainsi pour Thimonier et al (1974), il apparaît que l'intensité de l'émission de LH est mieux corrélée avec le rapport oestrogènes/progestérone qu'avec les niveaux plasmatiques des oestrogènes et de la progestérone.

Goding et al (1970) et Karsch et al (1980) ont montré que l'oestradiol et la progestérone sont nécessaires et suffisants tous les deux pour rendre compte de la sécrétion tonique de LH et de l'expression de l'oestrus pendant le cycle oestral de la brebis.

La réponse de LH à l'oestradiol ou à la progestérone seule ne reproduit jamais ce qu'on observe pendant un cycle normal.

c. Intervention des autres substances

c₁. La dopamine et la noradrénaline

Certaines études suggèrent qu'il existe un constituant dopaminergique dans la série des "événements neuraux" qui précède la décharge de LH lors du pro-oestrus et que ce stimulus dopaminergique précède la décharge de LH d'environ 4 à 5 heures. D'autres données suggèrent que chez la brebis une fonction normale des neurones noradrénergiques est nécessaire au maintien de l'émission de LH induite par les oestrogènes (Clemens et al, 1977). En comparaison avec cela, les neurones dopaminergiques apparaissent faciliter l'émission basale de LH et l'émission de LH induite par les oestrogènes.

Pour certains auteurs, l'émission de LHRH hypothalamique est stimulée quand on injecte de la L-dopa, cette dernière étant transformée en noradrénaline.

c₂. Les prostaglandines (PG)

Dans l'hypothalamus, les PG stimulent la libération de GnRH.

Dans l'hypophyse, elles favorisent l'action de GnRH et cet effet, conjugué à l'émission accrue de GnRH, est évidemment très favorable au pic de LH.

Dans l'ovaire, les PG sont synthétisées, principalement en fin de maturation folliculaire, à l'intervention des oestrogènes. En phase lutéale, la synthèse est moindre, mais en fin de cycle, de la PGF_{2α} en provenance de l'utérus gagne l'ovaire. Les PG stimulent la synthèse des oestrogènes, principalement pendant la période préovulatoire.

La PGE₂ stimule la maturation folliculaire et la PGF_{2α} intervient sûrement dans les mécanismes d'ovulation chez de nombreuses espèces, mais le mécanisme reste encore obscur. Il est possible qu'elle provoque des contractions de l'ovaire qui se rompraient à l'endroit aminci par les enzymes protéolytiques libérés à l'intervention de LH.

Mais il est aussi possible qu'elle intervienne directement dans la synthèse de plasmine, substance à activité lytique sur les fibres collagènes de la paroi de l'ovaire. Chez certaines espèces, les PG paraissent intervenir dans les mécanismes de lutéinisation et de formation du corps jaune. Les PGE_1 et E_2 ont peut-être aussi un effet favorable sur la sécrétion de progestérone par le corps jaune. Par contre, la $PGF_{2\alpha}$ a un rôle lutéolytique évident.

c₃. La prolactine (PRL)

La PRL est une hormone hypophysaire et sa sécrétion dépend principalement des conditions de luminosité. L'évolution des taux plasmatiques est, chez la brebis, parallèle à celle de la longueur du jour : 200 à 300 ng/ml en juillet, moins de 20 ng en décembre. Legan et al (1979) la tiennent pour responsable du passage des cycles à l'anoestrus et vice-versa. Pendant le cycle, le taux de prolactine plasmatique augmente significativement après le déclenchement de l'oestrus accompagné de la hausse gonadotropines. Il chute 24 heures après le pic préovulatoire, en même temps que la LH. Pendant le cycle sexuel, elle joue peut-être un rôle dans l'ovulation chez certaines espèces. Chez la brebis, la rate, la souris, le hamster, elle est lutéotrophique. A forte dose par contre, chez la femme, la brebis et la rate, elle inhibe le pic de LH et a un effet anovulatoire.

c₄. Les substances épiphysaires

Les substances épiphysaires ont un puissant effet modérateur sur la reproduction. Elles retardent la puberté et donc le développement des gonades. Chez la femelle, elles bloquent l'émission de LH et par là, l'ovulation.

Ces substances diminuent l'activité du SNC, ce qui se traduit par une induction du sommeil et par une réduction de l'activité de l'arc hypothalamo-hypophysaire. Ces substances paraissent agir essentiellement en inhibant dans l'hypothalamus la libération des libérines et des statines. La diminution de l'émission de FSH et LH, entre autres, a pour origine une inhibition de la libération et sûrement aussi de l'action hypophysaire de la GnRH.

II. Matériel et méthodes.

A. But et plan expérimental.

Le but de notre travail est de décrire le profil de la LH au cours du cycle chez la brebis Texel. Pour cela, nous avons travaillé sur six brebis qui étaient en cycle.

Pendant une période correspondant à un cycle, soit du 11 au 28 octobre 1983, nous avons réalisé une prise de sang par jour afin de déterminer le profil général de la LH et de la progestérone en cycle. Ces deux profils vont nous permettre de situer le jour du cycle. L'introduction d'un bélier vasectomisé, détecteur du comportement d'oestrus, nous confirme ce jour.

Nous avons étudié aussi l'évolution des concentrations hormonales de manière plus précise en réalisant des prises de sang plus nombreuses (tous les quarts d'heure pendant dix heures) à différents moments du cycle, en vue de développer trois aspects de manière précise:

1. - le taux de base;
2. - la fréquence des pulses;
3. - l'amplitude des pulses.

Nous analyserons aussi les relations existant entre ces trois points. Nous essayerons de voir s'il existe une relation entre ces points et la variation de la concentration en progestérone au cours du cycle.

B. Conditions et animaux expérimentaux.

Six brebis de race Texel pour lesquelles divers renseignements sont donnés dans les tableaux 1 et 2 sont utilisées.

Après mise bas en mars-avril 1983, les brebis allaitent jusqu'au 26 mai. Ensuite, elles restent en prairie, donc sous une photopériode naturelle, où elles peuvent récupérer.

Le 13 septembre, un bélier vasectomisé est introduit dans le lot en vue de détecter les animaux en oestrus.

Entre le 11 et le 18 octobre (jours 1 à 18 sur les figures de 6 à 11), une prise de sang est effectuée chaque jour vers 12 heures sur chaque brebis, les animaux étant pour cela rentrés en bergerie.

Les 17, 19, 24 et 26 octobre, les brebis sont rentrées en bergerie et de 8 heures 30 à 18 heures 30, des prises de sang sont effectuées tous les quarts d'heure (prises de sang de 1 à 41).

La quantité de sang recueillie par prise est d'environ 6 à 7 cc. Le sang est recueilli dans des tubes contenant de l'héparine afin d'empêcher la coagulation. Ces tubes sont immédiatement centrifugés pendant 15 minutes à 2000 g. Le plasma est ensuite récupéré à l'aide d'une micropipette et placé dans de petits tubes de cristal de polystyrène qui sont numérotés, datés et conservés à moins 22 degrés jusqu'au moment du dosage.

Tableau 1 : Date de naissance - Poids vif - N° tatouage.

Brebis N°	Date de naissance	Poids vif en août 83.	N° tatouage
18	27-02-78	65,0	8N856
86	14-02-79	65,5	9N040
91	29-02-79	61,0	9N531
II5	01-04-80	64,5	ONA26
211	13-03-82	55,0	
239	16-04-82	41,0	

FIG. 6

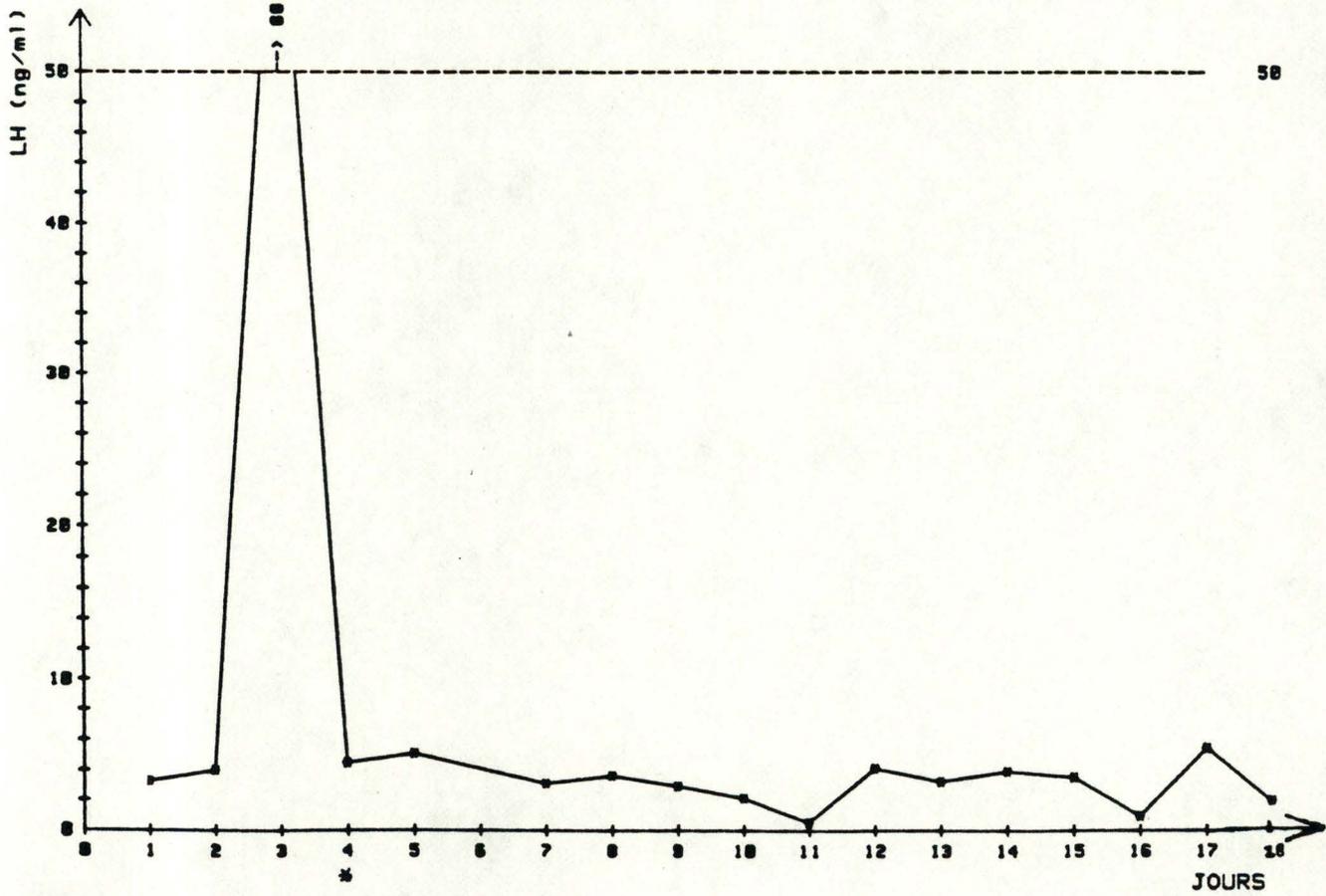
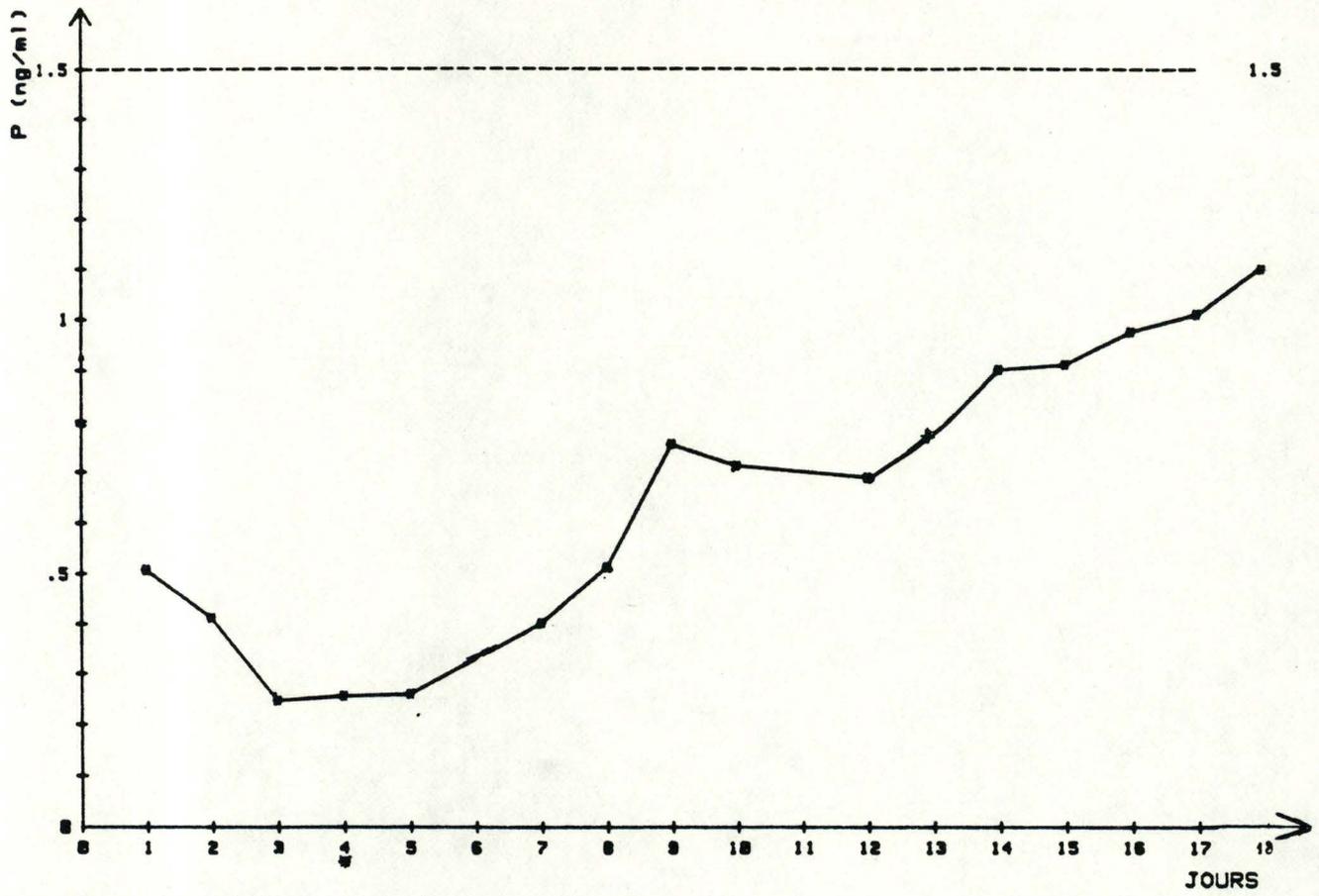
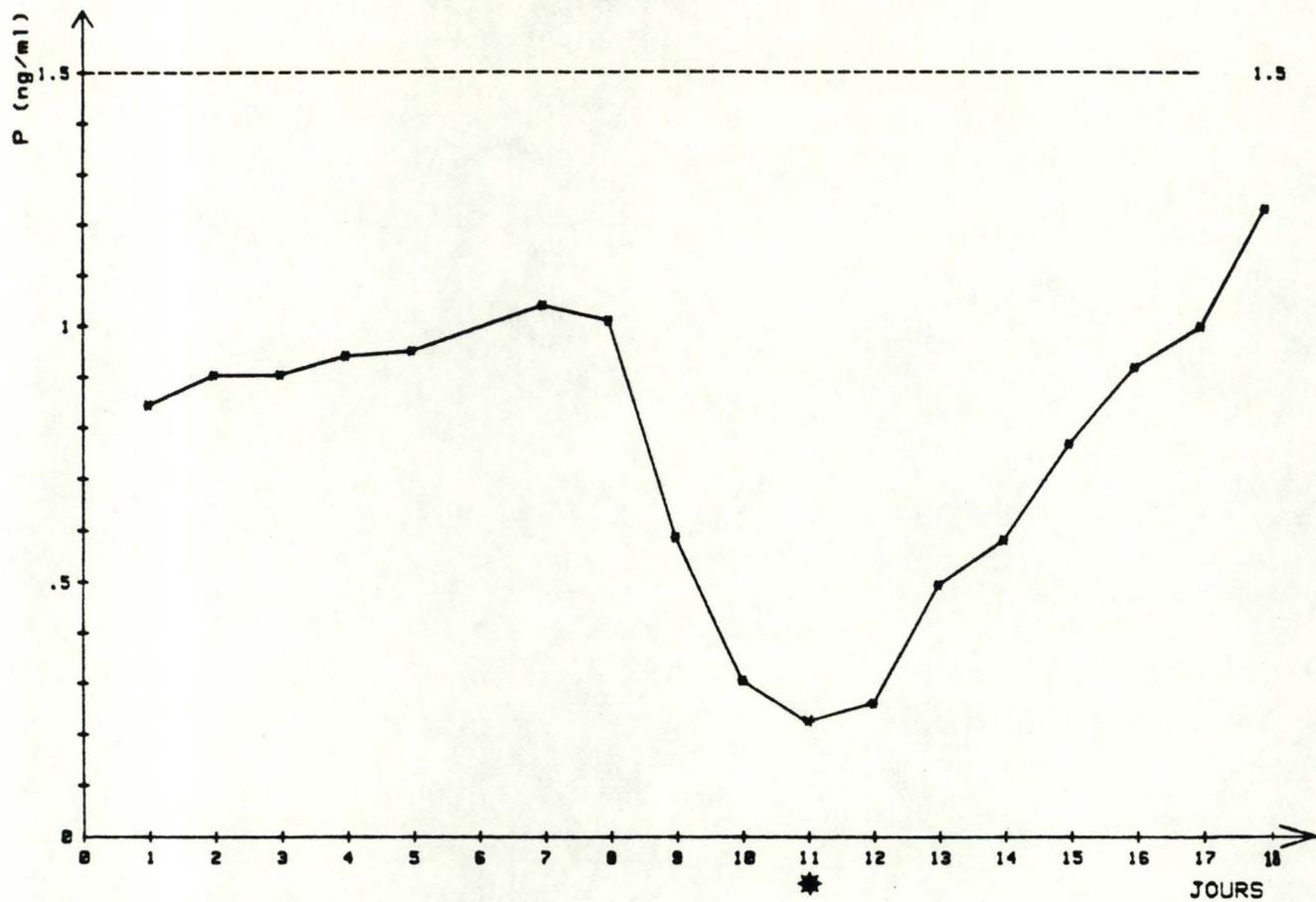
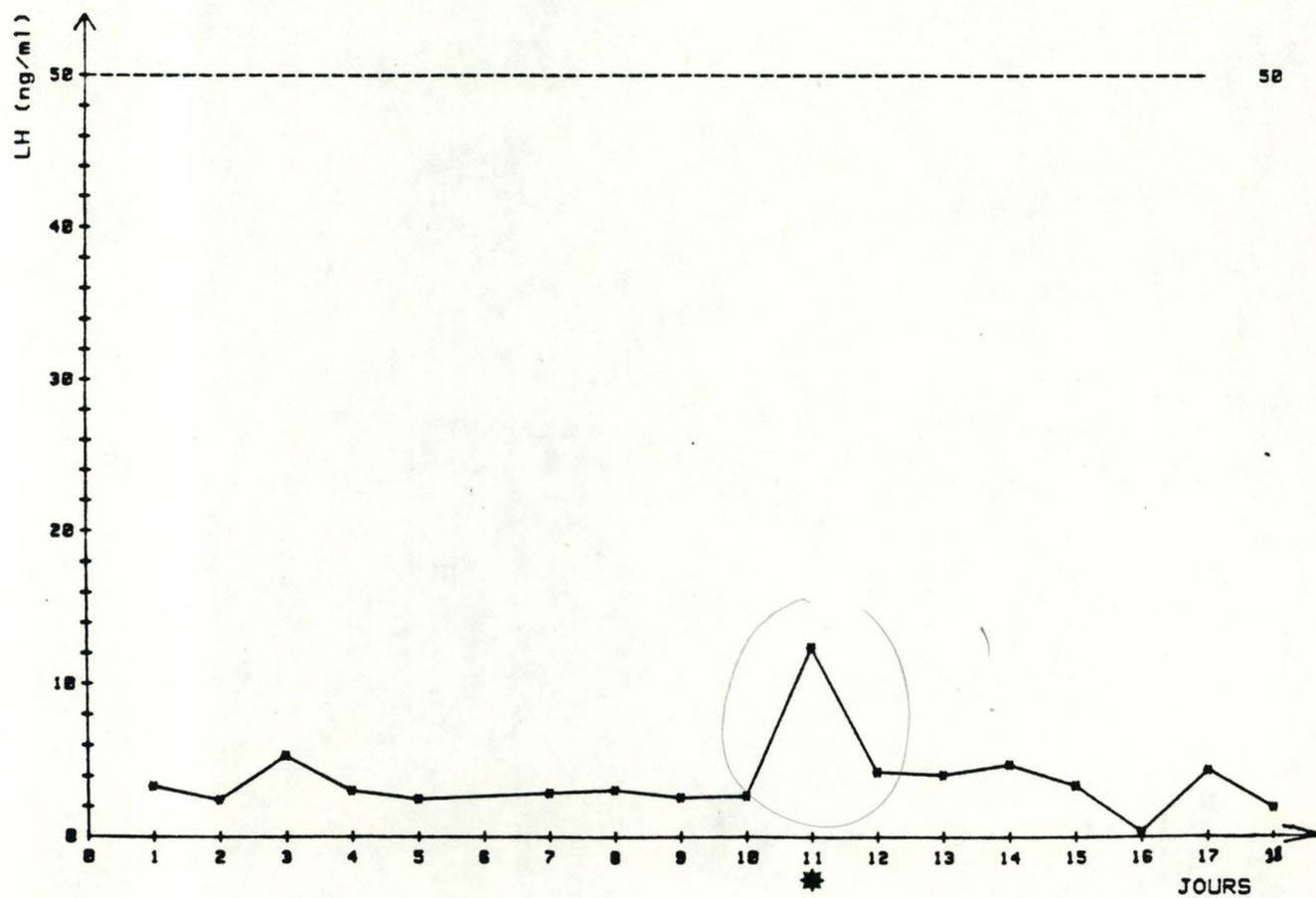


FIG. 7

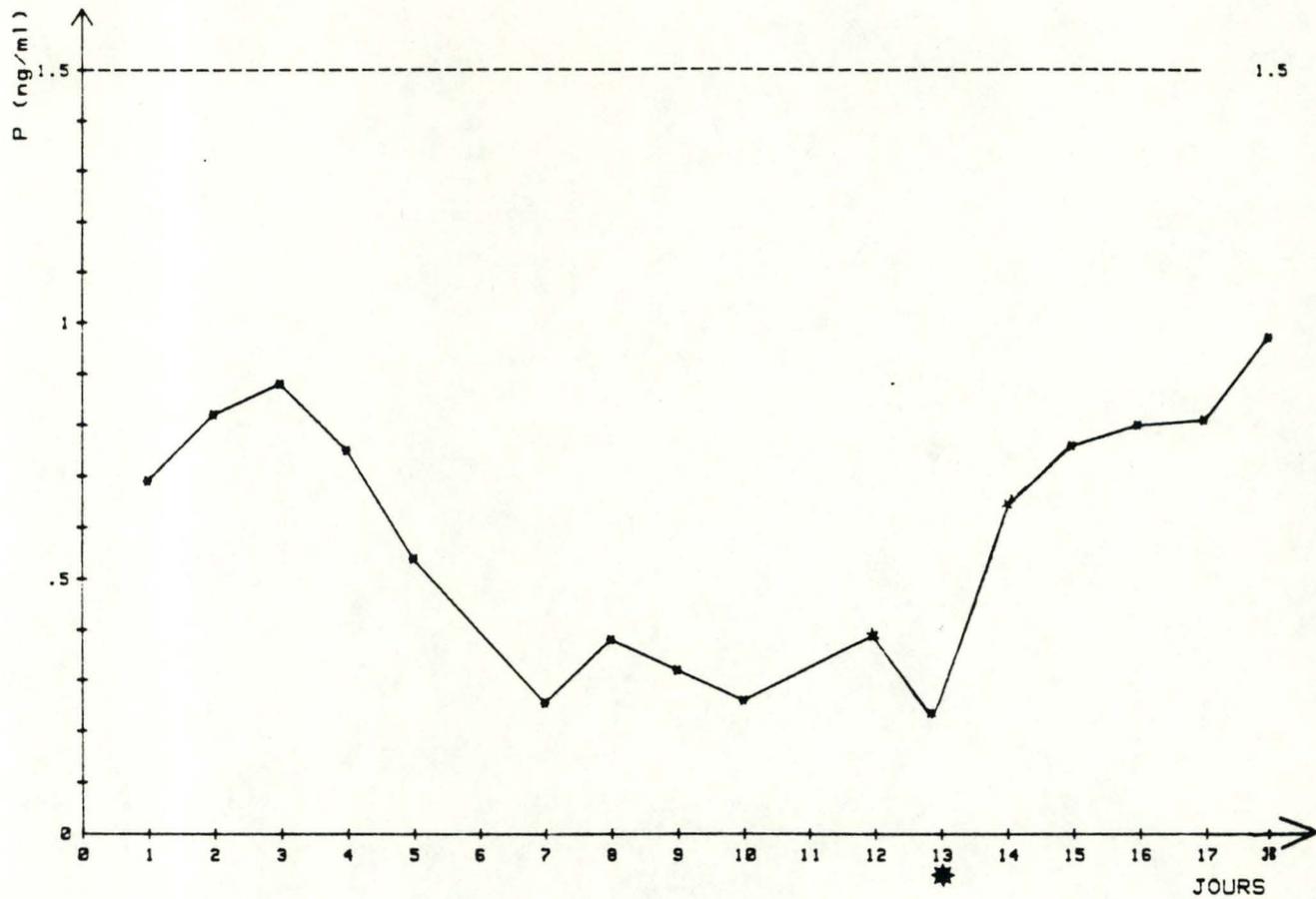


PROGESTERONE B.86

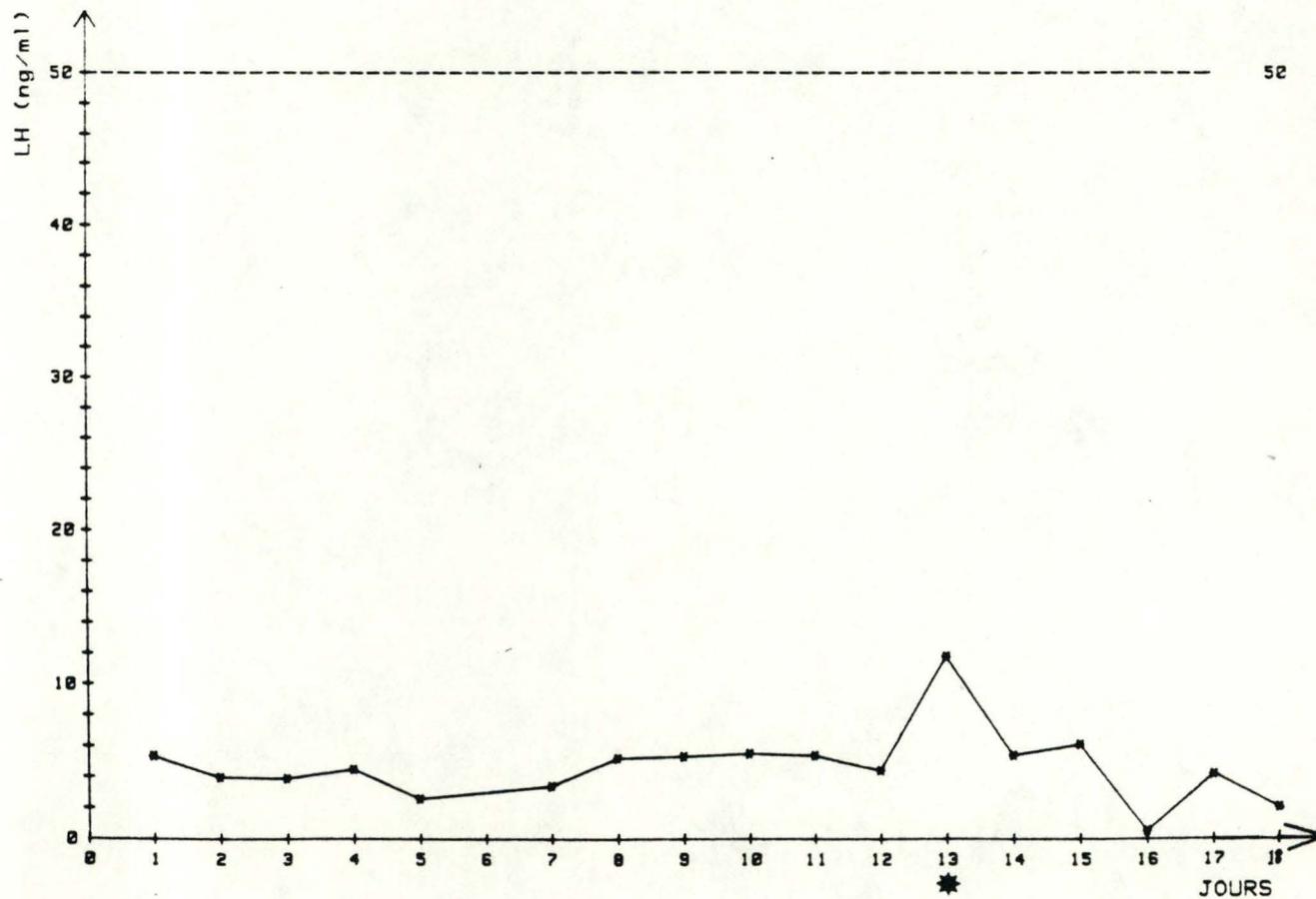


LH B.86

FIG. 8

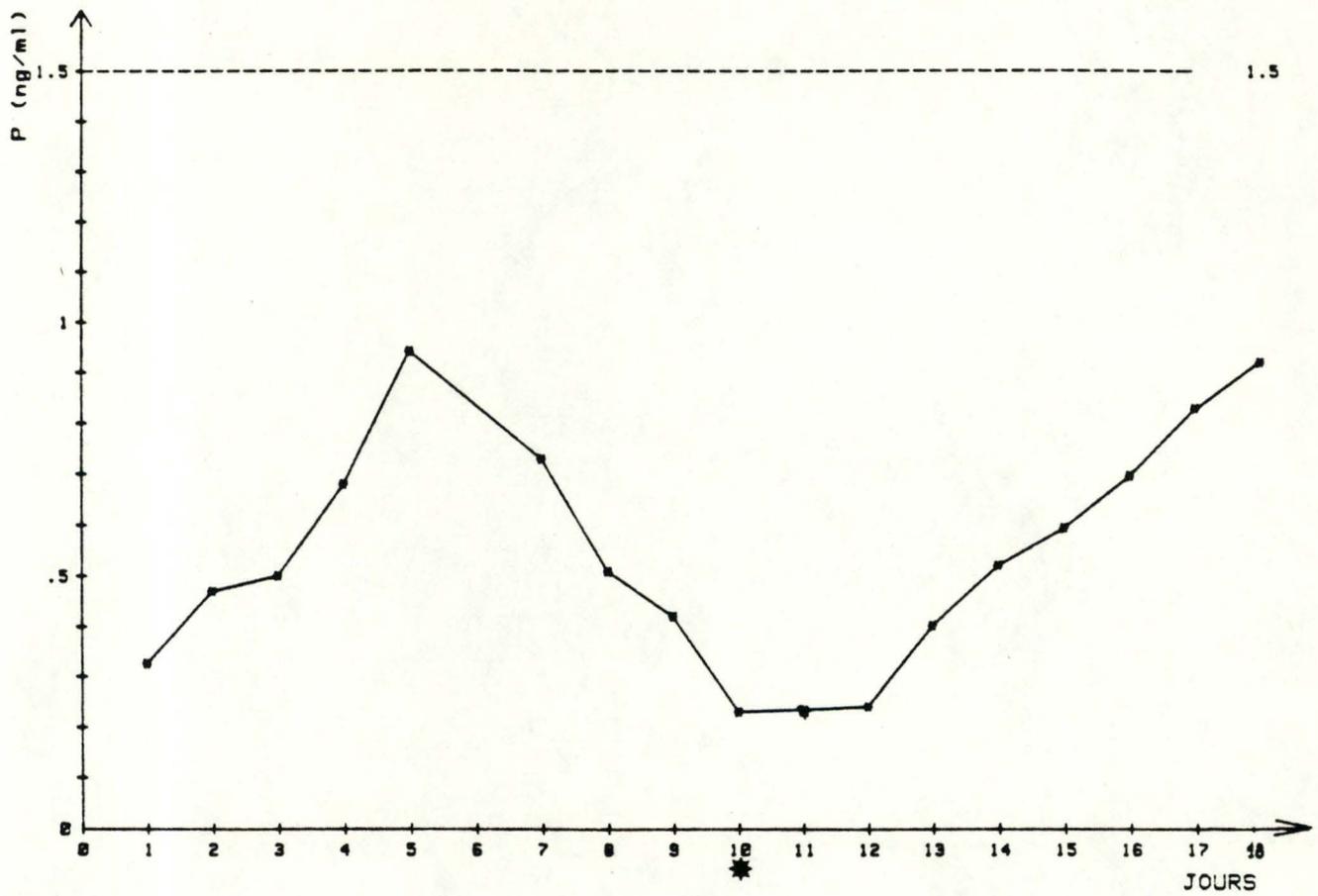


PROGESTERONE B.91

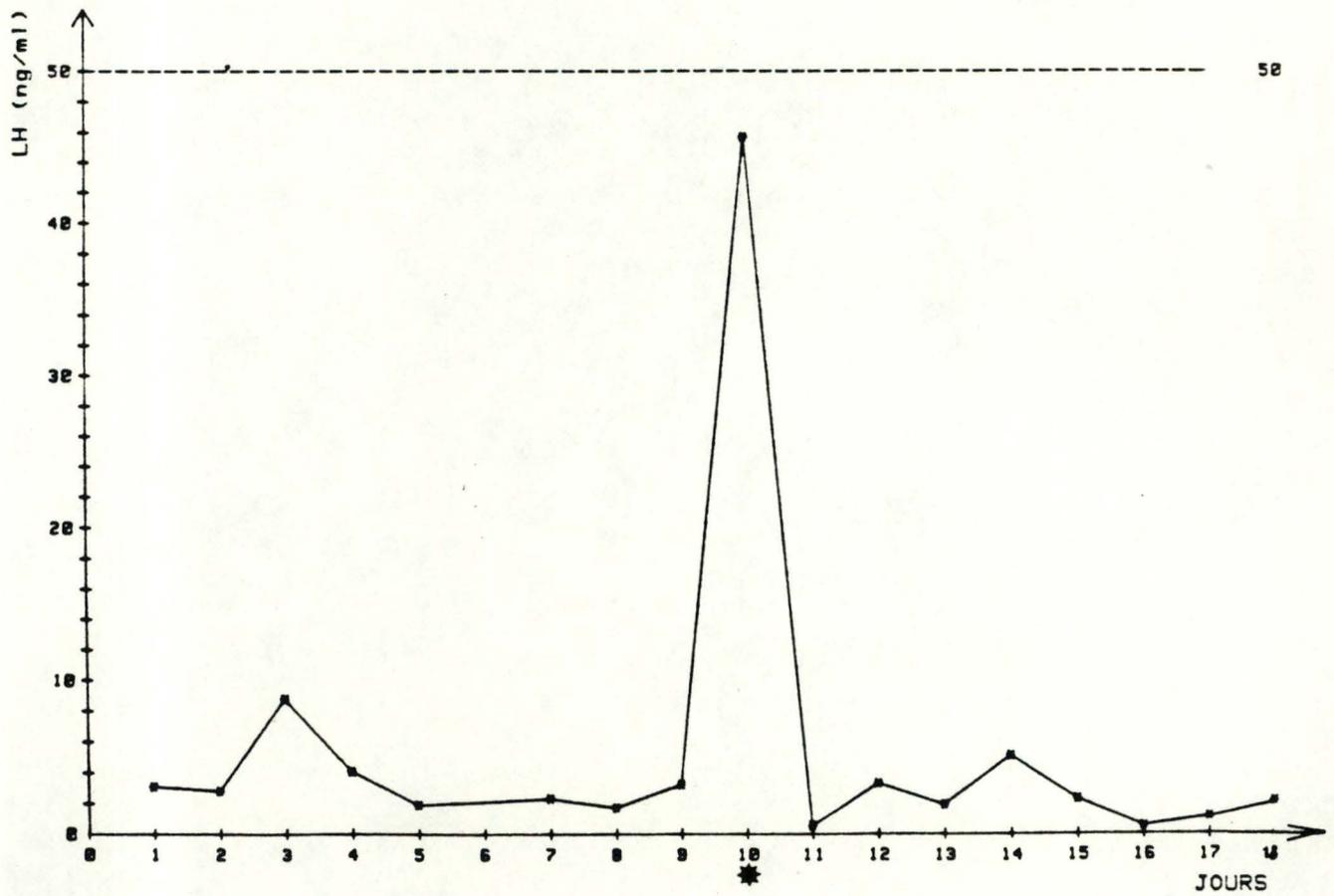


LH B.91

FIG. 9

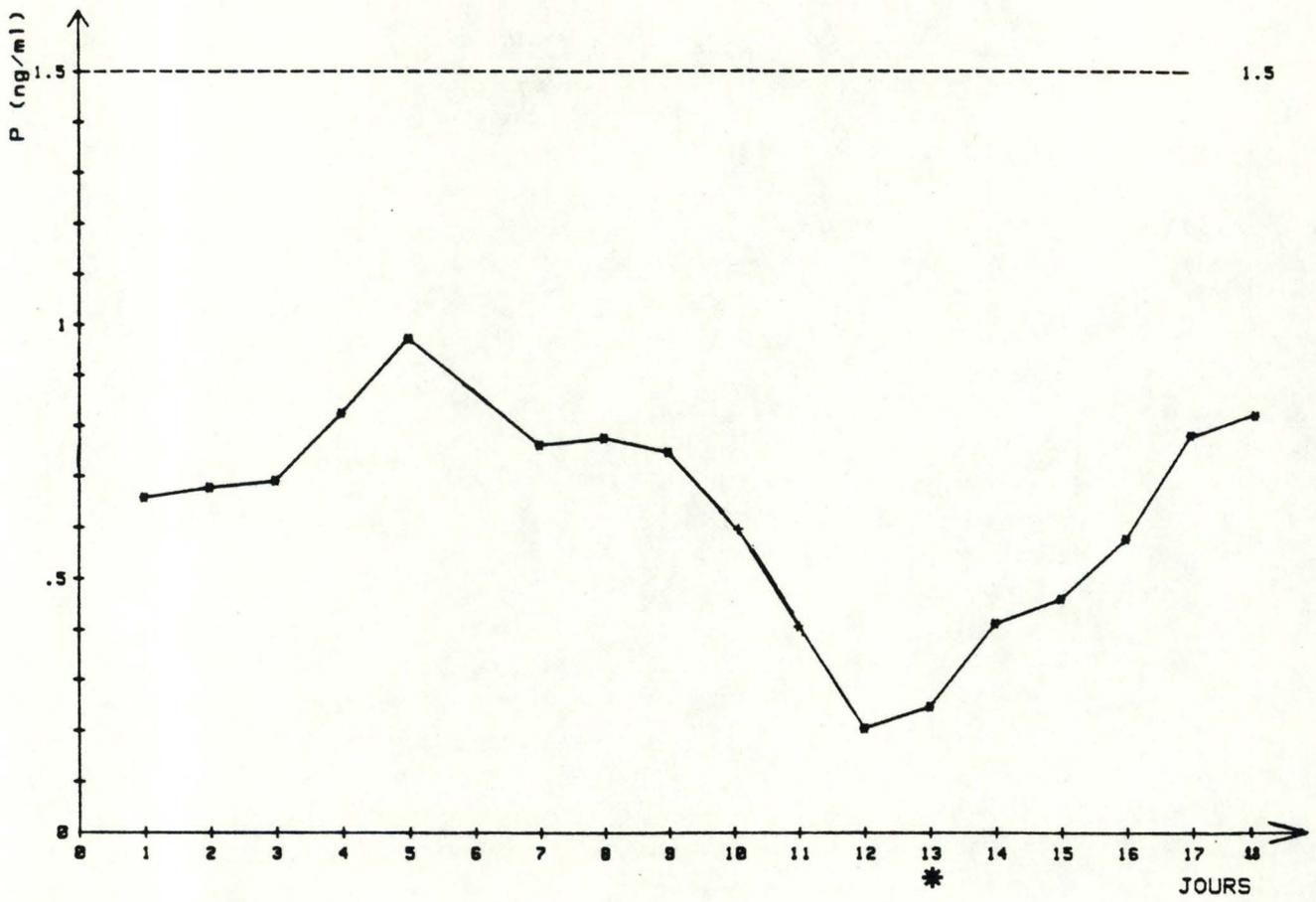


PROGESTERONE B.115

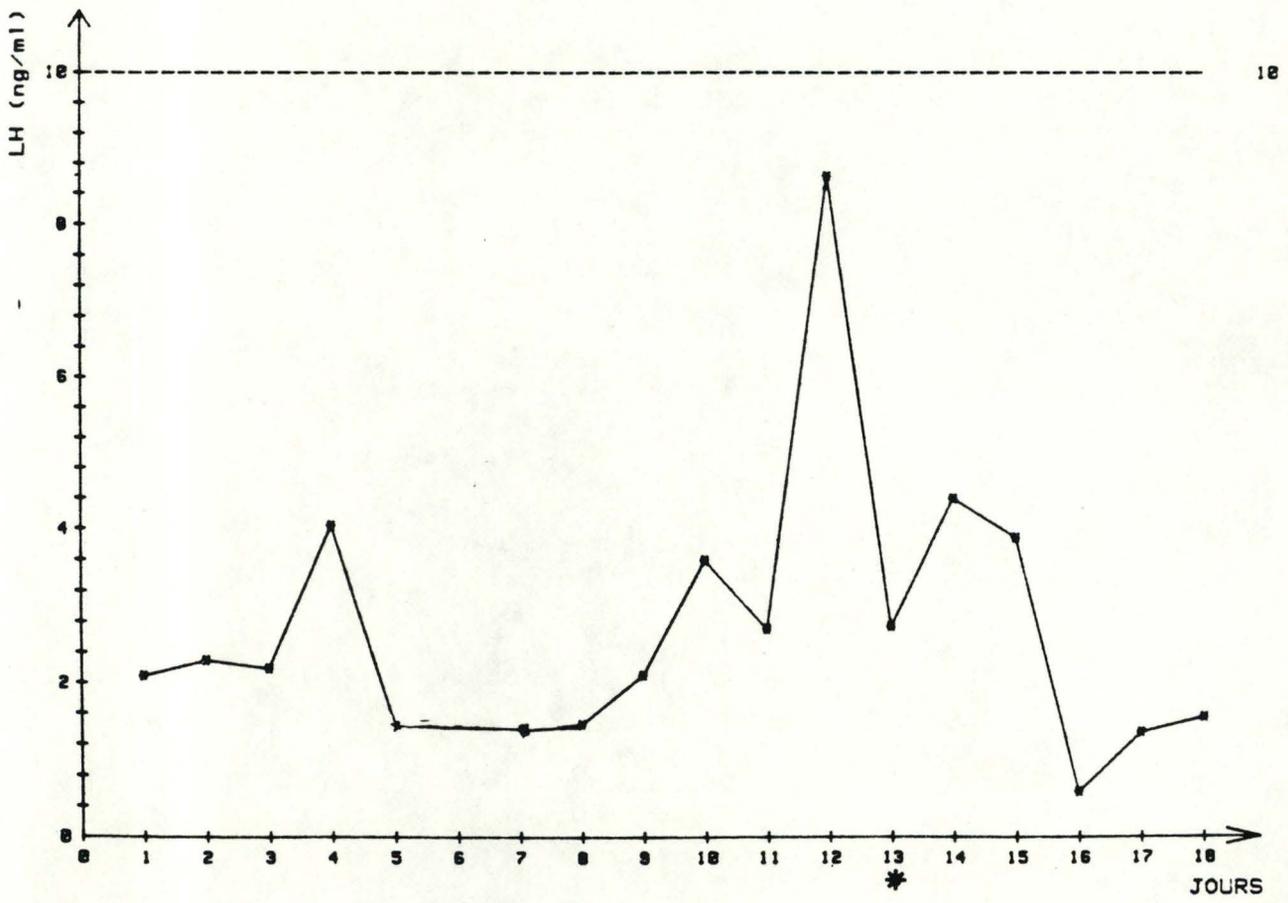


LH B.115

FIG. 10

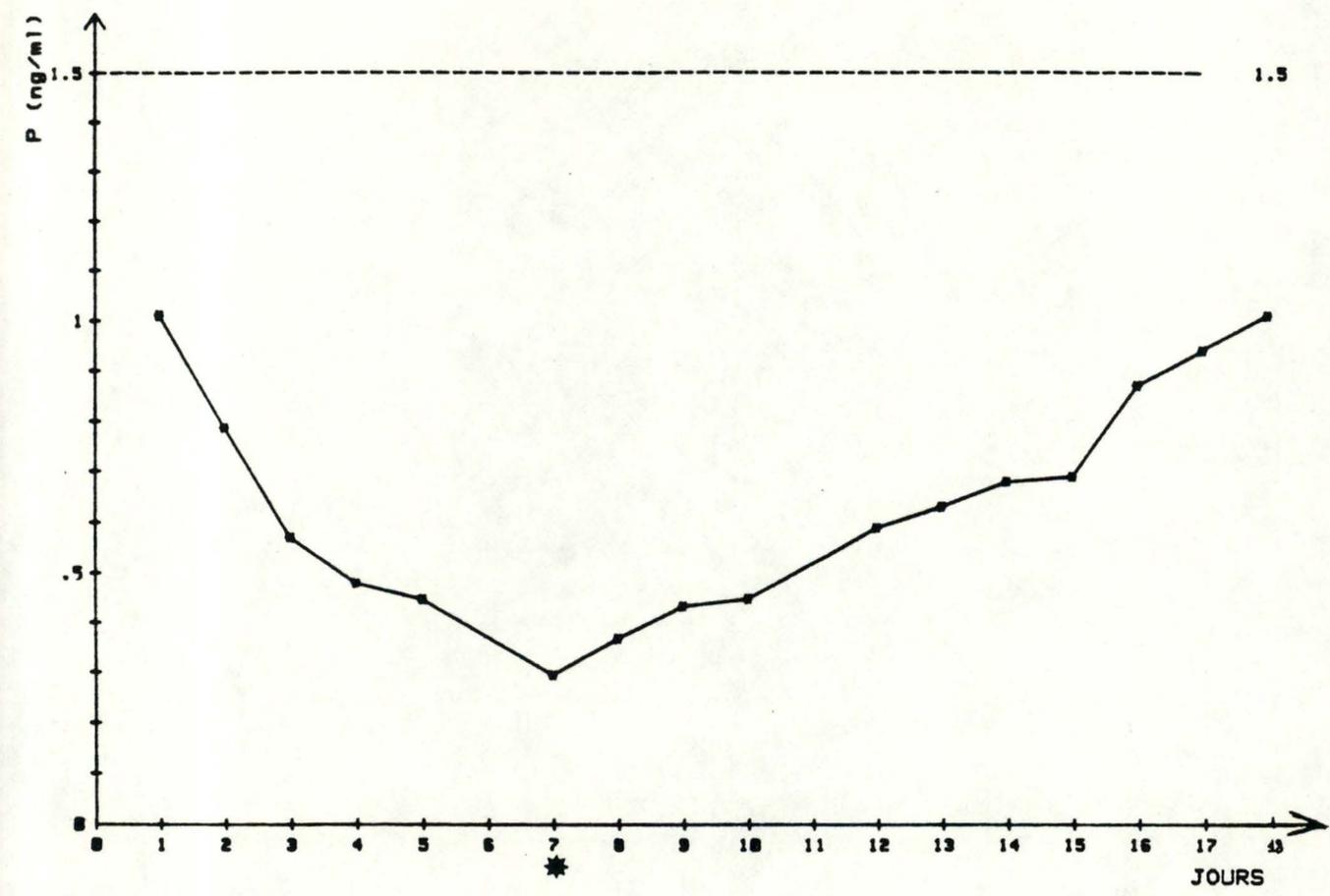


PROGESTERONE B.211



LH B.211

FIG. 11



PROGESTERONE B.239



LH B.239

Tableau 2 : Date du dernier agnelage - Nombre de jeunes

Brebis N°	Date du dernier agnelage	Nombre de jeunes
18	19-11-82	1 mort-né
86	29-03-83	2
91	21-03-83	1
115	14-04-83	1 mort-né
211		
239	04-04-83	1

C. Le dosage radioimmunologique.

1. Principe

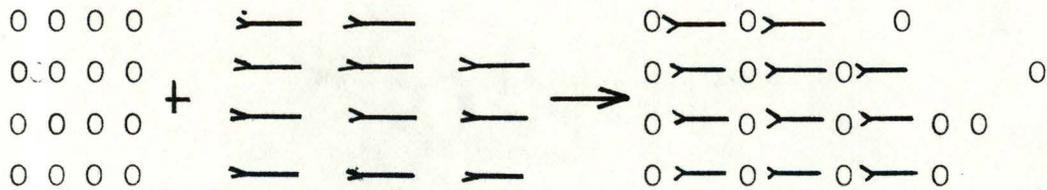
Le dosage radioimmunologique est basé sur la compétition entre une quantité déterminée d'hormone "marquée" par la fixation d'un ou plusieurs atomes radioactifs (I^{131} , I^{125} , H^3 ...) et la quantité inconnue et variable d'hormones se trouvant dans l'échantillon à analyser vis à vis d'un antisérum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

La quantité d'hormone marquée (H^*) liée aux anticorps sera d'autant plus faible que la quantité d'hormone "froide" (H^0) de l'échantillon sera élevée et inversement.

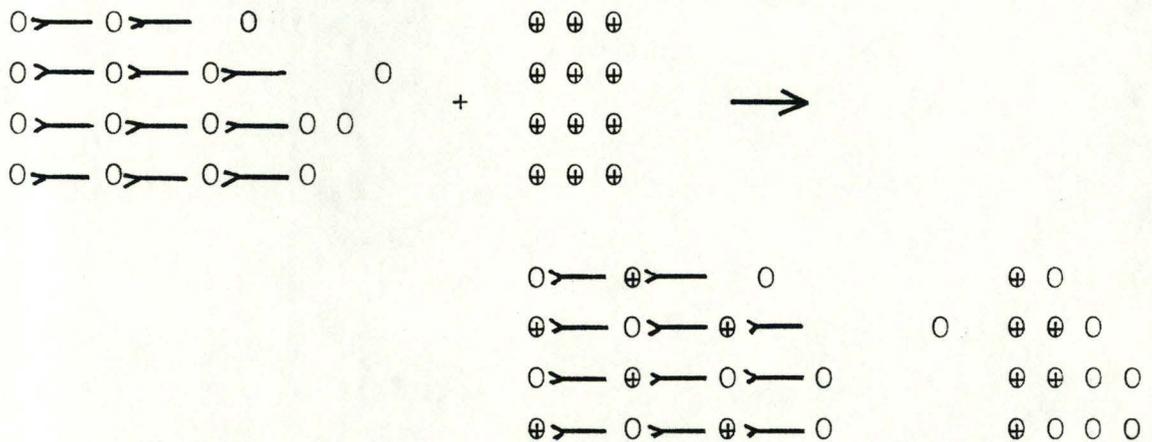
En séparant H^* liée à l'antisérum de H^* libre on peut, par l'analyse de la radioactivité de l'une de ces fractions, calculer la quantité d' H^0 . Une courbe standard effectuée dans les mêmes conditions avec des quantités connues d' H^0 sert de référence.

Le principe de la technique peut être schématisé de la façon suivante (O = H°, ⊕ = H*, — = AS) :

a. Fixation de l'H° sur AS



b. Compétition entre l'H* et l'H°



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

2. Dosage de la LH.

Les gonadotropines peuvent être dosées par R.I.A. Baron et al (1967) sont les premiers à avoir décrit le dosage de R.I.A. de la LH ovine; il s'agit d'un dosage homologue où la compétition vis à vis de l'antisérum se fait entre LH° et LH* marquée à l'I¹³¹, toutes deux extraites d'hypophyses de mouton. Par la suite, se basant sur une parenté antigénique due à une similitude de forme chimique existant entre les hormones gonadotropes du rat, du mouton, du porc et du bovin, Migdley et al (1968) et Niswender et al (1969) proposent une technique hétérologue du dosage de la LH.

a. Description

Le schéma général pour la réalisation d'un dosage hétérologue est décrit par la figure 12a.

Le système R.I.A. hétérologue que nous utilisons pour le dosage de la LH plasmatique est identique à celui qui est appliqué aux hormones bovines par l'équipe de Derivaux et Ectors. La LH° des échantillons est mise en compétition avec de la LH* de rat. Ectors et al. (1974).

La L.H. utilisée comme standard est l'ovine: "N.I.H.- L.H.S₁₉" dont l'activité biologique est de 1,01 x N.I.H.-L.H.S₁ unités/ng.

La L.H. de rat est la "N.I.A.M.D.D.-rat-L.H.-I₄" qui possède une activité biologique de 1 N.I.H.-L.H.S₁.

L'antisérum utilisé est un antibovin LH (commercialisé par l'union chimique). Il est produit par le lapin.

La séparation de la phase liée et de la phase libre est réalisée par la méthode du double anticorps en phase solide que préconisent Den Hollander et Schurso (1971). Ce système "D.A.S.P. (Double Antibody Solid Phase) consiste en la précipitation du complexe hormone-anticorps par la liaison sur immunoabsorbant, cellulose-anti γ globuline.

L'immunoabsorbant est préparé par la fixation d'anti globulines de lapin produites par un mouton sur de la cellulose microcristalline selon la technique de Wide et al (1961,1969) reprise par Dérivaux et al (1974). Le comptage des anti-globulines à la cellulose nécessite l'activité de celle-ci par addition de bromure de cyanogène à pH = 11.

Le traceur hormonal est obtenu par marquage à l'I¹²⁵ des gonadotropines de rat. La méthode utilisée est celle de Hunter et Greenwood (1962) et Greenwood et al (1963). Cette technique d'oxydation par la chloramine T a été modifiée par Ectors et al (1974) suivant les recommandations du N.I.H. L'hormone marquée est ensuite purifiée par chromatographie sur colonne de Sephadex G.50 médium. Le chromatogramme de la radioactivité élevée présente deux pics.

SCHEMA DE TRAVAIL

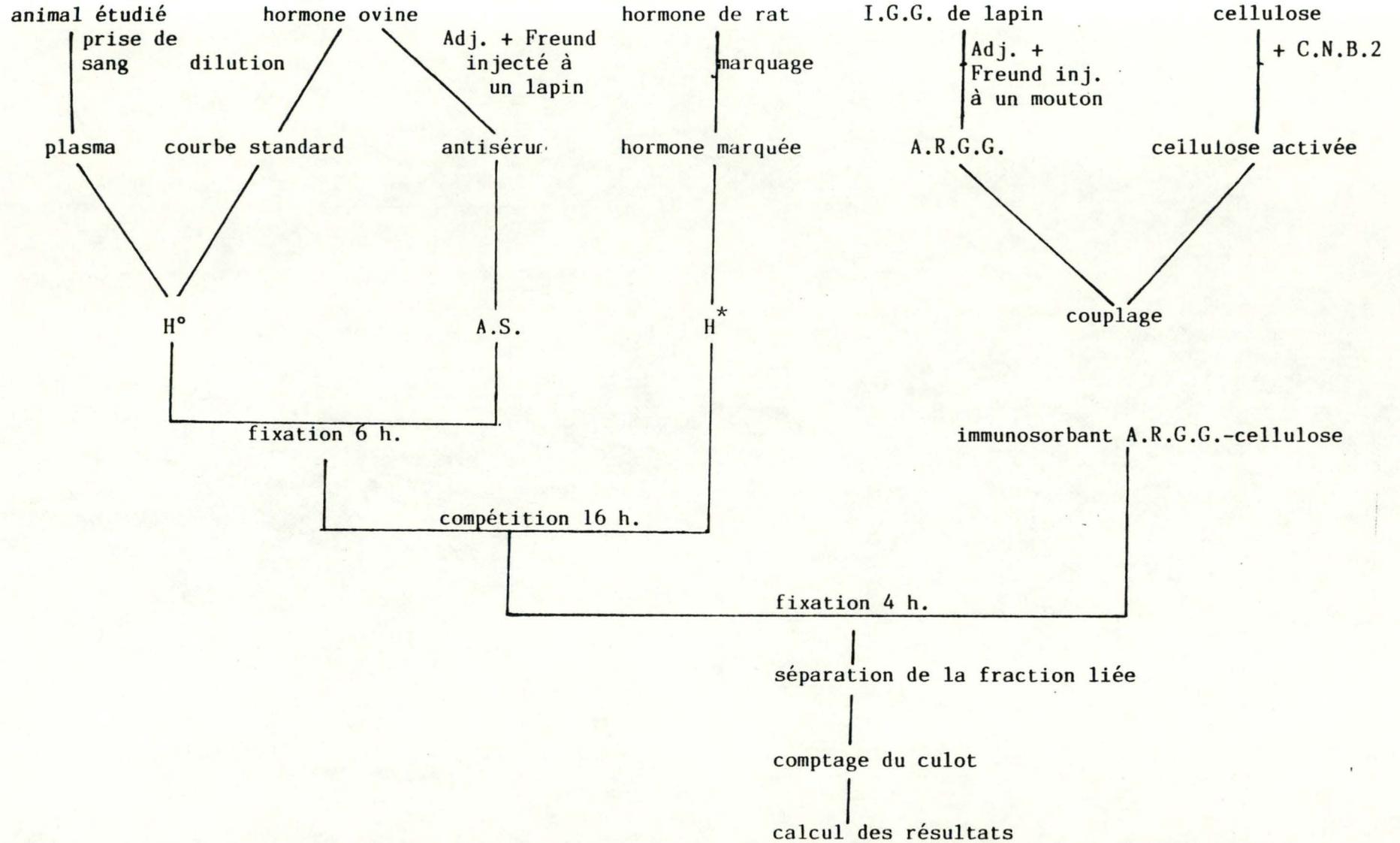


fig.12a: Résumé général des étapes nécessaires à la préparation et à la réalisation du dosage radio immunologique des gonadotropines.

Le premier pic correspond à la fraction protéinique marquée et le second aux résidus aminés à l'iode 125.

Les manipulations s'opèrent de la façon résumée dans le tableau 3. Dans un tube de cristal de polystyrène d'une contenance de 3 ml on dépose premièrement cent microlitres d'échantillon; ensuite on ajoute cent microlitres d'anti-sérum. Une incubation de 6 heures permet une bonne fixation de H° sur AS. Après cela, on ajoute cent microlitres d'hormones marquées. Il se produit donc une compétition H°-H* qui se poursuit jusqu'à équilibre pendant les seize heures que dure la seconde incubation. On additionne ensuite cinq cents microlitres d'immunoabsorbant et on laisse incuber pendant quatre heures. Cependant cette dernière incubation nécessite une agitation à va-et-vient pour maintenir l'immunoabsorbant en suspension.

Le mélange est centrifugé dix minutes à 2000 g, puis le surnageant est éliminé au moyen d'une trompe à vide. Le culot est lavé par deux millilitres de tampon phosphate de wide albumine (pH = 7,5) et centrifugé à nouveau. Après aspiration du surnageant, le culot est passé au compteur de radiation γ .

Tableau 3 : Schéma des manipulations nécessaires au dosage

Ordre	Substance déposée dans le tube	Quantité	Temps d'incubation
1	échantillon	100 μ l	
2	antisérum	100 μ l	6 heures
3	hormone marquée I ¹²⁵	100 μ l	16 heures
4	immunoabsorbant A.R.G.G.celluose	500 μ l	4 heures
5	centrifugation, clavage, isolement de la fraction liée		

L'échantillon (tableau 4) est formé soit d'une solution hormonale de concentrations connues destinée à l'établissement de la courbe standard, soit d'un plasma de référence (quality control) fabriqué par le mélange de différents plasmas et destiné à comparer les valeurs obtenues d'un dosage à l'autre, soit du plasma à analyser.

De plus, chaque dosage est accompagné d'une estimation de l'activité résiduelle (B.G. = Back Ground). Cette analyse est réalisée comme une analyse d'échantillon à la différence que l'échantillon et l'AS sont remplacés par du tampon.

Nous ajoutons aussi au comptage deux tubes ne contenant que 100 μ l d'H* de façon à mesurer extemporanément l'activité totale (T.C.) ajoutée lors de l'analyse de chaque échantillon (tableau 4).

La mesure de la radioactivité est effectuée par un analyseur à passeur d'échantillon L.K.B. - Wallac 1280 Ultrogamma II.

Le comptage des échantillons est programmé d'après les rayonnements qu'ils émettent dans les fenêtres d'énergie 24 et 33 du spectre.

Le spectre d'émission γ de l'iode 125 est donné par la figure 12 b.

Nous obtenons ainsi un rendement assez élevé (50 %) tout en éliminant au maximum les émissions parasites (bruit de fond de 7 ± 2 cpm.).

Le temps du comptage est fixé à deux minutes, ce qui permet d'obtenir une précision de la mesure de la radioactivité de l'ordre de 1 % au moins. Les résultats sont enregistrés sur une imprimante Télétype modèle : 3320/3WI Friction Feed.

La courbe standard est approximée à une droite par la méthode log-logit, soit la conversion des cpm en logit de cpm

$$\text{logit} = \ln \frac{(B - B_g)(B_o - B_g)}{1 - (B - B_g)(B_o - B_g)} \quad \text{et de la}$$

concentration en hormone par le log. (conc.en hormones).

Tableau 4 : Liste des tubes dont l'activité est mesurée au compteur γ et réactifs que nécessite l'analyse R.I.A. de la LH.

But de l'analyse	Dénomination	Nombre d'exemplaires	Composition(ml)				Tampon
			LH°	AS	LH*	ARGG cellulose	
Mesure de l'activité totale	TG	2	-	-	0,1	-	-
Mesure de l'activité résiduelle	BG	3	-	-	0,1	0,5	0,2
Etablissement de la courbe standard	C ng/100 l	3	de solution de conc. connue	0,10,10,1	0,1	0,5	-
	0,2						
	0,4						
	0,6						
	0,8						
	1,0						
	1,2						
	1,4						
	1,6						
	2,0						
	3,0						
	4,0						
	5,0						
10,0							
20,0							
Comparaison interdosage	Plasma de réf.	3	0,10,10,1	0,5	-	-	
Analyse des teneurs inconnues	Plasma N°1 à 250	2	de plasma à conc. inconnue	0,10,10,1	0,5	-	

START

011 0000 00020 60529 S=12X
11 .0003
12 .0001
13 .0001
14 .0001
15 .0001
16 .0004
17 .0007
18 .0018
19 .0029X
20 .0067.X
21 .0033..X
22 .0210.....X
23 .0239.....X
24 .0450.....X
25 .0495.....X
26 .0714.....X
27 .0753.....X
28 .0740.....X
29 .0868.....X
30 .0576.....X
31 .0624.....X
32 .0221.....X
33 .0335.....X
34 .0132....X
35 .0181.....X
36 .0051.X
37 .0053.X
38 .0025X
39 .0032X
40 .0053.X
41 .0047X
42 .0257.....X
43 .0193.....X
44 .0605.....X
45 .0544.....X
46 .0769.....X
47 .0790.....X
48 .0493.....X
49 .0596.....X
50 .0166.....X
51 .0256.....X
52 .0037X
53 .0064.X
54 .0004
55 .0010
56 .0002
57 .0001
58 .0001
59 .0001

Fig 12b.

Spectre des émissions γ de l'I¹²⁵ mesuré par le compteur LKB

Ultragamma 2

b. Caractéristiques

La qualité des dosages radioimmunologiques dépend de leurs caractéristiques de spécificité, de sensibilité, de précision, de reproductibilité et d'exactitude, caractéristiques que les calculs de l'ordinateur nous permettent de mesurer.

La spécificité ou capacité de détecter la seule hormone que l'on veut doser, dépend principalement de la qualité de l'antisérum.

Le déplacement de la LH* par la T.S.H. ou la F.S.H. est inférieur à 0,5% de ce qu'il est par la B.L.H.

La sensibilité est la plus faible quantité d'hormone que l'on puisse mesurer. Notre méthode de calcul qui établit les limites de confiance à $P < 0,25$ nous montre que des doses de 0,1 ng de LH/100 μ l sont significativement différentes des doses de 0 ng/ μ l. Ces valeurs varient avec la fraîcheur et la précision des pipetages, spécialement celui de l'AS.

La précision peut être estimée par la dimension de l'intervalle de confiance par rapport à la dose estimée. Dans la partie utile de la courbe standard, l'intervalle de confiance s'étend de chaque côté à 20 - 30% du taux calculé (pour $P < 0,25$).

La reproductibilité est la mesure de dispersion des résultats obtenus en répétant plusieurs fois le dosage d'un même échantillon.

Dans un même essai, la variation du nombre de cpm pour un même plasma analysé est de 2 à 3%, ce qui donne une variation de l'ordre de 10% dans l'estimation des taux hormonaux.

L'exactitude est la qualité d'un dosage dont les résultats correspondent effectivement au taux réel d'hormones présentes dans l'échantillon. Cette caractéristique dépend donc de l'absence d'interaction entre les composantes plasmatiques lors du dosage.

3. Dosage de la progestérone

L'analyse des teneurs plasmatiques en progestérone est réalisée par un dosage radioimmunologique schématisé dans le tableau 5.

Les standards utilisés ont été fabriqués après pesée précise de progestérone cristalline (Merck 24614).

L'antisérum provient du laboratoire d'hormonologie de Marloie. Ses caractéristiques sont reprises dans le tableau 6.

Tableau 5 : R.I.A. Progestérone H³

-
- | | |
|------------|---|
| Extraction | <ol style="list-style-type: none"> 1. Extraction de 0,3 ml progestérone (dans tube en verre) par 3 ml d'hexane, secoué pendant 10 min au vortex. 2. Centrifugation pendant 5 min à - 10° C à 2000 g. 3. Prélèvement de deux fois 1 ml (dans tube en verre) 4. Evaporation à sec dans étuve sous vide à 40° C (1 h.) nécessite tube en verre. |
| Dosage | <ol style="list-style-type: none"> 1. Addition - de 200 μl de solution de tampon phosphate de wide albumine à pH = 7,5
- de 100 μl de P[*]
- de 100 μl d'AS 2. Incubation 1/2 heure à 37° C et une nuit à 3° C. 3. Addition de 500 μl de charcoale à 31° C. 4. Agitation - incubation pendant 10 min à 3° C. 5. Centrifugation 10 min à 0° C. 6. Comptage pendant 5 min à l'analyseur de 400 l de surnageant dans 4 ml de Luma - gel (liquide scintillant) contenu dans des mini - fioles. |
-

Tableau 6 : Caractéristiques de l'antisérum

Spécificité	Stéroïdes	% de cross. réaction.
	Progestérone	100 %
	21 hydroxy progestérone	3,16 %
	17 _a hydroxy progestérone	1,90 %
	Pregnenolone	1,6 %
	11 _a hydroxy progestérone	1 %
	17 _a hydroxy progestérone	0,08 %
	Dehydroépiandrostérone	0,08 %
	Testostérone	0,08 %
	Cortisone	0,05 %
	Dexamethasone	0,05 %
	Prednisolone	0,05 %
	Cortisol	0,05 %
	17 Oestradiol	0,05 %
	Cholestérol	0,05 %
	Corticostérone	0,05 %
Titre final		1/7000.000

Le traceur consiste en de la progestérone tritiée
(1,2,6,7 H³ progestérone) d'activité spécifique =
80 ci/mmoles; fournie par International plc.

La technique nécessite une extraction préalable de la progestérone plasmatique par de l'hexane.

La fraction liée est testée pour sa radioactivité par scintillation liquide dans un compteur BECKMAN à passeur d'échantillon.

D. Méthodes d'interprétation des résultats.

1. Identification du pulse et autres fluctuations.

L'identification du pulse varie selon les différents auteurs. Pelletier et al (1980) observent que le pulse

de LH est une valeur de LH qui est au moins supérieure à trois fois le taux de base. Un pulse est une valeur de LH qui est trois fois plus grande que la concentration précédant et suivant le pulse (Strickler et al, 1977). Pour Platt et al (1983), le pulse doit avoir une concentration supérieure de 50 % au point précédent. Toutes valeurs supérieures à deux fois le coefficient de variation de dosage (Andrews et Ojéda, 1981), à trois fois le coefficient de variation du dosage (Ireland et Roche, 1983), à quatre fois le coefficient de variation du dosage (Wright et al, 1983), doivent être considérées comme un pulse.

Il nous paraît surprenant que certains auteurs emploient le coefficient de variation dans leurs critères de détermination des pulses, comme s'il s'agissait d'une valeur de concentration hormonale, alors que le coefficient de variation est un nombre pur souvent exprimé en %, indépendant des unités de mesure et donnant une mesure relative de la dispersion (Feytmans, 1980).

La plupart des auteurs sont cependant d'accord sur deux points:

1. - le pulse est caractérisé par une montée brusque et par une décroissance exponentielle qui est étalée sur plus ou moins deux heures;
2. - le pulse a une concentration d'au moins 1 ng/ml.

Pour ce travail, nous décidons que chaque valeur supérieure à la moyenne des concentrations, d'amplitude supérieure à 1 ng et qui présente une augmentation brusque et une décroissance exponentielle est un pulse.

L'échantillonnage réalisé toutes les 15 minutes est généralement trouvé comme adéquat pour déterminer les pulses de LH et spécialement si le nombre de pulses observés est faible. La fréquence des pulses est probablement légèrement sous-estimée lorsque le nombre des pulses est très élevé: cela est dû à la brièveté des pulses et à la grande incidence des pulses de petite amplitude (Martin et al, 1983).

*ni par
niveau
précédent*

*définir
pulse
10*

En plus des pulses, nous observons des petites variations d'amplitude (inférieures à 1 ng/ml), surtout lorsque la fréquence des pulses est faible.

2. Amplitude et fréquence du pulse.

L'amplitude d'un pulse est la différence entre la concentration de LH au moment du pulse et le taux de base. Elle traduit la quantité de LH qui est secrétée lors d'un pulse.

L'amplitude est assez variable, cette variabilité étant partiellement due aux deux erreurs d'échantillonnage suivantes:

1. - sous-estimation de la concentration du pulse due à des changements rapides dans les concentrations de LH au début du pulse;
2. - sur-estimation des niveaux de base juste avant le pulse, et cela spécialement si les pulses sont fréquents, car la valeur de LH la plus basse se trouve entre les échantillons.

Une estimation sur ordinateur de l'amplitude maximum des pulses nous permet de remédier quelque peu à ce problème.

Les valeurs de LH plasmatique sont ajustées à une exponentielle du type $y(t) = k + a \times e^{b(t-h)}$.

a = l'amplitude maximum estimée;

k = le taux de base estimé;

h = le moment de la décharge maximum.

Cette estimation n'est malheureusement pas possible pour tous les pulses car un nombre minimum de dix points par pulse est nécessaire.

3. Niveau de base.

Le niveau de base de la LH est la période de sécrétion faible et constante séparant les pulses et qui est estimée par la concentration moyenne des dix valeurs de LH les plus basses (Martin et al, 1983).

4. Temps de demi-vie

Le temps de demi-vie d'une hormone est le temps nécessaire pour que sa concentration dans le sang diminue de moitié.

Lorsque nous avons ajusté les valeurs de LH plasmatique sur ordinateur à une exponentielle du type $y(t)$ afin d'estimer l'amplitude maximum, nous avons pu calculer le temps de demi-vie ($t_{\frac{1}{2}} = \ln 2/b$).

5. Datation du cycle.

Le cycle est classiquement daté de 0 à 8 et de -8 à +1, le jour 0 étant le jour de la décharge de LH, le jour -1 celui précédant cette décharge.



III. Résultats expérimentaux.

A. Dates d'oestrus.

Le tableau 7 nous donne les premières dates d'oestrus et les dates d'oestrus lors de l'échantillonnage.

Tableau 7: Premières dates d'oestrus - Dates d'oestrus lors de l'échantillonnage.

Brebis N°	Premières dates d'oestrus	Dates d'oestrus lors de l'échantillonnage.
18	08-10-83	14-10-83
86	04-10-83	21-10-83
91	01-10-83	23-10-83
115	04-10-83	20-10-83
211	06-10-83	23-10-83
239	30-09-83	17-10-83

L'étude de ce tableau nous montre deux choses:

1. - dès le début du mois d'octobre, les six brebis étaient en cycle;
2. - lors des prélèvements sanguins, les six brebis étaient toutes en période d'oestrus.

B. Evolution générale des concentrations de LH et de progesterone et jour 0 du cycle.

Les figures de 6 à 11 nous donnent l'évolution générale des concentrations de LH et de Progesterone, la figure 13, l'évolution des concentrations moyennes de ces hormones.

Sur ces figures, les points de 1 à 18, donnés en abscisse, représentent les dates du 11 au 28 octobre, les petits signes *, le jour de l'oestrus.

A partir de ces figures, nous pouvons déterminer les dates de décharge de LH et les dates du taux minimum de progesterone (tableau 8).

*non
Jean-Luc
Collyer*

Fig. 13.

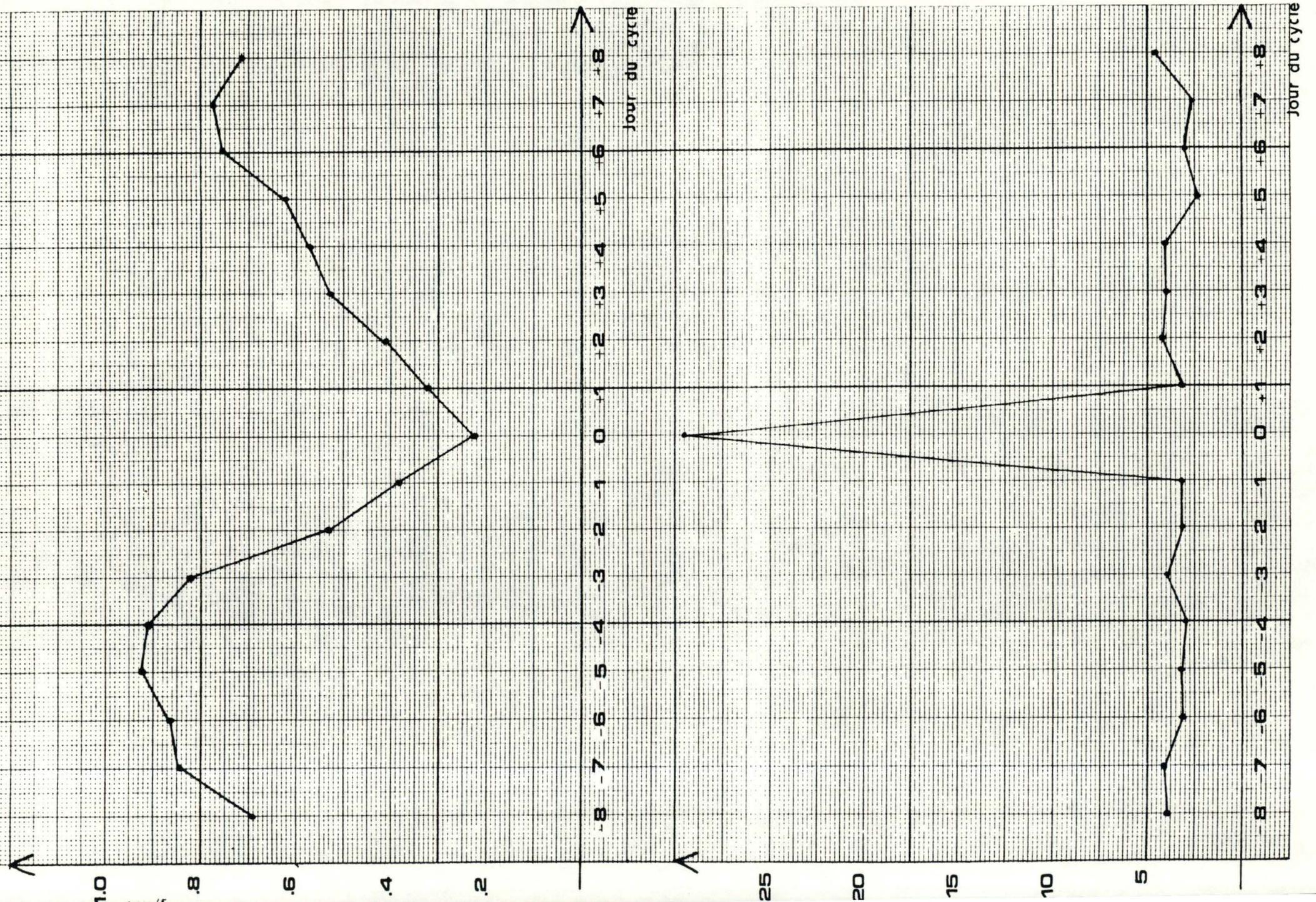


Tableau 8 : Dates des décharges de LH - Dates du taux minimum de progestérone.

Brebis N°	Dates des décharges de LH	Dates du taux minimum de progestérone
18	13-10-83	13-10-83
86	21-10-83	21-10-83
91	23-10-83	23-10-83
115	20-10-83	20-10-83
211	22-10-83	22-10-83
239	valeur manquante	valeur manquante

Ces valeurs, en plus des valeurs données dans le tableau 7, nous permettent de fixer le jour du cycle.

Par convention, le jour de la décharge de LH est considéré comme étant le jour 0 du cycle. Mais comme le pic de LH est assez bref (de 8 à 20 heures), lorsque nous faisons une prise de sang par jour, il y a une probabilité élevée de ne pas enregistrer ce pic. En plus de l'évolution des concentrations quotidiennes de LH, celle de la progestérone va nous permettre de fixer le jour 0 du cycle, la concentration en progestérone étant minimum ce jour.

Nous pouvons remarquer que nous n'avons pas enregistré le pic de LH chez la brebis 239. Ceci est dû au fait que les dosages de l'échantillon du jour 0 n'ont pu être réalisés. Mais grâce au tableau 7 et à la figure 11, nous pouvons dire que la brebis 239 est au jour 0 du cycle le 16-10-1983. En effet, cette brebis a été en oestrus le 17 octobre et ce jour, le taux de progestérone est le plus faible du profil mais est quand même presque égal à 0,3 ng/ml, tandis que chez les cinq autres brebis, il est de plus ou moins 0,22 ng/ml. La chute de la concentration de progestérone entre les jours +1 et +7 est moins forte que chez les autres brebis, ce qui laisse supposer que la valeur manquante est la plus basse. Le 17 octobre, nous n'enregistrons pas non plus de pic.

C. Evolution de l'émission de LH en dehors du pic préovulatoire
(émission tonique).

A partir des dates du jour 0, repris sur les figures 6 à 11 nous avons situé les dates des différentes prises de sang sériées (tableau 9).

239	f		f			f	f											
211		e		e					e			e						
115				d		d						d		d				
91	c		c						c		c							
86			b		b						b		b					
18				a		a			a		a							

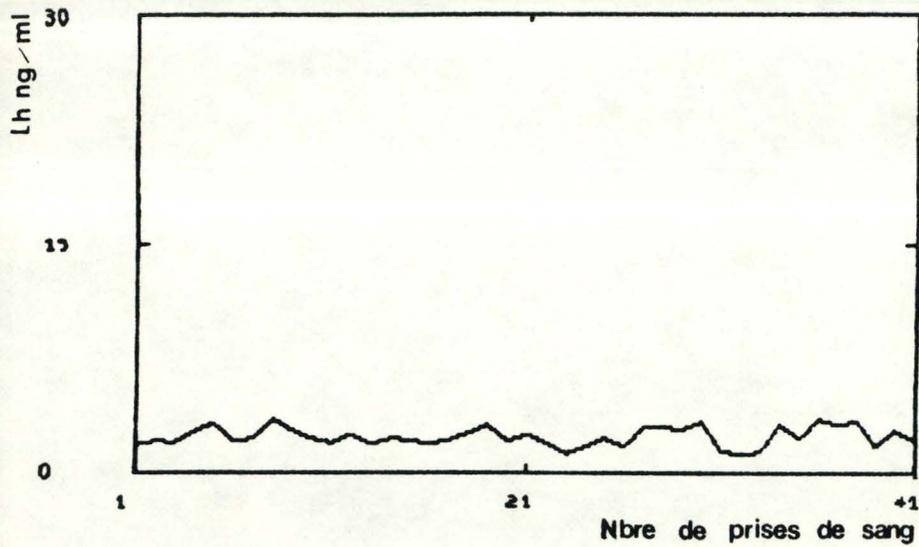
0 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1 0

Nous pouvons ainsi remarquer que les jours 0, +8 et -7, nous n'avons aucune valeur; sinon nous avons au moins une valeur par jour du cycle.

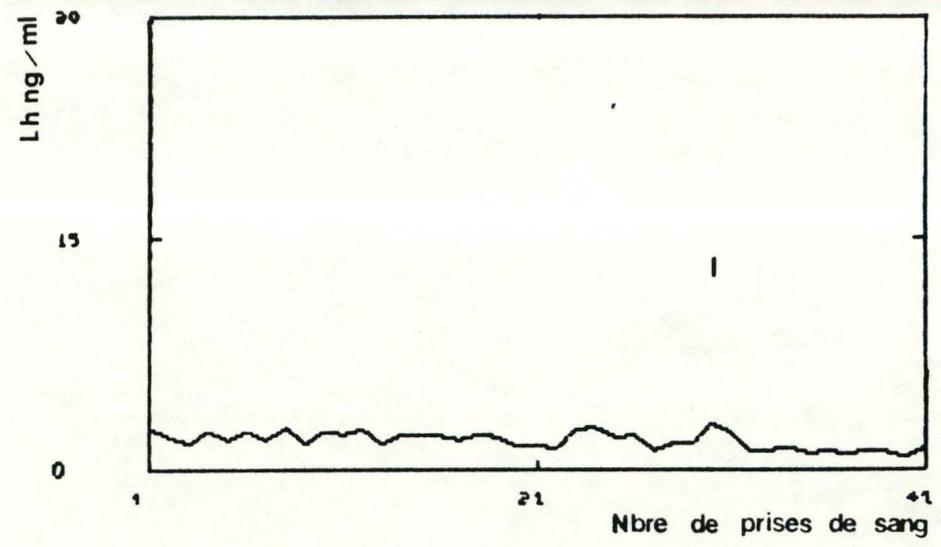
1. Evolution de la concentration en LH.

Les figures 14 à 19 retracent l'évolution de LH chez les six brebis lors des quatre séries de prises de sang. L'abscisse de ces figures (de 1 à 41) représente le nombre de prises de sang effectuées au cours de la journée, soit toutes les 15 minutes, de 8 heures 30 à 18 heures 30.

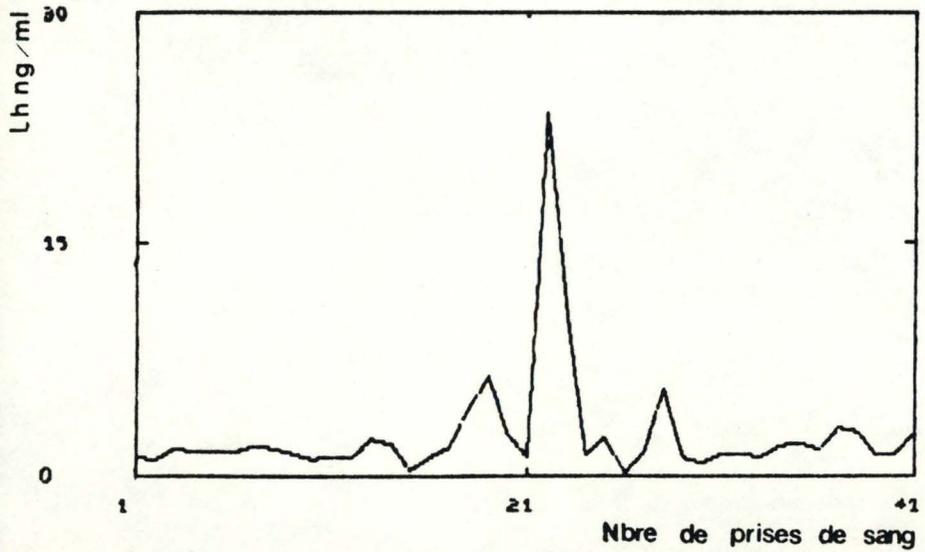
Ces figures permettent de déterminer, pour chaque série, l'amplitude des pulses et leur fréquence (tableau 10).



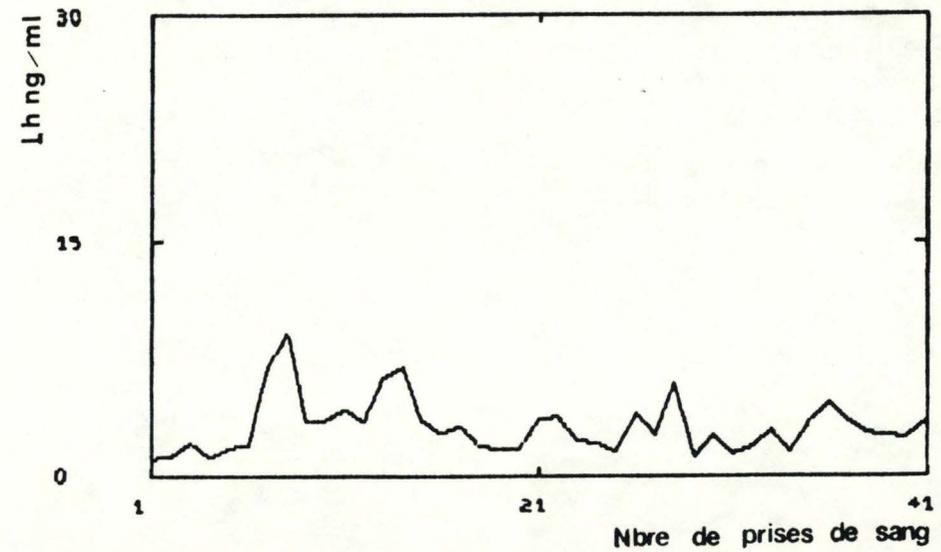
B.18 LH1 J+4



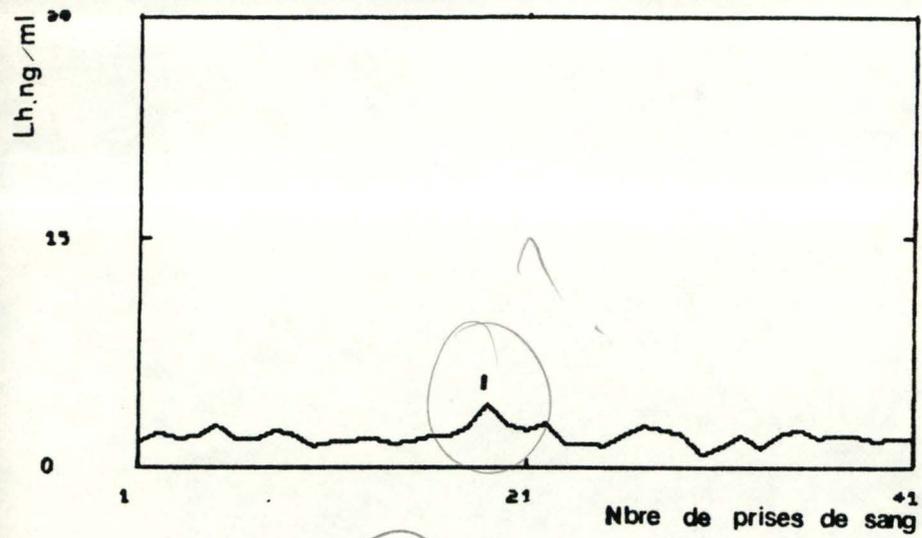
B.18 LH2 J+6



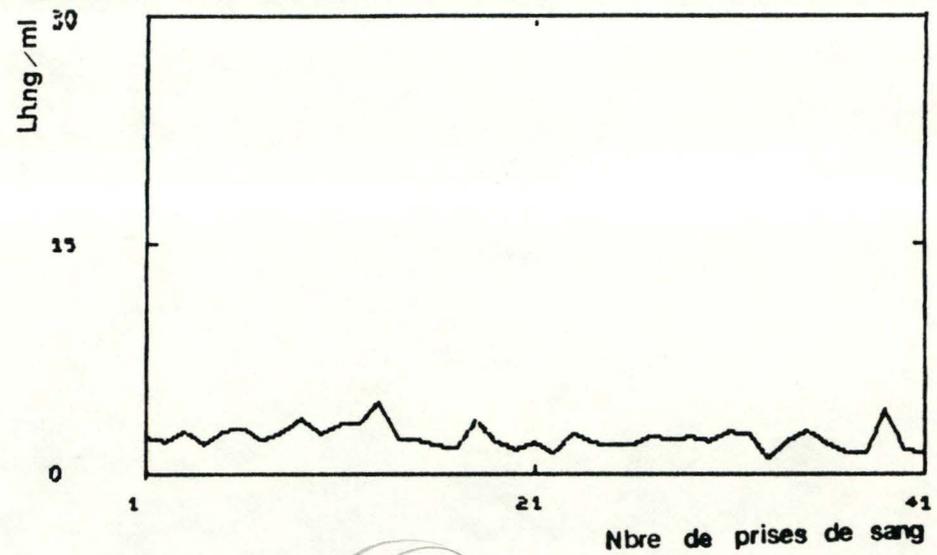
B.18 LH3 J-6



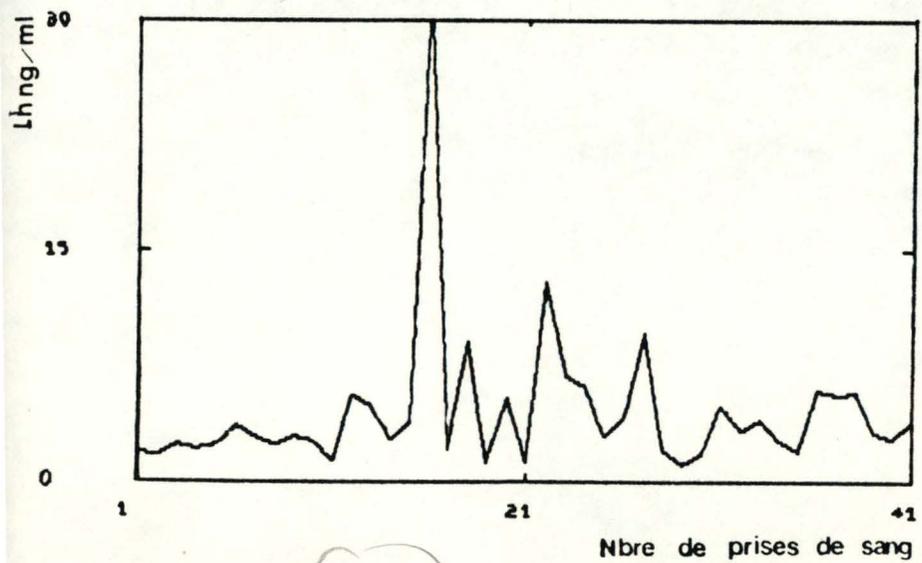
B.18 LH4 J-4



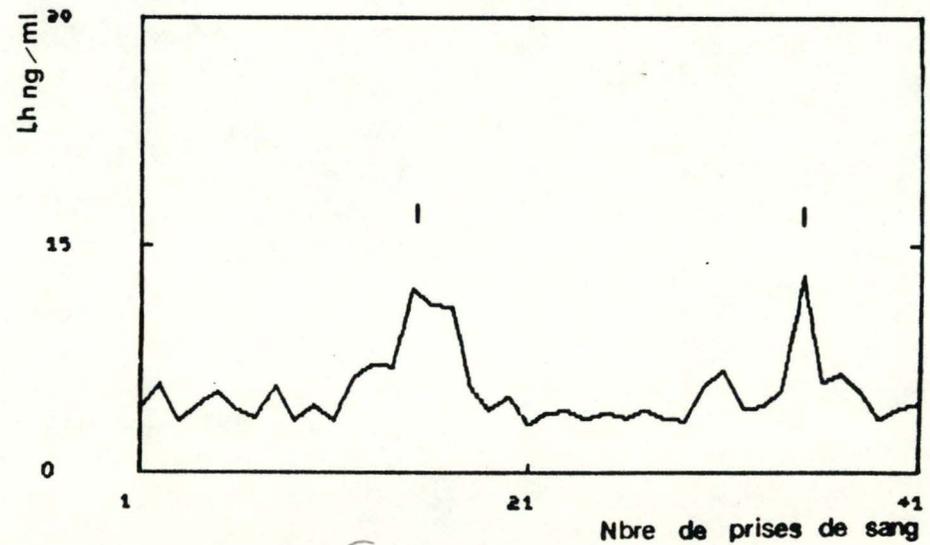
B.86 LH1 J-4



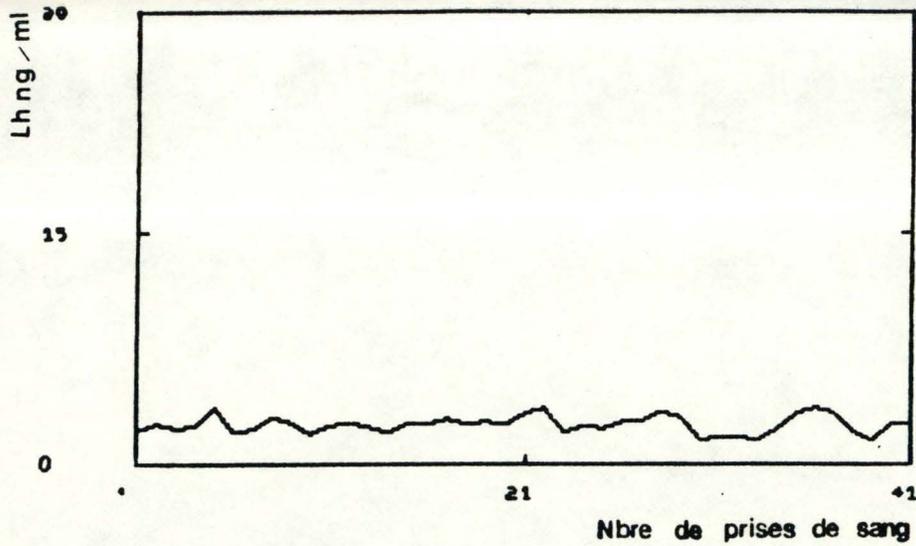
B.86 LH2 J-2



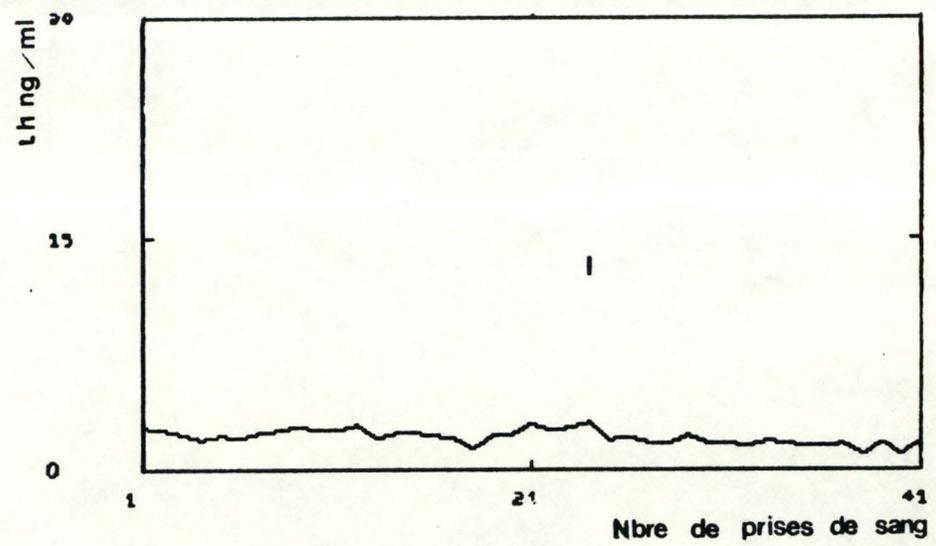
B.86 LH3 J+3



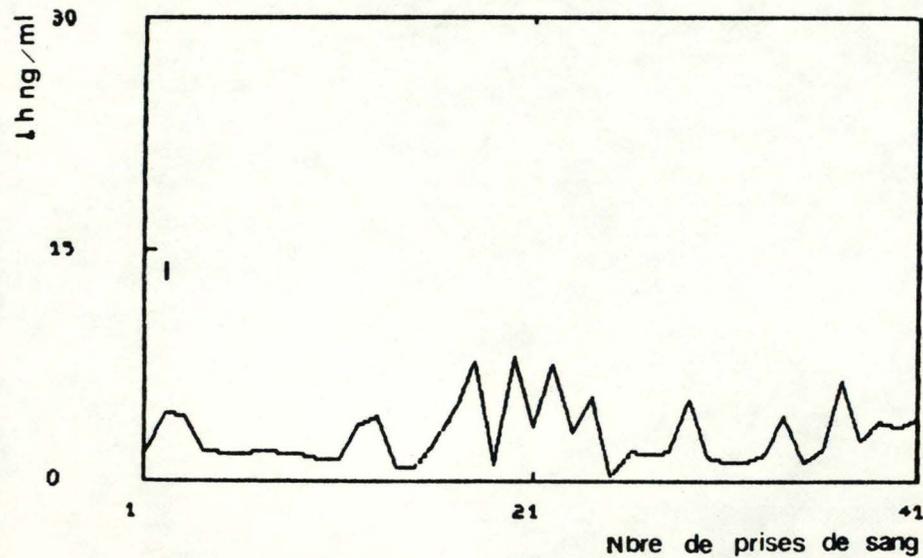
B.86 LH4 J+5



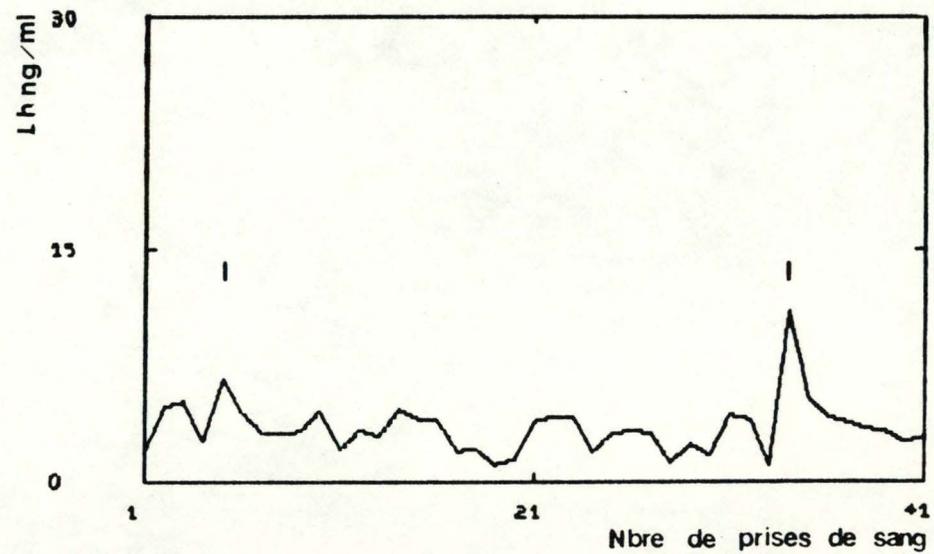
B.91 LH1 J-6



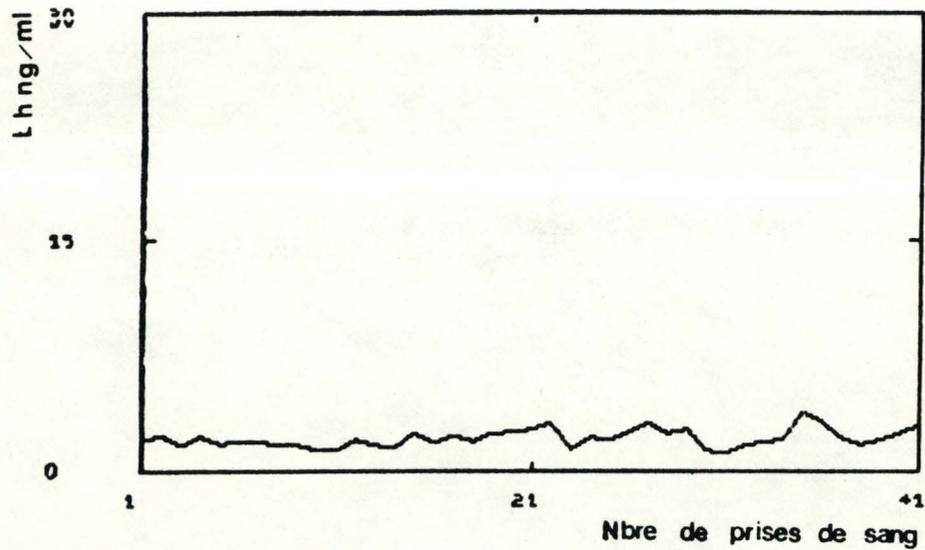
B.91 LH2 J-4



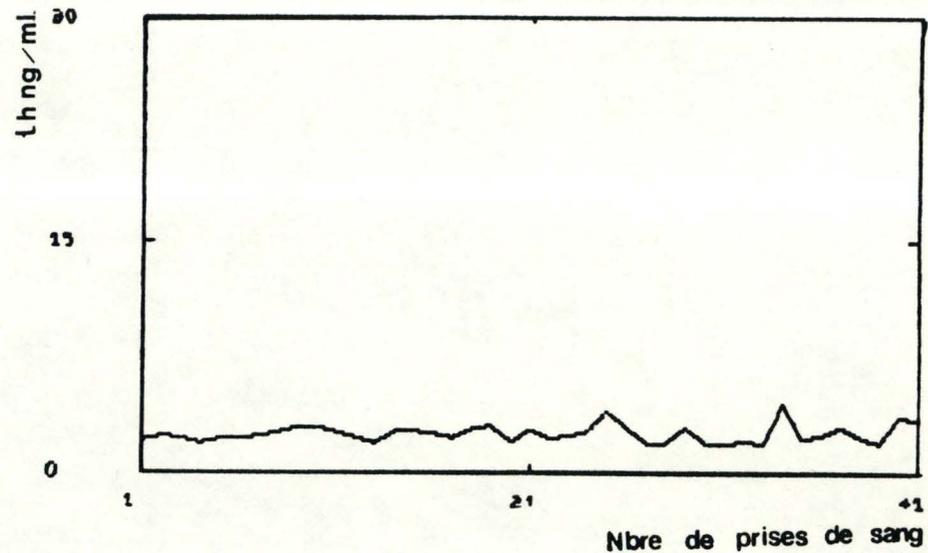
B.91 LH3 J+1



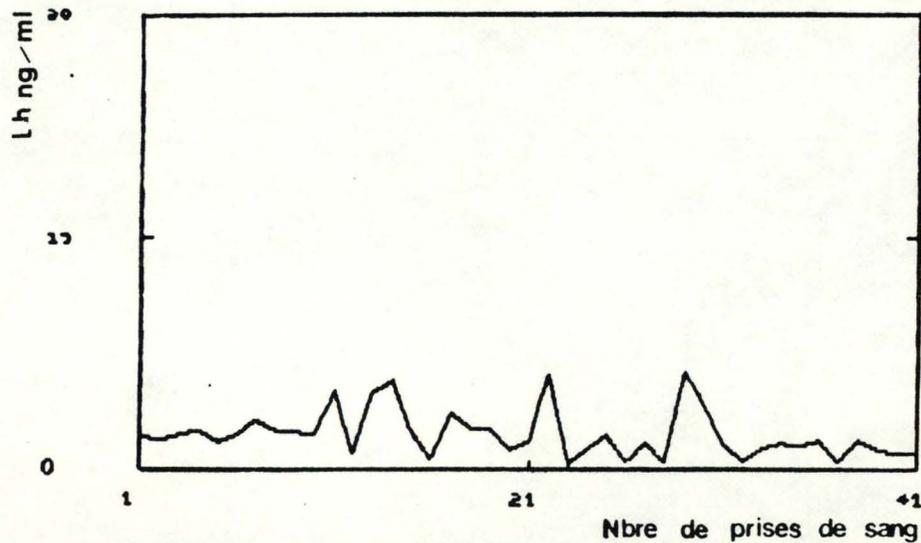
B.91 LH4 J+3



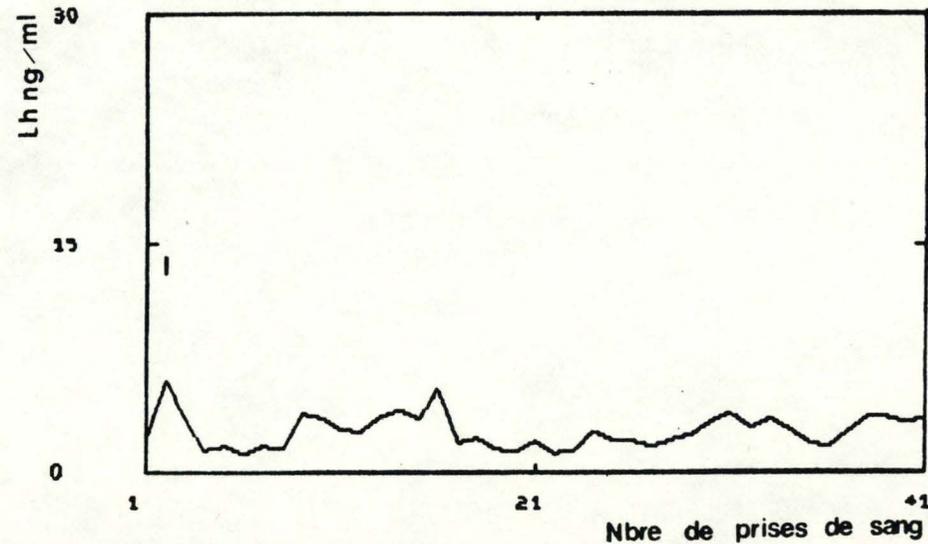
B.115 LH1 J-3



B.115 LH2 J-1

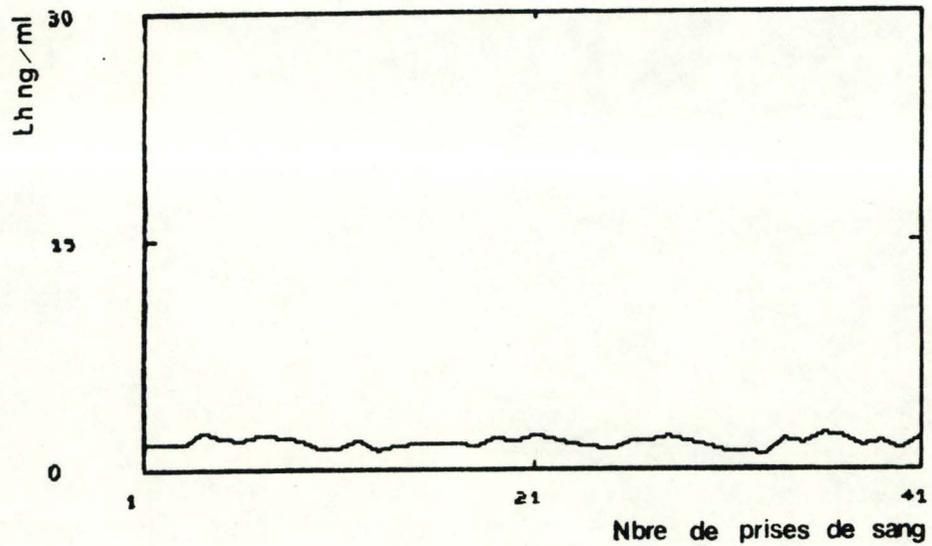


B 115 LH3 J+4

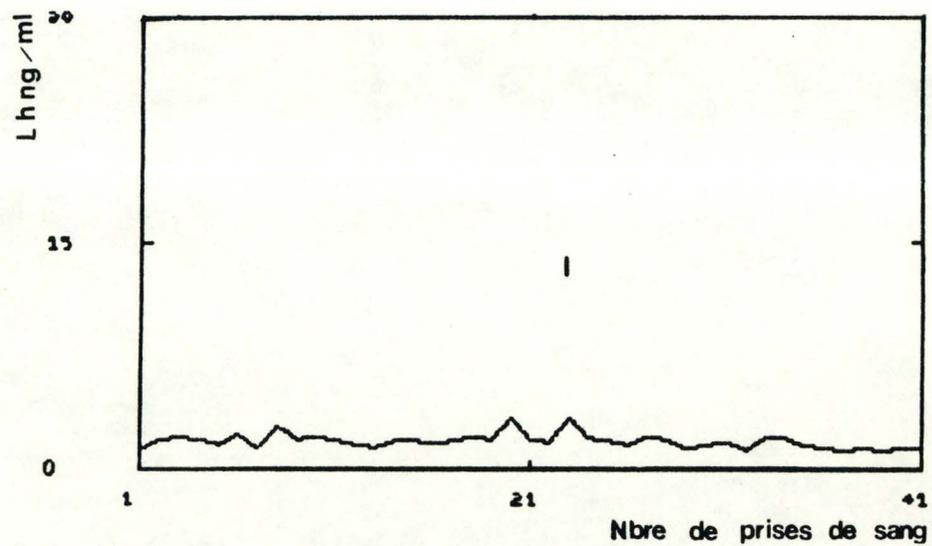


B.115 LH4 J+6

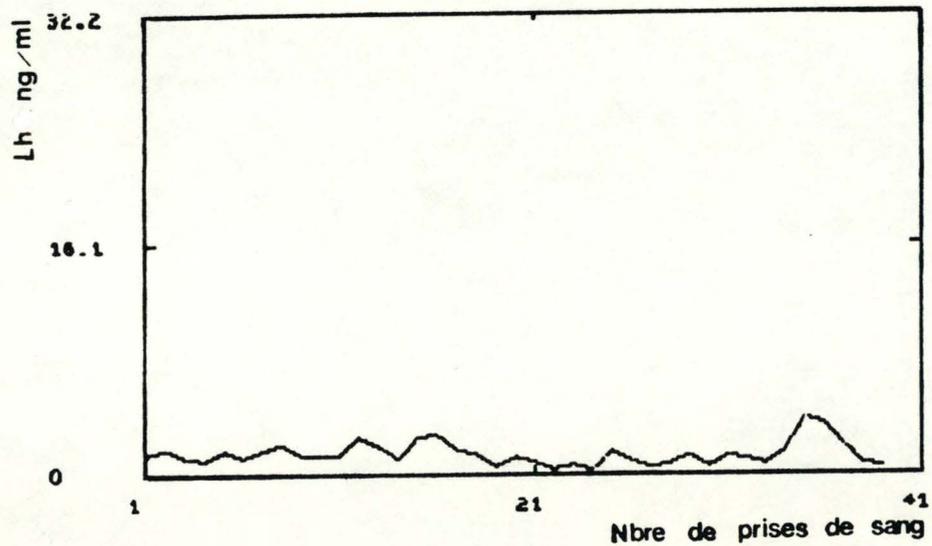
Fig. 18



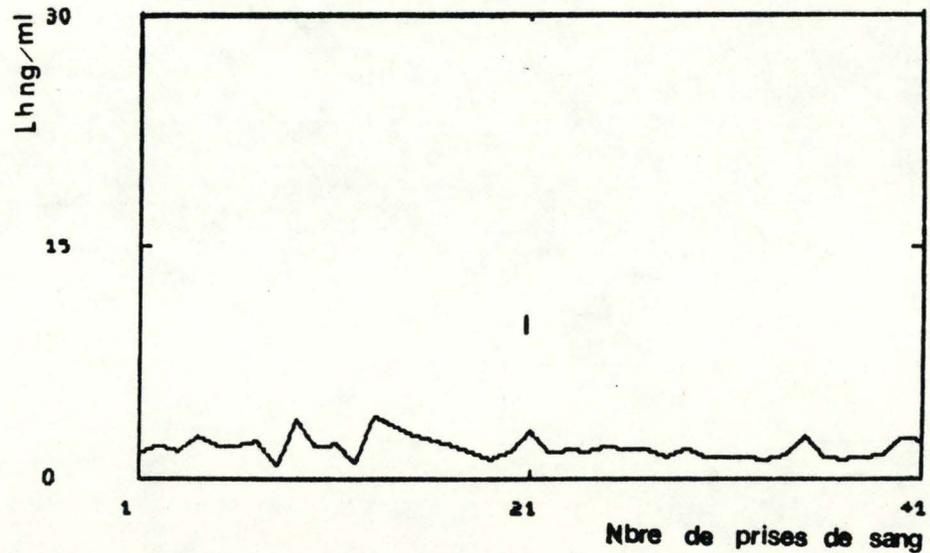
B.211 LH1 J-5



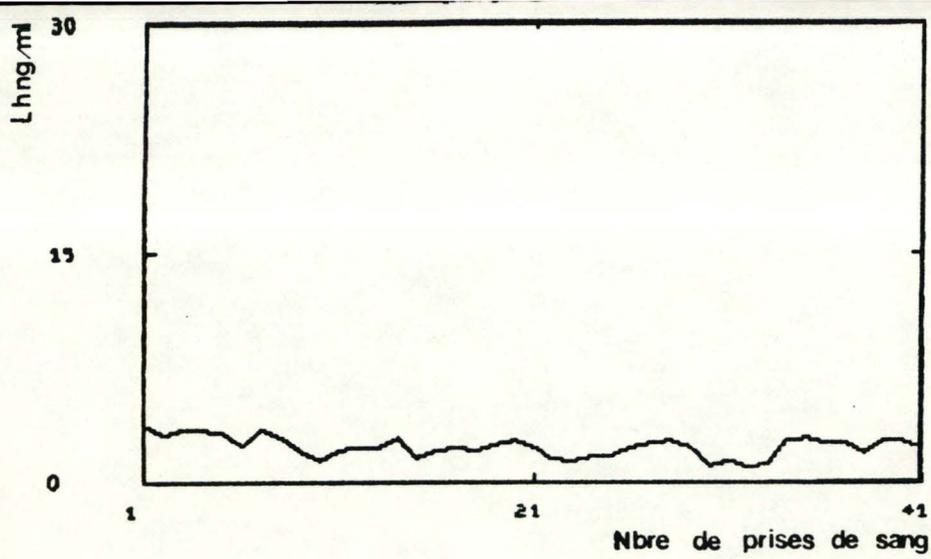
B.211 LH2 J-3



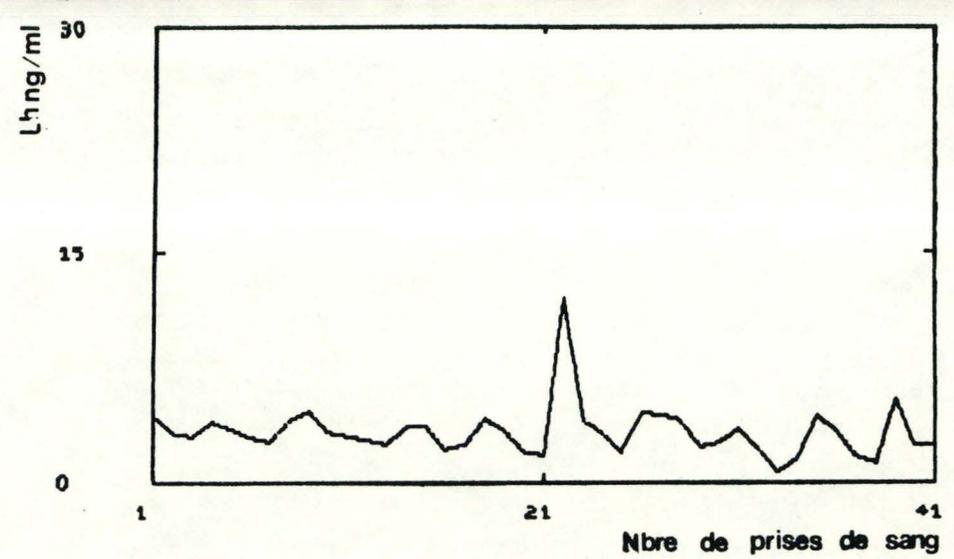
B.211 LH3 J+2



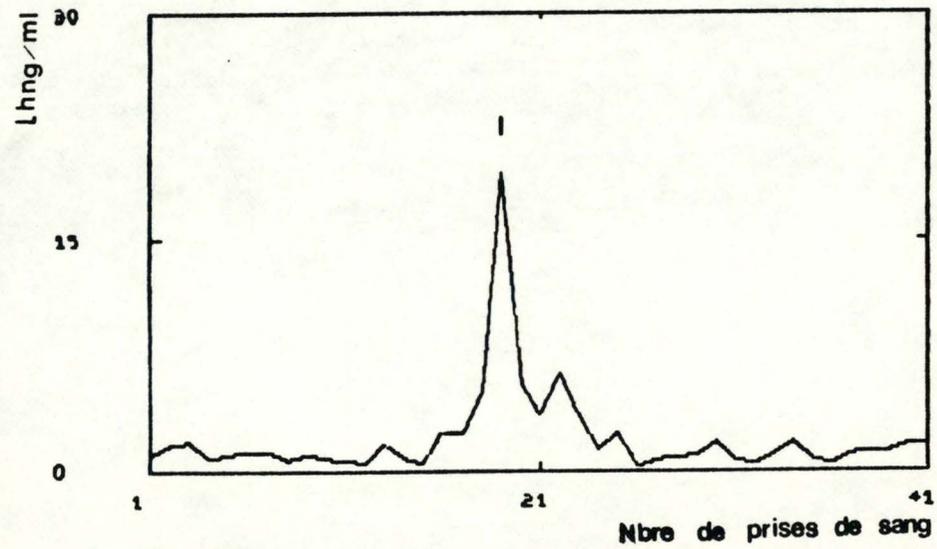
B.211 LH4 J+4



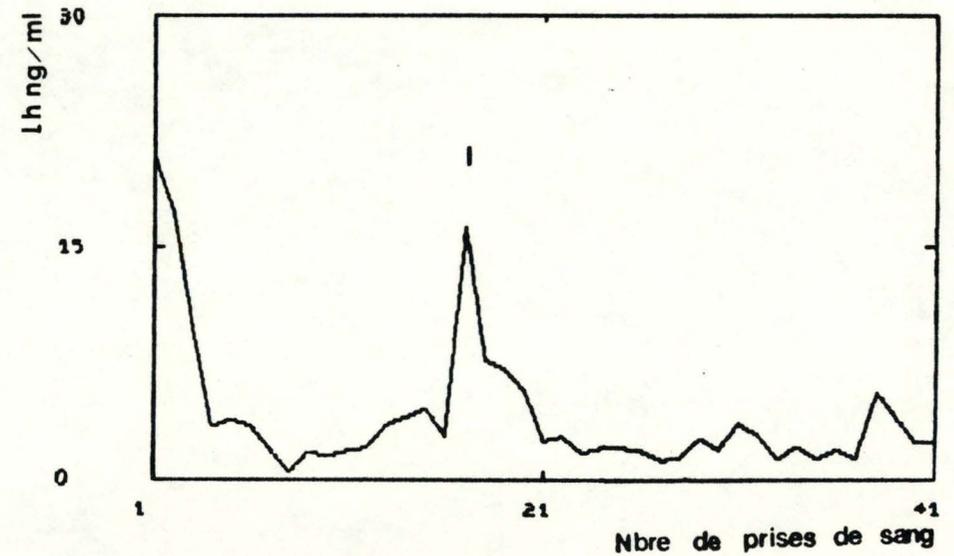
B.239 LH1 J+1



B.239 LH2 J+3



B.239 LH3 J+7



B.239 LH4 J-8

Tableau 10: Taux de base - Fréquence - Amplitude moyenne
 (selon les jours du cycle chez les six brebis).

Jours du cycle (brebis)	Taux de base (ng/ml)	Fréquence (pulses/10 heures)	Amplitude moyenne (ng/ml)
+1 (91)	1,06	10	4,59
(239)	1,40	6	1,33
+2 (211)	1,20	3	1,70
+3 (86)	1,59	8	9,02
(91)	1,78	7	3,92
(239)	1,69	9	3,27
+4 (18)	1,50	6	1,32
(115)	0,70	7	3,90
(211)	1,20	6	1,91
+5 (86)	3,21	5	5,38
+6 (18)	1,05	7	1,46
(115)	1,42	5	3,06
+7 (239)	0,61	1	18,94
-8 (239)	1,35	4	10,40
-6 (18)	0,84	3	10,50
(91)	1,78	6	1,57
-5 (211)	1,29	3	1,04
-4 (18)	1,80	8	3,62
(86)	1,05	4	1,84
(91)	1,58	2	1,37
-3 (115)	1,49	4	1,75
(211)	1,23	4	1,40
-2 (86)	1,46	9	1,60
-1 (115)	1,72	9	1,53

2. Taux de base en fonction du jour du cycle (figure 20).

Le taux de base ne semble pas varier au cours du cycle. Les valeurs de taux de base se situent à peu près toutes entre 1 et 2 ng/ml.

Nous remarquons le jour +5 chez la brebis 86, un taux de base qui est très élevé (3,2 ng/ml) par rapport aux autres jours du cycle et aux autres brebis. Le taux de base moyen pour la brebis 86 est de $1,82 \pm 0,94$ ng/ml, ce qui ne diffère pas très fort du taux de base moyen des cinq autres brebis. Les taux de base moyens des brebis 18, 91, 115, 211 et 239 sont respectivement de $1,29 \pm 0,43$, $1,55 \pm 0,44$, $1,33 \pm 0,39$, $1,23 \pm 0,04$ et $1,26 \pm 0,46$ ng/ml.

Si l'on regarde attentivement la figure 20, on peut voir cependant qu'à partir du jour -3, le taux de base semble augmenter pour les brebis 86 et 115. Pour les quatre autres brebis, nous n'avons pas de valeur pendant cette période.

3. Fréquence des pulses en fonction du jour du cycle (fig. 21)

Fréquence { Nous remarquons que, au fur et à mesure que l'on se rapproche du jour +8 en partant du jour +1, la fréquence des pulses semble diminuer. Par contre, du jour -8 au jour -1, le nombre des pulses semble augmenter, notre graphe ayant une allure de V droit.

Si nous prenons par couple de deux valeurs pour une même brebis, du jour +1 au jour +8, les couples des brebis 86, 91 et 115 présentent une diminution au fur et à mesure que l'on se rapproche du jour +8. Du jour -8 au jour -1, la tendance à l'augmentation est plus évidente: en effet, quatre couples de valeurs sur cinq représentant respectivement les brebis 18, 86, 115 et 211 s'entendent pour une augmentation.

4. Amplitude des pulses en fonction du jour du cycle (fig. 22).

L'examen de la figure 22 donne une impression contraire de l'étude de la figure 21. En effet, sur cette figure,

FIG. 20

Jour du cycle



0 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 -1 -2 -3 -4 -5 -6 -7 -8

Taux de base
ng/ml

3

2

1

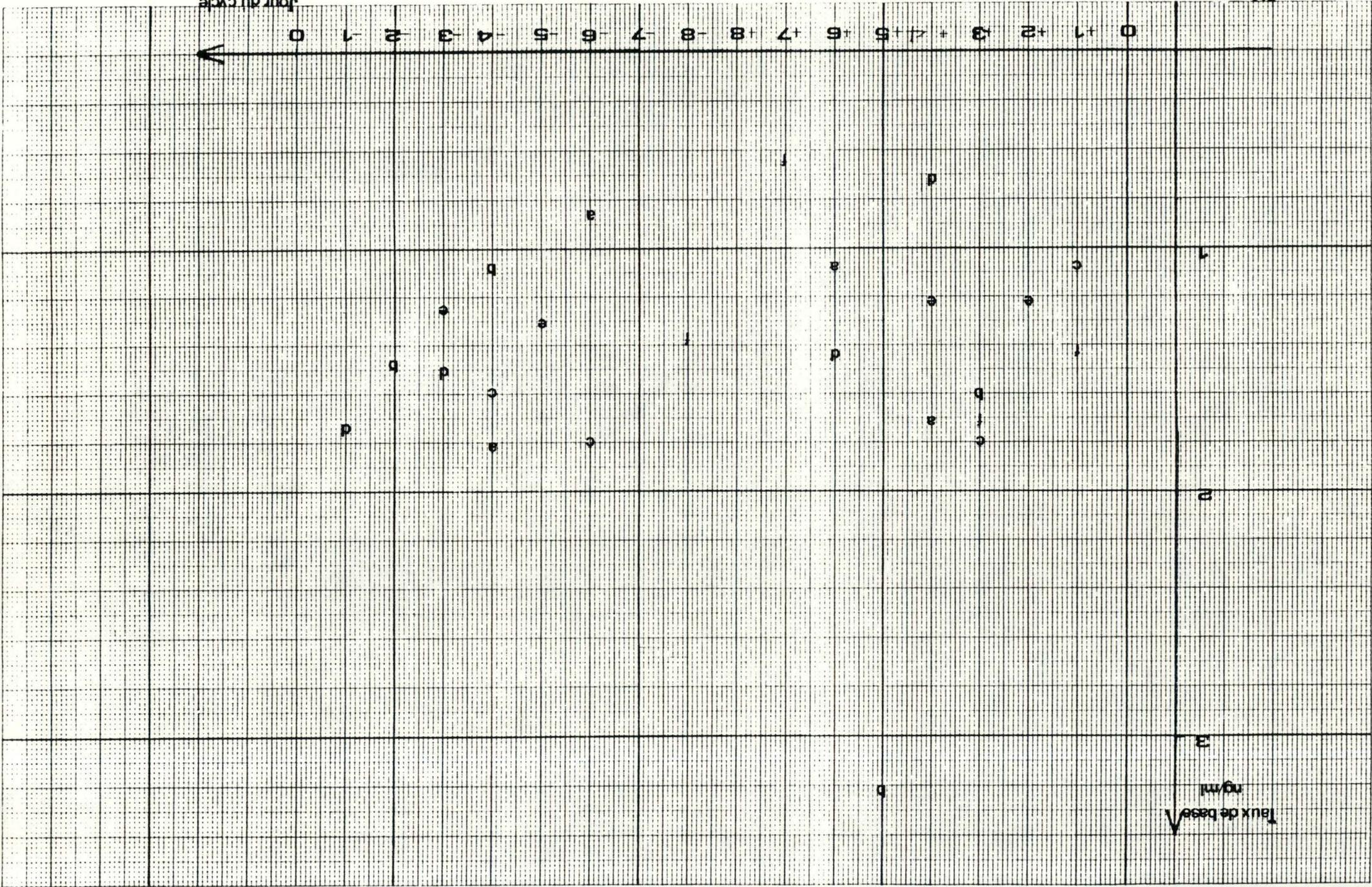
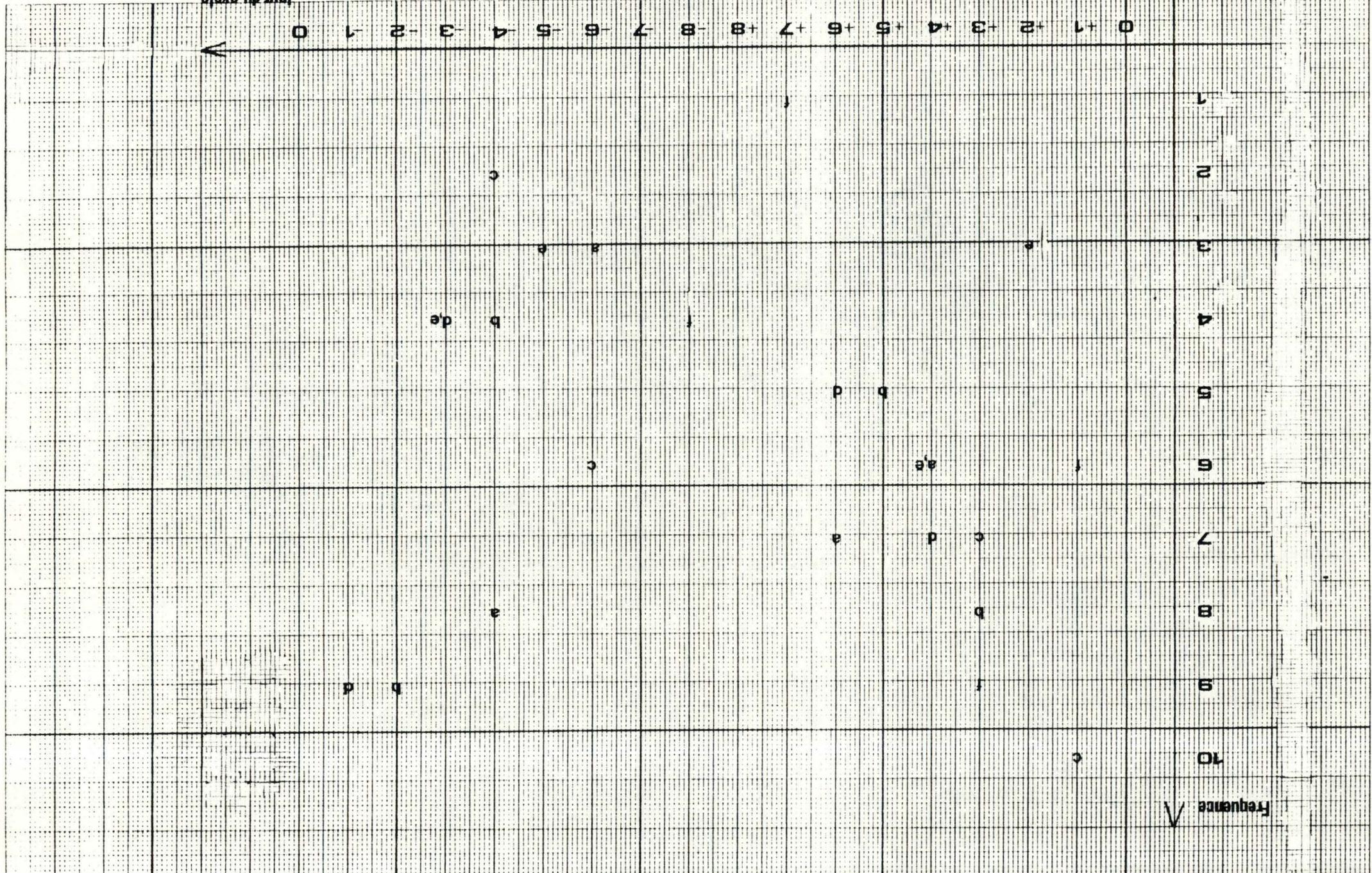


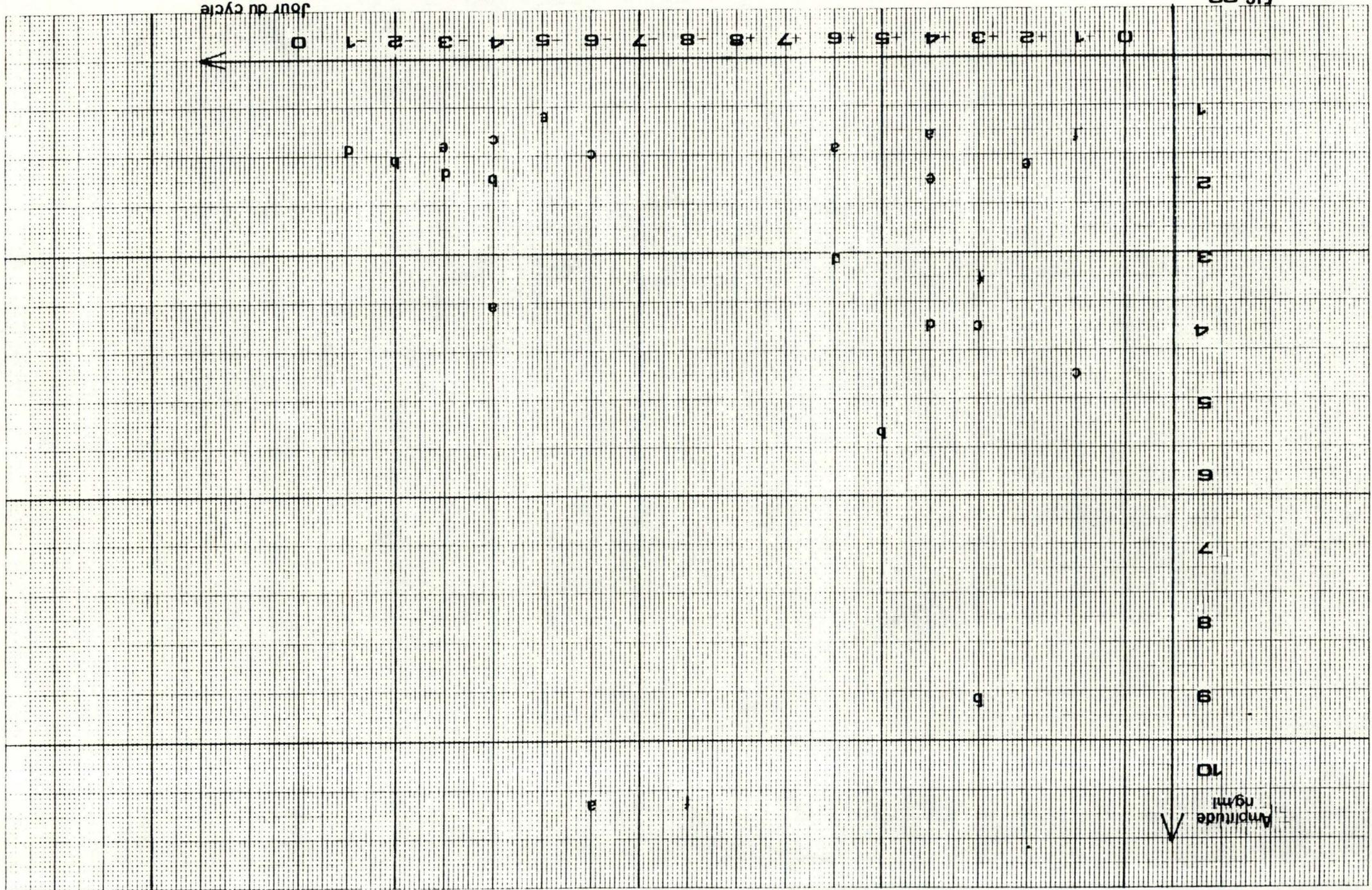
FIG. 21



Jour du cycle

Frequence

FIG. 22



il nous semble que du jour 0 au jour +8, l'amplitude des pulses augmente pour atteindre une valeur très élevée le jour +7, et que du jour -8 au jour -1, l'amplitude des pulses semble diminuer. La figure 21 ayant l'aspect d'un V droit, la figure 22 a tout à fait l'aspect contraire: un V renversé.

Après l'examen des figures 21 et 22, il nous est paru intéressant d'établir un graphe avec l'amplitude en abscisse et la fréquence en ordonnée, afin de voir s'il existait bien une relation inverse entre ces deux points.

5. Variation de fréquence en fonction de l'amplitude (fig. 23).

Comme le suggéraient les figures 21 et 22, la fréquence et l'amplitude des points varient en sens inverse. Nous avons calculé le coefficient de corrélation (r) qui est égal à - 0,31 (S avec $P < 0,05$)

Notre corrélation, quoique significative, est inférieure à celle trouvée dans la littérature où les coefficients de corrélation sont d'environ - 0,50.

Il faut cependant remarquer que le profil de la figure 23 est presque essentiellement basé sur quelques points. Un plus grand nombre de prises de sang sériées, étalées sur plus de jours, nous aurait donné quelques profils en plus à analyser et donc des couples de valeur fréquence et amplitude plus nombreux.

6. Variation du taux de base en fonction de la fréquence (figure 24).

L'étude de cette figure nous paraît intéressante. En effet, il est logique de penser que lorsque la fréquence des pulses est élevée, la LH a peu de temps pour revenir à un taux de base faible.

L'examen de la figure 24 ne contredit pas ce point bien que nous ayons un coefficient de corrélation $r = + 0,23$ qui est NS. Ceci peut s'expliquer par un manque de données.

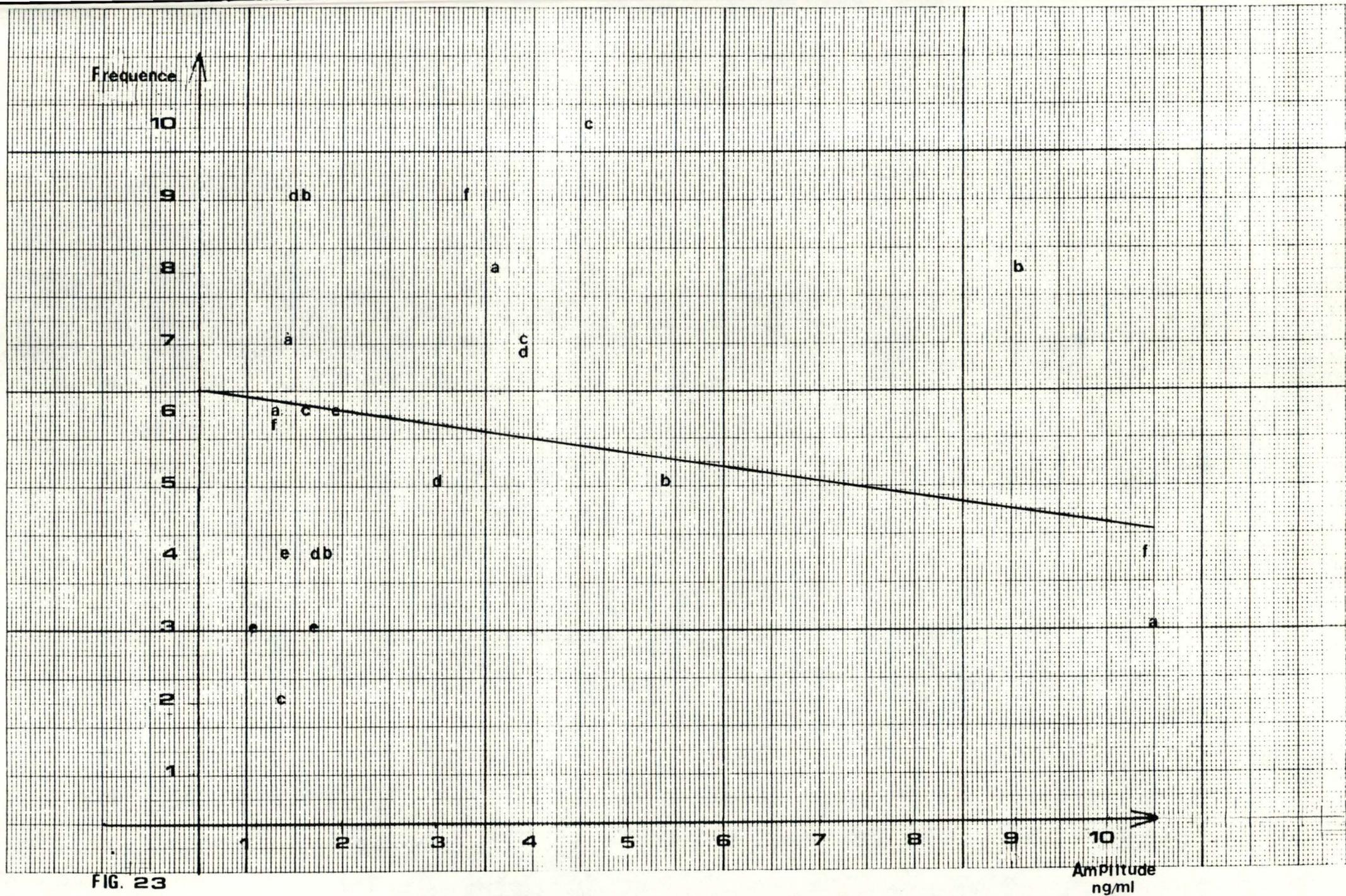


FIG. 23

Amplitude
ng/ml

Taux de base
no. l/m. \uparrow

3

2

1

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

Fréquence \rightarrow

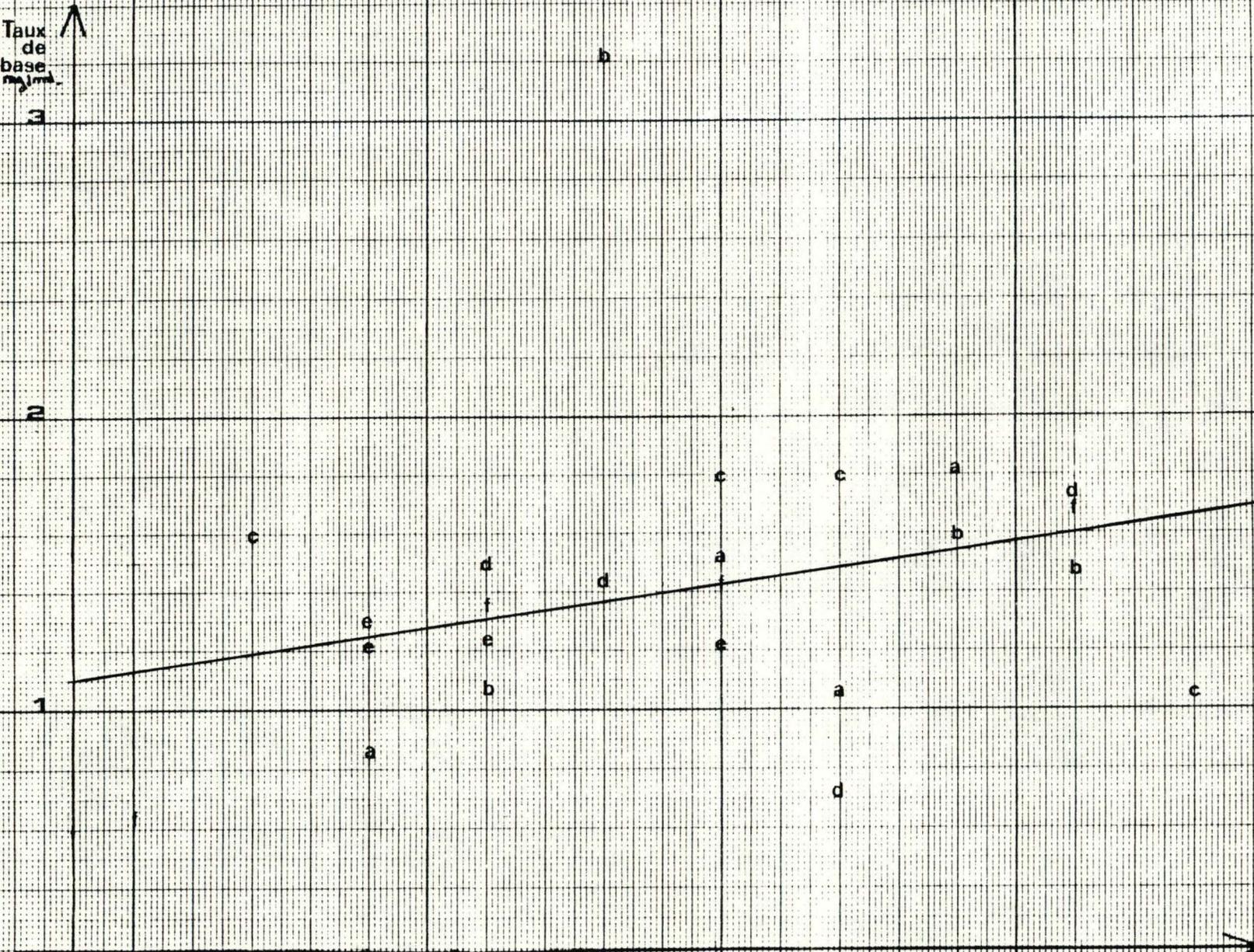


FIG. 24

7. Variation du taux de base en fonction de l'amplitude (figure 25).

L'examen de cette figure nous paraît aussi intéressante, car il est logique de penser que lorsque l'amplitude des pulses est très élevée, il faut plus de temps à la LH pour revenir à un taux de base faible.

Le coefficient de corrélation $r = 0,24$ est NS. Comme précédemment, ceci peut s'expliquer par un manque de données, quoique dans la littérature, il ne soit fait nulle part allusion à ce qui concerne la relation du taux de base en fonction de l'amplitude.

Des figures 24 et 25, nous ne tirons aucune conclusion. En effet, le taux de base variant très peu et le nombre de données dont nous disposons étant faible, il ne nous est pas possible de conclure sur la variation du taux de base. Il faut cependant remarquer que les observations des figures 20 et 21 se rapportant au taux de base et à la fréquence vont toutes dans le même sens:

- le taux de base semble augmenter du jour -8 au jour -1 (figure 20);
- du jour -8 au jour -1, la fréquence augmente (figure 21).

8. Variation du taux de base en fonction des concentrations en progestérone correspondant au jour du cycle où le taux de base est mesuré (fig. 26).

Le coefficient de corrélation ($r = -0,079$) est beaucoup trop faible que pour suggérer une relation.

Le taux de base n'est pas dépendant des concentrations en progestérone quoique, lors de la gestation, lorsque les concentrations en progestérone sont très élevées, la LH a un taux basal très faible et parfois même indétectable (Niswender et al, 1968).

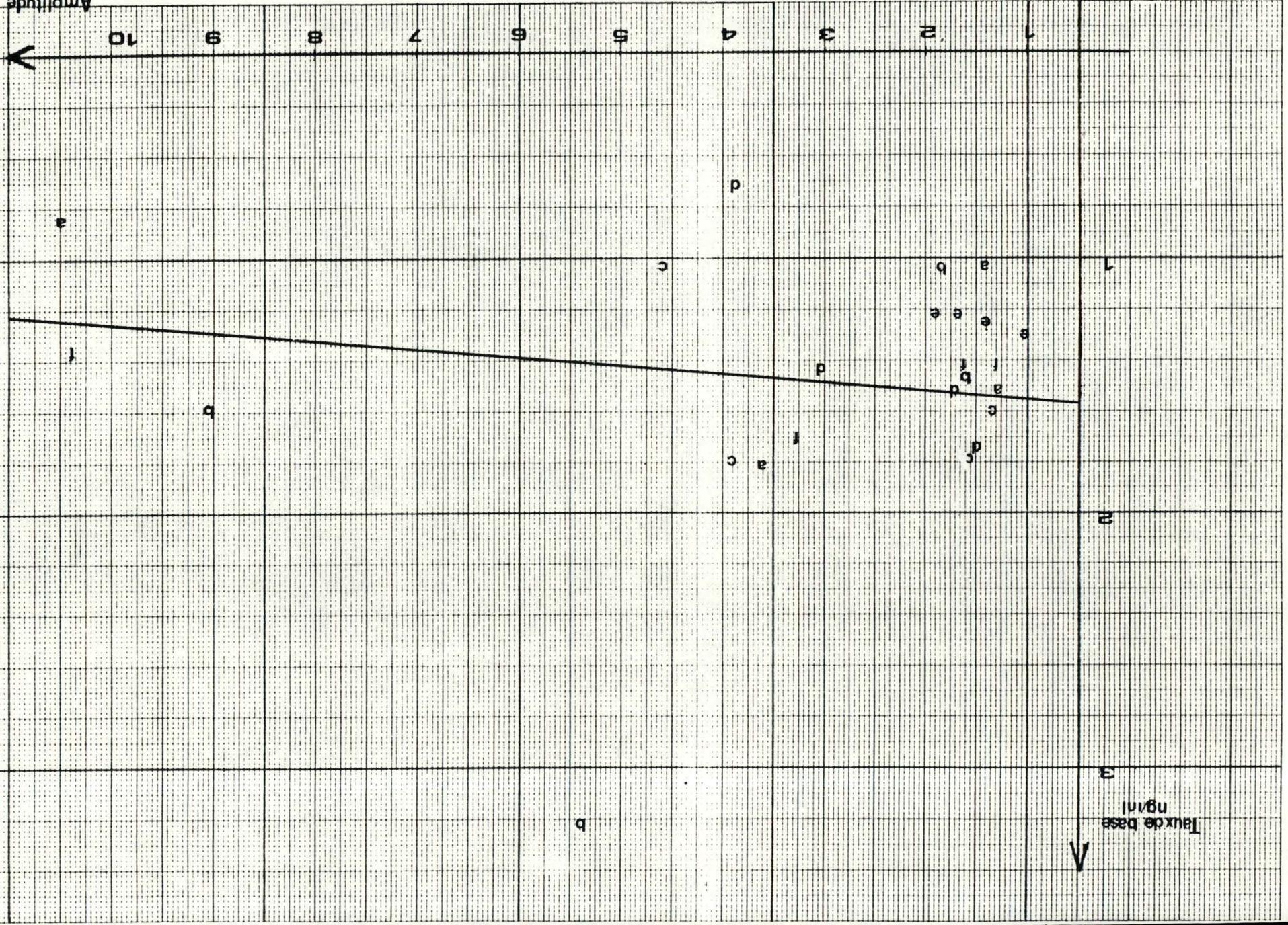
FIG. 25

Amplitude
ng/ml

Taux de base
ng/ml

10
9
8
7
6
5
4
3
2
1

1
2
3



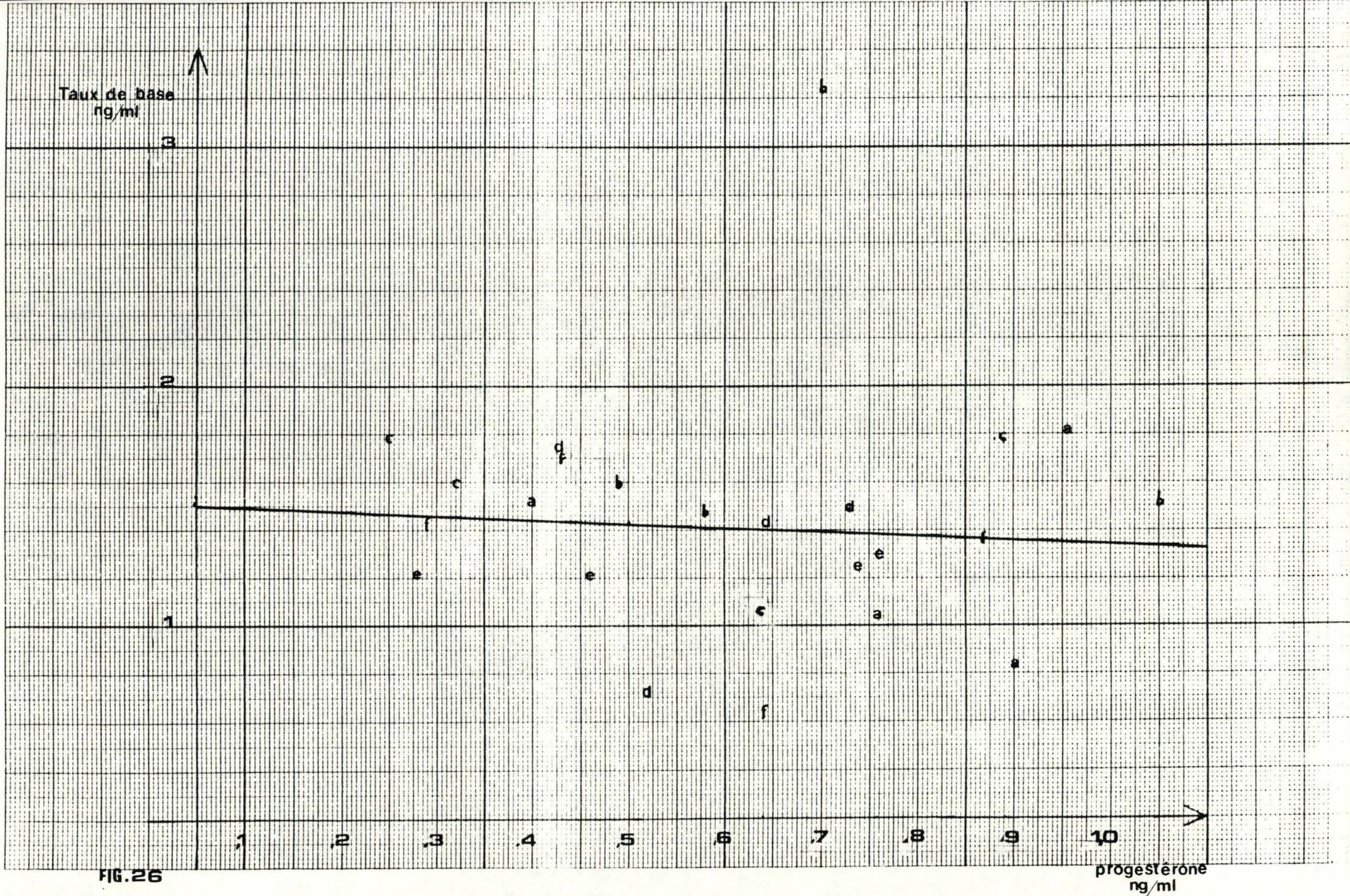


FIG. 26

progesterone
ng/ml

9. Variation de la fréquence en fonction des concentrations en progestérone correspondant aux jours du cycle où la fréquence est mesurée (fig. 27).

Nous examinons cette relation car, plusieurs fois dans la littérature, il est dit que la progestérone réduit la fréquence des pulses et de plus, les brebis ovariectomisées présentent une fréquence de pulses très élevée. Des injections de progestérone réduisent significativement cette fréquence (Goodman et Karsch, 1980).

Quand nous regardons la figure 27, il semble, en effet, que lorsque la concentration en progestérone est élevée, la fréquence se réduit: 2 points sur 4 pour la brebis 18, 3 sur 4 pour la brebis 86, 2 sur 4 pour la brebis 91, 3 sur 4 pour la brebis 115, 2 sur 4 pour la brebis 211 et 3 sur 4 pour la brebis 239 confirment ce fait.

Cependant, notre coefficient de corrélation r est égal à $-0,25$ et est non significatif.

10. Variation de l'amplitude en fonction des concentrations en progestérone correspondant au jour du cycle où l'amplitude est mesurée (figure 28).

Comme nous avons examiné la variation de fréquence en fonction de la progestérone et qu'en anoestrus la progestérone semble réduire l'amplitude des pulses, nous avons analysé l'effet de la progestérone sur l'amplitude.

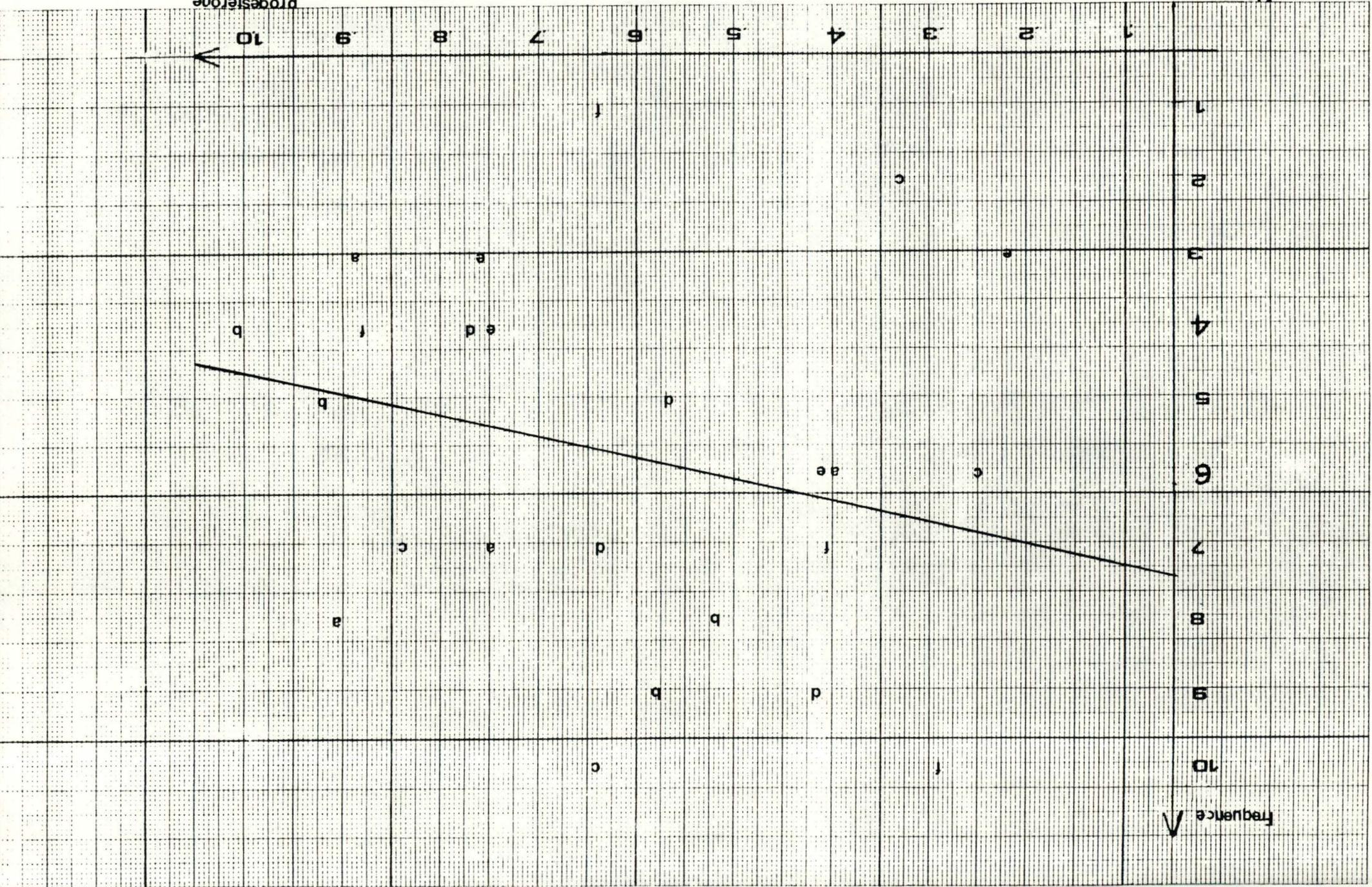
De la figure 28, il ne ressort pas grand chose et, de plus, le coefficient de corrélation est NS ($r = 0,22$).

11. Etude approfondie de certains pulses.

De tous les pulses repris dans les figures 14 à 19, un certain nombre est ajusté sur ordinateur à la fonction $y(t)$ afin de calculer le temps de demi-vie. Car lorsque nous effectuons les prises de sang, nous ne les effectuons pas à

FIG 27

progesterone
ng/ml



Amplitude
n/mi

10
9
8
7
6
5
4
3
2
1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

progesterone
ng/ml

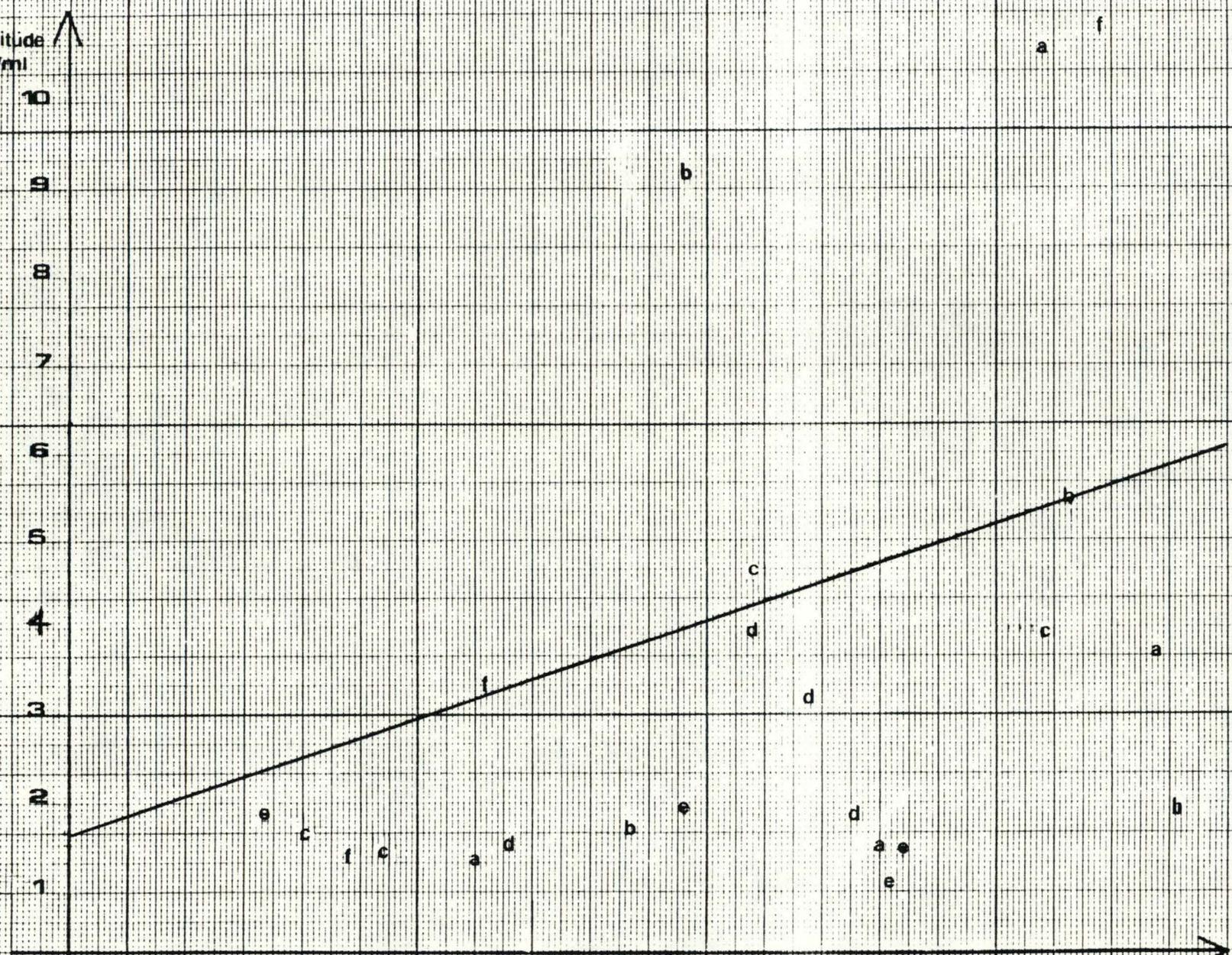


FIG. 28

la valeur maximum du pulse ou au minimum du taux de base. En fait, la probabilité de tomber sur ces valeurs est faible. C'est pourquoi, lorsque le pulse est défini par au moins dix points, nous l'estimons.

Les dates et le nombre de pulses pour lesquels nous avons calculé le temps de demi-vie sont repris dans le tableau 11. Les petits signes | sur les figures 14 à 19 indiquent les pulses estimés. Nous avons aussi estimé, en plus de la demi-vie, l'amplitude maximum (a) et le taux de base (k). Ces valeurs sont reprises dans le tableau 12. Le tableau 13 compare les valeurs de a et k estimées et calculées. La valeur estimée est la valeur obtenue sur ordinateur après avoir évalué le moment de la décharge maximum. La valeur calculée est celle mesurée sur les figures de 14 à 19.

Tableau 11: Dates (jour du cycle) - Nombre de pulses estimés.

Brebis N°	Dates (jour du cycle)	Nombre de pulses estimés
18	19-10-83 (+6)	1
86	17-10-83 (-4)	1
	26-10-83 (+5)	2
91	19-10-83 (-4)	1
	24-10-83 (+1)	1
	26-10-83 (+3)	2
115	26-10-83 (+6)	1
211	19-10-83 (-3)	1
	26-10-83 (+4)	1
239	24-10-83 (+7)	1
	26-10-83 (-8)	1

12. Tableau 12: a - k - $t_{\frac{1}{2}}$.

Brebis N° (jour du cycle)	a (ng/ml)	k (ng/ml)	$t_{\frac{1}{2}}$ (minute)
18 (+6)	2,49	0,87	18,20
86 (-4)	2,80	1,60	18,20
(+5)	11,80	3,42	18,50
(+5)	16,06	3,90	9,04
91 (-4)	2,94	1,79	4,76
(+1)	3,95	1,41	19,31
(+3)	5,60	2,90	9,80
(+3)	16,50	3,06	9,90
115 (+6)	7,42	1,29	10,70
211 (-3)	2,88	1,04	20,70
(+4)	2,58	1,51	9,20
239 (-8)	19,79	1,44	19,60
(+7)	36,84	1,41	10,02

$$t_{\frac{1}{2}} \text{ moyen} = 13,64 \pm 5,64$$

Le tableau 13: compare les valeurs de a et de k estimés avec les valeurs de a et de k calculés.

Brebis N° (jour du cycle)	a (ng/ml)		k (ng/ml)	
	calculé	estimé	calculé	estimé
18 (+6)	1,52	2,48	1,05	0,87
86 (-4)	2,49	2,80	1,58	1,60
(+5)	8,90	11,80	3,20	3,42
(+5)	9,80	16,06	3,20	3,90
91 (-4)	1,47	2,94	1,58	1,79
(+1)	3,24	3,95	1,06	1,41
(+3)	4,82	5,60	1,78	2,90
(+3)	9,12	16,50	1,78	3,06
115 (+6)	4,48	7,42	1,42	1,29
211 (-3)	2,06	2,88	1,23	1,04
(+4)	1,80	2,58	1,20	1,51
239 (-8)	16,20	19,79	1,35	1,44
(+7)	19,20	36,84	0,61	1,41
	$\bar{X}=6,546$	$\bar{X}=10,13$	$\bar{X}=1,54$	$\bar{X}=1,97$

De ce tableau, nous pouvons voir que l'amplitude estimée des pulses est toujours supérieure à l'amplitude calculée, ce qui montre bien que lorsque nous effectuons la prise de sang, la LH sanguine n'est pas à son niveau le plus élevé.

Quelques fois cependant, nous voyons que la valeur calculée se rapproche très fort de la valeur estimée, ce qui indique que nous avons fait la prise de sang presque au maximum de la concentration en LH lors du pulse.

Nous pouvons voir que, quelques fois, les taux de base estimés et calculés correspondent plus ou moins. D'autres fois, ils sont tout à fait différents, soit plus grands, soit plus petits. Cela s'explique par le fait que, lorsque nous estimons un pulse et si ce pulse est suivi rapidement d'un

autre, nous n'avons que quelques points pour l'estimer. Il en résulte que nous avons peu de valeurs en dehors du pulse pour estimer le taux de base. Si ces valeurs sont les cinq plus basses du profil, le taux de base estimé sera plus bas que le taux de base calculé. Par contre, si ces valeurs ne font pas partie des dix points les plus bas, le taux de base estimé sera supérieur au taux de base calculé.

a. Amplitude estimée en fonction du jour du cycle (fig. 29).

Cette figure est tout à fait en accord avec la figure représentant l'amplitude (calculée) en fonction du jour du cycle.

Il semble donc que, au fur et à mesure que l'on avance dans le cycle à partir du jour 0 jusqu'au jour +8, l'amplitude des pulses augmente pour diminuer après le jour +8.

b. Evolution du temps de demi-vie en fonction du jour du cycle (fig. 30).

L'étude de cette figure nous montre que le $t_{\frac{1}{2}}$ ne semble pas varier au cours du cycle. Nous obtenons des temps de demi-vie aussi bien élevés que bas en début, en mi ou en fin de cycle.

Fig. 29

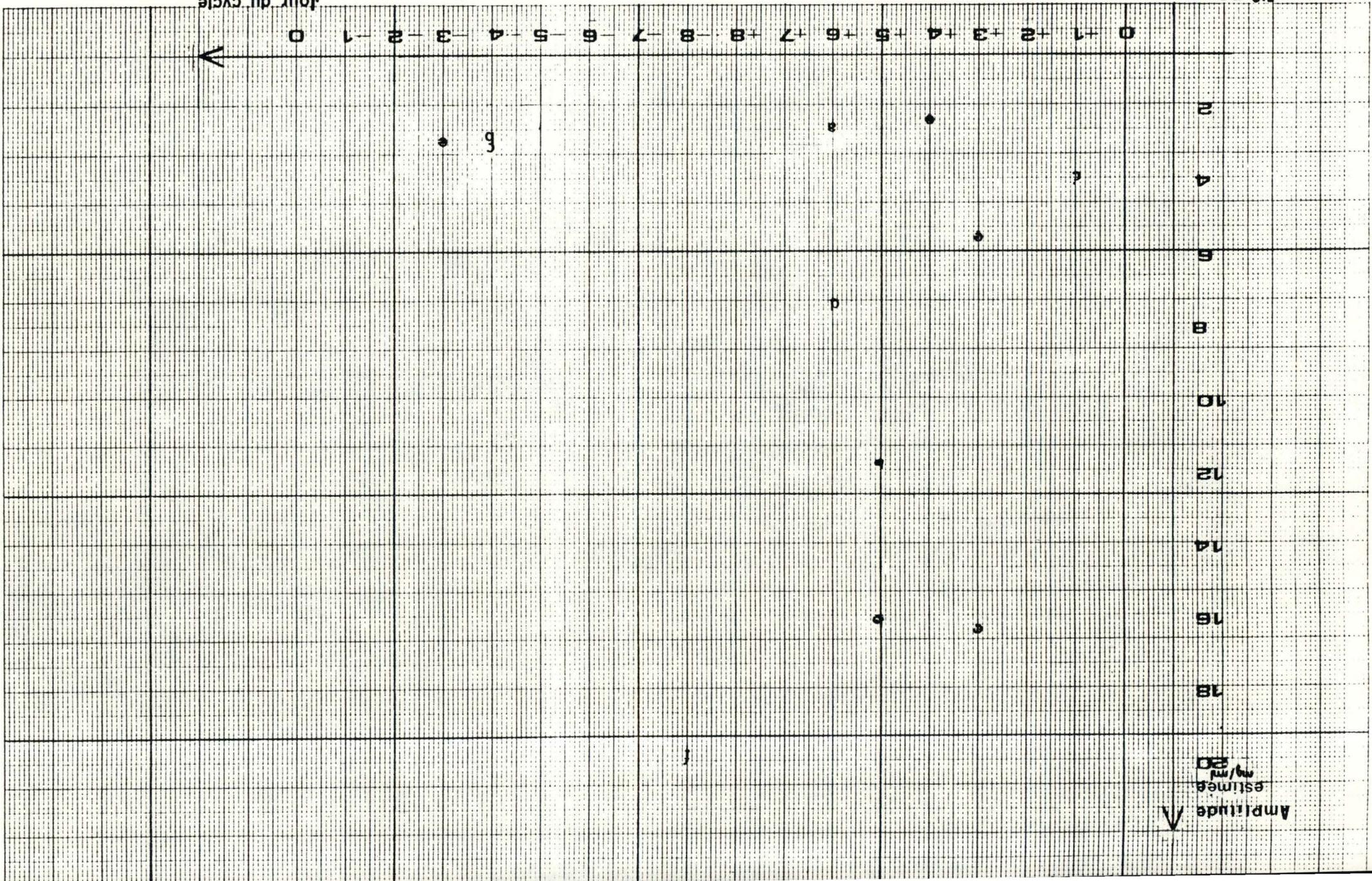
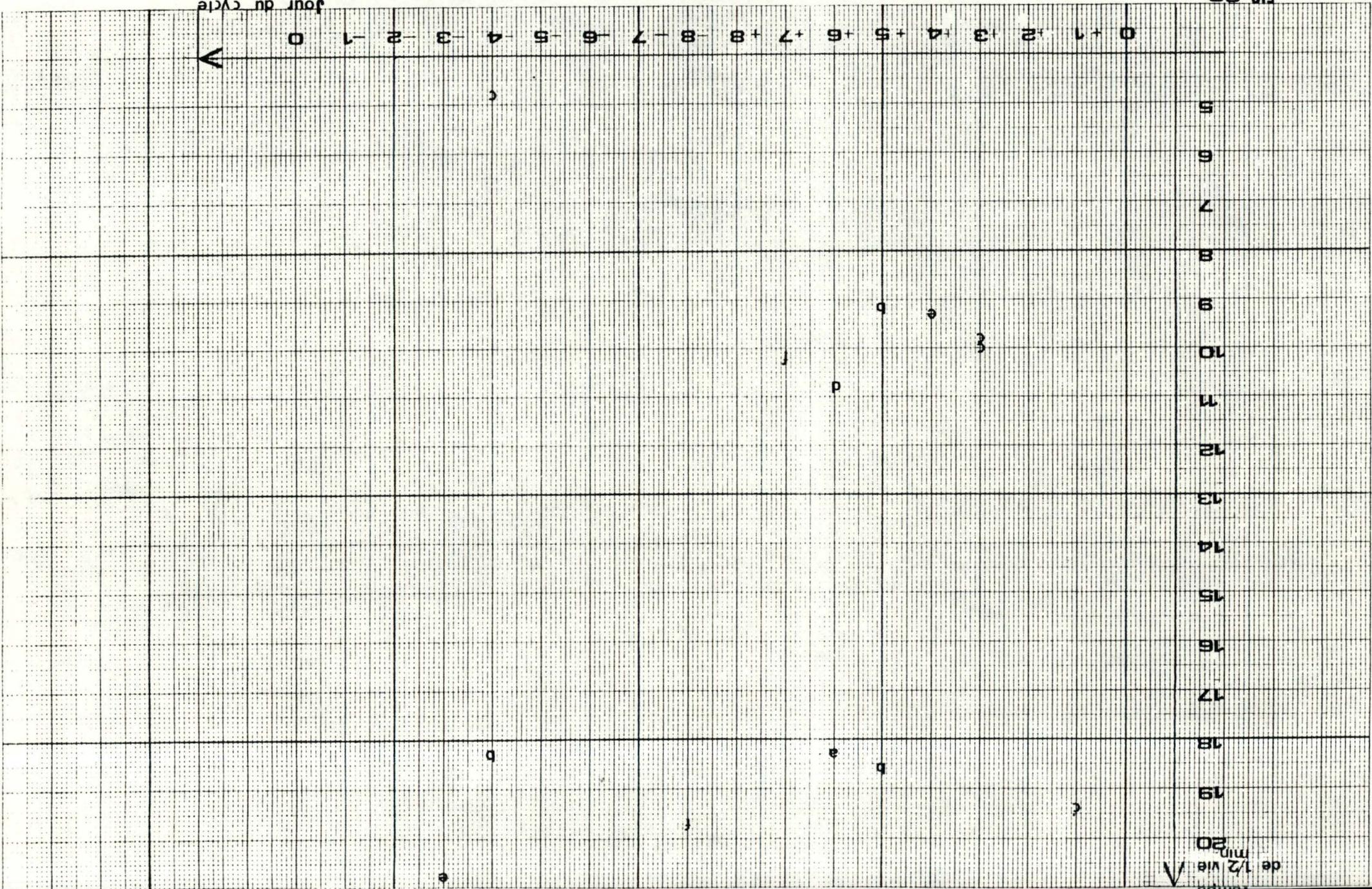


FIG. 30



de 1/2 vie
de min 20

IV. Discussion.

A. Profil hormonal de la LH.

Le profil hormonal que nous avons enregistré est celui décrit par un grand nombre d'auteurs:

- une émission tonique qui est le résultat d'une sécrétion pulsatile autour d'un niveau de base;
- une décharge cyclique de LH, dite préovulatoire, de très courte durée et de grande amplitude.

1. Emission tonique.

a. Taux de base.

Les valeurs de taux de base que nous avons enregistrées présentent de faibles variations individuelles entre les animaux. Il est de 1,23 ng/ml chez la brebis 211 de 1,83 chez la brebis 86.

Bien que ces valeurs soient assez basses par rapport à celles données par certains auteurs (Thibier, 1981, observe un taux de base de 3 à 5 ng/ml, Bister, 1980 de 5 ng/ml), elles se trouvent dans la norme de celles données par d'autres. Foster et al, 1974, décrivent un taux inférieur à 1 ng/ml; Pelletier et Thimonier, 1969, donnent une valeur de 2 ng/ml.

En fait, c'est entre les taux de 1 à 5 ng/ml que se situent les résultats de la plupart des auteurs (Baird et al, 1976; Nett et al, 1974; Pelletier et Thimonier, 1969).

Il faut aussi noter que le dosage R.I.A. 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.

En phase préovulatoire (J -2 et J -1), nous avons observé une légère augmentation du taux basal de LH et cette augmentation correspond à une fréquence de pulses plus élevée. En effet, le jour -2, nous observons 9 pulses chez la brebis 86 et 9 pulses

chez la brebis 115 au jour -1. Cela confirme la théorie de certains chercheurs (Baird et Neilly, 1981; Hauger et al, 1977; Legan et Karsch, 1977). Cependant, d'autres auteurs n'observent pas cette élévation du taux basal en phase préovulatoire (Bindon et al, 1979; Pelletier et Thimonier, 1969).

En phase postovulatoire, nous n'avons pas observé de variations du taux de base contrairement à Baird et Neilly (1981), Hauger et al (1977) et Legan et Karsch (1977).

b. Pulse.

Les variations des concentrations de LH dans le plasma sont dues à des sécrétions répétées de LH par l'hypophyse. Les mécanismes régulant de telles décharges pulsatiles ne sont pas encore connus.

Il est raisonnable de suggérer que cette émission peut être due à une stimulation pulsatile de l'hypophyse par la LHRH. Depuis que l'on a démontré que la LHRH fluctuait dans le sang porte-hypophysaire d'un singe ovariectomisé, diverses études ont montré que le pulse de LH résulte d'une sécrétion épisodique de GnRH par l'hypothalamus (Rasmussen et Malven, 1982) et que des injections de GnRH de manière non pulsatile ne provoquent pas de pulses de LH (Rahe et al, 1980).

b₁. Fréquence.

Tous les auteurs s'accordent pour affirmer que la fréquence des pulses de LH change au cours du cycle (Thibier, 1981; Baird et coll, 1976; Rahe et coll, 1980).

En phase folliculaire (J -2 à J +2), nous avons enregistré une moyenne de 7,4 pulses par 10 heures tandis qu'en phase lutéale (J +6 à J -6), nous avons une fréquence de 4,33 par 10 heures. La fréquence de nos pulses diminue de moitié quand on passe de la phase folliculaire à la phase lutéale.

Ces deux valeurs se trouvent dans la norme des valeurs donnée par les différents auteurs. Yuthasastrakosoll et coll (1977) observent que le nombre de pulses par 24 heures est de

l'ordre de 16,2, trois jours avant ou après les chaleurs, pour un seul par 24 heures en phase lutéale. Baird (1978) observe que la fréquence de ces pulses est de 1 par heure en phase folliculaire et seulement de 1 par 3 heures 33 en phase lutéale. Rahe et al (1980) notent que le nombre de pulses est de 20 à 30 par 24 heures en phase folliculaire pour 6 à 8 par 24 heures en phase lutéale, mais chez la vache.

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) note que divers paramètres encore mal appréciés (facteurs génétiques et de milieu, race, latitude, etc..) sont également capables d'interférer avec cette fréquence.

Pour la plupart des auteurs, les modifications de fréquence sont à mettre en relation avec la variation des concentrations en progestérone au cours du cycle. Lors de la phase folliculaire, lorsque les taux de progestérone sont les plus bas, la fréquence des pulses est élevée et en phase lutéale, lorsque les taux de progestérone sont les plus élevés, le nombre de pulses est minimum (Yuthasatrakosoll et coll, 1977; Baird, 1978). Notre corrélation négative entre la concentration en progestérone et la fréquence va aussi dans ce sens mais est malheureusement non significative: un plus grand nombre de données nous aurait peut-être confirmé ce point.

Wheaton et Mullet (1983), Pant et Ward (1973) et Wright et al (1978) montrent que la progestérone diminue la fréquence des cycles en réduisant la sensibilité de l'hypophyse à la LHRL. Reeves et al (1971) ont montré aussi que l'hypophyse était moins sensible à la LHRH pendant la phase lutéale.

b₂. Amplitude.

Les pulses que nous observons ont une amplitude moyenne de 2,15 ng/ml en début et en fin de cycle (J -2 à J +2) et de 7,65 ng/ml à mi-cycle (J -6 à J +6).

Nos résultats confirment les valeurs obtenues par les différents auteurs. Rahe et al (1980) observent une amplitude moyenne de 0,3 à 1,3 ng/ml, en début et en fin de cycle, et de 1,2 à 7 ng/ml à mi-cycle. Bien que l'amplitude moyenne que nous observons en fin de cycle soit légèrement supérieure à celle donnée par Rahe et al (1980), elle se trouve dans les normes d'amplitude données par Thiber (1980).

Il est facile d'expliquer les différences obtenues par les différents auteurs : le moment où sont effectuées les prises de sang influence très fortement l'amplitude, comme nous l'avons démontré lorsque nous avons comparé l'amplitude mesurée et estimée (tableau 12).

Toutefois, il apparaît après la lecture des articles que ce n'est pas la valeur absolue d'amplitude qui est importante, mais plutôt le profil des concentrations en LH au cours du cycle et nos profils d'amplitude, aussi bien mesurés qu'estimés, sont en accord avec tous les auteurs.

L'étude de la relation entre le taux de base et l'amplitude nous a donné une corrélation négative non significative. Il est probable que si nous avions eu plus de données, nous aurions obtenu le même résultat car, dans la littérature, il n'est fait nulle part allusion à une relation existant entre l'amplitude des pulses et le taux de base. Parfois cependant, un taux de base élevé est le reflet d'une amplitude plus importante des décharges pulsatiles, mais ce fait n'est remarqué que lorsque l'échantillonnage est réalisé à de grands intervalles de temps.

Goodman et al (1980) notent que les variations d'amplitude au cours du cycle sont à mettre en relation avec la concentration en oestrogènes. Ces auteurs montrent, après expérience sur animaux ovariectomisés, que les oestrogènes et spécialement l'oestradiol 17.β réduisent l'amplitude des pulses. En phase folliculaire, l'oestradiol limiterait l'élévation des concentrations de LH qui résulte du retrait de la progestérone et, en phase lutéale, l'oestradiol, en plus de supprimer l'émission tonique

de LH, rehausse les effets inhibiteurs de la progestérone (Goodman et al, 1980). La relation inverse existant entre l'amplitude et la fréquence des pulses s'explique d'elle même, puisque les oestrogènes sont surtout sécrétés en phase folliculaire (moment du cycle où nous avons enregistré une amplitude basse) et la progestérone en phase lutéale (lorsque nous enregistrons la fréquence la plus basse).

c. Autres fluctuations.
.....

En plus des pulses, nous avons observé de petites fluctuations d'amplitude inférieures à 1 ng/ml.

Rahe et al (1983) considèrent ces fluctuations comme des pulses mais, pour les autres auteurs, ces fluctuations ne sont pas des pulses.

Nous observons ces variations de base surtout lorsque la fréquence des pulses est faible.

Ces fluctuations n'étant pas dues à la précision du dosage, car elles sont bien régulières, ne pourrait-on pas émettre l'hypothèse qu'elles sont dues à une sécrétion de LH non précédée d'une émission de GnRH hypothalamique?

d. Temps de demi-vie.
.....

Le temps de demi-vie des pulses que nous avons enregistré (13,25 min. \pm 5,64) est inférieur à celui décrit par Bister en 1980 (22,4 min. \pm 8,8).

Nous avons mesuré nos temps de demi-vie en oestrus, tandis que Bister (1980), en anoestrus où les pulses sont moins fréquents. Ce qui voudrait dire que des temps de demi-vie plus courts autoriseraient une plus grande fréquence des pulses?

Cependant, lorsque nous regardons nos résultats, le jour +7 chez la brebis 239 où nous n'avons qu'un pulse, son $t_{\frac{1}{2}}$ est de 10,02 min. Et le jour +1, chez la brebis 91 où le nombre de pulses est élevé (10 pulses), notre $t_{\frac{1}{2}}$ est de 19,31.

La fonction $y(t)$ servant à estimer le pulse est la même que celle utilisée par Bister en 1980.

La différence s'explique, soit par des variations individuelles, ou peut être par le fait que nous n'avions pas assez de points pour estimer le pulse.

2. Emission cyclique.

Dans la même condition expérimentale, c'est-à-dire une prise de sang par jour, la valeur maximum du pic enregistrée chez la brebis 18 atteint 66,68 ng/ml, alors qu'elle n'est que de 45,80 chez la brebis 115, de 12,10 chez la brebis 86 et de 11,80 chez la brebis 91.

Ces différences peuvent être dues à la brièveté de la décharge ovulante. En effet, comme nous ne faisons qu'une prise de sang par jour, nous avons une probabilité de ne pas enregistrer le pic, vu que sa durée est de 8 à 20 heures (Land et al, 1973; Pelletier et al, 1977), mais des variations individuelles ne sont pas à exclure.

Il faut cependant noter que le taux de 66,68 ng/ml concorde avec les valeurs de la littérature où l'on relève des valeurs se situant fréquemment entre 50 et 150 ng/ml. Niswender et al, (1968), Pelletier et al (1968, 1977) et Bister (1980) enregistrent des niveaux de l'ordre de 200 ng/ml chez la brebis Texel, niveaux que nous n'avons pas relevés et que nous aurions eu de faibles chances d'enregistrer s'ils avaient existé. (v. 14)

Bien que la détection du comportement d'oestrus concorde avec le jour de la décharge de LH chez les brebis 86, 91 et 115, il n'en est pas de même pour les brebis 18, 211 et 239 : pour ces dernières, la détection a lieu le lendemain. Cela s'explique aisément : en effet, comme nous n'avons fait qu'une prise de sang par jour, nous ne surveillons les brebis que pendant environ 15 minutes, soit le temps nécessaire à la prise et à la centrifugation du sang. Il se peut très bien qu'après notre départ, le bélier détecte le comportement d'oestrus et, comme nous ne revenons que le lendemain, nous relevons ce comportement avec un jour de retard. *mais comport^t décelé au² delay*

Wheatley et Radford (1969) montrent que le pic de LH se produit 19,9 heures avant la fin de l'oestrus et 25,7 heures avant l'ovulation. Mais dans la plupart des cas, la décharge de LH débute entre 0 et 10 heures après le comportement d'oestrus.

B. Profil hormonal de la progestérone.

Notre profil des concentrations en progestérone correspond en tous points à celui décrit par les différents auteurs, si ce n'est des valeurs un peu plus faibles en phase lutéale, mais des variations individuelles ne sont pas à exclure.

Ce profil nous a satisfait en ce qui concerne la détermination du jour 0 et il nous a même permis de déterminer ce jour chez la brebis 239 pour laquelle nous n'avions pas enregistré de pic de LH.

Nous avons dosé la progestérone une seule fois par jour, car elle ne présente pratiquement pas de variation quotidienne.

La chute de progestérone que nous observons vers les jours -3, -2 contribue à élever la taux d'oestradiol en augmentant la sécrétion tonique de LH ainsi que la réponse du follicule à cette élévation de LH (Goodman et al, 1980) en lui faisant acquérir une plus grande disponibilité vis à vis des pulses (Baird et Mc Neilly, 1981).

C. Résumé et conclusions.

Notre but est de décrire le profil de concentration en progestérone et en LH au cours du cycle de la brebis Texel.

Pour cela, pendant une période correspondant à un cycle, nous avons réalisé une prise de sang par jour chez six brebis de race texel afin de donner une évolution générale des concentrations en progestérone et en LH.

Nous avons effectué des prises de sang tous les quarts d'heure pendant dix heures à quatre moments différents du cycle, afin de décrire de manière plus précise l'émission de LH.

Le profil de la progestérone est caractérisé par une émission faible pendant la période préovulatoire; elle augmente

progressivement vers les jours +1, +2 du cycle, pour atteindre un plateau en phase lutéale. Ce taux diminue brutalement à partir des jours -3, -2, pour atteindre son minimum le jour 0.

Le profil de la LH est caractérisé par un pic important en oestrus (émission cyclique), et pour le reste par une émission basale montrant des variations appelées pulses (émission tonique).

Nous avons analysé trois aspects de l'émission tonique :

- le taux de base ne semble pas varier au cours du cycle, sauf peut-être une légère augmentation avant le pic préovulatoire;
- la fréquence varie au cours du cycle : le nombre de pulses est élevé avant et après le pic préovulatoire, et est minimum le jour +7 du cycle, c'est-à-dire en phase lutéale;
- l'amplitude varie aussi au cours du cycle, mais de manière inverse à la fréquence : elle est minimum avant et après le pic préovulatoire, et est maximum le jour +7.

L'étude des relations entre ces trois caractéristiques nous a montré qu'il existait une corrélation négative entre la fréquence et l'amplitude. Parmi les relations étudiées, c'est la seule qui est significative.

la nymphéale

BIBLIOGRAPHIE.

ASCOLI M., LIDDLE R.A. and PUETT D.

Molecular and cellular endocrinology, 1975, 3, 21-36.

ANDREWS W.W. and OJEDA S.R.

Endocrinology, 1981, 109 (n° 6), 2031-2039.

BAIRD D.T.

Biology of reproduction, 1978, 18, 159-164.

BAIRD D.T., LAND R.B., SCARAMUZZI R.J., WHEELER A.G.

J. Endocr., 1976, 69, 275-286.

BAIRD D.T., SWANSON I., SCARAMUZZI R.J.

Endocrinology, 1976, 98, 1970.

BAIRD D.T., SWANSON I., MAC NEILLY A.S.

Biol. of reprod. 1981, 24, 1013-1025.

BAIRD D.T. et MAC NEILLY A.S.

Journal of reproduction and fertility, 1981, 30, 113-119.

BARON G., TERTIN C., JUTISZ M.

Cr. Acad. Sci., Paris, 1967, série D, 265-2058.

BINDON B.M., BLANC M.R., PELLETIER J., TERQUI M., THIMONIER J.

J. Reproduc., Fertil., 1979, 55, 15-25.

BISTER J.L.

Thèse 1980.

BISTER J.L., PAQUAY R.

Archives internationales de Physiologie et de Biochimie, 90 (5),
101-102.

BRAND and DE JONG W.H.R.

J. Reproduc. Fert., 1973, 33, 431-439.

BRINKLEY H.J.

Biology of reproduction, 1981, 24, 22-43.

CAHILL L.P., DUFOUR J.

An. Biol. anim., 1979, 19, (5), 1475-1481.

CAHILL L.P., MARIANA J.C., MAULEON P.

J. Reproduc. Fertil., 1979, 55, 27-36.

CAMPBELL H.J., FEVER G. et HARRIS G.W.

J. Physiol., 1964, 170, 474-486.

CHAKRABORTY P.K., STORMSHAK F.

J. Reproduc. Fertil., 1976, 48, 431-432.

CLEMENS J.A., TINSLEY F.C. and GULLER R.W.

Acta endocrinologica, 1977, 85 (n°1), 18-24.

COURRIER P., GUILLEMEIN R., JUTISZ K., SAKY E., et ASCHEIM P.

Cr. Acad., Sc., 1961, 253, 922-927.

CUMMING I.A., BROWN J.M., BLOCKLEY M.A. de B., GODING J.R.

J. Reprod. Fert., 24, 148-149.

DENAMUR R.

J. Reprod. Fert., 1974, 38, 251-259.

DENAMUR R., MARTINET J., SHORT R.V.

J. Reprod. Fert., 1973, 32, 207.

DEN HOLLANDER F.C., SCHURSOS H.

Kirkham K.E., Hunter W.N., 1971.

DERIVAUX J., ECTORS F., HENDRICK J.C., FRANCHIMONT P.
Ann. End., 1974, 35, 614-621.

ECTORS F., HENDRICK J.C., FRANCHIMONT P., DERIVAUX J.
Ann. Endocr., 1974, 35, 489-497.

FEYTMANS.

Statistiques 2nd candidature, 1980.

FOSTER J.P., HOLLAND D.T., JEFFCOATE S.L., CRIHTON D.B.
J. Endocr., 1974, 61, LXIII Abstr.

FLAMMENT, DURAND J.

Ann. Soc. Roy. Scie. Med. Nat., 1966, 19, 5-119.

FOSTER D.L. and RYAN K.D.

J. Reprod. Fert., 1981, 63, 239-294.

GENGENBACH D.R., HIXON J.E., HANSEL W.

Biol. Reprod., 1977, 16, 571-579.

GODING J.R.

J. Reprod. FAT., 1974, 38, 261-279.

GODING et al.

Endocr., 1969, 85, 133-142.

GOLBERG V.J., RAMWELL P.W.

Physiol Rev., 1975, 55, 325-351.

GOODMAN R.L., BITTMAN E.L., FOSTER D.L. and KARSCH F.

J. Endocrinol., 1981, 109 (5), 1414-1417.

GOODMAN R.L., KARSCH F.J.

Endocrinol., 1980, 107, 1286.

GOODMAN R.L., and KNOBIL E.
Neuroendocrinol., 1981, 32, 57-63.

GREENWOOD F.C., HUNTER W.M., GLOVERS.
Bioch.1., 1963, 89, 114-121.

GUILLEMIN R.
J. Physiol., 1963, 55, 7-44.

HAUGER R.L., KARSCH F.J. et FOSTER D.L.
Endocrinol., 1977, 101, 807-817.

HAMMOND J.
J. Endocrinol., 1945, 4, 169.

HIXON J.E., GENGENBACH D.R., HANSEL W.
Seventh. Ann. Meet. of Soc. for the study of reprod.
Ottawa, 1974, Abstr. 9.

HENDERSON K.M., MC NATTY K.P.
Prostagl., 1975, 9, 1979.

HOLWEG W., JUNKMANN K.
Pflüg. Arch. ges. Physiol., 1933, 232, 148-158.

HUNTER W.N. et GREENWOOD F.C.
Nature, 1962, 194, 495-496.

IRELAND J.J. and ROCHE J.F.
J. Reprod. Fert., 1982, 64, 295-302.

KARSCH F.J., FOSTER D.L., LEGAN S.J., RYAN K.D., PETER G.K.
Endocrinology, 1979, 105, 421-426.

KARSCH F.J., LEGAN S.J., HAUGER R.L. and FOSTER D.L., 1977.
Endocrinology, 1977, 101, 800-806.

KARSCH F.J., LEGAN J.J.

J. Biology of reproduction, 1980, 23, 404-413.

KRUIP T.A.M., BRAND A.

Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 1975, 15, 191-204.

LAND B., PELLETIER J., THIMONIER J., MAULEON P.

J. Endocr., 1973, 58, 305-317.

LEBLANC P., PATTOU E., L'HERITIER A., GOGAN F., SLAMA A., KORDON C.

Neuroendocrinology, 1983, 36, 88-94.

LEGAN S.J., KARSCH F.J.

Biol. Reprod., 1979, 20, 74-85.

LEGAN S.J., KARSCH F.J.

Biol. Reprod., 1979, 20, 74-85.

LEGAN S.J., KARSCH F.J., FOSTER D.L.

Endocr., 1977, 101, 818-824.

LINCOLN G.A., PEET M.J. and CUNNINGHAM R.A.

J. Endocr., 1977, 72, 337-349.

LIPNER H.

Handbook of Physiology VII, Endocr. II, Female reprod. Syst. Part.I,

1973, 18, 409-437.

MAC CANN S.M.

Amer. J. Physiol., 1962, 202, 610-604.

MAC CANN S.M., TALEISNICK S.

Amer. J. Physiol., 1960, 199, 847-850.

MAC NATTY K.P., GIBB M., DORSON L. and THURLEY D.C.
J. Endocr., 1981a, 90, 375-385.

MAC NATTY K.P., THURLEY D.C.
New Zealand J. Agric. Res., 1974, 17, 309.

MAC NATTY K.P., SOMERS R.S.
J. Endocr., 1975, 66, 391-400.

MAC NATTY K.P., REVFEIM K.J.A., YOUNG A.
J. Endocr., 1973, 58, 219-225.

MARTIN G.B., SCARAMUZZI R.J. and HENSTRIDGE J.D.
J. Endocr., 1983, 86, 181-193.

MIDGLEY A.R., GAY V.L., GALICARIS L.C.S., REBAR R.W., MONROE S.E.,
NISWENDER C.D.
Gonadotropins, 1968, 307.

NETT T.M., AKBAR A.M., NISWENDER G.P.
Endocr., 1974, 94, 713.

NIKOTOVITCH-WINER M.B.
Endocrinology, 76, 350-358.

NISWENDER C.D., REICHERT L.E., MIDGLEY A.R., NALBANDOV R.V.
Endocrinology, 1969, 84, 1166-1173.

PAPKOFF H.
Greenwood F.C. and Margoulies M., Amsterdam, 1971.

PARLOW A.F.
Feder. Proc., 1958, 17, 341-346.

PELLETIER J.

Acta Endocr., 1975, 78, 435.

PELLETIER J. and THIMONIER J.

Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 1975, 15, 131-146.

PELLETIER J., ORTAVANT R.

Coll. intern. C.N.R.S. Montpellier.

PELLETIER J., GARNIER D.H., DE REVIERS M.M., TERQUI M. and ORTAVANT R.

J. Reprod. Fert., 1982, 64, 341-346.

PELLETIER J., KANN G., DOLAIS J., ROSSELIN G.

C.R. Acad. Sci., 1968, Série D, 266, 2291-2294.

PELLETIER J., SIGNORET J.P., CAHILL L., COGNIE Y., THIMONIER J.,
ORTAVANT R.

Management reprod. in sheep and goats symp., Wisconsin, july 1977.

PELLETIER J., THIMONIER J.

C.R. Acad. Sci., 1969, 268, 573-576.

PLATT T.E., FOSTER G.S., TARNAVSKY G.K., REEVES J.J.

J. of animal Science, 1983, 56.(5), 1180-1185.

RAHE C.H., OWENS R.E., FLEEGER J.L., NEWTON H.J. and HARMS P.G.

Endocrinology, 1980, 107 (2), 498-503.

RASMUSSEN D.D., MALVEN P.V.

Neuroendocrinology, 1982, 34, 415-420.

REEVES J.J., TARNAVSKY G.K., CHAKRABORTY P.K.

J. Anim. Sci., 1974, 38, 364-373.

SCARAMUZZI R.J., BAIRD D.T.
Endocrinology, 1977, 101, 1801-1806.

SMEATON T.C., ROBERTSON H.A.
J. Reprod. Fert., 1971, 25, 243-252.

STRICKLER R.C.
Obstetrics gynecology, 1977, 50 (3), 340-346.

SZENTAGOTHAJ J., FLERKO B., MESS B., MALASZ B.
Akade. Kiado, Budapest, 1968.

TERQUI M., DRAY F., GOTTA J.
C.R. Acad. Sc., Paris, 1973, 277 (D), 1595-1798.

THIBIER M.
Rec. Méd. vét., 1981, 157, 15-28.

THIMONIER J, PELLETIER J.
Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys., 1971, II, 559-567.

TURNBALL K.E., BRADEN A.M.H., MATTNER P.E.
Aust. J. Sci., 1977, 30, 229-241.

WALKER R.F.
J. Endocr., 1983, 98, 7-17.

WATKINS B.E., MAC KAY D.W., MEITES J. and RIEGLE G.D.
Neuroendocrinology, 1975, 19, 331-338.

WHEATLEY I.S. and RADFORD H.M.
J. Reprod. Fert., 1969, 19, 211-214.

WIDE L.
Acta Endocr., 1969, 142, 207.

WIDE L., ROOS P., GEMZELL C.A.
Acta Endocr., 1961, 37, 445-449.

WRIGHT P.J., GEYTENBEEK P.E., CLARKE I.J. and FINDLAY J.K.
J. Reprod. Fert., 1981, 61, 97-102.

WRIGHT P.J., GEYTENBEEK P.E., CLARKE I.J. and FINDLAY J.K.
J. Reprod. Fert., 1983, 67, 257-262.

WRIGTH P.J., STELMASIAK T and ANDERSON G.A.
J. Reprod. Fert., 1983, 67, 197-202.

YOCHINAGA K.
Handbook of Physiol. VII, Endocrin. II, Female reproductive system,
part I, 1973, 15, 363-388.

YUTHASASTROKOSOL P., PALMER W.H. et HOWLAND B.P.
J. Reprod Fert., 1977, 50, 319-321.
