

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

UMR INRA-CNRS-Université de Tours

Physiologie de la Reproduction et des Comportements

THÈSE présentée par : Jean-Baptiste MENASSOL

soutenue le : 12 Juillet 2013

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie

Interactions entre facteurs photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction des ovins

THÈSE dirigée par :

Mr MALPAUX Benoît

Directeur de Recherche, INRA de Tours

RAPPORTEURS :

Mr BOCQUIER François

Mr MARTIN Graeme

Professeur, Montpellier SupAgro

Professeur, The University of Western Australia

JURY :

Mme DUITTOZ Anne

Mr BOCQUIER François

Mr CHALLET Etienne

Mr MALPAUX Benoît

Mr MARTIN Graeme

Mr ZARAZAGA Luís

Professeur, Université de Tours

Professeur, Montpellier SupAgro

Directeur de Recherche, CNRS de Strasbourg

Directeur de Recherche, INRA de Tours

Professeur, The University of Western Australia

Chargé de Recherche, Universidad de Huelva

MEMBRE INVITE :

Mr SCARAMUZZI Rex John

Professeur, Royal Veterinary College, University of London

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été financés par une chaire d'excellence du programme européen Marie-Curie attribuée au professeur Rex J. Scaramuzzi ainsi que par le département « Physiologie Animale et Systèmes d'Elevage » de l'INRA. Afin de réaliser ces travaux, j'ai bénéficié d'une bourse d'étude du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je remercie chaleureusement les rapporteurs de ces travaux MM François Bocquier et Graeme Martin, ainsi que les membres du jury Mme Anne Duittoz, MM Etienne Challet et Luis Zarazaga.

Je veux exprimer toute ma gratitude à MM Benoît Malpaux et Rex J. Scaramuzzi, directeurs de cette thèse, pour la confiance qu'ils m'ont accordé dans l'entreprise de ces travaux, pour leur soutien indéfectible, leurs conseils avisés et leur accompagnement jusqu'à la soutenance de thèse. Thank you so much Rex for giving me the opportunity to study for a PhD, for your guidance, your support and your contribution in the quality of my work. I also wish to thank you for having shared your vision of research and its perspectives of evolution with me. Merci Benoît pour m'avoir, lors des étapes critiques, toujours donné le cap et ne pas avoir hésité à me donner un coup de main pour les prélèvements de nuit !

Cette thèse est le prolongement logique d'une trajectoire amorcée en école d'ingénieur et mes premiers stages de recherche à l'INRA de Theix puis à l'INRA de Tours. Mr François Bocquier, professeur et directeur du département « Milieux, Productions, Ressources et Systèmes » de Montpellier SupAgro, a été un acteur essentiel de cette trajectoire. Dans les différentes étapes de ce parcours, il s'est investi professionnellement et personnellement en me témoignant toujours de son soutien. Qu'il puisse trouver dans ces quelques lignes l'expression de ma profonde reconnaissance. J'en profite également pour remercier Mme Nathalie Debus, chercheuse de l'UMR « Systèmes d'Elevage Méditerranéens et Tropicaux », pour l'aide qu'elle m'a régulièrement apportée notamment lors de l'élaboration – conjointement avec Mr François Bocquier – du protocole de restriction alimentaire, véritable pierre angulaire de ces travaux de thèse.

Je remercie vivement Mme Joëlle Dupont, chercheuse de l'UMR « Physiologie de la Reproduction et des Comportements », pour m'avoir guidé et soutenu matériellement dans le domaine de la biologie moléculaire et m'avoir également témoigné de son soutien. De la même manière je remercie Mr Daniel Guillaume, chercheur de l'UMR PRC, notamment pour

la mise au point du dosage radioactif de l'insuline chez les ovins. C'est également à toi que je dois les séances de barbier pour brebis !

Que MM Alain Caraty et Jean-Claude Thierry chercheurs de l'UMR PRC, trouvent ici l'expression de mes sentiments les plus sincères pour les différents entretiens informels qu'ils ont bien voulu m'accorder tout au long de la réalisation de ces travaux de thèse. Je remercie pareillement Mlle Laurence Dufourny, chercheuse de l'UMR PRC, pour les dissections d'encéphales ovins. Ta bonne humeur a rendu agréables ces heures passées en chambre froide. Enfin je tiens à remercier Mme Juliette Cognié, vétérinaire de la PRC, pour ses interventions chirurgicales sur les brebis.

Ces travaux de thèse ont mobilisé quotidiennement de nombreux acteurs que je tiens à remercier tout particulièrement.

J'exprime ainsi mes remerciements les plus respectueux envers Mme Armelle Collet ainsi que MM Didier Chesneau, Didier Lomet et Vincent Robert, techniciens excellents ! Merci Armelle pour toute l'aide que tu m'as apporté, pour les longues heures à coller des étiquettes, à numéroter/centrifuger/récolter/ranger/pipeter des tubes. Merci Didier C. pour tout le savoir-faire que tu as mis au service de nos expérimentations, notamment lors de la réalisation des dosages radioactifs. Merci à toi également Didier L. pour ton aide lors de la réalisation pratique des expérimentations sur les brebis du bâtiment conditionné, notamment pour les injections i.c.v. en obscurité constante. Merci à toi enfin Vincent, toujours volontaire pour les prélèvements de nuit.

Ces remerciements visent également l'ensemble du personnel de « l'Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfrasière » à savoir Mmes Christelle Audouin, Elodie Guettier et Frédérique Lantoine ainsi que MM Cyril Blanchet, Damien Capo, Pascal Chevreau, François Douady, Didier Dubreuil, Francis Dupont, Michel Neveu, Lionel Ouvrard, Régis Petit et Jean-Claude Vieuge. Leur savoir-faire et leur réactivité ont garanti des conditions d'élevage optimales et des conditions expérimentales d'un tout premier ordre.

Je remercie pareillement l'équipe de l'Hôpital-abattoir expérimental de l'UMR PRC à savoir MM Albert Arnould, Jean-Philippe Dubois, Gilles Gomot, Christian Moussu, Luc Perrigouard et Jean-Paul Petit. Votre savoir-faire a permis des interventions chirurgicales optimales et votre bonne humeur a rendu ces moments des plus agréables. Merci de m'avoir invité au nettoyage à grandes eaux de l'abattoir !

Ma gratitude va également au personnel du Laboratoire des Dosages Hormonaux de l'UMR PRC, Mmes Patricia Drane, Chantal Flon, Corinne Laclie et Anne-Lyse Laine. Je vous suis reconnaissant pour votre professionnalisme, votre disponibilité et vos bons sentiments à mon égard.

Je remercie enfin le personnel du Service d'Appui à la Recherche, le personnel de la laverie et particulièrement Mme Barbara Corbière ainsi que le personnel de l'atelier de la PRC pour la confection de nombreux outils dédiés à nos expérimentations dont le système d'alimentation individuel du Lazaret.

J'ai eu le plaisir d'encadrer deux stagiaires sur le long terme au cours de ces travaux de thèse. Mlle Claire Tautou, avec laquelle nous avons réalisé les travaux sur l'implication du système AMPK dans le contrôle du rythme de sécrétion de mélatonine. Mr Laurent Oujagir, avec lequel nous avons vérifié les effets de la nutrition sur le rythme endogène de sécrétion de mélatonine ainsi que les effets de la nutrition sur la réponse à un effet mâle. Vous avez été tous les deux des stagiaires très volontaires, particulièrement impliqués dans les protocoles expérimentaux et d'une très bonne composition. Je vous remercie d'avoir permis de repousser les limites pratiques des expérimentations et suis sincèrement heureux d'avoir travaillé avec vous.

J'adresse mes plus sincères remerciements et sentiments dévoués d'amitié à Mlle Sandrine Fréret, ingénieur de recherche à l'UMR PRC. Ne vous fiez pas à la physionomie de Mamie, elle a été un véritable pilier dans la réalisation de cette thèse. Merci pour ton aide dans les luttes statisticiennes et m'avoir presque soutenu quand j'ai voulu apprendre le langage R (quelle idée). Merci également pour ton aide dans la réalisation pratique des expérimentations. Le seul moment où le « pilier » mamie s'est fragilisé est d'ailleurs dû à la charge implacable d'une brebis restreinte. Promis je ne parlerai pas des moments de « chouine » si tu ne parles pas du coca, des bouchons, du spray marqueur pour brebis et du tuyau d'arrosage de la bergerie. Je parlerai plutôt volontiers de tous ces moments de bonne humeur partagés autour d'une pause bien méritée. Merci pour ton amitié. De la même façon je remercie Mlle Alice Fatet, ingénieur de recherche à l'UMR PRC, pour son aide lors des expérimentations et pour le fond musical lors de la pose des étiquettes. Son alter égo Amice Futée s'est bien gardé de partis pris au cours des sempiternelles querelles « Junior-Mamie » et je lui en sais bon gré. Merci à toutes les deux.

L'environnement proche des thésards et post-doctorants a été particulièrement stimulant. Je remercie particulièrement toutes les filles du bureau Mlles Samia Ben Saïd, Stéphanie Chalivoix, Caroline Decourt, Séverine Devavry et Marie-Emilie Sebert ainsi que Mlle Audrey Chanvallon. Merci pour votre aide lors de la réalisation des expérimentations, pour vos fonds d'écrans horribles et pour les discussions lors de la pause-café. Merci de m'avoir toujours soutenu même quand je sentais fort le mouton. Un remerciement plein d'émotions pour Séverine et toutes les joies que nous avons partagées. Pour les fois où nous avons chouiné au-dessus de nos objets d'expérimentation et tous les moments où nous avons relâché la pression ensemble.

J'ai également une pensée pour toutes les personnes qui sont intervenues d'une façon ponctuelle lors de nos expérimentations, notamment lors des prélèvements sanguins en obscurité constante.

Résumé

Contexte de l'étude

Dans les systèmes d'élevages de petits ruminants, le développement de méthodes durables pour faire face aux contraintes de la saisonnalité de la reproduction nécessite une bonne compréhension des facteurs génétiques et environnementaux qui dirigent son expression. La nutrition est indiscutablement un de ces principaux facteurs. Relativement peu d'études ont identifié ses effets et mécanismes sous-jacents dans l'expression de la saisonnalité des petits ruminants et des techniques visant à contrôler ce caractère.

Considérant cela, ces travaux de thèse ont été engagés. Leur objectif final était de contribuer à définir la nutrition comme un levier majeur dans la maîtrise de la reproduction de systèmes d'élevages ovins durables. Au cours de ces travaux, l'étude des effets de la nutrition a été réalisée par le maintien à long terme des animaux dans deux états d'engraissement différents (faible vs. moyen).

Méthodes

Nos travaux se sont organisés en trois parties distinctes :

- Au cours de la première partie, nous avons mis en évidence des effets de l'état d'engraissement sur les profils saisonniers d'activité ovarienne des brebis Île-de-France et Mérinos d'Arles, ainsi que sur les profils saisonniers d'activité neuroendocrinienne des brebis Île-de-France.

- Au cours de la deuxième partie, en supposant que les effets de la nutrition pouvaient se transmettre sur l'activité de l'horloge circadienne principale, nous avons suivi le rythme endogène de sécrétion de mélatonine en fonction de l'état d'engraissement de brebis Île-de-France. De plus, l'injection centrale d'activateurs de l'Adénosine MonoPhosphate Kinase (AMPK) devait permettre de vérifier l'implication de cette enzyme dans la transmission des effets de la nutrition sur le rythme de sécrétion endogène de mélatonine chez cette même race.

- Au cours de la troisième partie, nous avons étudié les effets de l'état d'engraissement de brebis Île-de-France dans la variabilité de leur réponse à deux techniques visant à maîtriser la saisonnalité de leur reproduction : l'utilisation d'implants de mélatonine et l'effet mâle, tous deux réalisés en fin de saison d'anoestrus pour cette race.

Résultats

Première partie. Les résultats de ces travaux révèlent des traits caractéristiques des effets de l'état d'engraissement sur les profils saisonniers d'activité ovarienne des brebis, généralisable à l'ensemble de l'espèce. Ainsi l'état d'engraissement a un important effet modulateur du moment des transitions saisonnières reproductives mais n'affecte ni la période du rythme reproductif, ni la capacité des brebis à exprimer une saison de reproduction. Des effets similaires de l'état d'engraissement sont observés sur les profils saisonniers d'activité neuroendocrinienne des brebis Île-de-France, suggérant que la nutrition agit principalement au niveau central pour moduler la sensibilité de l'axe hypothalamo-hypophysaire au rétrocontrôle œstrogénique.

Deuxième partie. Les travaux abordant les effets de l'état d'engraissement ou de l'activation centrale de l'AMPK sur le rythme endogène de sécrétion de mélatonine, n'identifient pas l'horloge circadienne principale des noyaux suprachiasmatiques comme un lieu d'intégration de la nutrition. En revanche, ces travaux mettent en évidence un effet de l'état d'engraissement ainsi que de l'activation centrale de l'AMPK dans les noyaux paraventriculaires sur l'amplitude du rythme journalier et endogène de sécrétion de mélatonine chez la brebis.

Troisième partie. Aussi bien lors de l'utilisation d'implants de mélatonine que lors de la réalisation d'un effet mâle, l'état d'engraissement des brebis a eu un effet important dans la variabilité de leur réponse. Concernant les implants de mélatonine, cette variabilité tenait probablement à un défaut d'interprétation de la stimulation lorsque l'état d'engraissement des animaux descendait au-dessous d'un seuil critique. Quant à la réponse à l'effet mâle, la variabilité liée à l'état d'engraissement des brebis consistait essentiellement en une chute de l'intensité de la réponse hypophysaire et ovarienne associée à un faible état d'engraissement.

Conclusion

En conclusion, les effets statiques de la nutrition sont capables de moduler le moment des transitions saisonnières reproductives naturelles ou provoquées. L'implication de la chute de l'amplitude du rythme de sécrétion de mélatonine dans ce phénomène reste à démontrer. Le pilotage de l'état d'engraissement apparaît être un facteur majeur à considérer pour le développement de méthodes durables du contrôle de la saisonnalité et de l'amélioration des performances reproductives des systèmes d'élevage ovins.

Abstract

Background

In small ruminant breeding systems, the development of sustainable methods to manage the constraints of the seasonality of reproduction, requires an understanding of the genetic and environmental factors which shape its expression. Nutrition is one of these main factors. The effects of nutrition and its underlying mechanisms on the expression of seasonality and on the techniques to control seasonality are poorly understood.

Considering this, we have conducted a series of experiments; their main objective was to identify nutrition as a major and sustainable lever in the control of reproduction in sheep breeding systems. The effects of nutrition were studied by maintaining the animals in two different body conditions (low vs. medium), over a long period.

Methods

These experiments were organized in three distinct parts:

- In the first part, we analyzed the effects of body condition on the seasonal patterns of ovarian activity in the Île-de-France and Mérinos d'Arles breeds of sheep, as well as on the seasonal patterns of neuroendocrine activity in the Ile-de-France breed.

- In the second part, taking into consideration that the master circadian clock is a putative center for the integration of the effects of nutrition, we monitored and compared the endogenous rhythm of melatonin secretion in the Île-de-France breed, between nutritional groups. Furthermore, in order to determine the implication of the Adenosine MonoPhosphate-activated protein Kinase (AMPK) system in these effects of nutrition, we also performed intracerebroventricular injections of two AMPK activators and monitored the endogenous rhythm of melatonin secretion in the same breed.

- In the third part, we studied the effects of body condition on two techniques aimed at controlling the seasonal reproductive patterns: the use of implants of melatonin and a male effect, both performed in the late anestrus season of the Île-de-France breed.

Results

Part one. In this part of the study, the main features of the effects of nutrition on the seasonal reproductive patterns were established and extended to the whole sheep specie. Body condition was found to be a potent factor that modulated the timing of each seasonal reproductive transition. However, it did not alter the period of the reproductive rhythm nor did it affect the ability of sheep to express a reproductive season. Body condition affected the seasonal pattern of neuroendocrine activity in a similar manner in the Île-de-France breed, suggesting that nutrition is mainly integrated at the central level to modulate the sensitivity of the hypothalamo-pituitary axis to the estrogen feedback.

Part two. Body condition or the central activation of the AMPK system did not alter the circadian clockwork of the suprachiasmatic nucleus. However, both body condition and the central activation of AMPK in the paraventricular nucleus, had similar effects on the amplitude of the endogenous and daily rhythm of melatonin secretion.

Part three. Body condition was a major cause of variability in the reproductive response of sheep to both the use of melatonin implants and the male effect. With regard to melatonin implants, this variability originated from a lack of interpretation of the stimulation when the body condition of the animals fell below a critical threshold. In response to a ram effect, a lower body condition was associated with a drop in the intensity of both the pituitary and ovarian responses.

Conclusion

To conclude, the static effects of nutrition modulate the timing of natural or artificially-induced seasonal reproductive transitions. Whether the amplitude of the rhythm of melatonin secretion is involved in this phenomenon remains to be determined.

The precise management of body condition appears to be a major factor in the development of sustainable methods to control the seasonality of reproduction and improve reproductive performance, in sheep breeding systems.

Table des matières

Introduction générale	17
Revue bibliographique	20
I. Caractérisation de la saisonnalité de la reproduction	20
1. Un rythme saisonnier	20
a. Le caractère adaptatif des rythmes saisonniers	20
b. Les différents rythmes saisonniers observés chez les mammifères	20
c. Caractérisation du rythme saisonnier de reproduction	22
2. L'élaboration des profils saisonniers de reproduction	23
a. La nature de l'information extraite de l'environnement	23
b. Mécanisme non photopériodique ou mécanisme de type III	23
c. Mécanismes photopériodiques ou mécanismes de type I et II	24
d. Le modèle théorique de Bronson (1989)	31
3. La saisonnalité de la reproduction chez les ovins	32
a. Manifestation du caractère saisonnier de la reproduction des ovins	33
b. Facteurs génétiques de variation	35
II. Mécanismes neuroendocriniens contrôlant la fonction de reproduction chez la brebis	35
1. Le cycle œstral	35
a. Le complexe hypothalamo-hypophysaire	36
b. Les ovaires	38
c. L'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique	38
2. Le rythme annuel d'activité ovarienne	44
a. La mesure du temps photopériodique	44
b. La génération du rythme circannuel	56
III. Les effets de la nutrition sur la saisonnalité de la reproduction chez la brebis	57
1. Analyse descriptive	58
a. Définition du statut nutritionnel	58
b. Statut nutritionnel et fonctions reproductives	59
2. Mécanismes neuroendocriniens impliqués dans l'intégration des effets statiques de la nutrition	64
a. Variations de l'intensité du rétrocontrôle œstrogénique	64

- b. Modulation de la sensibilité hypothalamique au rétrocontrôle œstrogénique..... 65
- c. Variations centrales de l'intensité des signaux hormonaux périphériques 72

Objectifs du travail de thèse 98

Première partie Établir les effets de l'interaction entre facteurs nutritionnel et photopériodique sur les profils saisonniers de reproduction des brebis100

- I. Caractériser les effets de l'interaction entre facteurs photopériodique et nutritionnel chez la brebis Île-de-France : observations sur plusieurs cycles photopériodiques, identification du niveau des interactions 101
 - 1. Résultats 102
 - 2. Conclusion..... 103
- II. Caractériser les effets génétiques de l'interaction nutrition / photopériode chez les ovins : étude comparative des effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction chez la brebis Mérinos d'Arles 118
 - 1. Résultats 119
 - 2. Conclusion..... 119

Deuxième partie Un effet de la nutrition en amont de la voie d'intégration du signal photopériodique ?131

- I. Identifier l'influence du statut nutritionnel sur l'activité des NSC 132
 - 1. Résultats 133
 - 2. Conclusion..... 133
- II. La voie AMPK est-elle impliquée dans la transmission des effets du statut nutritionnel en amont de la voie d'intégration du signal photopériodique ? 156
 - 1. Résultats 157
 - 2. Conclusion..... 157

Troisième partie Identifier les limites imposées par le statut nutritionnel sur les performances de certaines techniques visant à maîtriser la saisonnalité de la reproduction166

- I. Identifier les effets du statut nutritionnel sur la réponse ovarienne à un traitement d'implants sous-cutanés de mélatonine..... 167

1. Résultats	168
2. Conclusion.....	169
II. Identifier les effets du statut nutritionnel sur la réponse à un effet mâle	186
1. Résultats	187
2. Conclusion.....	188
Discussion Générale.....	189
I. Le statut nutritionnel module l'expression du rythme saisonnier de reproduction des ovins	189
1. Des traits caractéristiques.....	190
2. Un modèle généralisable à l'ensemble des races ovines ?.....	192
3. Une interaction en amont de l'axe d'intégration du signal photopériodique	194
4. Autres sites d'interactions envisageables.....	197
II. Le statut nutritionnel exerce une influence majeure sur la réponse des brebis à différentes techniques de maîtrise de la reproduction.....	199
1. Implication de l'état d'engraissement dans la variabilité de la réponse à un traitement d'implants de mélatonine	200
2. Implication de l'état d'engraissement dans la variabilité de la réponse à un effet mâle.....	201
3. Quelle variabilité liée aux effets statiques de la nutrition dans la réponse aux techniques visant à maîtriser la saisonnalité de la reproduction	202
Conclusion Générale	207
Bibliographie	212
Annexes.....	251

Liste des tableaux

Tableau 1	Comparaison de mesures par échographie ou mesure directe <i>post-mortem</i> de l'épaisseur de gras sous-cutané au niveau des dernières vertèbres lombaires chez 4 brebis de race Romanov	105
------------------	--	-----

Liste des figures

Figure 1	Un environnement présentant une variabilité importante favorise le développement d'étapes distinctes au cours du cycle biologique	74
Figure 2	Les profils saisonniers de reproduction de lagomorphes observés sous différentes latitudes.	75
Figure 3	Sous les aires tempérées la période favorable aux mises-bas correspond au printemps, selon la durée de gestation de l'espèce considérée la période propice aux accouplements varie en conséquence	76
Figure 4	Schéma de fonctionnement des mécanismes photopériodiques.....	76
Figure 5	Mise en évidence du contrôle exercé par l'horloge circannuelle sur les transitions saisonnières reproductives chez la brebis.....	77
Figure 6	Mise en évidence de la synchronisation du rythme circannuel par la photopériode	78
Figure 7	Le cycle photopériodique (45°N) et ses différentes portions.....	79
Figure 8	Les deux modèles de mesure du temps photopériodique.....	79
Figure 9	Le modèle de <i>Bronson</i>	80
Figure 10	Mise en évidence de la photosensibilité des races de petits ruminants originaires des latitudes intertropicales	81
Figure 11	Concurrence des périodes fertiles et infertiles chez les brebis et les béliers de race Île-de-France.....	82
Figure 12	Représentation schématique de certains des principaux éléments du dialogue endocrinien au sein de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique	83
Figure 13	Diagramme schématique des populations de neurones à KNDy du noyau arqué et de leurs relations avec les neurones à GnRH	84
Figure 14	Schéma d'une coupe sagittale d'un cerveau de brebis et représentation simplifiée du circuit neuronal impliqué dans le contrôle photopériodique de l'activité sécrétoire de la glande pinéale	85
Figure 15	Les principaux éléments de l'horloge circadienne des mammifères et leurs interrelations.....	86
Figure 16	Le mécanisme de mesure du temps photopériodique dans l'hypophyse : un modèle de coïncidence externe	87

Figure 17	Représentation schématique du lien entre le mécanisme hypophysaire de mesure du temps photopériodique et la variation du catabolisme hypothalamique des hormones thyroïdiennes	88
Figure 18	Mise en évidence d'un rôle pour l'hypothalamus médiobasal dans l'interprétation du signal mélatoninergique dans le contrôle de l'activité de l'axe gonadotrope.....	89
Figure 19	Variations photopériodiques du rétrocontrôle œstrogénique sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire	90
Figure 20	Représentation du circuit neuronal impliqué dans la transmission du signal œstrogénique vers les neurones à GnRH.....	91
Figure 21	Les effets aigus, dynamiques et statiques de la nutrition	92
Figure 22	Les effets statiques de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction des deux espèces saisonnées de jours courts (brebis et chèvre) et d'une espèce de jours longs (jument)	94
Figure 23	La transmission des effets de la nutrition sur l'activité gonadique	95
Figure 24	Les effets d'une restriction calorique sur le fonctionnement de l'horloge circadienne principale.	96
Figure 25	Mécanismes neuroendocriniens impliqués dans le contrôle saisonnier de l'axe hypothalamo-hypophysaire et interactions identifiées ou probables avec la nutrition	97
Figure 26	Comparaison d'estimation de l'état d'engraissement par mesure échographique ou attribution d'une NEC	105
Figure 27	Concentrations plasmatiques moyennes (\pm sem) de mélatonine chez 16 brebis Île-de-France suivies pendant 24 heures en rythme L:D ambiant puis le lendemain en obscurité constante à différents moments de l'expérimentation présentée en Première partie – <i>Article 1</i>	135
Figure 28	Profils de sécrétion de LH en fonction du statut nutritionnel en réponse à un traitement photopériodique	170
Figure 29	Modèle théorique des interactions entre signaux photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction chez la brebis Île-de-France, établi selon les résultats de la Première partie <i>Article 1</i>	203
Figure 30	Modèle théorique généralisé des interactions entre signaux photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction des ovins, établi selon les résultats de la Première partie <i>Articles 1 & 2</i>	204

Figure 31	Représentation schématique de la réponse ovarienne à un traitement d'implants de mélatonine réalisé en fin de saison d'anoestrus chez des brebis Île-de-France maintenues à un faible état d'engraissement (Troisième partie <i>Article 1</i>).....	206
Figure 32	Représentation des effets de l'interaction entre signaux photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers d'activité ovarienne des ovins.....	211

Liste des annexes

1. La méthode d'attribution d'une Note d'Etat Corporel (NEC) chez les ovins 251
2. Tableau d'aide à la décision concernant la sortie d'un animal du protocole alimentaire expérimental : critères et définition des valeurs de chaque critère (end points). 252
3. Troisième partie - *Article 2* 253

Introduction générale

Le secteur de l'élevage pris dans son ensemble contribue significativement à la compétitivité économique de l'Europe ainsi qu'au maintien et au développement de sa diversité sociale et territoriale. Dans cette dynamique générale l'élevage ovin montre certaines faiblesses principalement liées à un faible niveau de rentabilité, un manque de main d'œuvre et une chute de la demande. En conséquence, et depuis plus d'une dizaine d'années, le cheptel ovin européen est en constante diminution. D'un autre côté le marché mondial des produits d'origine animale et destinés à l'alimentation humaine subi de nombreux changements principalement du fait d'une perspective d'augmentation de la demande (notamment en provenance des pays émergents) associée à un souci actuel et croissant de moyens de production respectueux de l'environnement et du bien-être de l'animal. Ainsi la pérennité des systèmes d'élevage va être étroitement associée à leur durabilité, c'est-à-dire leur capacité à trouver un équilibre entre productivité et réduction des impacts sur l'environnement et le bien-être des animaux à un niveau acceptable (OCDE/FAO, 2012).

Cette problématique représente une opportunité majeure pour le développement des systèmes d'élevage des ruminants tenant essentiellement à leur fort potentiel adaptatif (Blanc et al., 2010). Ces derniers disposent en effet d'atouts non négligeables afin de conjuguer performances socio-économiques et environnementales ; il s'agit notamment d'une forte résilience vis-à-vis des aléas environnementaux et d'une bonne efficacité pour la valorisation des intrants et des territoires pastoraux (Oltjen et Beckett, 1996). En vue d'exploiter pleinement cette opportunité les différents instituts européens de la recherche agronomique s'organisent en développant de concert des méthodes capables de satisfaire les demandes de la société, des éleveurs et des consommateurs (Bocquier et González-García, 2010).

C'est dans cet objectif qu'a été attribuée la chaire d'excellence du programme européen Marie-Curie au Pr. Scaramuzzi qui a permis de financer les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit et dont le programme général était d'*établir un centre de formation et de recherche pour l'étude des méthodes de maîtrise de la reproduction sans hormones chez les ruminants, respectueuses de l'environnement et du bien-être animal*. Ces travaux s'inscrivent dans le cadre plus global des priorités scientifiques du département de Physiologie Animale et Systèmes d'Élevage (PHASE) de l'INRA dont les moyens de recherche s'orientent

définitivement dans la conception et l'évaluation de systèmes d'élevages durables. La ligne de conduite engagée vise à intégrer les concepts d'agroécologie et d'écologie industrielle dans le domaine de l'élevage (Dumont *et al.*, 2012) et sa réussite dépendra en grande partie de la compréhension des deux systèmes interdépendants que représentent i) l'animal *en tant que* système à part entière et ii) le système d'élevage ou autrement dit l'animal *dans* les systèmes.

Il est désormais clairement déterminé que l'optimisation des performances reproductives avec une utilisation minimale d'hormones ou substances exogènes implique l'utilisation de paramètres endogènes ou environnementaux manipulables et ayant une influence significative sur l'axe reproductif (Martin et Kadokawa, 2006). Dans ce contexte le facteur nutrition constitue un levier accessible, réversible et significatif du pilotage de la quantité et de la qualité des produits d'élevage. Si les travaux du Pr. Scaramuzzi ont déjà déterminé l'influence majeure des effets de la nutrition dans le contrôle du cycle ovarien de la brebis (Scaramuzzi *et al.*, 2006), relativement peu d'études ont pu déterminer le rôle de la nutrition dans l'élaboration des profils saisonniers de reproduction. Pourtant en zones tempérées, la maîtrise de ce caractère est un enjeu de rentabilité important (Chemineau *et al.*, 2008). Certaines techniques dites naturelles de maîtrise de la saisonnalité de la reproduction permettent déjà d'obtenir des résultats comparables aux techniques dites conventionnelles faisant usage d'hormones exogènes (Gómez *et al.*, 2006). Cependant leur réalisation pratique peut présenter des problèmes de mise en œuvre (Pellicer-Rubio *et al.*, 2009) et leurs résultats une variabilité importante (Scaramuzzi et Martin, 2008).

Les objectifs du présent travail de thèse visaient à améliorer l'état des connaissances concernant l'animal en tant que système, c'est-à-dire fournir des éléments permettant de déterminer le rôle de l'état d'engraissement dans l'élaboration des profils saisonniers de reproduction des ovins et déterminer la contribution de ce facteur dans la variabilité de la réponse à certaines techniques naturelles visant à maîtriser ce caractère saisonnier.

La présentation de nos travaux expérimentaux est précédée d'une revue bibliographique abordant essentiellement les mécanismes de génération du caractère saisonnier de la reproduction chez les petits ruminants et leurs interactions probables ou avérées avec les signaux nutritionnels, hormonaux et métaboliques liés à l'état d'engraissement de l'animal. Les objectifs des travaux de thèses sont ensuite récapitulés et nos travaux présentés sous forme d'articles scientifiques déjà publiés ou engagés dans un processus de publication. Ces travaux sont regroupés en trois parties :

- i) La première s'intéresse aux effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers d'activité ovarienne et neuroendocrinienne chez la brebis.
- ii) La deuxième partie analyse certains des sites d'interactions entre statut nutritionnel et photopériode pour moduler les mécanismes contrôlant la saisonnalité de la reproduction.
- iii) Enfin la troisième partie est consacrée à l'observation des effets du statut nutritionnel sur la réponse des brebis à un traitement d'implants de mélatonine ou un effet mâle tous deux réalisés en fin de saison d'anœstrus.

La présentation de nos résultats expérimentaux sera suivie de leur discussion générale puis de leur mise en perspective vis-à-vis des programmes de recherche ayant justifié leur mise en œuvre.

I. Caractérisation de la saisonnalité de la reproduction

1. Un rythme saisonnier

a. Le caractère adaptatif des rythmes saisonniers

La majorité des climats terrestres se caractérise par des variations saisonnières de la disponibilité en eau et/ou des températures qui imposent un rythme équivalent à la quantité de protéines végétales produite par les différents milieux. Les espèces animales terrestres, plus ou moins directement dépendantes de cette ressource afin d'exprimer leurs différents processus physiologiques, sont alors pour la plupart confrontées à une alternance entre périodes favorables et périodes défavorables quant à la capacité de leur environnement proche à satisfaire leurs besoins physiologiques. En conséquence, les forces évolutives ont conduit à adapter la physiologie, le comportement et la morphologie de ces espèces – c'est-à-dire l'état de l'individu (pour revue cf. Jacobs et Wingfield, 2000) – en fonction de l'environnement. Cette adaptation se traduit par l'expression d'états saisonniers, eux-mêmes issus de l'expression d'un rythme saisonnier. Ce dernier s'exprime chez la plupart des mammifères et ses différentes formes d'expression révèlent différentes stratégies adaptatives (Gwinner, 1986).

b. Les différents rythmes saisonniers observés chez les mammifères

Le principal rythme saisonnier, puisqu'il s'exprime chez la majorité des mammifères, est le rythme saisonnier de reproduction (ou saisonnalité de la reproduction). Il permet notamment la coordination des processus de gamétogénèse et de manifestation du comportement sexuel chez le mâle et la femelle (Bronson et Heideman, 1994), voir du développement de l'embryon chez certaines espèces (Lopes *et al.*, 2004), à un moment précis du cycle annuel. Cette stratégie se traduit par d'importantes variations saisonnières des activités de reproduction au cours du cycle annuel qui permettent de distinguer, chez certaines espèces, une période où ont lieu les accouplements (ou saison de reproduction) d'une période de repos sexuel (ou saison d'anoestrus). La limitation temporelle des activités de reproduction permet de faire coïncider

la période des mises bas, gourmande en besoins énergétiques de lactation (Bronson, 1989) et correspondant à une forte dépendance de la survie du nouveau-né envers l'environnement (Hill, 1992), avec la période du cycle annuel la plus favorable en termes de climat et d'offre alimentaire environnementale (Gwinner, 1986)

La plupart des espèces à reproduction saisonnée expriment également des variations saisonnières de leur métabolisme basal, permettant à l'individu d'adapter ses dépenses énergétiques à son environnement. Ces variations métaboliques saisonnières vont de mécanismes affectant l'efficacité du stockage et de l'utilisation des réserves énergétiques, mécanisme notamment présent chez les ruminants (Faulconnier *et al.*, 1999), jusqu'à une réduction réversible de la température corporelle et des activités physiques dans le cas de l'hibernation (Kortner et Geiser, 2000). Les mammifères expriment également des variations comportementales saisonnières notamment de l'ingestion volontaire d'aliments. Par ce mécanisme, l'ingestion volontaire est maximale lorsque les ressources environnementales sont les plus abondantes, ce qui permet aux animaux de constituer un stock de graisses mobilisables en vue de la période défavorable (Kay, 1979). Il peut encore s'agir de mouvements migratoires (Baker, 1978), observés chez le caribou (*Rangifer tarandus*) ou chez la plupart des ongulés des savanes et certaines chauve-souris, qui amènent ces espèces à se déplacer cycliquement vers les environnements propices à leur survie. Enfin, quelques espèces de mammifères présentent certaines variations morphologiques saisonnières. Citons pour exemple la mue saisonnière qui fait varier la croissance du pelage, par exemple chez le vison (*Mustela vison*), ou encore sa couleur chez l'hermine (*Mustela erminea*) (Johnson, 1972).

L'expression d'un ou plusieurs de ces changements d'état de l'individu a permis aux mammifères terrestres d'occuper la plupart des habitats et climats sous des latitudes contrastées (Bronson, 1985). Chacun de ces états constitue une étape du cycle biologique qui peut être considérée comme une adaptation stratégique à un contexte spatio-temporel présent ou à venir (Wingfield *et al.*, 1998). Ce sont ainsi les espèces vivant sous des latitudes présentant une variabilité environnementale annuelle importante qui expriment le plus grand nombre de ces étapes au cours du cycle annuel (**Figure 1**) (Wingfield, 2008).

c. Caractérisation du rythme saisonnier de reproduction

D'un point de vue purement descriptif, les profils annuels de saisonnalité de la reproduction sont contrastés entre espèces de mammifères et varient également lorsqu'ils sont observés au sein d'une même espèce répartie sous différentes latitudes. Pour une même espèce, sous des latitudes proches de l'équateur, la saison de reproduction peut s'étaler sur toute l'année puis, en s'éloignant vers les pôles, cette saison devient de plus en plus courte et délimitée dans le temps (**Figure 2**). De plus, la latitude de transition entre une saison de reproduction continue et une saison délimitée au cours du cycle annuel est remarquablement plus élevée chez les petits mammifères (rongeurs...). Enfin, le moment de reproduction au cours du cycle annuel varie de façon conséquente entre différentes espèces. Chez les petits mammifères, comparés aux mammifères de grande taille, ce moment possède également une plus forte variabilité interindividuelle et interannuelle (Bronson, 1985).

Les profils saisonniers de reproduction peuvent ainsi être définis selon deux paramètres que sont i) le moment de reproduction et ii) son potentiel d'expression au cours du cycle annuel, circonscrit à une ou plusieurs périodes de l'année ou continu. La durée de gestation d'une espèce est le principal paramètre conditionnant son moment de reproduction afin que la période des mises-bas soit synchronisée avec la saison environnementale favorable. Le moment et la durée de cette saison variant avec la latitude elle correspond au printemps sous les aires tempérées et à la saison des pluies sous les aires intertropicales (Zucker *et al.*, 1980) le moment de reproduction varie alors en conséquence (**Figure 3**). Le potentiel d'expression d'activités de reproduction au cours du cycle annuel apparaît quant à lui sensible à l'environnement puisqu'influencé par la latitude au sein d'une même espèce. Enfin, selon Bronson (1985), les différences de profils saisonniers de reproduction observées entre petits et grands mammifères sont attribuables non seulement à leurs différences respectives d'espérance de vie mais également au coût énergétique relatif que représente l'ensemble du projet reproductif pour la femelle en rapport avec la quantité totale d'énergie disponible pour sa survie.

Il apparaît ainsi que les espèces à reproduction saisonnée sont capables d'extraire de l'information en provenance de leur environnement afin de contrôler leurs activités de reproduction. Les différences observées, propres à des ensembles d'espèces (petits ou grands mammifères par exemple), peuvent alors être attribuées à des différences quant à la nature de

l'information environnementale utilisée et/ou son interprétation, c'est-à-dire de différences de fonctionnement du mécanisme générant le rythme saisonnier de reproduction.

2. L'élaboration des profils saisonniers de reproduction

a. *La nature de l'information extraite de l'environnement*

Le niveau à un instant donné et les variations saisonnières de nombreux facteurs environnementaux ont une influence sur la reproduction des mammifères. Ils façonnent les profils saisonniers de reproduction en agissant, selon leur degré de prédictibilité, à un niveau ultime ou proximal (Baker, 1938; Bronson, 1989; Jacobs et Wingfield, 2000).

Les facteurs ultimes n'ont pas ou peu de valeur prédictive, il s'agit principalement de facteurs alimentaires (disponibilités caloriques et disponibilités en nutriments), climatiques (pluviométrie, température et humidité) ou sociaux (compétition entre espèces, prédation, interactions sociales) ayant exercé, au cours de l'évolution, une pression sélective sur le potentiel d'expression du rythme saisonnier de reproduction et, de manière plus aigüe, affectant l'expression de ce potentiel. Les facteurs proximaux ont, quant à eux, une forte valeur prédictive. Utilisés par certaines espèces, ils leur permettent d'anticiper la période environnementale où la combinaison des facteurs ultimes sera optimale (Levins, 1968). Le cycle photopériodique annuel (*i.e.* la variation de la durée du jour au cours du cycle annuel) constitue le signal environnemental subissant le moins d'interférences interannuelles (Turek et Campbell, 1979) et est, de fait, le principal facteur proximal contrôlant les activités saisonnières des mammifères (Reiter et Follett, 1980; Gwinner, 1986; Bronson et Heideman, 1994; Malpaux, 2006).

Les modalités d'intégration et d'interprétation des facteurs ultimes et proximaux pour la génération du rythme saisonnier de reproduction sont variables entre espèces et traduisent, au sein même du caractère de saisonnalité de la reproduction, l'élaboration de différentes stratégies adaptatives. Il existe ainsi trois principaux mécanismes de génération d'un rythme saisonnier de reproduction, aussi reportés comme mécanismes (ou formes) de type I, II ou III (Zucker *et al.*, 1991).

b. *Mécanisme non photopériodique ou mécanisme de type III*

Seule la forme III ne fait pas intervenir de facteur d'un niveau proximal pour générer un rythme saisonnier. En conséquence, les espèces disposant d'un tel mécanisme n'anticipent pas

sur le long terme les variations de leur environnement mais privilégie l'opportunisme en initiant à court-terme une réponse adaptée à un contexte environnemental ultime donné (Bronson, 1985; Heideman et Bronson, 1992). Pour les espèces disposant d'un mécanisme de type III, l'expression d'une saison de reproduction devient facultative (Negus et Berger, 1972). En effet, selon le contexte environnemental, les profils de reproduction au cours du cycle annuel peuvent être continus (*i.e.* l'espèce est sexuellement active à tout moment de l'année ou inversement, en anœstrus permanent) ou distinctement saisonnés.

c. Mécanismes photopériodiques ou mécanismes de type I et II

Les formes I et II font intervenir le facteur photopériodique proximal pour générer un rythme saisonnier de reproduction anticipant les variations de l'environnement. Les deux formes intègrent l'information photopériodique au moyen d'un mécanisme endogène de mesure du temps au cours du cycle annuel (Paul *et al.*, 2008). Dans les deux cas, cette machinerie interne permet aux individus d'anticiper les variations environnementales même lorsqu'ils sont privés d'une information photopériodique fiable ou continue, c'est notamment le cas pour les espèces migrantes et hibernantes respectivement (Gwinner, 1981a; Gwinner, 1981b; Paul *et al.*, 2008). Opposées au caractère facultatif de la saison de reproduction générée par un mécanisme de type III, les formes I et II confèrent une certaine « rigidité » et un caractère obligatoire à l'expression d'une saisonnalité de la reproduction par rapport aux facteurs environnementaux ultimes (Negus et Berger, 1972; Bronson, 1985; Paul *et al.*, 2008). Les deux formes se distinguent néanmoins par la nature même de leur composante endogène.

▪ La forme I, un mécanisme de type « sablier »

Afin de générer un rythme saisonnier en conditions naturelles, la forme I requiert l'intervention d'une première portion du message photopériodique qui initie une première transition d'état physiologique et la mise en marche du mécanisme endogène de mesure du temps. Le fonctionnement de ce dernier détermine ensuite la durée de la saison en contrôlant le second moment de transition vers une réversion de l'état physiologique par mesure d'intervalle de temps (Goldman, 2001). Enfin, une seconde portion du message photopériodique va permettre de réinitialiser le mécanisme en le sensibilisant à nouveau au premier message photopériodique (**Figure 4-A**) (Gorman et Zucker, 1995; Paul *et al.*, 2008).

Le hamster Sibérien (*Phodopus sungorus*) est un exemple caractéristique d'espèce saisonnée de type I dont les paramètres de génération du rythme de reproduction ont été précisément

déterminés par les travaux d'Hoffmann (1973; 1979; 1982). Ainsi, lorsque cette espèce est maintenue en jours longs (> 13 heures de lumière par jour, JL), elle présente une saison de reproduction continue. Seul un transfert des animaux en jours courts (< 13 heures de lumière par jour, JC) peut provoquer une transition vers la saison d'ancestrus. La transition JL → JC, rencontrée zones tempérées à la fin de l'été, constitue donc le signal photopériodique d'initiation du rythme de reproduction pour cette espèce. Une fois initié et au bout de 20 semaines, qui correspondent à l'intervalle de temps mesuré, le générateur de rythme endogène provoque la réversion de l'état physiologique des animaux et cela malgré la persistance des JC, phénomène qualifié d'état photoréfractaire. Les animaux photoréfractaires ne peuvent ensuite répondre au traitement de JC qu'après plusieurs semaines passées en JL. La transition JC → JL, correspondant à l'accroissement printanier de la durée des jours en zones tempérées, est ainsi interprétée comme le signal photopériodique de réinitialisation du rythme.

▪ *La forme II, un mécanisme de type « horloge »*

A l'opposé des formes I et III, le mécanisme de type II n'a pas besoin d'information environnementale pour générer un rythme annuel de reproduction. Dans ce cas, les transitions entre états reproductifs sont l'expression du fonctionnement d'une horloge circannuelle endogène qui, en conditions environnementales naturelles, rend leur expression quasi-obligatoire (**Figure 4-B**) (Gwinner, 1981b).

Selon la définition donnée par Gwinner (1986), l'existence d'un tel mécanisme de génération de rythme peut être vérifiée expérimentalement et en l'absence de facteurs exogènes à même de renseigner sa période, sous trois conditions :

- i) le rythme persiste pendant au moins deux ans,
- ii) sa période diffère de l'année sidérale,
- iii) sa période diffère entre individus placés dans les mêmes conditions.

De cette manière, l'existence de rythmes circannuels de reproduction a pu être déterminée chez de nombreuses espèces (pour revues cf. Farner, 1985; Gwinner, 1986; Zucker, 2001). Chez l'écureuil terrestre doré (*Spermophilus lateralis*) par exemple, espèce hibernant en terrier et par conséquent privée d'information photopériodique pendant une partie de l'année, le rôle essentiel tenu par l'expression d'un rythme circannuel de reproduction a pu être mis en évidence dans l'anticipation de la saison de reproduction au sortir de la période d'hibernation

(Pengelley et Asmundson, 1974). Chez la brebis (*Ovis aries*), il a été démontré que l'expression d'un rythme circannuel de reproduction contrôle, en conditions environnementales naturelles, les moments de transitions entre états reproductifs en provoquant le développement d'un état photoréfractaire (**Figure 5**) (fin de la saison : Malpaux *et al.*, 1988b; début de la saison : Malpaux *et al.*, 1989). L'expression de l'horloge circannuelle garantit ainsi une certaine inertie du rythme annuel de reproduction par rapport aux facteurs environnementaux. Il est supposé que ce phénomène permet de limiter les effets potentiellement néfastes de fluctuations irrégulières et contradictoires de l'environnement (dans le cas des espèces migrantes) ou encore de limiter les modifications du rythme reproductif dues à l'environnement et qui ne seraient d'aucun avantage adaptatif pour l'animal (Jacobs et Wingfield, 2000; Malpaux, 2006; Paul *et al.*, 2008).

- *Le rôle de la photopériode*

L'intervention du facteur proximal photopériodique dans les mécanismes de génération de rythme de type I et II est nécessaire et souvent suffisante pour générer un rythme de reproduction capable de suivre et d'anticiper le cycle saisonnier des variations environnementales (Gorman *et al.*, 2001; Zucker, 2001). Le rôle fonctionnel de la photopériode dans la génération du rythme saisonnier de reproduction diffère toutefois entre les deux mécanismes. Dans le cas de la forme I, la photopériode en initialisant/réinitialisant le mécanisme de mesure d'intervalle de temps entraîne le rythme de reproduction (Gorman *et al.*, 2001). En ce qui concerne la forme II, le principal rôle de la photopériode est de faire coïncider la période endogène de l'horloge circannuelle avec la période annuelle sidérale, c'est-à-dire de synchroniser le rythme de reproduction (**Figure 6**) (Follett et Follett, 1981; Karsch *et al.*, 1984; Karsch *et al.*, 1989).

Les premières études descriptives de la saisonnalité de la reproduction ont mis en évidence l'implication majeure de la photopériode dans le processus de génération du rythme saisonnier de reproduction, notamment lors d'expérimentations réalisées sous photopériode contrôlée, accélérée ou inversée. Ces études ont principalement été réalisées chez le hamster, espèce saisonnée de type I (Hoffmann, 1973; Steger *et al.*, 1985) et chez les ovins, espèce saisonnée de type II (Marshall, 1937; Mauléon et Rougeot, 1962; Thwaites, 1965; Legan et Karsch, 1980; Thimonier, 1989). Pour ces espèces suivies en conditions photopériodiques contrôlées ou naturelles, une portion donnée du cycle photopériodique est toujours associée avec l'initiation d'une même physiologie reproductive (Karsch *et al.*, 1984; Gorman et

Zucker, 1998). Les espèces photopériodiques sont ainsi classées en espèces dites de jours-courts, lorsque la saison de reproduction débute avec la diminution de la durée des jours (ovins, caprins, cervidés...) ou en espèces de jours-longs, lorsque la saison de reproduction est associée à l'accroissement de la durée des jours (équidés, rongeurs...).

✓ *Déterminants de la réponse photopériodique*

La classification des espèces à reproduction saisonnées en espèces de JC ou de JL, ne rend toutefois pas compte de la réelle nature des modalités d'interprétation de la durée du jour chez les espèces photopériodiques. Si la valeur absolue de la durée du jour peut transmettre de l'information de nature photopériodique (Woodfill *et al.*, 1994; Gorman et Zucker, 1995; Gorman et Zucker, 1998), la réponse des mammifères ne peut exclusivement s'y fier, chaque durée du jour ayant lieu deux fois au cours du cycle photopériodique annuel (solstices exceptés). Les mécanismes d'intégration de la durée du jour permettent donc de relativiser une valeur absolue donnée en la comparant à son historique photopériodique (Prendergast *et al.*, 2000). Ce mécanisme, central dans la réponse photopériodique, permet d'interpréter la direction du changement photopériodique et d'y faire correspondre l'état reproductif adapté pour l'espèce considérée (Robinson et Karsch, 1987; Gorman et Zucker, 1995; Gorman *et al.*, 2001). Selon la terminologie utilisée par Jacobs et Wingfield (2006), l'organisme est alors assimilable à un système régulièrement modifié par un ensemble de stimuli exogènes (variables environnementales) dont la réponse à une nouvelle stimulation (ici un changement de photopériode) serait univoque et dépendante de son état actuel. Enfin, l'expression du rythme endogène de reproduction fait preuve d'une certaine indépendance vis-à-vis du régime photopériodique lorsqu'il initie les transitions reproductives saisonnières en développant un état photoréfractaire. En conditions expérimentales, les animaux photoréfractaires peuvent alors présenter une physiologie reproductive inverse à celle déterminée par leur classification (Karsch *et al.*, 1989).

Ainsi, l'interprétation de la photopériode est un phénomène complexe qui tient non seulement compte de la valeur absolue de la durée du jour à l'instant 't' mais également de l'historique photopériodique et éventuellement de la phase du rythme circannuel (Jackson *et al.*, 1989) où ces deux premiers facteurs sont considérés. Afin de s'accorder avec ces notions, dans la suite du manuscrit et conformément à l'usage actuel, l'abréviation 'JL' désignera des jours plus longs comparés aux précédents et inversement, 'JC' indiquera des jours plus courts comparés aux précédents (Chemineau *et al.*, 2008).

✓ *Le rôle des différentes portions du message photopériodique*

L'indépendance du moment des transitions saisonnières d'activités de reproduction vis-à-vis du signal photopériodique immédiat ainsi que le maintien d'activités de reproduction synchronisées chez des espèces pourtant privées d'une partie du cycle photopériodique annuel (espèces hibernant en terrier par exemple), ont conduit à reconsidérer le rôle tenu par l'ensemble du cycle photopériodique dans le contrôle de la saisonnalité de la reproduction. Ainsi certaines études, essentiellement réalisées chez la brebis (Wayne *et al.*, 1990; Moenter *et al.*, 1991; Woodfill *et al.*, 1994; Barrell *et al.*, 2000), sont parvenues à établir un cloisonnement du cycle photopériodique annuel en différentes portions eut égard à leur potentiel à synchroniser le rythme circannuel de reproduction *i.e.* en fonction de leur rôle dans l'élaboration des profils saisonniers de reproduction. Selon leurs conclusions, la portion allant du solstice d'été à l'équinoxe d'automne (jours longs décroissants, **Figure 7-3**) constitue le plus fort signal de synchronisation du rythme circannuel de reproduction alors que la portion allant de l'équinoxe de printemps au solstice d'été (jours longs croissants, **Figure 7-1**) aurait une influence moindre. Au sein des jours courts on distingue la portion se situant entre l'équinoxe d'automne et le solstice d'hiver (jours courts décroissants, **Figure 7-2**), qui joue un faible signal de synchronisation, de la portion allant du solstice d'hiver à l'équinoxe de printemps (jours courts croissants, **Figure 7-4**) qui n'a aucune influence directe sur la synchronisation du rythme circannuel de reproduction mais permettrait de sensibiliser à nouveau l'organisme à la perception des jours longs (Jackson *et al.*, 1989). De plus, la portion des jours décroissants située entre les deux solstices (**Figure 7-2**), influencerait la durée de la saison de reproduction débutant au début de l'automne chez la brebis (Malpaux *et al.*, 1988a; Woodfill *et al.*, 1994).

Le rôle essentiel tenu par les jours longs dans les mécanismes de synchronisation du rythme circannuel de reproduction assure aux espèces hibernantes, privées de la majeure partie de la portion des jours courts du cycle photopériodique, l'expression d'activités de reproduction synchronisées. Dans le cas des espèces exposées en permanence à un cycle photopériodique annuel complet comme la brebis, l'existence de certaines portions du cycle plus puissantes pour synchroniser le rythme circannuel de reproduction permettrait d'anticiper les variations environnementales à plus long-terme (Woodfill *et al.*, 1994).

✓ *Le modèle de mesure du temps photopériodique*

L'utilisation du caractère prédictif du cycle photopériodique annuel dépend essentiellement de la capacité des espèces photopériodiques à déterminer leur position au sein du cycle. Le rôle de la photopériode ambiante selon la portion du cycle photopériodique et l'importance de l'historique photopériodique pour la réponse reproductive des espèces saisonnées indiquent que ces espèces disposent de mécanismes capables de mesurer et interpréter le temps photopériodique.

Le rôle de la durée du jour est central dans les mécanismes de mesure du temps photopériodique. Ainsi, il est possible de définir pour chaque espèce une « durée de jour critique », fonction de la latitude d'origine de l'espèce considérée et relativisée entre individus d'une même espèce selon leur historique photopériodique. Au-delà de ce seuil, s'opère la transition du phénotype d'hiver au phénotype d'été (Saunders, 1977; Goldman, 2001). Cette notion est expliquée par l'hypothèse générale de Bünning (1960) qui pose les bases du fonctionnement des mécanismes de mesure du temps photopériodique. Selon ce modèle (**Figure 8-A**), la lumière a deux rôles principaux :

- i) celui d'entraîner un rythme endogène circadien (*i.e.* dont la période est proche de 24 heures en conditions environnementales constantes) de sensibilité à la lumière vers une période d'exactly 24 heures
- ii) et celui d'illuminer (ou non) la phase photosensible de ce rythme. Schématiquement, l'illumination de la phase photosensible (dès lors que la durée de jour critique est dépassée) est interprétée par l'organisme comme un signal de type JL qui provoque la transition vers le phénotype de printemps/été.

Le modèle de Bünning établit un mécanisme de mesure du temps photopériodique généralisable à l'ensemble des organismes photopériodiques (des plantes aux vertébrés en passant par les insectes et les champignons) dont le cœur du fonctionnement est l'interaction du rythme lumière/obscurité journalier avec le fonctionnement d'une horloge biologique circadienne.

L'extension au modèle initial proposée par Pittendrigh (1964; 1972) distingue, sur la même base d'horloge circadienne, deux formes de mécanismes de mesure du temps photopériodique : les modèles de coïncidence externe et interne. D'un côté, le modèle de coïncidence externe conserve le rôle dual de la photopériode d'entraînement et de photo-

induction. De l'autre côté, le modèle de coïncidence interne propose l'existence de deux oscillateurs recevant chacun sa source d'information temporelle d'un événement remarquable du rythme lumière/obscurité, en l'occurrence du moment des transitions lumière/obscurité accompagnant l'aube et le crépuscule (**Figure 8-B**). Chaque oscillateur du modèle de coïncidence interne étant lié à un de ces événements particuliers, leur relation de phase nyctémérale varie avec l'évolution de la photopériode, fournissant un autre mécanisme de traduction du « temps saisonnier ». Dans ce mécanisme, la lumière joue un rôle unique d'entraînement des oscillateurs. Chez les mammifères, ce sont les deux modèles de coïncidence externe et interne qui seraient impliqués dans le mécanisme de mesure du temps photopériodique (Saunders, 2005; Hazlerigg et Wagner, 2006). Les mécanismes physiologiques de ce dernier point seront abordés en détails dans la suite du manuscrit.

- *Le rôle des autres signaux environnementaux*

La classification établie par Wingfield *et al.* (1984; 2008) distingue quatre catégories de facteurs ultimes selon qu'ils agissent i) sur le développement embryonnaire (essentiellement la température et les disponibilités alimentaires), ii) en supplément de l'information prédictive initiale afin d'en permettre un ajustement précis (facteurs alimentaires et climatiques essentiellement), iii) en tant que signaux de synchronisation (facteurs socio-sexuels) ou encore iv) comme signaux imprédictibles d'interruption du processus de reproduction (ex. prédation ou événements climatiques extrêmes). L'état et les variations de ces signaux non-photopériodiques affectent plus ou moins profondément l'expression des profils saisonniers de reproduction (Desjardins et Lopez, 1983; Nelson *et al.*, 1983; Malpaux *et al.*, 1989; Hegstrom et Breedlove, 1999; Kriegsfeld *et al.*, 2000; Zarazaga *et al.*, 2005) en interagissant avec les modalités d'intégration du facteur photopériodique proximal et/ou en perturbant les mécanismes d'expression de la saison de reproduction (Paul *et al.*, 2008).

D'après le modèle établi par Jacobs et Wingfield (2006) basé sur les études mathématiques de Cohen (1967), lorsque la période idéale de mise-bas possède une forte valeur prédictive (lorsque la variabilité environnementale intra-annuelle est forte et la variabilité interannuelle faible) il apparaît optimal pour les espèces photopériodiques de ne répondre qu'à un minimum de facteurs environnementaux (et en premier lieu le facteur proximal) pour l'élaboration de leurs profils saisonniers de reproduction. D'un autre côté, lorsque la période idéale des mises-bas est incertaine (lorsque la variabilité environnementale interannuelle est forte), il est préférable pour ces espèces de prendre en compte un maximum de facteurs environnementaux

afin d'élaborer des alternatives à un profil saisonnier de reproduction figé. Ce modèle confère aux facteurs ultimes un rôle d'ajustement du facteur photopériodique proximal, plus ou moins important en fonction des conditions environnementales (l'intensité de l'ajustement définissant le degré de photosensibilité de l'espèce considérée), et relativise ainsi la hiérarchisation entre facteurs proximaux et ultimes pour le contrôle des profils saisonniers de reproduction dans un contexte environnemental donné.

d. Le modèle théorique de Bronson (1989)

Les travaux de Bronson (1985; 1988; 1989) ont abouti à la création d'un modèle permettant de relativiser le degré de photosensibilité des espèces saisonnées de mammifères en fonction de leur latitude d'origine et de leur espérance de vie (**Figure 9**) (pour revues : Bronson et Heideman, 1994; Bronson, 2009).

Ce modèle prédit que la photosensibilité globale de ces espèces (intra- et inter-espèces) diminue à mesure que l'on se rapproche de l'équateur. Cette diminution de photosensibilité s'explique par la perte progressive de la valeur prédictive du facteur photopériodique dont les variations annuelles diminuent, en valeur absolue, sans toutefois être accompagnées d'une diminution de la saisonnalité des habitats. En deçà d'une certaine latitude le modèle prédit la généralisation de stratégies opportunistes dans le contrôle de la saisonnalité de la reproduction ; ainsi on peut observer, pour des individus d'une même espèce répartie sous différentes latitudes, différents degrés de photosensibilité.

C'est l'espérance de vie de l'espèce considérée qui détermine la « latitude seuil » : pour les mammifères à courte espérance de vie (< 6 mois) comparés aux mammifères à longue espérance de vie (> 12 mois) la latitude de transition entre opportuniste et photosensibilité est à la fois plus élevée et plus diffuse (la transition s'opère respectivement de 70° à 30° contre de 30° à 10° de latitude ; **Figure 9**). Cette différence tient essentiellement aux stratégies reproductives respectives de ces deux groupes d'espèces. En effet, les mammifères à courte espérance de vie ont un cycle reproductif rapide qui confère une bonne valeur adaptative au développement de stratégies opportunistes. Ces espèces disposent majoritairement de mécanismes de type I pour générer un rythme saisonnier de reproduction. Son contrôle sur les activités reproductives étant relativement souple, il permet le développement de stratégies reproductives opportunistes sous des latitudes relativement élevées (Prendergast *et al.*, 2001; Bronson, 2009). De fait, on observe au sein de ces espèces

une forte variabilité du degré de photosensibilité (Bronson et Heideman, 1994; Prendergast *et al.*, 2001). Au contraire, les espèces à longue espérance de vie disposent majoritairement de mécanismes de type II pour générer un rythme saisonnier dont la rigidité de fonctionnement confère certains avantages adaptatifs précédemment évoqués dans ce manuscrit.

Il existe toutefois des exceptions aux prédictions du modèle (pour revue : Bronson, 2009) lorsque sont observés des comportements opportunistes ou un fort degré de photosensibilité indépendants de la latitude (fonctions d'écosystèmes remarquables ou exceptions sans explication apparente au modèle).

3. La saisonnalité de la reproduction chez les ovins

Le cheptel mondial actuel d'ovins domestiques (*Ovis aries*) est composé de nombreuses races (> 200) exploitées sous un large panel de latitudes (Reavill, 2000). Cette diversité reflète l'adaptabilité de cette espèce de petit ruminant située au centre de systèmes d'élevages compétitifs pouvant constituer un des seuls moyen de valorisation de certains milieux difficiles (Ensminger et Behlow, 1978).

Les ovins domestiques sont une espèce photopériodique de jours-courts (Mauléon et Rougeot, 1962; Thwaites, 1965; Ortavant *et al.*, 1985; Thimonier, 1989). La photosensibilité de l'espèce a notamment été mise en évidence par les travaux de Hafez (1952), réalisés chez différentes races anglaises, qui démontrent le rôle primordial joué par la latitude (*i.e.* de la photopériode) dans le contrôle de la durée de la saison de reproduction. Ce caractère a été généralisé aux races ovines des zones intertropicales qui, observées dans leur habitat d'origine, n'exhibent pas ou peu de saisonnalité dans leurs activités de reproduction (Khaldi, 1984; Yenikoye, 1984; Mahieu *et al.*, 1989). Toutefois lorsque les espèces de petits ruminants originaires de Guadeloupe (16° de latitude Nord) sont transférées en conditions photopériodiques tempérées, elles expriment une reproduction saisonnée normalement stimulée par les JC et inhibée par les JL (**Figure 10**) (Chemineau *et al.*, 2004).

L'espèce ovine dans son ensemble apparaît être dotée d'un mécanisme photopériodique de génération d'un rythme de reproduction saisonnier, aux propriétés comparables entre les différentes races. Certaines études archéozoologiques (Balasse *et al.*, 2003) ont démontré l'existence relativement ancienne (\approx 1.800 ans B.P.) d'un tel mécanisme dans l'historique de domestication de l'espèce ovine dont les premières traces remontent à environ 9.000 ans B.P., en Asie du Sud-est dans les pays du croissant fertile (Ryder, 1984). Il s'agit probablement

d'un héritage génétique conservé (Balasse et Tresset, 2007) des différents bassins d'origine génétique (situés aux environs de 30° de latitude Nord) de l'espèce (Rocha *et al.*, 2011). Ce caractère aurait été transmis au cours des différents événements de domestication des ovins (Bruford *et al.*, 2003) non sans subir quelques altérations liées au processus de domestication (Thiery *et al.*, 2002). Conformément aux prédictions du modèle de Bronson (1989), la longue espérance de vie de l'espèce (la sénescence reproductive débute à 5/6 ans) (Mysterud *et al.*, 2002) a favorisé l'acquisition d'un mécanisme photopériodique de type II mis en évidence par l'étude de Karsch (1989), précédemment abordée dans ce manuscrit.

a. Manifestation du caractère saisonnier de la reproduction des ovins

▪ *Chez la femelle*

L'expression de la saisonnalité de la reproduction des brebis peut conduire à des variations remarquables de la fréquence des ovulations au cours du cycle annuel. Fonction de la latitude et de l'espèce considérée, la saison de reproduction peut être restreinte à un mois de l'année ou être pratiquement continue (Hafez, 1952; Santiago-Moreno *et al.*, 2000). Au sein d'une même race, les dates de début et de fin de saison possèdent une certaine répétabilité interannuelle (Thimonier et Mauléon, 1969; Quirke *et al.*, 1986).

Observée en régions tempérées, la saison de reproduction des brebis débute à l'automne et se termine à la fin de l'hiver pour des mises-bas commençant au printemps (**Figure 11-A**) ; leur durée de gestation étant d'environ 5 mois (Thimonier et Mauléon, 1969). L'espèce étant polyoestrienne, sa saison de reproduction (qui débute avec l'initiation du premier cycle sexuel) est composée d'une succession ininterrompue de cycles sexuels. Ce cycle correspond à l'intervalle entre chaleurs successives et dure en moyenne 17 jours chez la brebis (pour revue cf. Goodman, 1994). Deux phases principales sont identifiables :

- i) la phase folliculaire, qui dure 2 à 3 jours et au cours de laquelle s'opère la croissance folliculaire terminale aboutissant à l'apparition des chaleurs et, 24 à 30 heures plus tard, à l'ovulation (Robertson, 1969).
- ii) la phase lutéale, qui débute après l'ovulation et correspond au développement du corps jaune. En l'absence de fécondation ce dernier régresse au bout de 14 à 16 jours entraînant le début d'une nouvelle phase folliculaire.

Les chaleurs durent, en fonction de la race considérée, de 24 à 36 heures (Hanrahan et Quirke, 1975). Elles se traduisent par un ensemble de modifications physiologiques et comportementales (Fabre-Nys et Gelez, 2007) favorisant l'accouplement. Certains auteurs (Thimonier et Mauléon, 1969; Ricordeau *et al.*, 1976) rapportent la possibilité d'une dissociation entre l'ovulation et l'apparition des chaleurs. Ce phénomène est qualifié « d'ovulation silencieuse » et son intensité varie au cours du cycle annuel. La succession des cycles sexuels s'interrompt avec la fécondation de l'ovule ou, le cas échéant, avec la mise en place de la saison d'anœstrus.

Lorsque s'initie la transition vers la saison d'anœstrus, l'intensité du comportement sexuel diminue (Banks, 1964) tandis que le nombre d'ovulations silencieuses et de cycles ovariens anormaux s'accroît (Thimonier et Mauléon, 1969; Bartlewski *et al.*, 1999b). Enfin, lorsque la saison d'anœstrus est établie, les brebis n'ovulent plus, n'expriment plus de chaleurs et ne développent pas de corps jaune (Thimonier et Mauléon, 1969; Gallegos-Sanchez *et al.*, 1998). Au cours de cette période les ovaires restent actifs et présentent une croissance folliculaire ralentie qui s'accéléra lors de la transition vers la saison de reproduction (Bartlewski *et al.*, 1998; Bartlewski *et al.*, 1999a).

- *Chez le mâle*

La saisonnalité de la reproduction des béliers se manifeste par des variations au cours du cycle annuel du poids et du volume testiculaire, reflétant les variations de la spermatogénèse, ainsi que par des variations comportementales (**Figure 11-B**) (Schanbacher et Lunstra, 1976; Lincoln et Davidson, 1977). Pour une même race observée sous un même cycle photopériodique, les béliers expriment une photosensibilité moindre en comparaison aux brebis, leur activité sexuelle étant stimulée jusqu'à un mois et demi plus tôt (**Figure 11-B**) (Lincoln et Short, 1980; Pelletier et Almeida, 1987). Ces différences de profils saisonniers de reproduction traduiraient des différences sexuelles au sein des mécanismes neuroendocriniens contrôlant la fonction de reproduction des ovins (Lubbers et Jackson, 1993). Si la spermatogénèse des béliers est maintenue tout au long du cycle annuel, elle subit toutefois d'importantes variations en termes de quantité (Colas, 1981; Dacheux *et al.*, 1981; Ortavant *et al.*, 1985) et de qualité (nombre de spermatozoïdes normaux) (Colas, 1981).

b. Facteurs génétiques de variation

Observés dans un même environnement, les profils saisonniers de reproduction entre différentes races peuvent être contrastés (Hafez, 1952; Chemineau *et al.*, 2004; Chemineau *et al.*, 2008). Cette observation souligne le rôle joué par certains paramètres génétiques, présentant un polymorphisme fonction de la race, dans le contrôle de sa saisonnalité (Pelletier *et al.*, 2000). Ces traits génétiques contrôleraient notamment l'initiation, la cessation et la durée de la saison de reproduction (Quirke *et al.*, 1986; Al-Shorepy et Notter, 1997) ainsi que l'aptitude des brebis à se reproduire en dehors de leur saison de reproduction naturelle (ou aptitude au désaisonnement) (Hanocq *et al.*, 1999). Ils agiraient ainsi sur l'intensité (ou profondeur) de l'anœstrus de l'espèce considérée, défini comme étant la proportion de brebis ovulant de façon spontanée (Thimonier *et al.*, 2000), probablement en modifiant le degré de photosensibilité de la race considérée (Martin *et al.*, 2002).

Chez les ovins les différentes portions du signal photopériodique synchronisent et participent à définir la durée d'expression d'un rythme endogène annuel de reproduction. Les profils saisonniers définitifs sont ensuite élaborés en intégrant l'ensemble des autres facteurs environnementaux dont le rôle est dépendant de l'intensité du signal photopériodique. Ainsi ces facteurs secondaires agiraient en ajustant et/ou perturbant les mécanismes du décodage du signal photopériodique. Cette hiérarchisation des facteurs implique qu'une manipulation des facteurs secondaires ne peut avoir qu'un impact limité sur les profils saisonniers de reproduction, tout du moins sous les aires tempérées.

II. Mécanismes neuroendocriniens contrôlant la fonction de reproduction chez la brebis

La fonction de reproduction de la brebis est dominée par l'interaction continue de deux rythmes distincts que sont i) le cycle œstral et ii) le rythme annuel d'activité ovarienne (Goodman et Inskeep, 2006). Aussi, l'analyse des mécanismes neuroendocriniens sous-jacents à l'expression de chacun de ces rythmes structurera le présent chapitre.

1. Le cycle œstral

Les mécanismes neuroendocriniens aboutissant à l'ovulation au cours du cycle œstral de la brebis sont comparables à ceux des mammifères à ovulation spontanée, tout en présentant

quelques particularités propres à l'espèce. Un dialogue hormonal entre l'ovaire et le complexe hypothalamo-hypophysaire est au centre de la régulation de ces mécanismes (**Figure 12**).

a. Le complexe hypothalamo-hypophysaire

L'hypophyse, constituée par la neurohypophyse (ou lobe postérieur de l'hypophyse) et l'adénohypophyse (ou lobe antérieur de l'hypophyse), est l'une des principales glandes endocrines des vertébrés. Elle est reliée à l'hypothalamus dans le diencephale par la tige pituitaire. L'ensemble hypothalamus-hypophyse constitue un tout fonctionnel ou complexe hypothalamo-hypophysaire (Gilles *et al.*, 2006).

La *pars distalis* et la *pars tuberalis* sont deux parties morphologiquement distinctes de l'adénohypophyse qui contiennent différents types cellulaires sécrétant des hormones protéiques à effets trophiques. Plus précisément, la *pars tuberalis* contient majoritairement (80 %) des cellules sécrétant de l'hormone lutéinisante (LH) et/ou de l'hormone folliculostimulante (FSH) (Childs *et al.*, 1994) à effet gonadotrope (ou gonadotrophines). L'hypothalamus contrôle la sécrétion de LH et FSH par la libération dans le système porte-hypophysaire de facteurs stimulant (gonadolibérines ou LH/FSH-RF) ou inhibant (gonadostatines ou LH/FSH-IF) l'activité des gonadotrophines (Gilles *et al.*, 2006).

La GnRH est la principale gonadolibérine produite par l'hypothalamus (Schally *et al.*, 1971). Il s'agit d'un décapeptide dont de multiples formes ont été identifiées chez les vertébrés (Fernald et White, 1999; Kah *et al.*, 2007). Chez les mammifères, seules deux à trois formes distinctes sont exprimées (Yahalom *et al.*, 1999). La première forme (ou GnRH-1) possède une séquence fortement conservée chez la plupart des mammifères et joue le rôle principal dans le contrôle de l'activité des gonadotrophines. A ce jour, les autres formes de GnRH mammalienne (GnRH-II et IGnRH-III) n'ont pas de rôle *in vivo* définitivement établi et généralisé à l'ensemble des mammifères (Herbison, 2006). De fait et dans la suite du manuscrit, la dénomination « GnRH » désignera la première forme du décapeptide.

▪ *Les neurones à GnRH*

A l'instar des autres espèces de mammifères, les neurones à GnRH de l'espèce ovine ont une origine extra-cérébrale et migrent vers l'encéphale au cours de l'embryogénèse (Wray, 2002). Cette particularité ontogénique explique la répartition diffuse des corps cellulaires des neurones à GnRH le long de leur couloir de migration dans l'encéphale depuis les bulbes olfactifs jusqu'à l'hypothalamus médiobasal (Lehman *et al.*, 1986; Caldani *et al.*, 1988). Chez

les ovins, la majorité de ces corps cellulaires sont situés dans la partie rostro-caudale du couloir de migration, localisée au niveau du diencéphale (Lehman *et al.*, 1986). Les neurones à GnRH diencéphaliques sont distribués à 50 % dans l'aire préoptique (APO), le reste se répartissant entre la bande diagonale de Broca (BdB), l'aire hypothalamique antérieure (AHA) et l'hypothalamus médiobasal (HMB) (Lehman *et al.*, 1986; Caldani *et al.*, 1988; Boukhliq *et al.*, 1999).

La plupart des neurones à GnRH projettent vers la zone externe de l'éminence médiane, organe neurohémal localisé à la base de l'hypothalamus et ce quelle que soit la région cérébrale considérée (Polkowska, 1981; Caldani *et al.*, 1988; Jansen *et al.*, 1997). Ce réseau de neurones libère le décapeptide dans les capillaires du système porte et est ainsi impliqué dans le contrôle direct de l'activité sécrétoire des gonadotrophines.

- *La sécrétion de GnRH et des gonadotrophines*

La GnRH peut être libérée dans le réseau porte sous deux formes distinctes i) une série de « pulses » ou ii) une unique décharge massive (encore appelée pic). Les pulses de GnRH correspondent à des épisodes de libération brutale d'hormone dans le réseau porte, caractérisés par leur fréquence et leur amplitude. Le pic de GnRH est quant à lui caractérisé par une libération d'hormone de forte amplitude qui reflète la transition d'une sécrétion pulsatile vers une sécrétion continue (Goodman et Inskeep, 2006). Ces propriétés des profils de libération de la GnRH ont d'abord été exclusivement attribuées à la sécrétion de LH (Dierschke *et al.*, 1970; Butler *et al.*, 1972) avant que le développement, chez les ovins, de méthodes neurochirurgicales permettant le prélèvement répété d'échantillon de sang porte-hypophysaire sur des animaux vigiles (Clarke et Cummins, 1982; Caraty et Locatelli, 1988; Caraty *et al.*, 1994) n'établisse la dépendance de la sécrétion des gonadotrophines vis-à-vis de la sécrétion de GnRH. Le mode de sécrétion pulsatile de la GnRH apparaît ainsi indispensable pour maintenir l'activité sécrétoire des gonadotrophines (Hotchkiss et Knobil, 1994). Toutefois, si un pulse de LH est toujours associé à un pulse de GnRH l'équivalent n'est pas vérifié pour la FSH. Cette régulation différentielle de la sécrétion des gonadotrophines trahit la présence d'une gonadolibérine propre à la FSH (ou FSH-RF), qui reste non identifiée, et qui provoquerait la sécrétion de pulses de FSH indépendants de la GnRH (pour revues cf. Padmanabhan et McNeilly, 2001; Padmanabhan et Sharma, 2001)

b. Les ovaires

Chez les ovins, le processus de la production d'ovocytes ainsi que les différentes étapes de la maturation des follicules sont comparables à ceux des autres espèces de mammifères (Richards, 1980; Scaramuzzi *et al.*, 1993). Ils sont en partie tributaires des fonctions endocrines et paracrines des ovaires, fonctions principalement assurées par les cellules de granulosa et de la thèque interne des follicules ainsi que par les cellules lutéales du corps jaune (Robel, 2001).

A partir d'un même précurseur, le cholestérol, des cascades de conversions enzymatiques opèrent la stéroïdogenèse de la progestérone par les cellules lutéales du corps jaune ainsi que d'œstrogènes (principalement sous forme de 17β -œstradiol) par les cellules de la granulosa des follicules (Miller, 1988). Les cellules de la granulosa des follicules produisent également des protéines, en particulier l'activine, l'inhibine (toutes deux issues de l'épissage alternatif des mêmes gènes) et la follistatine (Ying, 1988). Chez les ovins, seule la forme A de l'inhibine est produite (Engelhardt *et al.*, 1993). Si le rôle endocrinien de l'inhibine A est avéré (Campbell et Baird, 2001), les rôles endocriniens de l'activine et de la follistatine dans l'espèce ovine restent sujet à débats (Padmanabhan *et al.*, 2002).

c. L'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique

Les systèmes endocriniens du complexe hypothalamo-hypophysaire et des ovaires sont en dialogue permanent. Alors que les taux circulants des stéroïdes gonadiques sont un des facteurs régulateurs les plus importants de la sécrétion de GnRH, les taux circulants et les différents profils de libération des gonadotrophines influencent de façon concomitante le processus de maturation folliculaire (**Figure 12**).

▪ *La sécrétion de GnRH au cours du cycle œstral*

Les gonadotrophines jouent un rôle majeur dans la régulation des fonctions ovariennes. En effet, la libération pulsatile de LH et les taux circulants de FSH dirigent les différentes étapes de la folliculogenèse tandis que le pic de LH (ou pic préovulatoire) provoque l'ovulation (pour revues cf. Scaramuzzi *et al.*, 1993; Monniaux *et al.*, 2009).

D'un autre côté, les stéroïdes gonadiques exercent des rétrocontrôles sur la sécrétion de GnRH et *in fine* sur la sécrétion des gonadotrophines. Ainsi, la progestérone sécrétée par le corps jaune exerce un rétrocontrôle négatif en inhibant la fréquence des pulses de GnRH

(Karsch *et al.*, 1987). La nature du rétrocontrôle exercé par la progestérone sur le pic préovulatoire de GnRH dépend de son moment d'exposition. Lorsque la progestérone est présente en amont du processus de génération du pic, elle stimule la libération de GnRH (Caraty et Skinner, 1999) alors que présente au cours de ce même processus, elle inhibe le pic de GnRH (Kasa-Vubu *et al.*, 1992). L'œstradiol, quant à lui, exerce un rétrocontrôle plus complexe sur la pulsativité de la GnRH. Présent à faible concentration lors des premières étapes de la croissance folliculaire, l'œstradiol exerce un rétrocontrôle négatif en altérant les profils de libération de la GnRH ainsi qu'en diminuant l'amplitude des pulses tout en augmentant leur fréquence et le taux basal de GnRH entre chaque pulse (Evans *et al.*, 1994; Evans *et al.*, 1995). Lorsque les quantités d'œstradiol s'accroissent dans les dernières étapes du processus de maturation folliculaire, le rétrocontrôle exercé devient largement positif, le mode de sécrétion de GnRH passe d'épisodique à continu et s'ensuit le pic préovulatoire de GnRH (Karsch, 1987). Par ailleurs, ces deux hormones agissent de façon synergique notamment lorsque la progestérone sensibilise l'hypothalamus au rétrocontrôle positif des fortes quantités d'œstradiol (Caraty et Skinner, 1999; Skinner *et al.*, 2000).

Le dialogue hormonal s'établissant au sein de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique conduit à moduler les profils de sécrétion de GnRH tout au long des phases folliculaire et lutéale du cycle œstral, établissant ainsi des profils caractéristiques pour chaque phase : les pulses de GnRH sont de forte amplitude et de faible fréquence lors de la phase lutéale puis de forte fréquence et faible amplitude lors de la phase folliculaire jusqu'au pic préovulatoire (pour revues cf. Goodman *et al.*, 2002; Goodman et Inskeep, 2006).

- *Les systèmes impliqués dans l'action centrale des stéroïdes sexuels*

Les neurones à GnRH n'expriment pas de récepteurs aux œstrogènes de type ER α et aucun des deux récepteurs à la progestérone (Herbison *et al.*, 1993; Skinner *et al.*, 2001). Si environ 50 % des neurones à GnRH expriment le second récepteur intracellulaire aux œstrogènes de type ER β (Skinner et Dufourny, 2005), ce dernier ne semble pas jouer un rôle majeur dans le contrôle du cycle œstral, du moins chez la souris (Krege *et al.*, 1998; Dorling *et al.*, 2003). De fait il est admis que, chez les mammifères, les rétrocontrôles des stéroïdes sexuels sur la sécrétion de GnRH sont indirects et transmis via des populations neuronales intermédiaires disposant de récepteurs aux stéroïdes (Wintermantel *et al.*, 2006).

Les afférences synaptiques en provenance de populations neuronales sensibles aux stéroïdes sexuels, ou de neurones intermédiaires à ces populations, sont nombreuses sur les neurones à

GnRH (Herbison, 1998). Ainsi sont rapportées chez les mammifères des afférences directes depuis de nombreuses régions télencéphaliques majoritairement situées dans l'hypothalamus (Iqbal *et al.*, 2001; Pompolo *et al.*, 2003a; Pompolo *et al.*, 2003b; Pompolo *et al.*, 2005) conjointement avec celles de neurones noradrénergiques localisés dans le tronc cérébral (Rawson *et al.*, 2001) ou encore de neurones sérotoninergiques du noyau du raphé (Kiss et Halasz, 1985). Plus récemment des afférences indirectes depuis les neurones noradrénergiques des noyaux A1 et A2 du tronc cérébral, via le noyau du lit de la strie terminale (BNST), ont également été mis en évidence chez la brebis (Pereira *et al.*, 2010). Toutes ces populations, en transmettant le rétrocontrôle des stéroïdes sexuels vers les neurones à GnRH, participent à différents degrés à la modulation d'un ou de plusieurs paramètres des profils de libération de la GnRH. Si certaines études ont par exemple pu déterminer que les neurones GABAergiques (Herbison, 1997) et glutamatergiques (Kuehl-Kovarik *et al.*, 2002) de l'hypothalamus ont une place importante dans la transmission du rétrocontrôle négatif et positif (respectivement) des stéroïdes sexuels ; la découverte du rôle de certains peptides de la famille des RF-amides ou *RFamide-related peptides* (RFRPs) (pour revue cf. Kriegsfeld, 2006) dans le contrôle de la sécrétion de GnRH a récemment permis d'identifier le circuit neuronal majeur de l'intégration des rétrocontrôles stéroïdiens (pour revues cf. Smith, 2008; Caraty *et al.*, 2010; d'Anglemont de Tassigny et Colledge, 2010; Clarke, 2011; Roa *et al.*, 2011).

✓ *Le rôle majeur des kisspeptines*

Membres de la famille des RF-amides, les kisspeptines Kp-54, Kp-14, Kp-13 et Kp-10 sont issues de régulations post-traductionnelles du produit du gène *Kiss-1* (Kotani *et al.*, 2001; Ohtaki *et al.*, 2001). Les kisspeptines sont les ligands naturels du récepteur GPR54 qu'elles stimulent avec une efficacité équivalente (Kotani *et al.*, 2001). Chez les primates et rongeurs, l'immunoneutralisation centrale contre le peptide (Kinoshita *et al.*, 2005), l'utilisation d'un antagoniste (Roseweir *et al.*, 2009; Pineda *et al.*, 2010a) ou l'étude des paramètres de fertilité des animaux *knocked-out* pour GPR54 et *Kiss-1* (Clarkson *et al.*, 2008), ont démontré le caractère essentiel de la voie des kisspeptines dans le contrôle central de l'ovulation. D'un point de vue neuroanatomique, les neurones à kisspeptine de la brebis sont localisés au niveau l'APO latérale et du noyau arqué (ARC) avec une population plus importante dans cette dernière structure (Franceschini *et al.*, 2006). Chez la brebis, le pouvoir sécrétagogue des kisspeptines sur la GnRH (Messenger *et al.*, 2005), la présence de récepteurs aux œstrogènes de type ER α (Franceschini *et al.*, 2006) et de récepteurs à la progestérone (Smith *et al.*, 2007)

sur la majorité des neurones à kisspeptines ainsi que la présence de GPR54 sur 90 % des neurones à GnRH (Smith *et al.*, 2006b) ont conduit à considérer un rôle majeur pour ces populations neuronales dans le contrôle de la sécrétion de GnRH au cours du cycle œstral.

Les neurones à kisspeptines de l'APO latérale projettent directement vers les neurones à GnRH pour modifier leur activité alors que la population présente dans l'ARC, présentant peu de projections directes vers les corps cellulaires à GnRH, agirait via d'autres populations intermédiaires (Backholer *et al.*, 2010). Concernant ce dernier point il a été démontré, chez la souris, que les stéroïdes sexuels pouvaient sensibiliser les neurones à GnRH à l'action des kisspeptines via la modulation de l'activation des populations GABAergiques et glutamatergiques au contact des neurones à GnRH (Pielecka-Fortuna *et al.*, 2008; Pielecka-Fortuna et Moenter, 2010). Les neurones à kisspeptines de l'ARC agiraient également directement au niveau de l'éminence médiane, région riche en fibres à kisspeptines (Franceschini *et al.*, 2006), en régulant la libération de GnRH par des interactions axo-axoniques (Amstalden *et al.*, 2005) sans toutefois présenter d'effets hypophysiotropes (Smith, 2008). Si les deux populations de neurones à kisspeptines sont impliquées dans l'intégration et la transmission des rétrocontrôles stéroïdiens vers les neurones à GnRH, des différences fonctionnelles sont rapportées. Ainsi différentes sous-populations de neurones à kisspeptines coexisteraient dans l'ARC permettant à cette seule structure de participer à la fois aux rétrocontrôles positif et négatif des hormones stéroïdiennes (Smith *et al.*, 2006b). Il est intéressant de noter que ce rôle central de l'ARC avait déjà été mis en évidence chez la brebis (Caraty *et al.*, 1998) notamment du fait de la présence de populations neuronales bêta-endorphinergiques, catécholaminergiques, ou encore dynorphinergiques qui peuvent contrôler l'activité des neurones à GnRH (Dufourny *et al.*, 2005b; Dufourny *et al.*, 2005a). Les neurones de l'APO latérale interviendraient, conjointement avec la sous-population des neurones de la partie caudale de l'ARC, seulement lors de la transmission du rétrocontrôle positif des œstrogènes (Campbell *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2009; Caraty *et al.*, 2010).

✓ *Le rôle de la GnIH*

Chez les mammifères, le gène *GnIH* code pour deux peptides de la famille des RF-amides GnIH-1 et GnIH-3 (ou RFRP-1 et RFRP-3 selon la nomenclature) (pour revues cf. Smith et Clarke, 2010; Tsutsui *et al.*, 2010). Les GnIH sont les ligands naturels d'un récepteur couplé à une protéine G identifié comme étant GPR147 (Dockray, 2004) puis renommé GnIH-R (Smith et Clarke, 2010). Les études d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* réalisées

chez la brebis révèlent une distribution neuroanatomique des corps cellulaires à GnIH principalement localisée dans le noyau hypothalamique dorsomédian (HDM), région disposant de projections vers de nombreux noyaux hypothalamiques, notamment vers la région ventrale du noyau paraventriculaire (NPV) (Clarke *et al.*, 2008; Dardente *et al.*, 2008). Le GnIH-R, quant à lui, est principalement localisé dans les noyaux suprachiasmatiques et supraoptiques, le NPV et l'hypophyse (Dardente *et al.*, 2008).

La démonstration d'une forte proximité entre 40 à 80 % des neurones à GnRH et les fibres à GnIH a suggéré un rôle pour les GnIH dans la régulation de la libération de GnRH (Smith *et al.*, 2008). De plus, sont observées des fibres à GnIH au niveau de la zone neurosécrétoire de l'éminence médiane (Dardente *et al.*, 2008; Qi *et al.*, 2009) suggérant une possible régulation au niveau des terminaisons axoniques des neurones à GnRH. Effectivement, chez les rongeurs, le GnIH-3 a un effet inhibiteur sur les neurones à GnRH (Ducret *et al.*, 2009). Cependant, alors que certaines études suggèrent que de faibles niveaux de GnIH constituent une partie du signal permettant l'expression du pic préovulatoire de GnRH (Gibson *et al.*, 2008; Rizwan *et al.*, 2009) ; d'autres auteurs constatent chez les primates une stimulation de l'expression du gène en fin de phase folliculaire (Smith *et al.*, 2010). Chez les ovins, comme chez la plupart des mammifères, le rôle de la GnIH-3 sur les neurones à GnRH n'est pas encore clairement établi au moment de la rédaction de ce manuscrit (Smith et Clarke, 2010). Une vraisemblable association fonctionnelle entre les fibres à GnIH et kisspeptines au niveau de l'éminence médiane pour réguler la libération de GnRH étant principalement à l'étude (Smith *et al.*, 2008; Smith, 2009). D'un autre côté, la GnIH-3 possède un effet hypophysiotropique inhibiteur plus net chez l'ensemble des mammifères (Clarke *et al.*, 2009; Pineda *et al.*, 2010b), notamment sur les niveaux de sécrétion de LH chez les bovins (Kadokawa *et al.*, 2009). La démonstration *in vitro*, sur des cellules hypophysaires ovines, d'un effet inhibiteur de la GnIH-3 uniquement sur la FSH amène à considérer ce peptide en tant que potentielle gonadostatine spécifique de cette gonadotrophine (FSH-IF) (Sari *et al.*, 2009).

▪ *Le générateur de pulses de GnRH*

La génération des pulses de GnRH est conditionnée par le fonctionnement d'un mécanisme de coordination et de synchronisation de l'activité neurosécrétoire de l'ensemble des neurones à GnRH (pour revues, cf. Moenter *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2010). Les mécanismes neurobiologiques impliqués auraient deux composantes principales, à savoir i) la génération

d'une activité épisodique des corps cellulaires des neurones à GnRH et ii) la synchronisation de la libération du décapeptide au niveau des terminaisons axoniques de ces mêmes neurones (Maeda *et al.*, 2010). Le fonctionnement de ces mécanismes n'est pas complètement déterminé. Cependant, il apparaît désormais probable que le générateur de pulses de GnRH associe la capacité des corps cellulaires des neurones à GnRH à auto-entretenir une activité pulsatile (Duittoz et Batailler, 2000), à un mécanisme de synchronisation contrôlé par d'autres neurones (pour revues, cf. Goodman et Inskeep, 2006; Lehman *et al.*, 2010a).

Depuis les travaux de Halasz et Pupp (1965), il est déterminé que le substrat neuroanatomique du générateur de pulses de GnRH est l'hypothalamus médiobasal (chez les ovins, se reporter aux travaux de Thiery et Pelletier, 1981; Whisnant et Goodman, 1994). Récemment, les travaux de Ohkura *et al.* (2009a; 2009b) réalisés chez la chèvre (*Capra hircus*) et la ratte, ont suggéré que les neurones à kisspeptines du noyau arqué étaient au cœur du fonctionnement du générateur de pulses. Dès lors, la plupart des études réalisées ont confirmé ces observations (Navarro *et al.*, 2009; Corander *et al.*, 2010; Goodman *et al.*, 2011). Les neurones impliqués ont été renommés neurones à KNDy (Lehman *et al.*, 2010a) afin de souligner qu'ils co-expriment la dynorphine A (Dyn) et la neurokinine B (NKB) (Goodman *et al.*, 2007), deux peptides inhibiteurs de la sécrétion de GnRH (Goodman *et al.*, 2002; Goodman *et al.*, 2004; Goodman *et al.*, 2011). En effet, selon le modèle établi (Wakabayashi *et al.*, 2010), les neurones à KNDy forment un circuit neuronal dont l'activité peut être accélérée ou freinée par l'action respective de la NKB et de la Dyn ; les actions réciproques des deux peptides génèrent ainsi une oscillation rythmique dans l'activité des neurones du circuit. Ces oscillations engendrent une libération pulsatile de la kisspeptine qui, libérée au niveau des terminaisons nerveuses des neurones à GnRH dans l'éminence médiane, stimule à son tour la libération du décapeptide de façon pulsatile. Dans ce modèle, la sensibilité du circuit de neurones à KNDy à l'œstradiol (Rance et Bruce, 1994; Smith *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2009) et probablement à la progestérone (Goodman *et al.*, 2004), expliqueraient les effets des rétrocontrôles stéroïdiens sur la pulsativité du couple GnRH/LH (**Figure 13**).

En plus d'être sensible aux rétrocontrôles stéroïdiens, le générateur de pulses de GnRH constitue, au niveau central, le point d'intégration final des facteurs environnementaux modulateurs de la fonction de reproduction. Le générateur de pulses de GnRH apparaît donc jouer un rôle essentiel dans le contrôle du rythme annuel d'activité ovarienne (pour revue, cf. Karsch *et al.*, 1984).

2. Le rythme annuel d'activité ovarienne

Chez la plupart des vertébrés, l'interaction des mécanismes de mesure du temps photopériodique et de génération du rythme circannuel aboutit à la régulation à long terme des cycles saisonniers reproductifs (Gwinner, 1986). Le principal facteur responsable de ce phénomène étant la variation de la sensibilité du générateur de pulses de GnRH au rétrocontrôle négatif exercé par l'œstradiol (Legan *et al.*, 1977). Chez les mammifères, si le fonctionnement du mécanisme de mesure du temps photopériodique n'est pas résolu dans son ensemble, ses bases physiologiques sont en revanche bien déterminées. D'un autre côté, l'existence du mécanisme de génération du rythme circannuel de GnRH n'est étayée que par des observations indirectes de son fonctionnement dont les principes restent à ce jour hypothétiques.

a. La mesure du temps photopériodique

Chez les mammifères, la photopériode module l'activité saisonnière du générateur de pulses de GnRH via le rythme de sécrétion d'une hormone, la mélatonine (Bittman *et al.*, 1985; Robinson, 1987; Reiter, 1993). Ce rythme est lui-même dépendant du système circadien endogène à la fois pour sa génération et son interprétation (Lincoln, 2006; Lincoln et Hazlerigg, 2010). Les mécanismes de mesure du temps photopériodique apparaissent ainsi être totalement dépendant du système circadien endogène (Lincoln et Hazlerigg, 2010).

▪ La génération du rythme de mélatonine

La transmission de l'information lumineuse et sa traduction en un rythme de sécrétion de mélatonine implique une voie neurale multisynaptique dont les principaux acteurs sont la rétine, les noyaux suprachiasmatiques hypothalamiques (NSC) et la glande pinéale qui sécrète la mélatonine (Karsch *et al.*, 1984). La voie rétinohypothalamo-pinéale (**Figure 14**), en fournissant d'une part i) un signal d'entraînement circadien de l'activité sécrétoire de la glande pinéale synchronisé par le rythme lumière/obscurité ambiant et d'autre part ii) en limitant cette même activité aux périodes d'obscurité, conditionne une libération nocturne de la mélatonine dont la durée est inversement proportionnelle à la photopériode (pour revue cf. Simonneaux et Ribelayga, 2003).

✓ La rétine

Chez les mammifères, la perception lumineuse pour le contrôle de la sécrétion de mélatonine s'effectue au niveau de la rétine (Legan et Karsch, 1983) en partie par les photorécepteurs

visuels classiques (cônes et bâtonnets) mais surtout via une sous population de neurones de la rétine interne rendue exclusivement photosensible par l'expression de la mélanopsine, un photopigment (Panda *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2005). Les prolongements des neurones impliqués forment le tractus rétinohypothalamique (RHT), tractus monosynaptique distinct du chiasma optique, et transmettent l'information lumineuse vers les noyaux suprachiasmatiques (**Figure 14-A**) (Legan et Winans, 1981; Hatter *et al.*, 2002). Les principaux neurotransmetteurs libérés au niveau des contacts synaptiques du RHT avec les neurones des NSC sont le glutamate et le peptide PACAP (pour revue cf. Meijer et Schwartz, 2003).

✓ *Les noyaux suprachiasmatiques*

Les NSC des mammifères sont localisés dans la partie antéroventrale de l'hypothalamus au-dessus du chiasma optique, de part et d'autre du troisième ventricule. Cette structure est capable d'élaborer de façon autonome un message rythmique circadien persistant. Les oscillations générées sont transmises au reste de l'organisme où elles sont indispensables pour synchroniser d'autres oscillateurs circadiens, présents dans la plupart des organes et tissus. L'oscillateur des NSC est ainsi considéré comme étant l'horloge circadienne principale (par opposition aux horloges périphériques dépendantes) et son fonctionnement responsable des activités comportementales et physiologiques circadiennes cohérentes au niveau des organes et de l'organisme entier (pour revues cf. Klein *et al.*, 1991; Hastings *et al.*, 2007).

L'oscillation circadienne est générée au niveau des gènes par chaque cellule de l'organisme disposant de la machinerie moléculaire adéquate. Principalement déterminés chez les rongeurs (pour revue cf. Reppert et Weaver, 2002), ses principes de fonctionnement (**Figure 15**) sont relativement similaires chez les ovins (Dardente *et al.*, 2009). Ainsi qu'il est observé dans les horloges périphériques en l'absence d'un signal de synchronisation, les oscillations circadiennes générées par chaque cellule sont déphasées et ne permettent pas l'émergence persistante d'un rythme circadien cohérent au niveau tissulaire (Welsh *et al.*, 2004). C'est la synchronisation intercellulaire inédite des neurones des NSC via des contacts synaptiques et des jonctions gaps qui, en l'absence d'information environnementale, permet le maintien en phase de ces oscillations (pour revue cf. Welsh *et al.*, 2010). Dans ces conditions, la période du rythme endogène est d'un peu plus de 24 heures chez les différentes races ovines étudiées (Ile-de-France : Ravault *et al.*, 1989; Suffolk : Earl *et al.*, 1990; Romney Marsh : Matthews *et al.*, 1992).

L'information lumineuse, transmise par le RHT, est le principal synchroniseur (ou zeitgeber) du rythme généré par les NSC entraînant ce dernier vers une période d'exactly 24 heures (pour revues cf. Klein *et al.*, 1991; Dibner *et al.*, 2010). Cette synchronisation est obtenue par une remise à l'heure quotidienne de l'horloge principale, dépendante du moment où la lumière est perçue en relation avec la période endogène de l'horloge (phase photosensible) (Daan et Pittendrigh, 1976). Ainsi chez les ovins, du fait de leur période endogène, la synchronisation de l'horloge correspondrait à des avances de phase quotidiennes liées à l'aube (Matthews *et al.*, 1993). Au niveau moléculaire, cette réinitialisation de l'horloge s'effectue via une activation transcriptionnelle dépendante de la lumière des gènes *Pers* (pour revue cf. Hastings *et al.*, 2007).

En sus de leur rôle dans la génération et la propagation d'un rythme circadien pouvant être synchronisé au cycle jour/nuit (ou cycle L:D), les NSC constituent également un site de mesure du temps photopériodique (pour revue cf. Goldman, 2001). Ainsi la phase photosensible des NSC est affectée par la photopériode (Sumova *et al.*, 1995) de même que leurs profils d'activité neuronale (Mrugala *et al.*, 2000; VanderLeest *et al.*, 2007). Dans les NSC, la mesure du temps photopériodique semble conforme au modèle de Pittendrigh (1964). Le décodage de la photopériode, via les variations des relations de phase entre les oscillateurs de l'aube et du crépuscule (de deux : Jagota *et al.*, 2000; à trois oscillateurs : Inagaki *et al.*, 2007), ne dépendrait pas d'un mécanisme intracellulaire mais d'un mécanisme intercellulaire intimement lié à la structure hétérogène des NSC (Johnston, 2005; Kuhlman et McMahon, 2006) et renforcé par des phénomènes de plasticité neuronale (VanderLeest *et al.*, 2007; Girardet *et al.*, 2010; Meijer *et al.*, 2010).

Les NSC transmettent l'information concernant le rythme L:D ambiant et sa position au cours du cycle photopériodique notamment vers la glande pinéale où ils jouent un rôle majeur dans le contrôle de son activité métabolique (**Figure 14-B**). La transmission du message temporel depuis les NSC s'effectue via l'axe hypothalamo-pinéalien, une voie multisynaptique ayant entre autres relais les noyaux paraventriculaires (NPV) puis les ganglions cervicaux supérieurs (SCG). Les fibres sympathiques issues des SCG constituent une afférence majeure de la glande pinéale (pour revues cf. Reiter, 1981; Simonneaux et Ribelayga, 2003).

✓ *La glande pinéale*

La glande pinéale, une évagination du plafond diencephalique localisée chez les ovins entre les commissures habénulaire et postérieure, est un tissu homogène principalement composé de

cellules neuroendocriniennes ou pinéaloctes, capables de synthétiser et libérer l'hormone mélatonine (**Figure 14-C**) (pour revue cf. Pevet, 1983). Cette libération s'effectue directement (les pinéaloctes ne stockent pas la mélatonine) dans la circulation périphérique ou dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) au niveau du troisième ventricule via le récessus pinéalien (Malpoux *et al.*, 2001; Tricoire *et al.*, 2002). Une fois libérée, la demi-vie plasmatique de l'hormone est de l'ordre de la dizaine de minutes chez la brebis (Zarazaga *et al.*, 1998b). Au sein des pinéaloctes, la sérotonine est convertie en mélatonine par l'action successive des enzymes AANAT et HIOMT, cette première étant considérée comme l'enzyme limitante de cette synthèse (pour revue cf. Simonneaux et Ribelayga, 2003).

Les NSC, via l'axe hypothalamo-pinéalien, conditionnent les profils de libération de la mélatonine en entraînant le rythme d'activité de l'AANAT vers la période nocturne du nyctémère. L'activité de cette enzyme, via un réseau neuronal distinct en provenance de la rétine (Dafny, 1980), est également intensément inhibée par la lumière. Ce deux mécanismes d'entraînement et d'inhibition s'exerçant sur l'activité de l'AANAT sont responsables de la libération exclusivement nocturne de la mélatonine (pour revues cf. Lincoln *et al.*, 1985; Schwartz *et al.*, 2001; Simonneaux et Ribelayga, 2003). Chez les mammifères, les forces relatives de ces deux mécanismes déterminent les profils de libération nocturne de l'hormone (Reiter, 1991b; Reiter, 1991a). Chez les ovins en particulier, l'entraînement par les NSC (Matthews *et al.*, 1992; Ravault et Chesneau, 1999) et la forte inhibition par la lumière de l'activité de l'AANAT (Picazo et Lincoln, 1995; Stehle *et al.*, 2001) conditionnent une sécrétion soutenue de mélatonine tout au long de la phase obscure ainsi qu'une élévation et une chute brutales des taux au moment des transitions lumineuses (**Figure 14-C**) (Bittman *et al.*, 1983b). L'activité de l'enzyme HIOMT est quant à elle responsable de l'amplitude du rythme de sécrétion de mélatonine et, au moins chez les rongeurs, serait sous le contrôle photopériodique des NSC (Ribelayga *et al.*, 2000).

Ainsi que démontré par les effets d'une ablation (pinéalectomie) ou dénervation de la glande pinéale (Barrell et Lapwood, 1979; Lincoln, 1979; Bartness *et al.*, 1993), le rythme de sécrétion de mélatonine est le signal essentiel dans la transduction de l'information photopériodique vers l'hypothalamus.

- *L'interprétation du signal mélatoninergique*

Des trois paramètres caractérisant le rythme de sécrétion de mélatonine (durée, amplitude et phase), le rôle majeur tenu par la durée de sécrétion de l'hormone dans la transmission de

l'information photopériodique recueille un large consensus (pour revues cf. Bartness *et al.*, 1993; Reiter, 1993). Ainsi les effets des traitements photopériodiques sur les profils saisonniers de reproduction peuvent être résumés quant à leurs effets sur l'évolution de la durée de sécrétion de la mélatonine (Illnerova, 1991; Gorman et Zucker, 1997). Chez les ovins pinéalectomisés en particulier, les transitions reproductives peuvent être induites par l'infusion périphérique de mélatonine dont la durée mime celle constatée en JC (initiation) ou en JL (suppression) (Bittman *et al.*, 1983a; Bittman et Karsch, 1984).

Les effets de la mélatonine s'exercent via ses récepteurs à haute affinité MT1 et MT2, disposant de sept domaines transmembranaires et couplés à une protéine Gi (Reppert *et al.*, 1996b). Ces récepteurs ont été communément identifiés dans la *pars tuberalis* des mammifères lors d'études autoradiographiques employant de la mélatonine marquée à l'iode 125 (Vanecek, 1988; Morgan *et al.*, 1994). Cette même méthode a plus particulièrement permis l'identification de ces récepteurs dans l'HMB des ovins et des hamsters Syriens (*Mesocricetus auratus*) (Maywood et Hastings, 1995; Malpoux *et al.*, 1998; Sliwowska *et al.*, 2004). Il est toutefois intéressant de noter qu'une étude récente n'en détecte pas la présence dans l'HMB de béliers par hybridation *in situ* (Hanon *et al.*, 2008). En se fixant sur MT1, la mélatonine régule négativement le système de l'adenylate cyclase et inhibe l'accumulation intracellulaire d'AMP cyclique (AMPC) (Morgan *et al.*, 1989; Morgan *et al.*, 1990). Quant à MT2, son rôle dans la transduction du signal photopériodique semble être limité à la régulation de MT1 voir être inexistant (Weaver *et al.*, 1996; Hanon *et al.*, 2008; Coge *et al.*, 2009). Plus récemment, une étude réalisée chez la souris conforte le rôle essentiel tenu par MT1 dans la transmission du message photopériodique (Yasuo *et al.*, 2009).

La mélatonine étant un composé lipophile, le signal mélatoninergique atteint ses cibles au niveau central via la circulation périphérique en traversant passivement la barrière hématoencéphalique (Vanecek, 1998) et probablement via le liquide céphalo-rachidien par diffusion depuis les parois du 3^{ème} ventricule (Legros *et al.*, 2006; Skipor et Thiery, 2008). La contribution relative de ces voies distinctes dans la transmission du signal mélatoninergique restant indéterminée.

✓ *Le rôle de la pars tuberalis de l'hypophyse*

Les cellules de la *pars tuberalis* pourvues de récepteurs à la mélatonine MT1 disposent d'une machinerie moléculaire circadienne complète dont l'expression est dépendante du signal mélatoninergique (von Gall *et al.*, 2005). Dans ce tissu, la réinitialisation du rythme généré

par l'horloge circadienne est dépendante de la montée des taux de mélatonine au crépuscule (Lincoln *et al.*, 2002). De plus la mélatonine, en supprimant des taux d'AMPC, inhibe la transcription des gènes dont la région promotrice dispose de l'élément de réponse circadien E-box (Johnston *et al.*, 2006). Ces interactions entre l'horloge de la *pars tuberalis* et le rythme de sécrétion de mélatonine permettent à l'horloge d'en interpréter la durée de sécrétion via un ou plusieurs mécanismes de mesure du temps photopériodique (Lincoln *et al.*, 2002; Johnston *et al.*, 2006; Dupré *et al.*, 2008; Dardente *et al.*, 2010). Ces mécanismes permettent d'une part à l'horloge de la *pars tuberalis* de diriger les profils saisonniers de sécrétion de la prolactine (Lincoln et Clarke, 1994) et de réguler d'autre part le catabolisme des hormones thyroïdiennes dans l'hypothalamus médiobasal pour contrôler l'initiation des transitions saisonnières reproductives (pour revues cf. Hazlerigg et Loudon, 2008; Morgan et Hazlerigg, 2008).

La prolactine est une hormone sécrétée par les cellules lactotrophes de la *pars distalis* dont les variations saisonnières de libération contrôlent principalement les cycles de croissance et mue de la toison (Lincoln, 1989). Les cellules de la *pars tuberalis* décodent le signal mélatoninergique et libèrent de façon photopériode-dépendante des sécrétagogues de la prolactine, notamment des neurokinines (Dupré *et al.*, 2010). L'utilisation de béliers HPD, dont l'hypophyse est isolée chirurgicalement de toute influence hypothalamique, a permis de mettre en évidence l'autonomie intrapituitaire de ce mécanisme (Lincoln et Clarke, 1994). Les bases de son fonctionnement restent toutefois à déterminer. Les premières études menées en ce sens suggèrent la présence d'un mécanisme de mesure du temps photopériodique conforme au modèle de Pittendrigh (1964) localisé au niveau intracellulaire. Le premier oscillateur lié à l'aube serait la famille de gènes *Pers* dont la séquence promotrice E-box conduit à une transcription dépendante de la chute des taux de mélatonine par un phénomène de dérépression (Messenger *et al.*, 1999; Messenger *et al.*, 2000). Les gènes de la famille des *Crys* constitueraient le second oscillateur, lié au crépuscule, dont la transcription est liée à l'élévation des taux de mélatonine par un mécanisme restant à définir (Dupré *et al.*, 2008). Les variations saisonnières de l'intervalle transcriptionnel des gènes *Pers* et *Crys* conduiraient à plus ou moins favoriser l'interaction des protéines PERs et CRYs (Lincoln *et al.*, 2002; Hazlerigg et Wagner, 2006; Lincoln, 2006; Dupré *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2008) et ainsi réguler la transcription photopériodique des gènes contrôlés par l'horloge circadienne dont les sécrétagogues de la prolactine (Stirland *et al.*, 2001).

Les cellules de la *pars tuberalis* disposant de récepteurs à la mélatonine sont des thyrotrophines ; elles expriment en effet la sous-unité β de la TSH (TSH β) ainsi que la sous-

unité α de l'hormone glycoprotéique (α GSU) dont l'arrangement hétérotrimérique forme l'hormone thyrotrope ou TSH (Klosen *et al.*, 2002). Contrairement aux thyrotrophines de la *pars distalis*, ces cellules ne sont pas sensibles à l'hormone thyroïdienne T3 ou à la thyrolibérine (Bockmann *et al.*, 1997). En revanche leur activité est photopériode-dépendante (Bockmann *et al.*, 1996; Dardente *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 2008). Récemment, trois études réalisées respectivement chez la caille Japonaise (*Coturnix japonica*) (Nakao *et al.*, 2008a), le bélier Soay (Hanon *et al.*, 2008) et le hamster européen (*Cricetus cricetus*) (Hanon *et al.*, 2009), ont mis en évidence l'implication des thyrotrophines de la *pars tuberalis* dans le contrôle photopériodique des transitions reproductives des vertébrés. Selon ces études, la perception des JL provoque dans un premier temps une augmentation des niveaux de TSH via la stimulation de l'expression de la TSH β . Les travaux concomitants de Dardente *et al.* (2010) réalisés chez le bélier Soay et de Masumoto *et al.* (2010) réalisés chez la souris, ont mis en évidence un mécanisme conforme au modèle de Bünning (1960) pour ce contrôle photopériodique de la transcription de TSH β . D'après leurs travaux, confirmés par une autre étude (Dupré *et al.*, 2010), le gène *Eya3* joue un rôle central dans ce mécanisme (Hut, 2011). En effet, la réinitialisation de l'horloge de la *pars tuberalis* par la mélatonine conditionne le moment de son pic d'expression (\approx 12 heures après le crépuscule) déterminant ainsi une phase « photosensible ». De fait, le gène *Eya3* dispose de plusieurs séquences E-box dans sa région promotrice ; dès lors que la sécrétion de mélatonine empiète sur cette phase, la transcription du gène est inhibée. Ainsi, seules des nuits dont la durée est inférieure à 12 heures (*i.e.* des JL) permettent l'expression du pic transcriptionnel d'*Eya3*. Une fois exprimée, la protéine EYA3 stimulera la transcription de TSH β via la coactivation de la protéine TEF (**Figure 16**).

✓ *Le rôle des tanycytes de l'hypothalamus médiobasal*

L'approche fonctionnelle des événements transcriptionnels induits par des changements photopériodiques, a permis à l'étude de Nakao *et al.* (2008a) de déterminer que les premiers événements hypophysaires entraînaient une seconde vague d'expression de gènes dans l'hypothalamus médiobasal. Ces événements hypothalamiques, confirmés chez les ovins (Hanon *et al.*, 2008), sont notamment localisés dans la zone épendymaire paraventriculaire (PVZ) entourant la base du 3^{ème} ventricule et impliquent la régulation de l'expression des enzymes du catabolisme des hormones thyroïdiennes, les déiodinases 2 et 3 (DIO2 et DIO3). L'enzyme DIO2 est le premier régulateur clé de la bioactivité des hormones thyroïdiennes puisqu'elle convertit la forme inactive et majoritairement circulante de l'hormone (T4) en

forme biologiquement active (T3). L'enzyme DIO3, second régulateur clé, est impliquée dans le phénomène inverse d'inactivation de la T3 (pour revue cf. Lechan et Fekete, 2005).

Dans la PVZ des vertébrés, les récepteurs à la TSH (ou TSH-Rs, récepteurs couplés à une protéine G) et les déiodinases sont colocalisés dans des cellules gliales remarquables, les tanocytes (Yoshimura *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2004; Yasuo *et al.*, 2007; Hanon *et al.*, 2008). Ces cellules bipolaires, dont les projections s'étendent de la surface du 3^{ème} ventricule jusque dans l'éminence médiane, sont impliquées dans la captation et le transport bidirectionnel de molécules à travers la barrière hématoencéphalique (Rodriguez *et al.*, 2005). Ainsi, les tanocytes permettraient une action locale et rétrograde de la TSH depuis les cellules de la *pars tuberalis*. Les TSH-Rs des tanocytes, activés en JL par l'augmentation de la production de TSH, stimulent en 10 jours la production de DIO2 via un mécanisme AMPc-dépendant (**Figure 17**) (Hanon *et al.*, 2008). Si, chez la caille et le hamster Sibérien, sont observées des variations saisonnières inverses de l'activité de la DIO3 (Yoshimura *et al.*, 2003; Yasuo *et al.*, 2005; Barrett *et al.*, 2007), ces dernières restent à identifier chez les petits ruminants (Yasuo *et al.*, 2006a; Hanon *et al.*, 2008). Ainsi, chez les vertébrés, les variations photopériodiques de l'activité des voies de conversion des hormones thyroïdiennes conduisent à favoriser la production de T3 en JL par rapport aux JC (pour revues cf. Hazlerigg et Loudon, 2008; Ono *et al.*, 2009).

Les disponibilités hypothalamiques en T3 sont également dépendantes du passage actif de la forme T4 produite par la glande thyroïde à travers la barrière hématoencéphalique, ce dernier étant assuré par de nombreux transporteurs (Kassem *et al.*, 2007). Il s'agit notamment de MCT-8 et Oatp1c1, dont la présence dans la PVZ et l'expression photopériodique favoriserait le transport bidirectionnel et le catabolisme des hormones thyroïdiennes au niveau des tanocytes chez les rongeurs (Herwig *et al.*, 2009; Ross *et al.*, 2011).

Cette régulation hypothalamique du catabolisme des hormones thyroïdiennes est l'élément central du mécanisme initié dans l'hypophyse qui aboutit à la régulation saisonnière de l'activité du générateur de pulses de GnRH (**Figure 17**) (pour revue cf. Hazlerigg et Loudon, 2008). Si ce mécanisme n'a été que récemment identifié, le rôle des hormones thyroïdiennes dans le contrôle des profils saisonniers de reproduction des vertébrés est en revanche connu depuis plusieurs décennies (Nicholls *et al.*, 1988; Webster *et al.*, 1991a; Webster *et al.*, 1991b). Chez la brebis, une thyroïdectomie réalisée en saison de reproduction permet de surmonter le développement d'un état photoréfractaire aux JC et ainsi de maintenir

perpétuellement la saison reproductive (Nicholls *et al.*, 1988; Moenter *et al.*, 1991; Karsch *et al.*, 1995). En revanche, une thyroïdectomie réalisée en saison d'anœstrus n'a pas d'impact sur le moment de la transition vers la saison de reproduction (Parkinson et Follett, 1994; Thrun *et al.*, 1997b).

Les études ayant procédé à l'infusion périphérique ou centrale de T4 avaient déterminé l'action centrale et photopériode-dépendante de l'hormone (limitée au début de la saison d'anœstrus des brebis intactes) pour le contrôle du moment de transition vers la saison d'anœstrus (Thrun *et al.*, 1997a; Viguié *et al.*, 1999; Billings *et al.*, 2002). Les travaux de Yasuo *et al.* (2006a) chez le bouc Saanen ont permis d'expliquer l'existence de cette fenêtre temporelle pour l'action de la T4 au niveau central. D'après cette étude, la perception de JL artificiels (L:D 16:8) avant la transition vers la saison de repos sexuel (observée en Mars pour cette race à 38°N) inhibe l'expression hypothalamique de DIO2 alors que les JL naturels (des jours relativement courts mais croissants) la stimulent. Ainsi chez les petits ruminants, à l'opposé des observations réalisées chez la caille (Yasuo *et al.*, 2006b), lorsque les JL naturels dépassent un certain seuil (en milieu ou fin d'anœstrus) l'absence d'effets de la T4 est expliqué par la réduction de sa conversion en T3 liée à l'inhibition de l'expression de DIO2.

✓ *Un rôle pour l'aire prémamillaire de l'hypothalamus médiobasal ?*

Dans un premier temps, chez les ovins, la pose centrale d'implants de mélatonine a désigné l'aire prémamillaire de l'hypothalamus médiobasal (HPM), et non la région hypophysaire, comme étant essentielle à l'intégration du signal mélatoninergique pour le contrôle saisonnier de l'activité du générateur de pulses de GnRH (**Figure 18**) (Lincoln et Maeda, 1992; Malpaux *et al.*, 1993; Malpaux *et al.*, 1994; Malpaux *et al.*, 1998). La vraisemblance de ces résultats ayant été confirmée par la détection de sites de liaisons à la mélatonine et la présence de transcrits de *mtl* dans l'HPM ovin (Morgan *et al.*, 1994; Migaud *et al.*, 2005). Toutefois, de récentes études remettent en cause l'existence de tels sites de liaison à la mélatonine arguant l'impossibilité d'en détecter la présence (Hanon *et al.*, 2008) ou leur caractère non-spécifique (Morgan et Hazlerigg, 2008). Sans statuer sur ce dernier point, la puissance des plans expérimentaux conduisant à l'observation d'une action hypothalamique de la mélatonine (Malpaux *et al.*, 1997) nous amène à considérer la pertinence physiologique d'un mécanisme hypothalamique de mesure du temps photopériodique.

Compte-tenu des résultats expérimentaux, l'activation de ce second mécanisme photopériodique et exclusivement hypothalamique synchroniserait le développement de l'état

photoréfractaire aux JL (*i.e.* la transition vers la saison de reproduction). Premièrement, peut être envisagé un fonctionnement complémentaire des deux mécanismes photopériodiques. Chaque transition reproductive serait alors synchronisée temporellement par l'activation de l'un et la décompression de l'autre. L'étude précédemment abordée de Yasuo *et al.* (2006a) semble toutefois en contradiction avec cette première hypothèse. En effet, ses résultats indiquent clairement que la décompression du mécanisme hypophyso-hypothalamique a lieu bien avant le moment de la prochaine transition reproductive saisonnière. Ainsi, le fonctionnement des deux mécanismes photopériodiques pourrait s'avérer être exclusif ; chacun contrôlant le moment d'une des transitions reproductives. Cette deuxième hypothèse est à mettre en parallèle des résultats de certaines études suggérant l'existence de voies distinctes pour le contrôle de chaque transition saisonnière de reproduction (Hileman *et al.*, 1994; Yasuo *et al.*, 2010).

Dans l'HPM, diverses populations neuronales contribueraient à transmettre le signal mélatoninergique vers le générateur de pulses de GnRH (pour revue cf. Malpaux, 2006). Les neurones de la partie caudale de l'ARC, déjà impliqués dans le contrôle du cycle œstral, y constitueraient alors le principal centre d'intégration du signal mélatoninergique (Yasuo *et al.*, 2006a). Ce mécanisme pourrait être propre aux mammifères puisque, à la différence de l'espèce aviaire, chacun de leurs noyaux hypothalamiques exprime un rythme circadien distinct (Yasuo et Yoshimura, 2009). Pour valider cette hypothèse, la présence d'une horloge circadienne localisée dans la partie caudale du noyau arqué et dépendante du signal mélatoninergique reste à mettre en évidence.

✓ *La modulation de l'activité du générateur de pulses de GnRH*

Chez les petits ruminants le contrôle photopériodique de l'axe reproducteur se caractérise par une réponse lente, de l'ordre de plusieurs semaines (Thimonier, 1989; Chemineau *et al.*, 1992; Viguié *et al.*, 1995). A contrario, l'axe lactotrope présente une réponse significativement plus rapide (Thimonier *et al.*, 1978). Tandis que le mécanisme photopériodique du contrôle des cycles saisonniers de prolactine est exclusivement hypophysaire, la séquence hypothalamique impliquée dans le contrôle saisonnier du générateur de pulses de GnRH apparaît être responsable du délai de réponse supérieur (Lincoln, 1999; Lincoln *et al.*, 2003a). De plus, puisque le mécanisme photopériodique hypophysaire est conservé entre espèces de JL et de JC ainsi qu'entre animaux présentant différentes vitesses de réponse photopériodique (oiseaux *vs.* mammifères par exemple), l'implication de voies neuronales hypothalamiques plus ou

moins complexes expliquerait ces différences d'interprétation du signal mélatoninergique (Hanon *et al.*, 2008; Hut, 2011).

In fine, cette séquence hypothalamique aboutit à la variation photopériode-dépendante de l'activité du générateur de pulses de GnRH principalement attribuable à une augmentation du rétrocontrôle négatif exercé par l'œstradiol en saison d'œstrus (**Figure 19**) (pour revue cf. Goodman *et al.*, 2010). Au niveau central ce phénomène a pour relais essentiel un groupe de cellules dopaminergiques localisé dans l'aire hypothalamique rétrochiasmatisique (RCh) latérale, le noyau A15 (Przekop, 1978; Thiery *et al.*, 1995; Lehman *et al.*, 1996). Le signal œstrogénique serait alors intégré dans l'APO ventromédiane, région disposant de récepteurs ER α , puis transmet via le noyau A15 vers les neurones à GnRH (Stefanovic *et al.*, 2000; Anderson *et al.*, 2001). Bien que les cellules du noyau A15 soient dépourvues de récepteurs aux œstrogènes ER α (Lehman *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 2000), certaines études y envisagent également une action directe de l'œstradiol selon un mécanisme inédit (Lehman et Karsch, 1993; Gallegos-Sanchez *et al.*, 1997). Ces deux voies pourraient ainsi agir de façon synergique (Thiery *et al.*, 2002). Si les cellules du noyau A15 projettent effectivement dans les régions de l'HMB où sont localisés les neurones à GnRH (Havern *et al.*, 1991; Gayrard *et al.*, 1995; Viguié *et al.*, 1998), la transmission du signal œstrogénique impliquerait des contacts dopaminergiques directs (Thiery *et al.*, 1995) ainsi que des populations cellulaires intermédiaires via un circuit neuronal multisynaptique (Bogusz *et al.*, 2008).

Récemment, les populations de neurones à RF-amides de l'HMB (principalement des neurones à kisspeptines et RFRP-3) ont été identifiées comme constituant des éléments clés du contrôle photopériodique de l'activité du générateur de pulses de GnRH (Greives *et al.*, 2008; Clarke et Smith, 2010; Smith, 2011). Ces populations participent vraisemblablement aux dernières étapes de l'intégration du signal œstrogénique à titre d'intermédiaires entre les efférences dopaminergiques du noyau A15 et les neurones à GnRH (Chalivoix *et al.*, 2010a; Lehman *et al.*, 2010d).

Différents mécanismes expliqueraient les variations photopériodiques du potentiel inhibiteur du rétrocontrôle œstrogénique sur l'activité pulsatile des neurones à GnRH. Tout d'abord certaines études mettent en évidence des variations photopériodiques de l'intensité du signal œstrogénique. Ces variations seraient liées à une stimulation par les JL i) de l'accès des hormones stéroïdiennes au niveau central, via des modifications structurales de la barrière hématoencéphalique (Thiery et Malpoux, 2003; Lagaraine *et al.*, 2011) et ii) d'une production

centrale et localisée d'œstradiol (chez les rongeurs, Cornil *et al.*, 2006). La photopériode fait également varier la sensibilité du générateur de pulses de GnRH au rétrocontrôle exercé par l'œstradiol.

Cette sensibilisation impliquerait des phénomènes de plasticité neuronale affectant la fonctionnalité du circuit d'intégration du signal œstrogénique (**Figure 20**) (Lehman *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2006; Lehman *et al.*, 2010b). Chez la brebis, une telle neuroplasticité associée aux transitions saisonnières reproductives a été mise en évidence sur la plupart des étapes de ce circuit (Lehman *et al.*, 1997; Xiong *et al.*, 1997; Viguie *et al.*, 2001; Jansen *et al.*, 2003; Pompolo *et al.*, 2003a; Sergeeva et Jansen, 2009; Singh *et al.*, 2009; Chalivoix *et al.*, 2010b). De fait, sont observés des variations photopériodiques du nombre d'afférences synaptiques stimulatrices (glutamatergiques) vers les neurones du noyau A15 ainsi que d'importants réarrangements morphologiques de leurs prolongements dendritiques. Ces phénomènes seraient probablement responsables de l'augmentation de l'activité catalytique et électrique du noyau observée en saison d'anœstrus (Gayrard *et al.*, 1994; Lehman *et al.*, 1996).

Cette plasticité est également présente au niveau des neurones à GnRH où l'on observe i) des remaniements morphologiques de leurs terminaisons axoniques dans l'éminence médiane, régulant la libération du décapeptide (Yamamura *et al.*, 2006) ainsi que ii) des variations dans la nature de leurs afférences synaptiques en provenance de populations neuronales intermédiaires, notamment celles à kisspeptines et GnIH (Smith *et al.*, 2008; Chalivoix *et al.*, 2010a). L'action concertée de ces populations neuronales intermédiaires, via une stimulation dopaminergique différentielle, et leurs effets opposés sur l'activité des neurones à GnRH aboutirait à la régulation photopériodique du générateur de pulses (Clarke, 2011; Smith, 2011). Cette neuroplasticité serait à l'origine des délais de réponse attribués à la séquence hypothalamique.

Compte tenu de ce qui précède, la régulation du catabolisme hypothalamique des hormones thyroïdiennes par le mécanisme photopériodique hypophysaire apparaît être un phénomène obligatoire pour l'accroissement du rétrocontrôle négatif de l'œstradiol (Yasuo *et al.*, 2006a). Les deux systèmes hormonaux, thyroïdien et œstrogénique, sont en effet étroitement liés (pour revue cf. Vasudevan *et al.*, 2002). De plus, il a été démontré que l'APO ventromédiane et la RCh constituaient des structures cibles pour l'action des hormones thyroïdiennes au niveau central (Anderson *et al.*, 2003). Selon toute vraisemblance, la neuroplasticité observée

dans le circuit d'intégration du signal œstrogénique serait sous la dépendance du signal thyroïdien (Yamamura *et al.*, 2006; Nakao *et al.*, 2008b; Lehman *et al.*, 2010b). Le mécanisme photopériodique hypophysaire agirait alors comme un levier pour la mise en place d'un circuit neuronal fonctionnel qui permettrait au signal œstrogénique de moduler l'activité du générateur de pulses de GnRH. Ce modèle possède toutefois quelques limites puisque les changements d'expression de DIO2 ne coïncident qu'avec une des deux transitions reproductives tandis que des mouvements de neuroplasticité symétriquement opposés sont associés à chaque transition (Chalivoix, 2010).

✓ *Les limites de la réponse photopériodique*

En l'état des connaissances concernant le fonctionnement des mécanismes de mesure du temps photopériodique, les bases neuroendocriniennes sous-jacentes aux concepts de photosensibilité, de photopériode critique et d'histoire photopériodique sont relativement mal appréhendées (Teubner *et al.*, 2008; Butler *et al.*, 2010). Certaines études avancent que la photopériode critique s'établirait avec une durée de sécrétion de mélatonine ayant une influence maximale sur le pic d'expression de *Per1*, à la fois sur son amplitude mais également sur sa coïncidence temporelle d'expression avec celui des gènes *Crys* (Yasuo *et al.*, 2006b; Wagner *et al.*, 2008). Concernant le degré de photosensibilité, l'étude de Dardente *et al.* (2010) suggère qu'il puisse être en partie encodé dans la séquence en D-box du gène *TSHβ*. En effet, selon cette étude, des variations de séquence définiraient un potentiel à produire de la TSHβ qui serait positivement corrélé avec le degré de photosensibilité de la plupart des espèces considérées.

b. La génération du rythme circannuel

Si l'observation d'un rythme circannuel de sécrétion de LH et de prolactine (Karsch *et al.*, 1989; Zucker, 2001; Lincoln *et al.*, 2006) rend évidente l'existence de mécanismes permettant leur génération, les voies neuroendocriniennes impliquées ne font l'objet que d'hypothèses restant souvent à tester. Si aucune structure hypothalamique n'a été identifiée comme étant indispensable à l'expression du rythme circannuel de sécrétion de LH, son blocage lors d'une thyroïdectomie réalisée en JC suggère que le signal circannuel partage au moins en aval les voies d'intégration du signal photopériodique (Nicholls *et al.*, 1988). En revanche les études concernant la génération du rythme circannuel de sécrétion de prolactine sont plus avancées, essentiellement grâce au modèle de bélier HPD, et ont pu mettre en évidence l'autonomie de

l'hypophyse dans ce processus (Lincoln *et al.*, 2003a; Lincoln *et al.*, 2003b; Lincoln *et al.*, 2006).

L'hypothèse centrale des plus récentes études est que le mécanisme de génération des rythmes circannuels reposerait sur de la plasticité structurale sous forme de neurogenèse (Lincoln et Hazlerigg, 2010; Hazlerigg et Lincoln, 2011). Selon cette « hypothèse histogénique » un rythme circannuel pourrait être généré par la synchronisation génétique de certaines des étapes critiques jalonnant le développement de cellules souches (amplification, différenciation et apoptose). Ainsi, les différentes aires centrales présentant une activité de neurogenèse pourraient chacune contribuer à la génération d'un rythme circannuel (Wittkowski *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2005; McNay *et al.*, 2009).

Les transitions saisonnières reproductives sont contrôlées par les variations photopériodiques de l'activité du générateur de pulses de GnRH, ainsi l'élaboration des profils saisonniers de reproduction se déroule essentiellement au niveau central. Dans un premier temps le système circadien et les signaux photiques traduisent la photopériode en un rythme journalier de sécrétion de la mélatonine par la glande pinéale. Dans un second temps le mécanisme hypophysaire de PTM interprète le signal mélatoninergique et initie les événements hypothalamiques modulant l'activité du générateur de pulses de GnRH. Les modalités d'interaction et de synchronisation du rythme circannuel par la photopériode restent à déterminer. Les phénomènes de neuroplasticité, présents à chacune de ces étapes, constituent vraisemblablement un paramètre central de la génération du rythme saisonnier de reproduction.

III. Les effets de la nutrition sur la saisonnalité de la reproduction chez la brebis

L'état physiologique, la nature des interactions sociales ainsi que les conditions climatiques du milieu (*i.e.* l'ensemble des facteurs ultimes) participent, en fonction du degré de photosensibilité de l'individu, à l'élaboration de son projet reproductif ou « décision d'ovuler » (Lindsay *et al.*, 1993; Monget et Martin, 1997). Tandis que chez les populations non-saisonnées ces facteurs interviennent dans cette prise de décision tout au long du cycle annuel de façon proportionnelle à leur intensité, chez les populations saisonnées ils exercent leurs effets via leur interaction avec le facteur photopériodique. Dans ce dernier cas, les

facteurs ultimes sont alors considérés comme des modulateurs du signal photopériodique (Bronson, 1989; Jacobs et Wingfield, 2000; Martin *et al.*, 2002; Rosa et Bryant, 2003).

Le processus décisionnel mis en œuvre dans l'élaboration du projet reproductif s'apparente à l'atteinte d'un certain équilibre, fonction de la stratégie reproductive de l'espèce considérée, entre régulations homéostatiques et téléophorétiques (Bronson, 1985; Blanc *et al.*, 2006). Dès que l'animal a accès à son alimentation les flux énergétiques mis à l'œuvre sont principalement dirigés depuis les apports nutritionnels (principale voie d'entrée) vers les activités de reproduction (principale voie de sortie) conduisant les systèmes nutritionnel et reproductif à entretenir des liens très étroits (Bronson et Manning, 1991; Schneider, 2004). Ainsi, chez les espèces saisonnées, la nutrition est considérée comme le principal facteur modulateur du signal photopériodique (pour revues cf. Bronson, 1989; Swanson, 1989; Lindsay *et al.*, 1993; Knobil et Neill, 1994; Martin et Walkden-Brown, 1995; Forcada et Abecia, 2006).

Le terme nutrition renvoie à deux composantes, une quantitative (apports énergétiques et protéiques) qui semble expliquer la majorité des effets de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction et une qualitative (équilibre des nutriments) dont les effets restent peu étudiés (Bronson, 1985). Aussi, dans la suite du manuscrit, le terme nutrition renverra uniquement à sa composante quantitative excepté dans les cas où le protocole expérimental de référence ne permet d'identifier qu'un effet nutritionnel global.

1. Analyse descriptive

a. Définition du statut nutritionnel

Le statut nutritionnel d'un individu peut être apprécié à un instant t par son bilan énergétique, soit le différentiel entre les apports énergétiques d'origine alimentaire et l'ensemble des dépenses énergétiques de l'organisme, combiné à l'état de ses réserves corporelles qui correspond à la quantité d'énergie stockée et mobilisable par l'organisme (sous forme de triglycérides, glycogène et protéines). Selon leur valeur ces deux paramètres renseignent diverses informations sur la quantité totale d'énergie disponible pour l'organisme et son affectation. A ces deux paramètres peut s'adjoindre une notion temporelle (ex. le taux d'utilisation énergétique) qui permet d'effectuer des prévisions simplifiées à plus ou moins long terme quant à l'évolution du statut nutritionnel, on parle également de statut métabolique (Blache *et al.*, 2000; Blache *et al.*, 2006; Scaramuzzi *et al.*, 2006).

Les réserves corporelles directement mobilisables se retrouvent essentiellement sous la forme de lipides dans le tissu adipeux ce qui permet de résumer l'état des réserves corporelles d'un individu à une mesure de son état d'engraissement. Chez les ovins différentes méthodes permettent d'apprécier l'état d'engraissement de l'animal de façon plus ou moins raffinée (Mendizabal *et al.*, 2003). La plus couramment utilisée, du fait de sa praticité et sa fiabilité, est la mesure de la note d'état corporel (NEC ; **Annexe 1**) déterminée par une estimation de l'épaisseur de gras sous-cutané par palpations au niveau de la région lombaire (Russel *et al.*, 1969) ou caudale chez certaines races (Atti, 1991). Ces réserves adipeuses sont mobilisables plus ou moins efficacement selon la race considérée (Chilliard *et al.*, 2000; Atti *et al.*, 2004).

D'un autre côté différentes méthodes de rationnement dont celle développée par l'INRA (INRA, 2010), permettent de raisonner les apports alimentaires (essentiellement énergétiques et protéiques) selon l'état corporel (poids, NEC) et le stade physiologique des animaux afin d'équilibrer leur bilan énergétique. Les manipulations des apports alimentaires permettent ainsi de diriger le statut nutritionnel de l'animal et de le maintenir à plus ou moins long terme au niveau déterminé.

b. Statut nutritionnel et fonctions reproductives

Une situation nutritionnelle idéale, c'est-à-dire lorsque l'état d'engraissement de l'animal permet sa mise à la reproduction (établi en fonction de standards pour chaque race) et que son bilan énergétique est équilibré, est un paramètre majeur dans l'expression du potentiel zootechnique de la race ovine considérée. Cependant de nombreux facteurs (offre alimentaire variable, rationnement au lot, dépenses énergétiques imprévues, ...) imposent des contraintes nutritionnelles de plus ou moins forte intensité qui limitent les performances reproductives. Ces conséquences des effets de la nutrition sur la reproduction ont justifié de nombreuses études chez l'espèce ovine visant à limiter leur impact économique par le développement de pratiques nécessitant peu d'intrants, respectueuses de l'environnement et socialement acceptables (Downing et Scaramuzzi, 1991; Forcada et Abecia, 2006; Scaramuzzi et Martin, 2008).

▪ *Dynamiques nutritionnelles*

Le degré et la durée de variation des apports énergétiques conduisent à différentes situations nutritionnelles dont les effets sur la reproduction varient en fonction de l'état initial des réserves corporelles (Downing et Scaramuzzi, 1991; Archer *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2005;

Blache *et al.*, 2006). Ainsi une variation des apports alimentaires de courte durée entraînant un déséquilibre du bilan énergétique peut ne pas être accompagnée d'un changement dans l'état des réserves corporelles ; lors de cette phase sont observés les effets **aigus** de la nutrition. Les effets **dynamiques** sont observés dès que ce déséquilibre se prolonge et s'accompagne de modifications de l'état des réserves corporelles. Sous peine d'atteindre des états pathologiques cette dernière phase est nécessairement transitoire et sollicite l'adaptabilité de l'individu pour le recouvrement d'un état homéostatique où seront observés les effets dits **statiques** du statut nutritionnel (**Figure 21**) (adapté de Scaramuzzi *et al.*, 2006). Un tel dynamisme du statut nutritionnel est inhérent aux systèmes d'élevage de ruminants en général. Il peut être utilisé à l'avantage de l'éleveur ayant souci des coûts de production, maîtrisé afin d'améliorer les performances zootechniques du troupeau ou encore être subi (conséquence involontaire d'un environnement contraignant ou de pratiques alimentaires inadaptées) et affecter négativement ces mêmes performances.

✓ *Vers un bilan énergétique positif*

Les effets dynamiques d'un bilan énergétique positif sont essentiellement mobilisés lorsque l'environnement alimentaire des animaux est très contraignant et ne permet pas de maintenir un niveau des réserves corporelles suffisant pour l'expression du potentiel génétique de la race considérée (Bishaw et Melaku, 2008; Dessie *et al.*, 2010). Chez le bélier il a été démontré que l'augmentation rapide et transitoire du poids vif par une augmentation des apports énergétique pouvait s'accompagner d'une augmentation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (Martin *et al.*, 1994; Archer *et al.*, 2002).

D'un autre côté les effets aigus d'un bilan énergétique positif visent à maximiser ce potentiel génétique et sont *de facto* particulièrement étudiés. Exploités dans le cadre de pratiques zootechniques consistant à apporter aux femelles mises à la reproduction un aliment à haute valeur énergétique sur une courte durée (en plus de leur ration habituelle), ils permettent d'améliorer sensiblement le taux d'ovulation. Ces pratiques de supplémentation (Nottle *et al.*, 1990; Downing *et al.*, 1995; Nottle *et al.*, 1997; Letelier *et al.*, 2008; Vinales *et al.*, 2009) nécessitent un pilotage précis en termes d'intensité, de moment et de durée afin d'obtenir une efficacité maximale à coûts réduits (Scaramuzzi et Martin, 2008). Les signaux nutritionnels et métaboliques issus de la supplémentation énergétique stimulent l'activité ovarienne, en particulier les premières étapes de la folliculogénèse (Downing et Scaramuzzi, 1991; Webb *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2006; Scaramuzzi *et al.*, 2006). Selon la plupart des études ces

effets impliquent une action ovarienne directe par l'augmentation des taux circulants de glucose et d'insuline (Vinoles *et al.*, 2005; Somchit *et al.*, 2007; Gallet *et al.*, 2011); l'implication des gonadotrophines restant à démontrer (pour revue cf. Scaramuzzi *et al.*, 2006). Enfin il est intéressant de noter qu'une supplémentation est toujours plus efficace chez les individus ayant un plus faible état d'engraissement (Downing et Scaramuzzi, 1991; Zhang *et al.*, 2005). Cette interaction entre effets statiques et aigus de la nutrition suggère une confluence des voies de signalisation du glucose et de l'insuline avec les voies d'intégration des signaux métaboliques liés à l'état d'engraissement au niveau des follicules ovariens (Dupont *et al.*, 2008).

✓ *Vers un bilan énergétique négatif*

A l'opposé, les effets aigus et dynamiques d'un bilan énergétique négatif sont rarement volontairement recherchés. Ils sont généralement observés au gré des fluctuations des contraintes environnementales ou de façon plus systématique lors des premières semaines de lactation. En effet la baisse de la capacité d'ingestion de la femelle à l'approche de la mise-bas ne permet pas de satisfaire les besoins énergétiques importants liés à l'allaitement. Aussi cette période correspond à une forte mobilisation des réserves corporelles (Atti *et al.*, 1995; Chilliard, 1999). Le fait est remarquable que chez les petits ruminants, lorsque les réserves corporelles sont suffisantes, un bilan énergétique négatif de courte durée n'a peu voire pas d'impact sur les performances reproductives. Ce phénomène est lié à la rapide mise en place d'une réponse adaptative efficace permettant de contrer les effets potentiellement négatifs associés au déficit énergétique (Chilliard *et al.*, 1998). Toutefois, lorsque la saison de reproduction est établie, il semblerait qu'un faible niveau d'apports nutritionnels tende à rallonger l'intervalle interœstral de brebis de race Salz (Robinson *et al.*, 1991).

✓ *L'adaptabilité des ruminants aux contraintes énergétiques*

L'adaptabilité des ruminants résulte d'une combinaison de processus physiologiques et comportementaux visant à rétablir l'homéostasie énergétique (pour revue cf. Blanc *et al.*, 2010). Ces processus physiologiques impliquent la mobilisation des réserves corporelles, la mise en place de mécanismes d'épargne énergétique et la réduction du métabolisme basal (pour revues cf. Chilliard *et al.*, 1998; Chilliard *et al.*, 2000; Blanc *et al.*, 2006). Les réserves adipeuses y jouent un rôle central ; la capacité d'une race donnée à les mobiliser efficacement contribue à sa plus ou moins bonne adaptabilité (Panaretto, 1964; Bocquier et Chilliard, 1994; Bocquier *et al.*, 2000; Atti *et al.*, 2004). Une bonne adaptabilité permet de maintenir des

performances zootechniques correctes face à des contraintes énergétiques de plus forte intensité (Bocquier *et al.*, 2002). Elle confère également de l'élasticité à l'organisme lui permettant de reconstituer à l'issue d'une phase de réalimentation l'ensemble des réserves mobilisées au cours d'une précédente période de restriction alimentaire ; ce phénomène étant connu sous le nom de « croissance compensatoire » (Hoch *et al.*, 2003; Atti *et al.*, 2004; Blanc *et al.*, 2010).

- *Effets statiques de la nutrition sur la saison de reproduction*

Chez les ruminants les mécanismes du maintien de l'homéostasie énergétique limitent l'impact des effets dynamiques de la nutrition dans le processus décisionnel d'ovulation ; en agissant au niveau ovarien ils modulent essentiellement l'intensité de son expression (Monget et Martin, 1997). Ce sont les signaux nutritionnels et métaboliques liés à l'état des réserves corporelles qui interagissent avec le facteur photopériodique au niveau central et influent sur la prise de décision en elle-même (Martin *et al.*, 2004). Ainsi se distinguent deux voies selon lesquelles la nutrition module la fonction de reproduction, une voie dite indépendante de la GnRH qui transmet les effets à court-terme de la nutrition et une voie dite dépendante de la GnRH transmettant les effets à long-terme (Martin et Walkden-Brown, 1995). Il est important de noter que les régulations téléophorétiques de l'organisme ne se basent pas uniquement sur l'état des réserves corporelles à un instant t mais intègrent également des informations concernant les dynamiques passées ayant engendré la situation nutritionnelle actuelle (Friggens, 2003). Chez les ovins en particulier, différents auteurs ont suggéré ou mis en évidence l'existence d'une telle mémoire nutritionnelle (Archer *et al.*, 2002; Blache *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2011). Les conclusions de ces études sonnent comme un avertissement pour l'intégration de notions temporelles dans l'interprétation des effets de l'interaction entre le statut nutritionnel et la photopériode sur les profils saisonniers de reproduction.

L'état d'engraissement aurait un effet biphasique sur la saison de reproduction c'est-à-dire négatif dès lors qu'il serait trop faible ou trop important (Forcada et Abecia, 2006; Caldeira *et al.*, 2007; Clarke, 2008). Principalement du fait de la lourdeur des plans expérimentaux, relativement peu d'études ont été réalisées dans le but de déterminer les effets statiques de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction chez l'ensemble des espèces de rente dont la brebis (**Figure 22-A**) (Smith, 1965; Knight *et al.*, 1983; Hulet *et al.*, 1986; Forcada *et al.*, 1992), les caprins (**Figure 22-B**) (Walkden-Brown *et al.*, 1994; Zarazaga *et al.*, 2005; De

Santiago-Miramontes *et al.*, 2009; Estrada-Cortes *et al.*, 2009; Urrutia-Morales *et al.*, 2009; Zarazaga *et al.*, 2011) et la jument (**Figure 22-C**) (Salazar-Ortiz *et al.*, 2011). Ces études ont d'ailleurs été réalisées en comparant les effets de réserves corporelles restreintes à ceux d'un état d'engraissement standard ; si certains points de résultats divergent il est tout de même possible de ressortir des similitudes essentielles. Ainsi les cas d'ancêtres nutritionnels complets liés à un faible état d'engraissement sont anecdotiques, dans la plupart des cas le principal effet observé est une réduction de la durée de la saison de reproduction. Chez la brebis (pour revue cf. Forcada et Abecia, 2006) cet effet découle d'une fin précoce de la saison d'activité ovarienne (Forcada *et al.*, 1992) ; l'absence d'effets sur la transition depuis la saison d'ancêtres vers la saison de reproduction étant probablement liée à une synchronisation des femelles via des signaux socio-sexuels (Zarazaga *et al.*, 2003).

Conformément au modèle développé chez le bélier (Blache *et al.*, 2000), l'interaction entre la nutrition et les fonctions reproductives se déroule essentiellement au niveau de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (**Figure 23**). En effet chez le bouc un faible état d'engraissement provoque de la même manière une réduction de la durée de la saison d'activité neuroendocrinienne (LH et FSH) en agissant, concernant les profils saisonniers de sécrétion de la LH, de façon équivalente sur chaque transition saisonnière (Walkden-Brown *et al.*, 1994). Ces résultats ont été confirmés chez la chèvre (Zarazaga *et al.*, 2011) où une réduction globale des concentrations plasmatiques de LH était également observée sans toutefois affecter la pulsativité de l'hormone. Chez la brebis, les effets de l'état d'engraissement sur les profils saisonniers d'activité neuroendocrinienne sont supposés être similaires à ceux observés chez la chèvre. Ces effets ont toutefois été moins examinés et pourraient apparaître plus contrastés (Barker-Gibb et Clarke, 1996). Il a en revanche été démontré que l'état corporel pouvait affecter l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (pulsativité et concentrations) en agissant principalement au niveau de l'hypothalamus (Tatman *et al.*, 1990; Kile *et al.*, 1991; Rhind *et al.*, 1991; Renquist *et al.*, 2008b). D'un autre côté, probablement du fait des conditions expérimentales, certaines études n'identifient que peu ou pas d'effets du statut énergétique sur ces mêmes paramètres (Schillo, 1992; Barker-Gibb et Clarke, 1996).

Tout indique qu'un faible état d'engraissement agit en accentuant l'expression du caractère saisonnier de la reproduction chez les petits ruminants. Ce phénomène est particulièrement mis en évidence chez des races peu photosensibles où le facteur nutritionnel joue un rôle relativement plus important dans le contrôle photopériodique des activités de reproduction

(Martin *et al.*, 2002; Hotzel *et al.*, 2003). A l'extrême, chez des espèces considérées comme non photosensibles, un faible état d'engraissement serait susceptible de faire ressurgir un caractère saisonnier ancestral (Walker et Bethea, 1977; Montgomery *et al.*, 1985; Hut, 2011).

2. Mécanismes neuroendocriniens impliqués dans l'intégration des effets statiques de la nutrition

Les facteurs hormonaux, nutritionnels et métaboliques liés à l'état d'engraissement interagissent avec les mécanismes photopériodiques centraux élaborant les profils saisonniers d'activité neuroendocrinienne (Klaus, 2004; Schneider, 2004; Blache *et al.*, 2006) ; le centre d'intégration ultime étant le générateur de pulses de GnRH (Karsch *et al.*, 1984; Schillo, 1992). Le fruit de cette interaction *i.e.* l'expression de profils saisonniers de reproduction plus ou moins accentués, serait essentiellement issu de variations photopériode-dépendantes du potentiel inhibiteur du rétrocontrôle œstrogénique (Forcada et Abecia, 2006). Schématiquement ces variations pourraient être liées à des modifications strictes du pouvoir inhibiteur du signal œstrogénique et/ou à des variations de la sensibilité du générateur de pulses de GnRH à ce même signal. D'un autre côté la photopériode peut moduler, au niveau central, l'intensité des signaux hormonaux périphériques (Zieba *et al.*, 2008a; Zieba *et al.*, 2008b). Le rôle de ces différents mécanismes dans la transmission des effets de la nutrition sur l'élaboration centrale des profils saisonniers de reproduction est ainsi présenté.

a. Variations de l'intensité du rétrocontrôle œstrogénique

Chez les ruminants la masse et le degré d'activité métabolique des tissus splanchniques s'adaptent au statut nutritionnel afin d'ajuster les dépenses énergétiques de l'organisme ; une réduction du statut nutritionnel s'accompagnant d'une diminution de ces deux paramètres. Cette adaptation a pour conséquence directe une diminution de la clairance hépatique et rénale liée à la diminution du flux sanguin (Burrin *et al.*, 1989; Chilliard *et al.*, 1998). Il a ainsi été démontré chez la brebis qu'une restriction alimentaire réduisait la clairance de la LH et de l'œstradiol (Adams *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1997; Renquist *et al.*, 2008a; Renquist *et al.*, 2008b). Concernant la LH si une augmentation des taux plasmatiques est effectivement observée suite à un jeûne de courte-durée, à plus long terme cet effet s'estompe, probablement du fait d'une diminution du pool de LH libérable dans l'hypophyse (Kile *et al.*, 1991; Renquist *et al.*, 2008b). En revanche des concentrations plasmatiques élevées d'œstradiol sont maintenues chez des brebis subissant une restriction à long-terme du statut énergétique (Adams *et al.*, 1994; Renquist *et al.*, 2008a).

L'idée séduisante selon laquelle cette baisse du métabolisme de l'œstradiol transmettrait les effets statiques du statut énergétique sur le générateur de pulses de GnRH reste toutefois peu concluante (Renquist *et al.*, 2008a; Renquist *et al.*, 2008b). En effet, ainsi que précédemment évoqué, les concentrations périphériques d'œstradiol ne reflètent pas nécessairement les concentrations observées au niveau des tissus cibles dans l'hypothalamus ; d'une part du fait de variations photopériode-dépendante de la perméabilité de la BHE aux œstrogènes et d'autre part du fait d'une probable synthèse locale d'œstradiol (Thiery et Malpaux, 2003; Cornil *et al.*, 2006). De plus cet effet du statut nutritionnel sur le métabolisme de l'œstradiol n'est pas systématique (Archer *et al.*, 2002) et des variations de l'activité du générateur de pulses liées au statut nutritionnel peuvent être observées indépendamment des concentrations plasmatiques d'œstradiol (Renquist *et al.*, 2008b).

Ces variations de la clairance de l'œstradiol ne sont probablement pas un événement critique dans la modulation nutritionnelle de l'activité du générateur de pulses de GnRH. Ainsi il apparaît être plus probable que la nutrition agisse en modulant la sensibilité hypothalamique au rétrocontrôle négatif exercé par l'œstradiol. Concrètement cet effet pourrait s'exercer à différents niveaux, soit i) en inhibant directement le fonctionnement du générateur de pulses de GnRH, ii) en altérant le fonctionnement des mécanismes de mesure du temps photopériodique ou encore iii) en inhibant leur expression.

b. Modulation de la sensibilité hypothalamique au rétrocontrôle œstrogénique

Tout au long de la voie centrale d'intégration du signal photopériodique des systèmes senseurs/effecteurs distincts sont capables d'intégrer les signaux nutritionnels, métaboliques ou nerveux liés à l'état d'engraissement ; *in fine* ces systèmes seraient susceptibles d'affecter l'activité du générateur de pulses de GnRH en le sensibilisant aux effets négatifs des stéroïdes (Rhind *et al.*, 1991; Forcada *et al.*, 1997). Ces différents systèmes ou voies de signalisation sont interconnecté(e)s et forment un réseau global visant à maintenir l'homéostasie énergétique (Marshall, 2006).

- *En amont du décodage du signal mélatoninergique*
 - ✓ *Sur l'horloge circadienne*

Des connexions entre la génération des rythmes circadiens et la nutrition ont été établies chez la plupart des organismes (**Figure 25-1**) (pour revues cf. Kovac *et al.*, 2009; Delezie et Challet, 2011). Chez les mammifères, les perturbations de la machinerie circadienne par la

nutrition ont été essentiellement étudiées chez les rongeurs (pour revues cf. Challet *et al.*, 2003; Mendoza, 2007). Ces études se basent sur deux types de protocole nutritionnel, dans le premier cas il s'agit d'une **restriction calorique** où est imposée une quantité limitée de nourriture de façon chronique et dans le second cas d'une **restriction temporelle** pour laquelle le temps d'accès à la nourriture est limité à quelques heures fixes par jour. Dans les deux cas, malgré la perception du rythme lumière/obscurité journalier, la nutrition apparaît comme un synchroniseur puissant des rythmes circadiens tout en agissant à des niveaux différents (Damiola *et al.*, 2000; Pardini et Kaeffer, 2006).

Dans le cadre d'une restriction temporelle, les signaux nutritionnels et métaboliques provoquent des décalages de phase des rythmes des horloges périphériques indépendamment de l'horloge principale des NSC (Hara *et al.*, 2001; Mendoza, 2007; Waddington Lamont *et al.*, 2007). Ce type de restriction synchronise notamment l'activité d'une horloge circadienne dédiée au rythme d'expression des activités comportementales et physiologiques liées à la prise alimentaire (Feillet *et al.*, 2006; Feillet, 2010), probablement localisée dans le cervelet (Mendoza *et al.*, 2010).

D'un autre côté, lors d'une restriction de type calorique les patrons temporels d'expression des gènes et protéines de l'horloge principale des NSC peuvent être perturbés (**Figure 24-A-B**) (Challet *et al.*, 2003). Le conflit ainsi engendré entre synchroniseurs lumineux et nutritionnel (Mendoza *et al.*, 2005) perturbe l'ensemble des événements circadiens physiologiques et comportementaux orchestrés par les NSC (**Figure 24-C**) (Challet *et al.*, 1997a; Challet *et al.*, 1997b). Chez les espèces saisonnées ce type de conflit serait susceptible de perturber l'ensemble du fonctionnement du mécanisme de mesure du temps photopériodique. En effet ce dernier est entièrement fondé sur l'expression d'un rythme circadien par l'horloge principale des NSC, l'horloge périphérique localisée dans la pars tuberalis et éventuellement une horloge périphérique localisée dans l'HMB (cf. chapitre précédent).

Parmi les différents signaux nutritionnels potentiellement impliqués, les taux circulants de glucose semblent affecter plus ou moins directement les mécanismes de génération du rythme circadien, du moins chez les rongeurs (pour revue cf. Pardini et Kaeffer, 2006). Tout d'abord directement lorsque les variations du statut redox cellulaire qui accompagnent le catabolisme du glucose perturbent la liaison des protéines de l'horloge aux éléments E-box (Rutter *et al.*, 2001). Les nutriments tels le glucose sont également susceptibles d'influencer indirectement

le fonctionnement du cœur de la machinerie circadienne via différentes voies de signalisation (pour revue cf. Marshall, 2006). Ainsi il a été démontré que trois des voies majeures de la signalisation des disponibilités en nutriments – la voie AMPK (Um *et al.*, 2007), la voie mTOR (Cao et Obrietan, 2010) et la voie de l’hexosamine (Durgan *et al.*, 2011) – sont capables d’interagir avec certaines horloges circadiennes périphériques pour en modifier la période. Ces voies sont interconnectées et capables d’intégrer les signaux en provenance des différentes hormones du tissu adipeux (leptine, adiponectines, ...) et de l’insuline (pour revue cf. Marshall, 2006). De cette manière peut être envisagé, notamment chez les espèces saisonnées dont la glycémie reste relativement indépendante des effets à long terme du statut nutritionnel, un rôle pour ces différentes voies dans la détermination du rythme circadien généré au niveau central.

✓ *Sur la synthèse de la mélatonine par la glande pinéale*

Chez certains mammifères à reproduction saisonnée dont le hamster européen (Vivien-Roels *et al.*, 1992; Vivien-Roels *et al.*, 1997), le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) (Garcia *et al.*, 2003) ou encore la brebis Suffolk (Arendt *et al.*, 1981), l’observation de variations saisonnières de l’amplitude du rythme de sécrétion de la mélatonine a suggéré que ce paramètre pouvait intégrer une information de nature photopériodique. De la même façon, ce phénomène est observé chez la plupart des ectothermes vertébrés (Vivien-Roels et Arendt, 1983; Pévet *et al.*, 1991).

Si certaines études lui suggèrent une implication dans l’élaboration des profils saisonniers de reproduction (Pévet *et al.*, 1991); d’autres études réalisées chez la brebis Île-de-France réfutent cette hypothèse en identifiant une absence de variations saisonnières (Chemineau *et al.*, 1996), une forte variabilité interindividuelle (Zarazaga *et al.*, 1998a) ainsi qu’une absence de corrélation de ce paramètre avec les dates de début et de fin de saison d’activité ovarienne (Zarazaga *et al.*, 2003). D’un autre côté a pu être reporté chez la brebis, au sein d’une même race (race mixte 50 % Dorset, 25 % Mérinos de Rambouillet et 25 % Finnois), une association étroite entre le degré de saisonnalité d’un individu et ses concentrations plasmatiques de mélatonine (Notter et Chemineau, 2001). Le rôle tenu par l’amplitude du rythme de sécrétion de la mélatonine dans le contrôle des profils saisonniers de reproduction demeure par conséquent sujet à caution (pour revue cf. Malpoux, 2006). Il est toutefois intéressant de noter que ce paramètre peut être sensible à un ou plusieurs facteurs environnementaux chez certains vertébrés ectothermes (pour revue cf. Vivien-Roels, 1999). De la même façon chez le rat

(Chik *et al.*, 1987) ou chez la brebis Salz (Forcada *et al.*, 1995) une dégradation du statut nutritionnel est associée à des concentrations plasmatiques de mélatonine élevés tandis que, au moins chez le rat, le contenu pinéalien en est réduit. Chez les mammifères ce phénomène reste à confirmer puisqu'une récente étude réalisée chez la chèvre « méditerranéenne » n'établit aucune corrélation entre statut nutritionnel et concentrations plasmatiques nocturnes de la mélatonine (Zarazaga *et al.*, 2011). Si une telle sensibilité est avérée, elle apparaîtrait alors comme un candidat potentiel à l'intégration d'une partie des effets de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction (**Figure 25-2**). Tandis que l'augmentation des concentrations plasmatiques pourrait s'expliquer par une variation du catabolisme de l'hormone selon les mécanismes précédemment abordés, chez le rat, la réduction des niveaux de mélatonine du contenu pinéalien suggère une action des signaux nutritionnels le long du circuit neuronal contrôlant la synthèse de la mélatonine par la glande pinéale.

Chez les rongeurs, les variations photopériodiques de synthèse de la mélatonine sont principalement entraînées par des variations d'activité de l'AANAT (Garidou *et al.*, 2003). D'un autre côté, la transmission des effets des facteurs environnementaux sur la synthèse de mélatonine semble impliquer les deux enzymes AANAT et HIOMT (Welker et Vollrath, 1984; Garidou *et al.*, 2003). Chez le rat en particulier, les mécanismes de maintien de l'homéostasie glucidique reposent en partie sur les niveaux de sécrétion de la mélatonine (la Fleur *et al.*, 2001) ces derniers étant notamment sensible à l'insulinémie (Lynch *et al.*, 1973; Tannenbaum *et al.*, 1987). Chez la brebis les concentrations plasmatiques de mélatonine sont fonctions de la taille de la glande pinéale (*i.e.* du nombre de ses pinéaloctes) ; cette dernière possédant un fort déterminisme génétique (Coon *et al.*, 1999; Gomez Brunet *et al.*, 2002). Ainsi l'activité enzymatique des pinéaloctes apparaît être, *in vitro*, sensible à différents signaux nutritionnels dont la leptine et cela de façon photopériode-dépendante (Zieba *et al.*, 2011). En JL la leptine, en agissant probablement directement sur la glande pinéale via son récepteur spécifique OB-R (Chelikani *et al.*, 2003), inhibe la sécrétion de mélatonine et inversement en JC (Zieba *et al.*, 2007; Zieba *et al.*, 2008a). Les variations d'expression du neuropeptide orexigénique Y (NPY), déjà impliquées dans la transmission des effets de la photopériode sur la sécrétion de la mélatonine chez les rongeurs (Reuss et Schroder, 1987; Simonneaux *et al.*, 1994; Garidou *et al.*, 2003), pourraient également participer à ce phénomène chez la brebis. En effet l'expression centrale du NPY y est influencée par le statut nutritionnel (McShane *et al.*, 1992; Polkowska et Gladysz, 2001) et inclut un réseau dense de fibres entourant la glande pinéale (Williams *et al.*, 1989).

✓ *Sur l'intégration du signal mélatoninergique par les cellules cibles*

Le récepteur membranaire GPR50 appartient au sous-type des récepteurs à la mélatonine (MT1 et MT2) avec lesquels il possède environ 45 % d'homologie de séquence nucléotidique (Reppert *et al.*, 1996a). Ce récepteur localisé au niveau central dans diverses aires hypothalamiques (Reppert *et al.*, 1996a; Barrett *et al.*, 2006; Bhattacharyya *et al.*, 2006), possède trois caractéristiques particulièrement remarquables. En premier lieu, bien qu'il soit phylogénétiquement proche des récepteurs à haute affinité pour la mélatonine, GPR50 ne lie pas la mélatonine et ne possède pas de ligand connu (Levoye *et al.*, 2006). D'un autre côté il peut former des hétérodimères avec MT1 et MT2 lui conférant de probables fonctions ligands-indépendantes (Barrett *et al.*, 2006; Bhattacharyya *et al.*, 2006; Ivanova *et al.*, 2008). En effet, si la formation du couple GPR50-MT2 semble être sans conséquences sur l'activité de ce dernier, celle du couple GPR50-MT1 conduit en revanche à inhiber l'activité de MT1 (Levoye *et al.*, 2006). Cette inactivation constatée *in vitro* pourrait, en situation physiologique, perturber l'intégration du signal mélatoninergique au niveau de ses cellules cibles et son interprétation par l'axe reproducteur.

Enfin l'expression centrale de GPR50 est dépendante de paramètres liés au métabolisme lipidique (Bhattacharyya *et al.*, 2006), notamment au niveau de la couche épendymaire du 3^{ème} ventricule (Barrett *et al.*, 2006). De fait, chez la souris, un jeûne ou une supplémentation énergétique de 48 heures entraînent une diminution de l'expression de GPR50 dans l'HDM ainsi qu'au niveau de la PVZ du 3^{ème} ventricule où sont localisées les tanocytes (Ivanova *et al.*, 2008). La sensibilité de GPR50 au statut nutritionnel de l'individu pourrait participer à la transmission des effets de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction (**Figure 25-3**). En modulant *in vivo* la formation du couple GPR50-MT1, notamment dans les zones clés de l'intégration du message photopériodique, elle serait susceptible de perturber l'intégration et l'interprétation du signal mélatoninergique par l'axe reproducteur.

▪ *En aval, sur l'interprétation du signal mélatoninergique*

✓ *Sur le mécanisme hypophysaire de mesure du temps photopériodique*

Ainsi que précédemment abordé, les signaux nutritionnels constituent un synchroniseur puissant des rythmes circadiens particulièrement dans certaines horloges périphériques où leur action est plus flagrante (**Figure 25-3**) (Bur *et al.*, 2010; Feillet, 2010). A ce titre l'hypophyse apparaît être une structure hétérogène où l'horloge de la *pars tuberalis* ne montre peu ou pas de synchronisation aux signaux nutritionnels (Cokelaere *et al.*, 1996; Bur *et al.*, 2010; Feillet,

2010). De fait, chez les rongeurs, les profils circadiens de sécrétion de la TSH ne sont pas affectés par une restriction alimentaire calorique ou temporelle (Armario et Jolin, 1986; Cokelaere *et al.*, 1996). En revanche, lors d'une restriction calorique, les principaux éléments de l'axe thyroïdien (TRH, TSH, T4 et T3) sont inhibés et voient leur production diminuée (Ooka *et al.*, 1978; Boelen *et al.*, 2008).

Plusieurs éléments semblent concourir à l'inhibition de l'axe thyroïdien par le statut nutritionnel dont une variation de la clairance hépatique et rénale des hormones thyroïdiennes, une perturbation du fonctionnement de la glande thyroïdienne et enfin une modulation de l'activité des déiodinases (pour revues cf. St Germain *et al.*, 2009; Araujo et Carvalho, 2011). La participation de cette dernière, bien qu'elle soit sujette à controverse (St Germain *et al.*, 2009), pourrait occuper une place prépondérante dans ce phénomène (**Figure 25-4**) (Diano *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 2005a). Ainsi l'activité centrale des déiodinases apparaît être sensible à la leptine (Araujo *et al.*, 2009) notamment dans les tanocytes via certains neurones à NPY du noyau arqué (Coppola *et al.*, 2005b). Ces effets démontrés chez les rongeurs pourraient prendre place de la même façon chez les ruminants où, chez la chèvre Criollo par exemple, statut nutritionnel et taux circulants de T3 sont strictement corrélés (Urrutia-Morales *et al.*, 2009).

Les hormones thyroïdiennes hypothalamiques en général, et la régulation de l'activité des déiodinases en particulier, occupent une place importante dans les mécanismes de maintien de l'homéostasie énergétique (pour revues cf. Herwig *et al.*, 2008; Araujo et Carvalho, 2011). Ces relations pourraient directement affecter le catabolisme hypothalamique des hormones thyroïdiennes, contrôlé par le mécanisme hypophysaire de mesure du temps photopériodique, et ainsi participer à l'intégration des effets du statut nutritionnel sur les profils saisonnier de reproduction.

✓ *Sur la séquence hypothalamique contrôlant le générateur de pulses de GnRH*

Les transitions saisonnières d'activité du générateur de pulses de GnRH sont finalement imputables aux modifications d'une part **électrophysiologiques** et d'autre part **plastiques** (plasticité synaptique et neurogenèse) d'un circuit neuronal hypothalamique spécifique (Hofman et Swaab, 2002; Lehman *et al.*, 2002; Thiery et Malpoux, 2003). Récemment, chez le hamster Sibérien, le mécanisme photopériodique initiant les modifications plastiques du circuit (cf. plus haut) a également été impliqué dans le contrôle des variations saisonnières du

poids vif et de l'ingestion volontaire d'aliments (Ebling et Barrett, 2008). Ces observations suggèrent une interaction hypothalamique entre ces deux systèmes photopériodiques du contrôle de l'homéostasie énergétique et de l'activité du générateur de pulses de GnRH ; tout particulièrement sur les phénomènes de neuroplasticité (**Figure 25-5**). Ces interactions seraient une des composantes impliquées dans les régulations téléopporétiques de l'organisme (Ebling et Barrett, 2008).

Considérons dans un premier temps les potentiels effets du statut nutritionnel sur les modifications de nature électrophysiologiques du circuit. En amont du noyau arqué, la pertinence physiologique des effets du statut nutritionnel sur l'activité des systèmes dopaminergique et sérotoninergique reste à déterminer (Forcada *et al.*, 2002b). En revanche, il apparaît beaucoup plus clairement que le noyau arqué constitue un centre d'intégration majeur des signaux métaboliques et hormonaux liés au statut nutritionnel pour un contrôle direct de l'activité du générateur de pulses de GnRH (**Figure 25-6**) (Backholer *et al.*, 2010; Barrett et Bolborea, 2012). Cette structure dispose en effet de certains des principaux peptides impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique (peptides orexigéniques : NPY et AgRP, peptides anorexigéniques : POMC et CART) (Schwartz *et al.*, 2000; Archer *et al.*, 2004; Crown *et al.*, 2007).

Parmi les signaux potentiellement impliqués, la leptine est un facteur essentiel (Zieba *et al.*, 2008b). Secrétée par le tissu adipeux blanc, elle agit au niveau du noyau arqué où elle tient le rôle « d'adipomètre » (Banks *et al.*, 2006) pour influencer de façon permissive sur l'activité du générateur de pulses de GnRH (Cunningham *et al.*, 1999; Blache *et al.*, 2000). Cette action sur les neurones à GnRH est indirecte (Quennell *et al.*, 2009) et implique des populations neuronales récemment identifiées. Il s'agit vraisemblablement des populations de neurones à RF-amides et principalement des neurones à kisspeptines du noyau arqué (Tena-Sempere, 2006; Roa *et al.*, 2008; d'Anglemont de Tassigny et Colledge, 2010) où, chez la souris, environ 40 % de ces neurones coexpriment le récepteur à la leptine (Smith *et al.*, 2006a). En établissant des interactions complexes avec les neurones à POMC, NPY et AgRP les neurones à kisspeptines du noyau arqué forment un circuit neuronal capable de diriger le contrôle métabolique de l'activité des neurones à GnRH (**Figure 25-6**) (Castellano *et al.*, 2009; Backholer *et al.*, 2010; Fu et van den Pol, 2010). A ce sujet, l'intervention des fibres à GnIH dans le noyau arqué reste à déterminer (Clarke, 2011).

Des modifications de neuroplasticité du circuit, liées au statut nutritionnel, ont également été mises en évidence et sont principalement localisées dans le noyau arqué (**Figure 25-6**). Au sein de ce dernier, une neuroplasticité indépendante du statut nutritionnel est inhérente au bon fonctionnement des voies de signalisation du maintien de l'homéostasie énergétique (Horvath et Diano, 2004; Kokoeva *et al.*, 2005; Pierce et Xu, 2010). Les hormones métaboliques périphériques (leptine, ghrelin, ...) interviendraient en perturbant ces phénomènes de plasticité synaptique (pour revue cf. Horvath, 2006) et de neurogenèse (McNay *et al.*, 2012) ; la plupart des mécanismes sous-jacents à ces effets restant à identifier.

Le statut nutritionnel perturbe les modifications électrophysiologiques et plastiques du circuit hypothalamique impliqué dans le contrôle photopériodique de l'activité du générateur de pulses de GnRH. Les effets de cette interaction se concentrent essentiellement au sein du noyau arqué où les hormones périphériques modifient l'activité et la fonctionnalité d'un réseau neuronal continuellement renouvelé et remodelé. Ces interactions récemment découvertes représenteraient donc un aspect essentiel du contrôle métabolique de l'activité du générateur de pulses de GnRH. Ainsi le noyau arqué constituerait un des principaux éléments d'un centre hypothalamique d'intégration des signaux métaboliques (Blache *et al.*, 2002).

c. Variations centrales de l'intensité des signaux hormonaux périphériques

Le principal moyen pour la leptine, l'insuline et la ghréline d'agir sur les voies hypothalamiques du maintien de l'homéostasie énergétique est de traverser la barrière hématoencéphalique via un mécanisme de transport actif et saturable (Banks *et al.*, 1997; Ziylan *et al.*, 2009; Castaneda *et al.*, 2010). Chez les ovins, à la manière des hormones stéroïdiennes (Thiery et Malpaux, 2003), la photopériode contrôle le transport de la leptine au travers de la BHE (Adam *et al.*, 2006). Le passage de l'hormone anorexigénique est alors freiné en JC, contrebalançant ainsi la diminution saisonnière de l'ingestion volontaire d'aliments (Adam *et al.*, 2006).

Ce processus dynamique apparaît être dépendant du statut nutritionnel chez les ovins (Adam et Findlay, 2010), les rongeurs (Kastin et Akerstrom, 2000; Banks *et al.*, 2004), les lagomorphes (Karonen *et al.*, 1998) ainsi que chez l'homme (Caro *et al.*, 1996; Schwartz *et al.*, 1996). Cette dépendance se traduit par une diminution du passage vers le liquide céphalo-rachidien pour des situations nutritionnelles « extrêmes » (jeûne ou obésité). Chez les rongeurs ce phénomène est réversible (Banks et Farrell, 2003) et associé à la chute des taux

circulants de triglycérides (Banks *et al.*, 2004) tandis que chez les ovins ces deux paramètres ne sont pas vérifiés (Adam et Findlay, 2010). Alors que la même dépendance vis-à-vis du statut nutritionnel s'applique au transport de l'insuline et de la ghréline chez rongeurs (Gerozissis *et al.*, 1993; Banks *et al.*, 2008) ; chez les ovins le passage de l'insuline au niveau central est indépendant du statut nutritionnel (Adam *et al.*, 2012).

La BHE apparaît être un site dynamique pour la régulation des communications hormonales entre la circulation sanguine et le LCR (Kastin et Akerstrom, 2000). Elle apporte ainsi une réponse biphasique au statut nutritionnel sur l'intensité du signal leptinémique transmis au niveau central. Dans le cas d'une restriction alimentaire soudaine il peut s'agir d'une réponse adaptative visant à atténuer les effets anorexigéniques de l'hormone et assurer l'homéostasie énergétique de l'organisme. Dans les cas d'obésité, le développement d'une résistance centrale à la leptine serait une conséquence inappropriée du fonctionnement de ces mêmes mécanismes (Banks *et al.*, 2006).

Les signaux hormonaux, nutritionnels et métaboliques liés à l'état d'engraissement interagissent avec les principales étapes du processus d'intégration du signal photopériodique pour le contrôle de l'activité du générateur de pulses de GnRH. Ces interactions consistent en des modifications de l'intensité d'expression de certains mécanismes (sur la synthèse de la mélatonine et son intégration par les cellules cibles, sur l'activité des déiodinases et sur les différents éléments de la séquence hypothalamique) mais également en des perturbations de leur fonctionnement (sur l'horloge circadienne des NSC et sur le PTM hypophysaire). Si l'ensemble de ces interactions peuvent expliquer la majorité des effets de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction, leur intervention en situation physiologique et leur contribution individuelle restent souvent à déterminer.

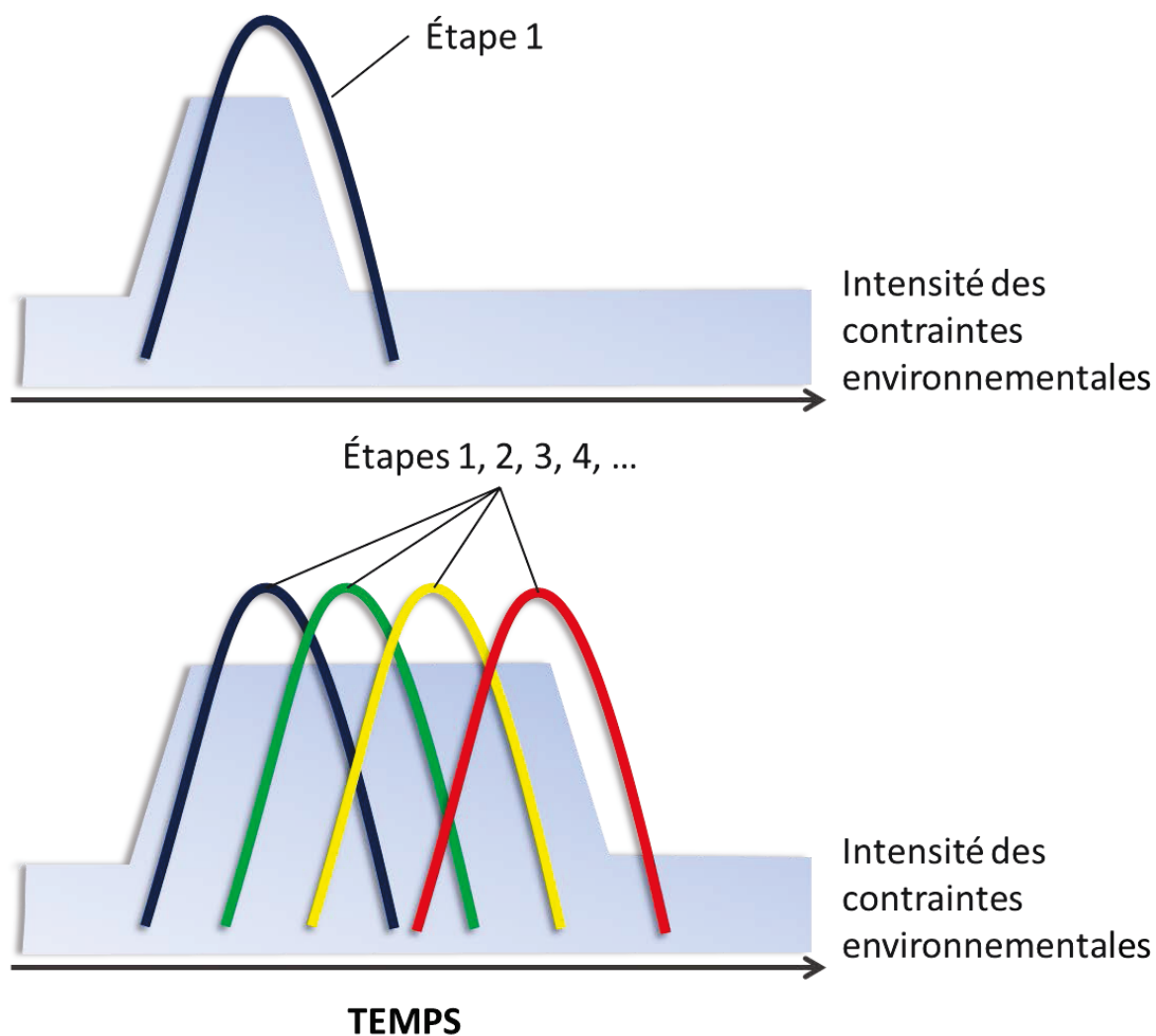


Figure 1 Un environnement présentant une variabilité importante favorise le développement d'étapes distinctes au cours du cycle biologique. L'expression de chacune de ces étapes correspond à un changement de l'état physiologique des individus ayant valeur adaptative : saisonnalité de la reproduction, mue, migration... (d'après Wingfield, 2008).

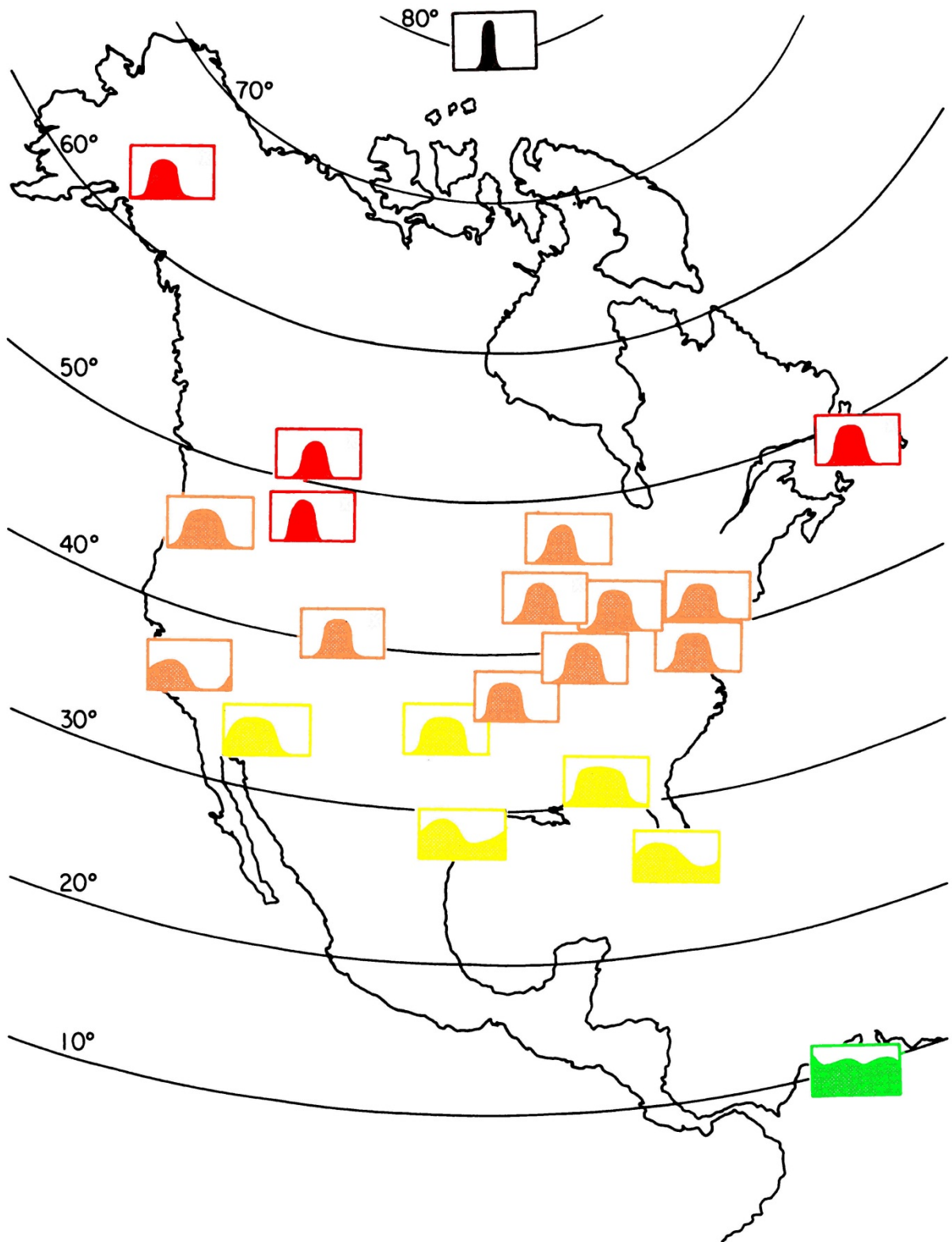


Figure 2 Les profils saisonniers de reproduction de lagomorphes observés sous différentes latitudes (% de femelles gestantes) : proche de l'équateur les profils reproductifs ne suivent pas un rythme particulier, à mesure que la latitude augmente les profils de reproduction se font saisonniers et de plus en plus marqués (Bronson, 1985).

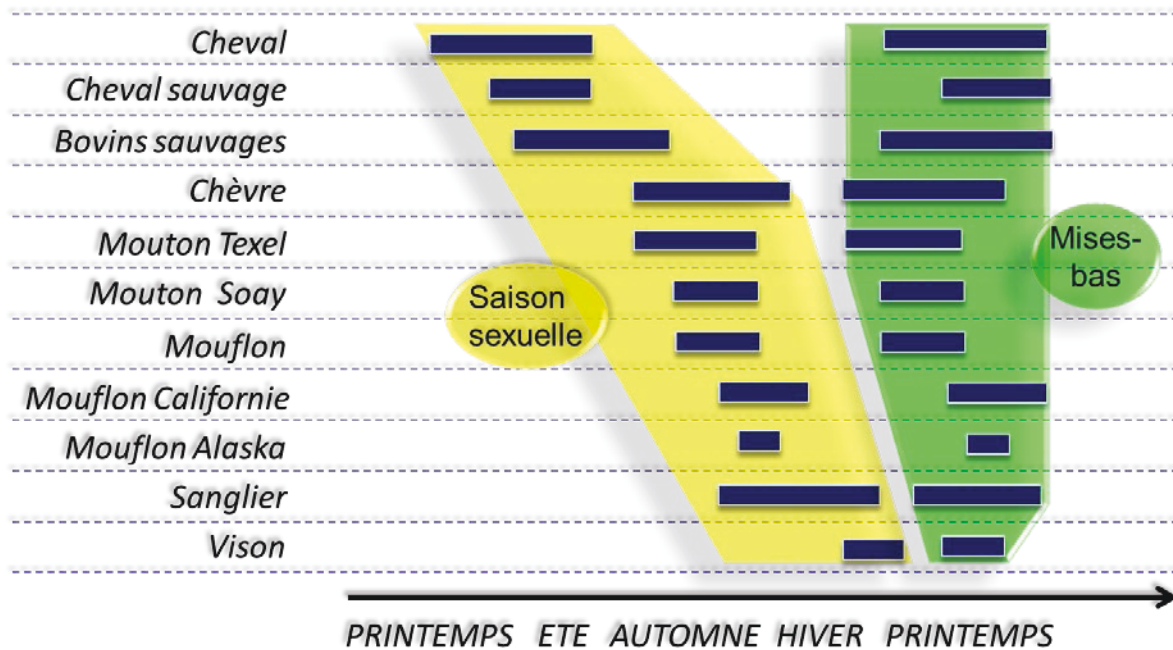


Figure 3 Sous les aires tempérées la période favorable aux mises-bas correspond au printemps, selon la durée de gestation de l'espèce considérée la période propice aux accouplements (ou saison sexuelle) varie en conséquence (d'après Ortavant *et al.*, 1985).

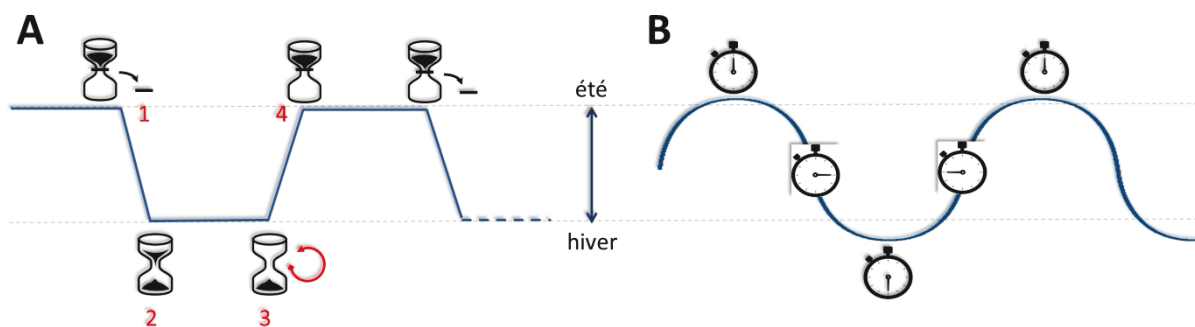


Figure 4 Schéma de fonctionnement des mécanismes photopériodiques de type I (A) et de type II (B). A : un premier signal photopériodique provoque un changement phénotypique (1) et initie la mise en marche du mécanisme endogène de mesure du temps (2), arrivé à terme ce dernier initie une transition phénotypique inverse (3). Un second signal photopériodique est nécessaire pour sensibiliser l'ensemble du système à l'action du premier signal (4). B : le fonctionnement de l'horloge circannuelle provoque de façon autonome les changements entre phénotypes d'hiver et d'été (Paul *et al.*, 2008).

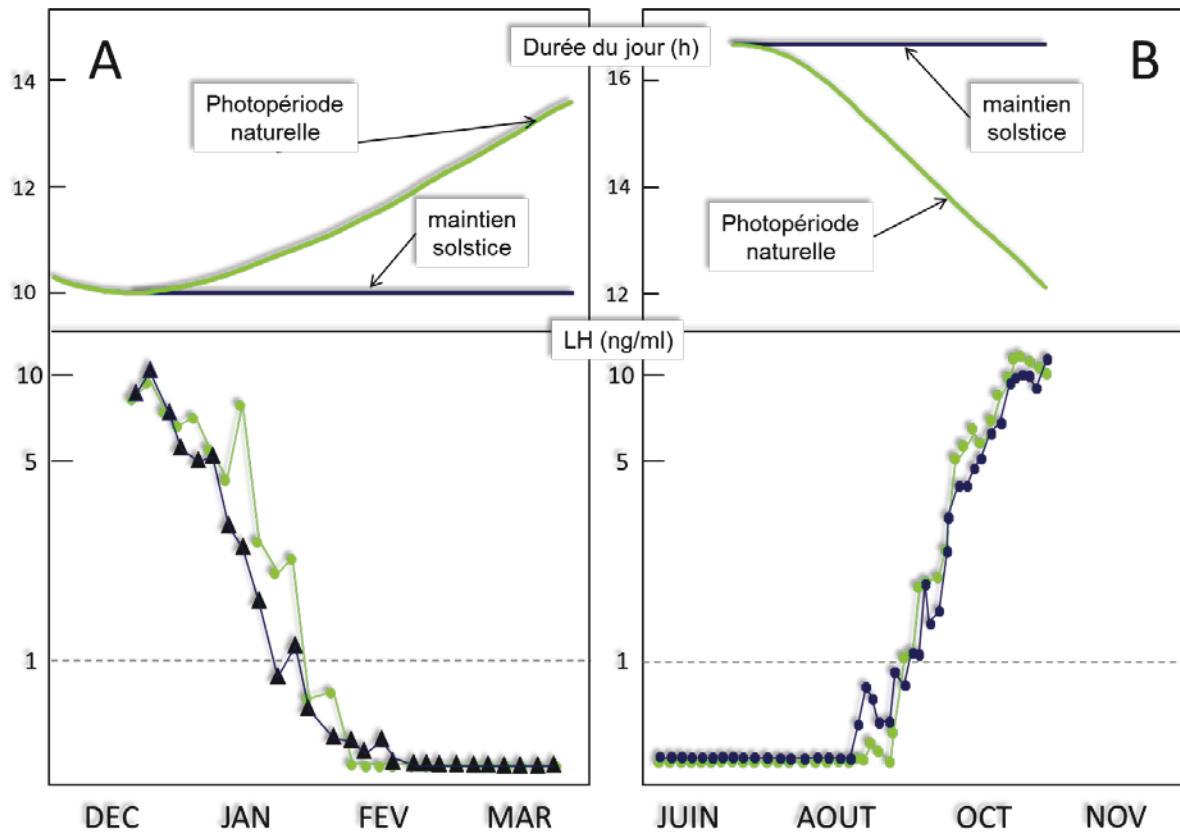


Figure 5 Mise en évidence du contrôle exercé par l'horloge circannuelle sur les transitions saisonnières reproductives chez les espèces saisonnées (ici la brebis) disposant d'un mécanisme photopériodique de type II : développement de l'état photoréfractaire. A : maintenir la photopériode expérimentée au solstice d'hiver ($n = 5$) n'empêche pas la mise en place « normale » ($n = 6$) de la saison d'ancestrus (ici représentée par des concentrations plasmatiques de LH < 1 ng/mL). B : les résultats sont comparables pour le maintien de la photopériode du solstice d'été ($n = 6$) qui n'empêche pas la mise en place « normale » ($n = 6$) de la saison de reproduction (LH > 1 ng/mL) (d'après Malpaux *et al.*, 1988b; Malpaux *et al.*, 1989).

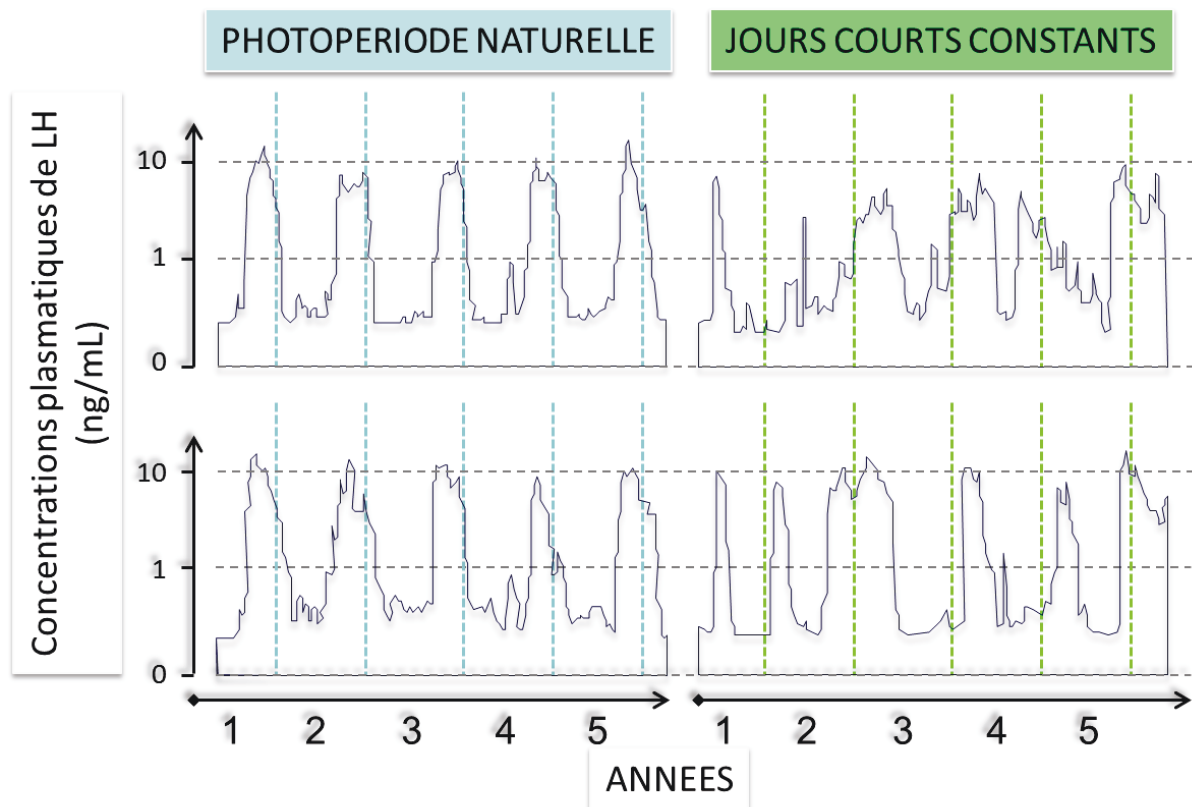


Figure 6 Mise en évidence de la synchronisation du rythme circannuel par la photopériode : les brebis placées en jours courts constants (droite, $n = 5$) étant privées d'information photopériodique expriment un rythme reproductif généré de façon endogène, qualifié de circannuel. Ce rythme n'est pas synchronisé entre animaux et sa période est proche de 365 jours. Les brebis soumises aux conditions photopériodiques éprouvées au niveau des régions tempérées (gauche, $n = 5$) expriment un rythme reproductif circannuel synchronisé par la photopériode (i.e. un rythme reproductif saisonnier). Ce rythme est synchronisé entre animaux et d'une période égale à une année (Karsch *et al.*, 1989).

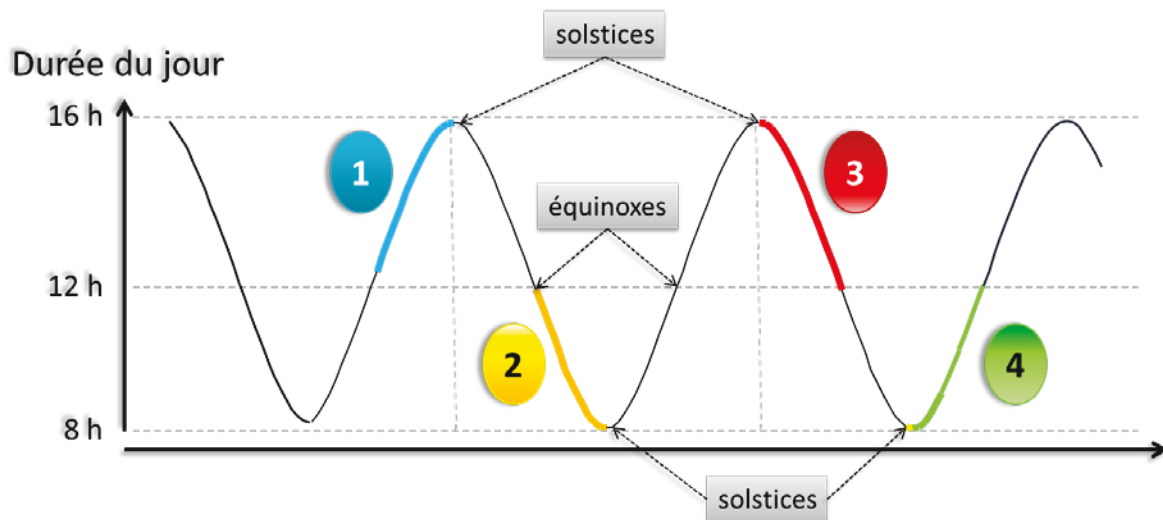


Figure 7 Le cycle photopériodique (45°N) et ses différentes portions identifiées quant à leur rôle respectif dans l'élaboration des profils saisonniers de reproduction. 1, 2, 3 et 4 : se référer au paragraphe correspondant.

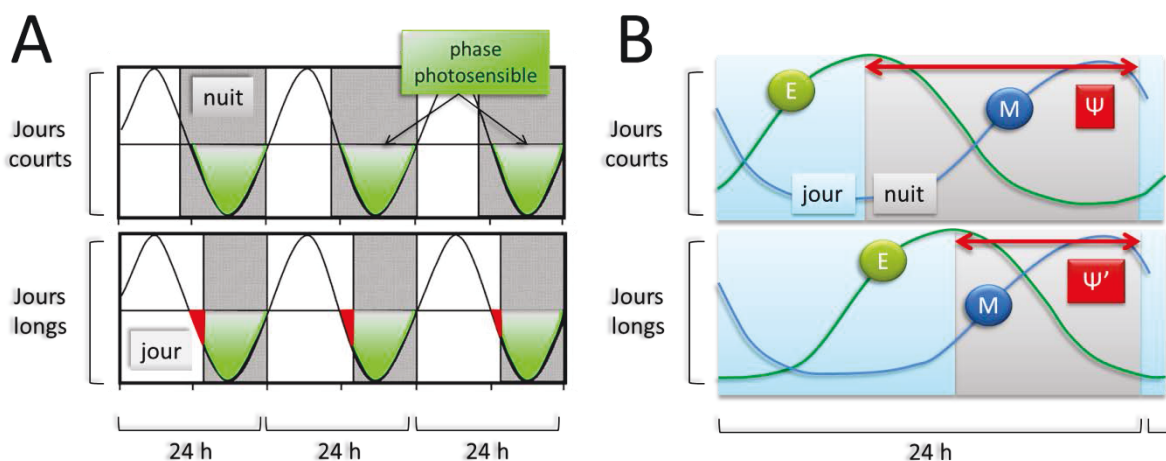


Figure 8 Les deux modèles de mesure du temps photopériodique. A : modèle de coïncidence externe. La courbe sinusoïdale représente le rythme circadien. L'illumination de la phase photosensible en jours longs (zone rouge) provoque la transition phénotypique (d'après Saunders, 2005). B : modèle de coïncidence interne. Les variations de rapports de phase (Ψ et Ψ') entre les deux oscillateurs (M : aube et E : crépuscule) en fonction de la durée du jour rendent compte des variations photopériodiques.

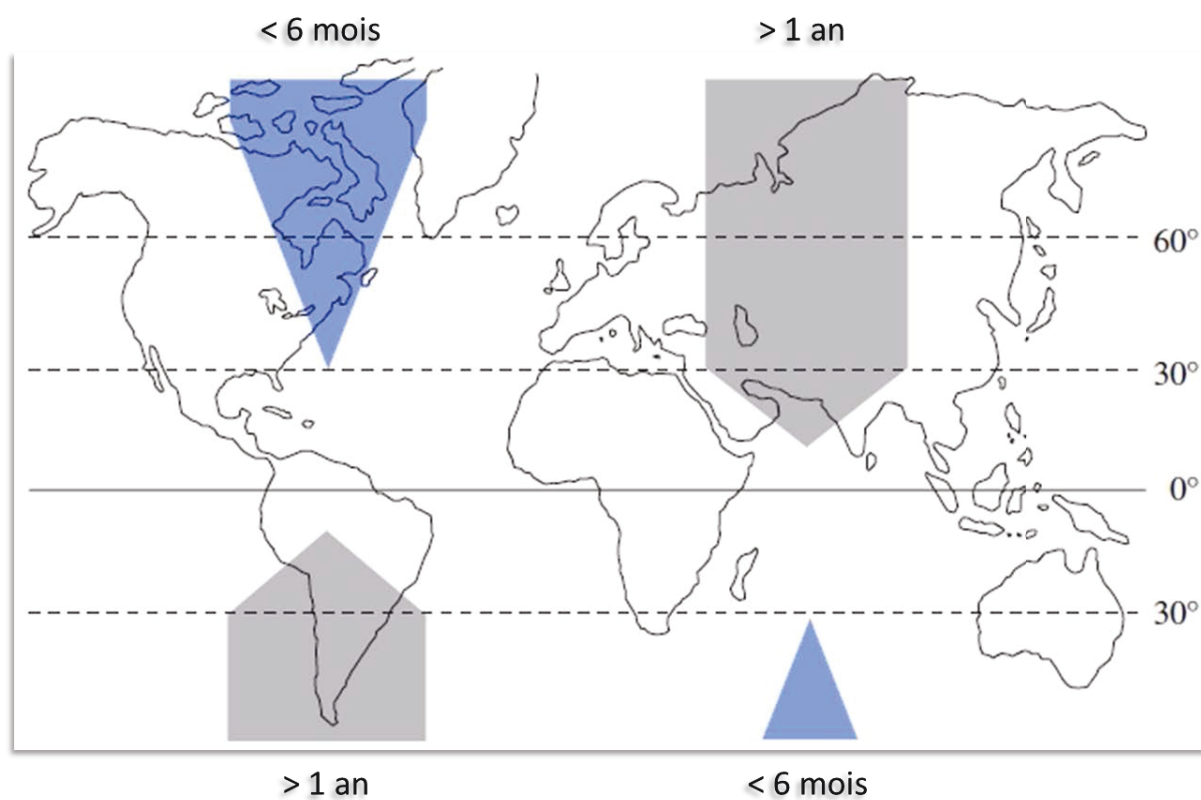


Figure 9 Le modèle de *Bronson* : les aires grisées représentent l'évolution du degré de photosensibilité des populations animales en fonction de l'espérance de vie des espèces considérées (Bronson, 2009).



Figure 10 Mise en évidence de la photosensibilité des races de petits ruminants originaires des latitudes intertropicales. Exposées aux conditions photopériodiques tropicales (n = 17), les profils annuels de reproduction des chèvres créoles n’expriment pas de rythme saisonnier. En revanche lorsque des chèvres de cette même race sont observées en parallèle en conditions photopériodiques tempérées (n = 16), les profils annuels de reproduction suivent un rythme saisonnier, stimulé par les jours courts et inhibé par les jours longs (Chemineau *et al.*, 2004).

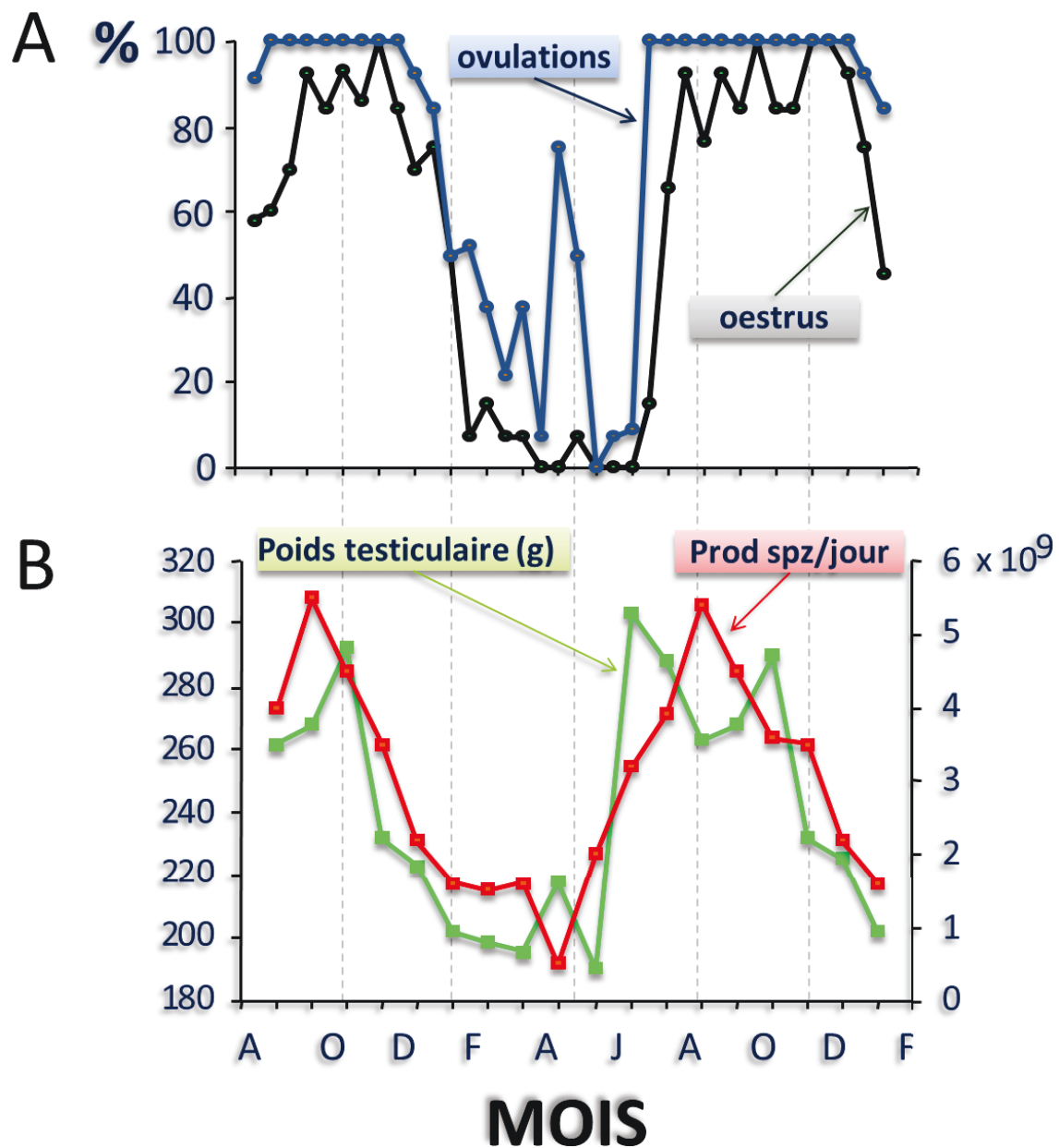


Figure 11 Concurrency des périodes fertiles et infertiles chez les brebis (A) et les béliers (B) de race Île-de-France. A, profils saisonniers de reproduction des femelles : variations des proportions de brebis Île-de-France (n = 17) ovulant et exprimant un comportement d'oestrus (Thimonier et Mauléon, 1969). B, profils saisonniers de reproduction des mâles : variations saisonnières du poids testiculaire et de la production de spermatozoïdes chez des béliers Île-de-France (n = 26) (d'après Dacheux *et al.*, 1981).

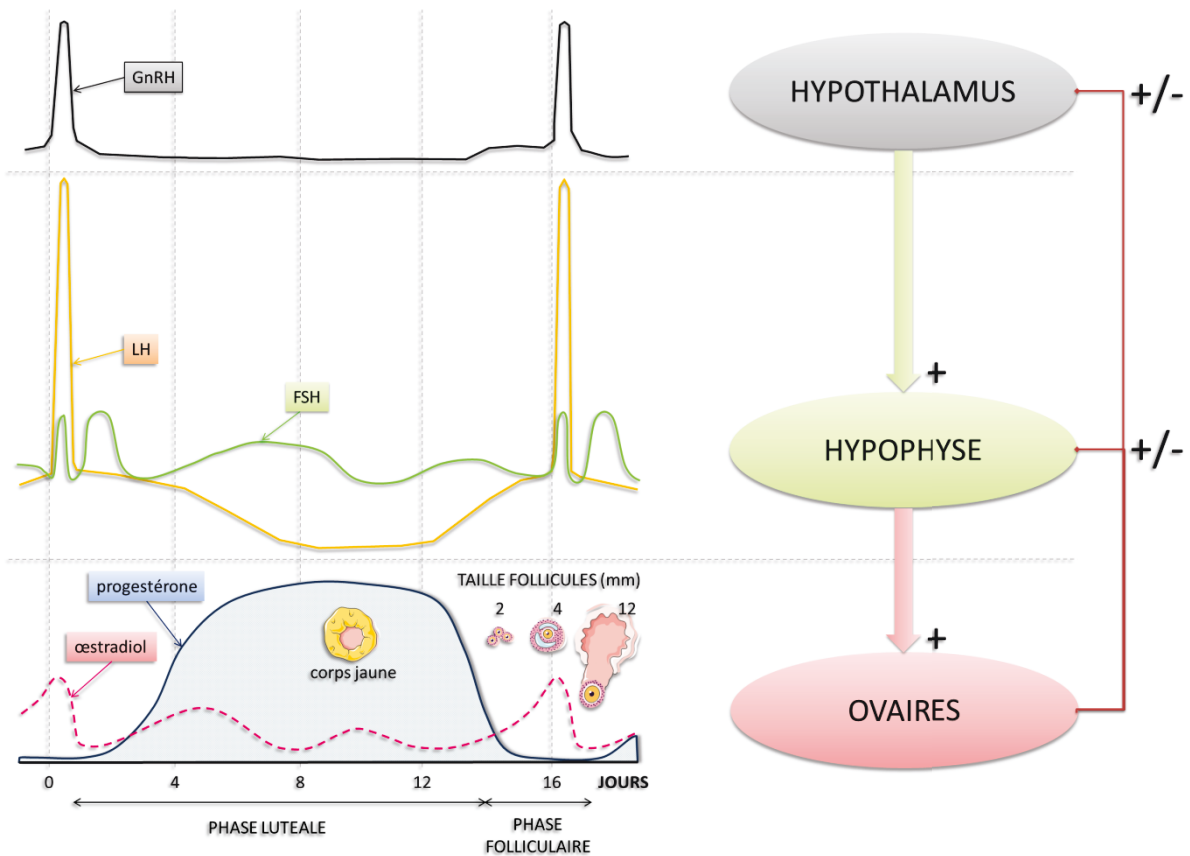


Figure 12 Représentation schématique de certains des principaux éléments du dialogue endocrinien au sein de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. A gauche : certains profils hormonaux observés au cours du cycle œstral de la brebis (d'après Karsch et Evans, 1996; Driancourt, 2001). A droite : représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique.

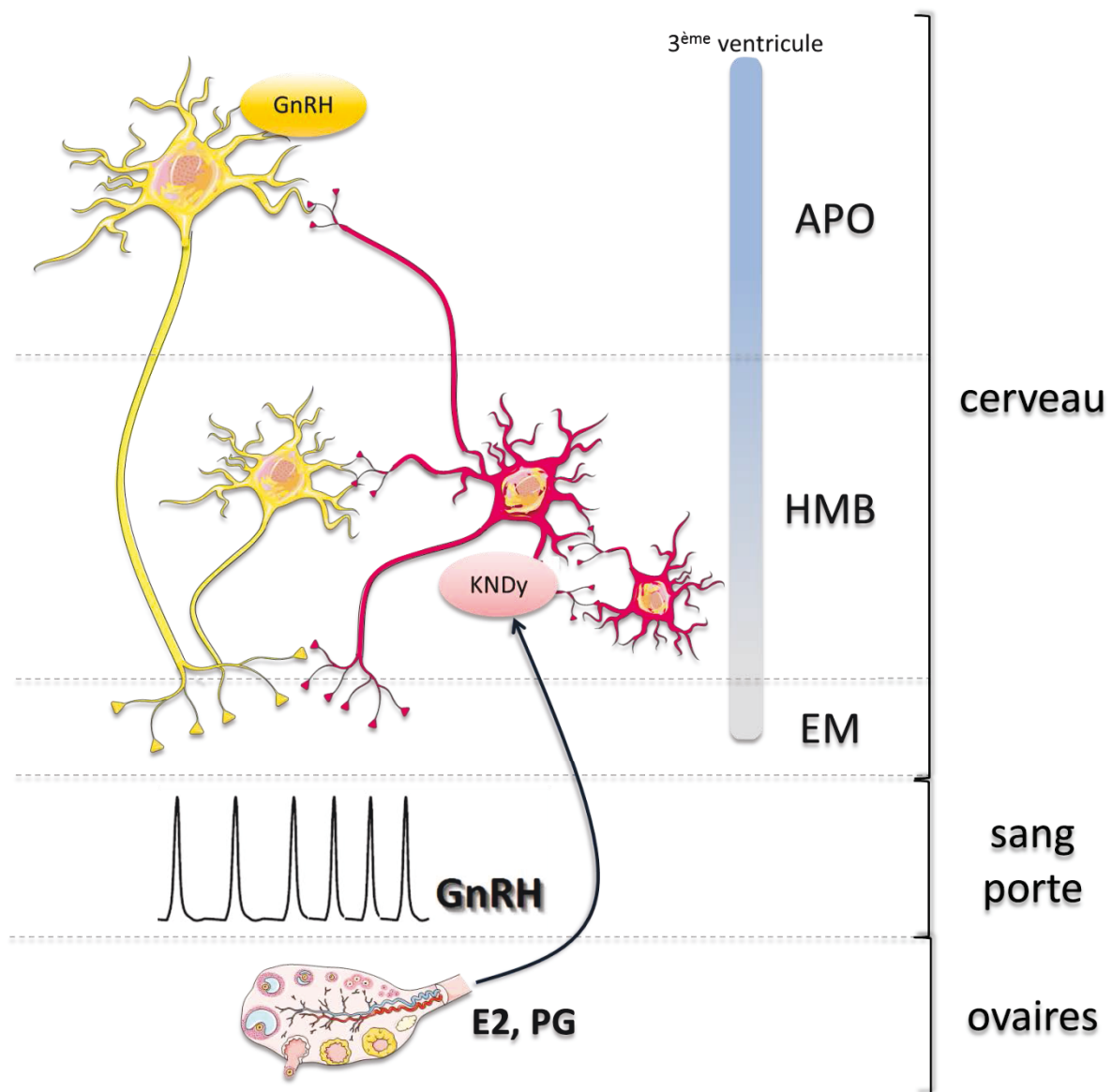


Figure 13 Diagramme schématique des populations de neurones à KNDy du noyau arqué et de leurs relations avec les neurones à GnRH et les hormones ovariennes pour le contrôle de la libération pulsatile de GnRH. Les populations neuronales sont représentées dans le plan rostro-caudal (d'après Lehman *et al.*, 2010a; Lehman *et al.*, 2010c).

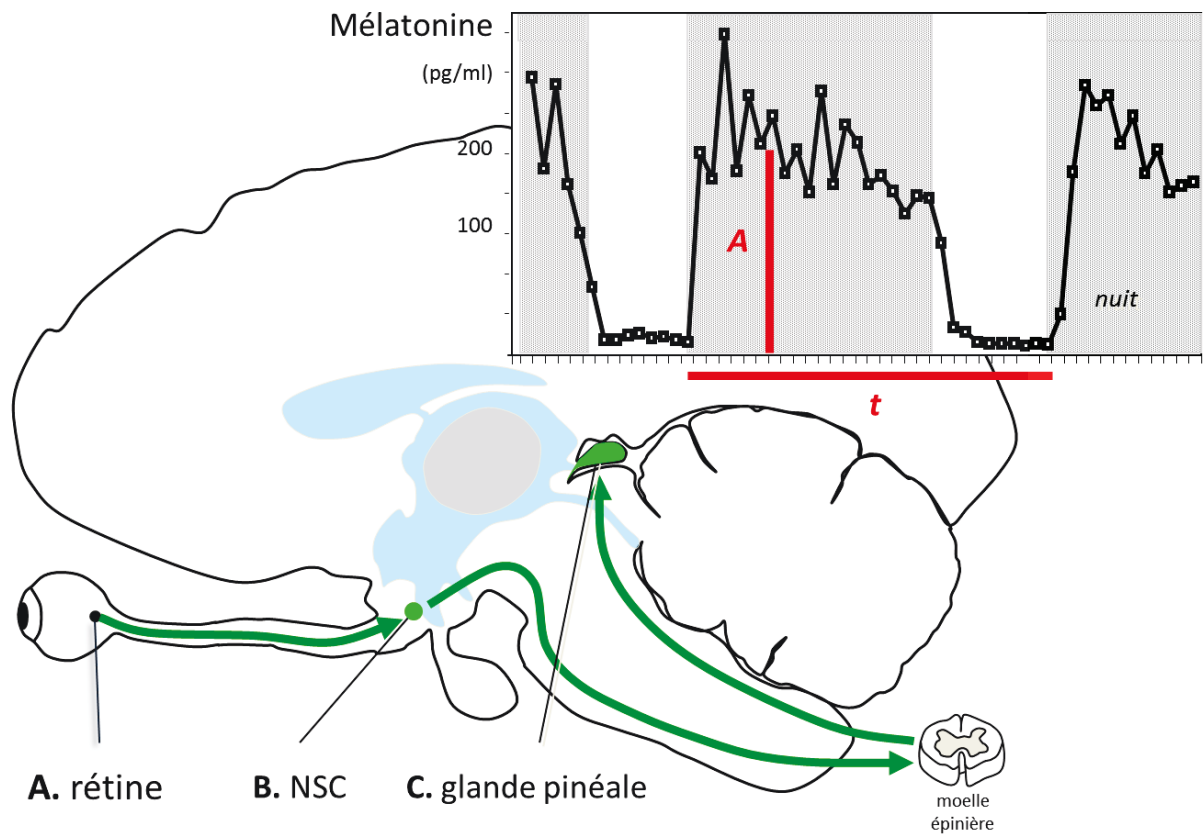


Figure 14 Schéma d'une coupe sagittale d'un cerveau de brebis et représentation simplifiée du circuit neuronal impliqué dans le contrôle photopériodique de l'activité sécrétoire de la glande pinéale (trait vert). Le profil journalier des concentrations plasmatiques de mélatonine est également illustré en mettant en évidence ses deux composantes principales : la période (*t*) et l'amplitude (*A*). La zone bleue représente les ventricules.

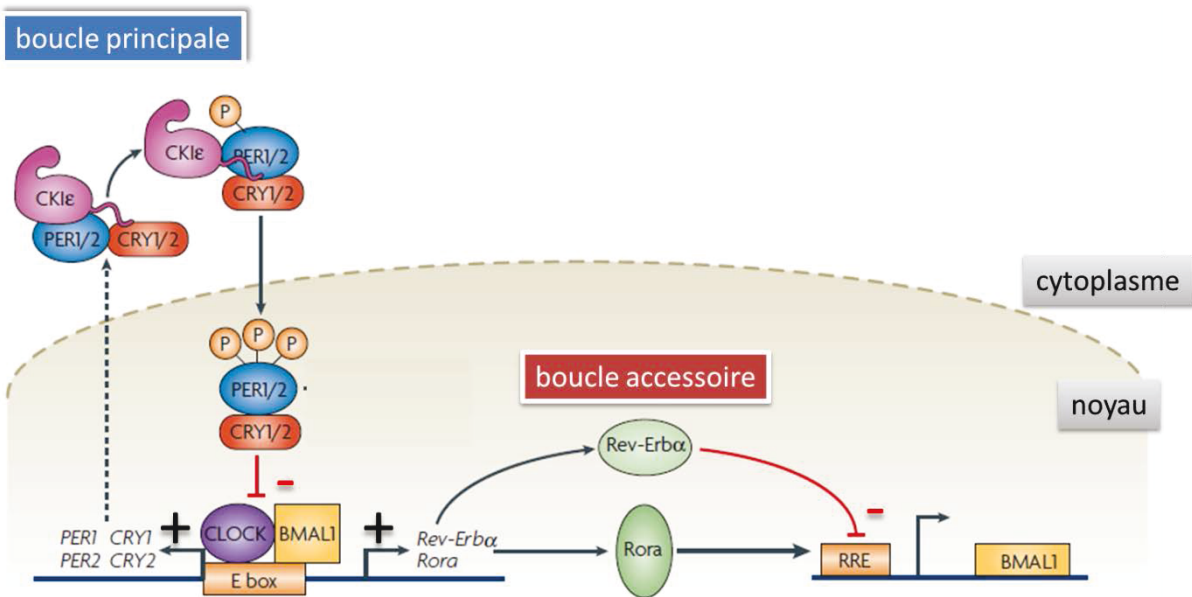


Figure 15 Les principaux éléments de l’horloge circadienne des mammifères et leurs interrelations (Gallego et Virshup, 2007).

Le cœur du fonctionnement de l’horloge circadienne dépend d’une boucle de feedback négatif autorégulée et retardée où les produits protéiques de certains gènes régulent négativement leur propre transcription. Les activateurs transcriptionnels de cette boucle principale sont les produits protéiques des gènes *clock* et *bmal1* et ses régulateurs négatifs appartiennent à la famille des gènes *Pers* (*Per1*, *Per2* et *Per3*) et *Crys* (*Cry1* et *Cry2*).

Une fois transloquées dans le cytoplasme les protéines PERs et CRYs sont phosphorylées par différentes enzymes (caséine kinase epsilon, glycogène synthase kinase 3 beta, ...) ce qui influencent à la fois leur stabilité et leur taux d’entrée dans le noyau sous forme d’hétérodimères. Il s’agit d’un processus central dans l’élaboration de la période du rythme circadien.

Au sein du noyau régulations transcriptionnelles s’effectuent via l’élément E-box, une séquence promotrice clé de la réponse circadienne. Cette séquence interconnecte la boucle principale avec deux boucles accessoires qui impliquent les gènes *Rev-erba / Rora* et *Dbp / E4bp4* (ces deux derniers éléments n’étant pas représentés sur cette figure) et régulent leurs séquences promotrices associées, les éléments RORE et D-box. Ces boucles accessoires stabilisent la boucle principale et constituent le premier produit de l’expression de l’horloge circadienne. La régulation temporelle de l’expression des gènes porteurs d’une ou plusieurs de ces séquences promotrices forme un réseau transcriptionnel complexe qui *in fine* dirige l’activité circadienne des cellules (pour revue cf. Reppert et Weaver, 2002).

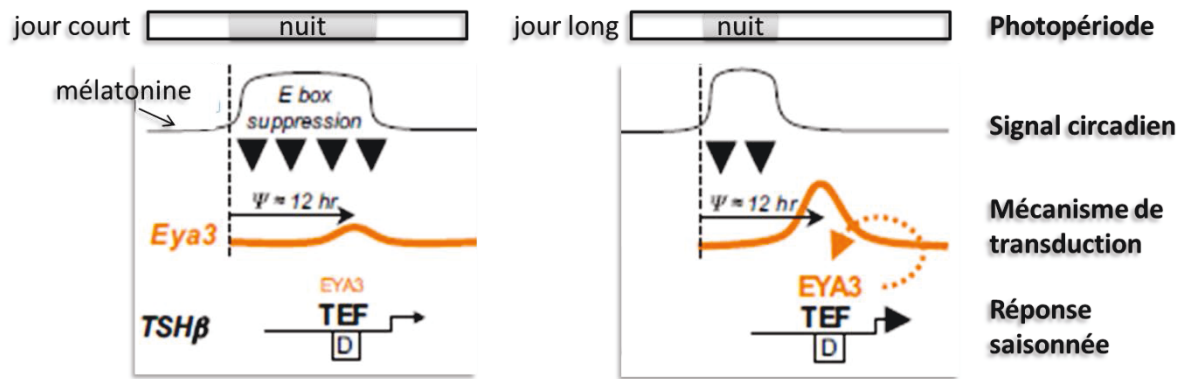


Figure 16 Le mécanisme de mesure du temps photopériodique dans l'hypophyse : un modèle de coïncidence externe. Le fonctionnement de ce modèle (cf. texte pour plus de détails) aboutit aux variations photopériodiques de la transcription de la TSH β .

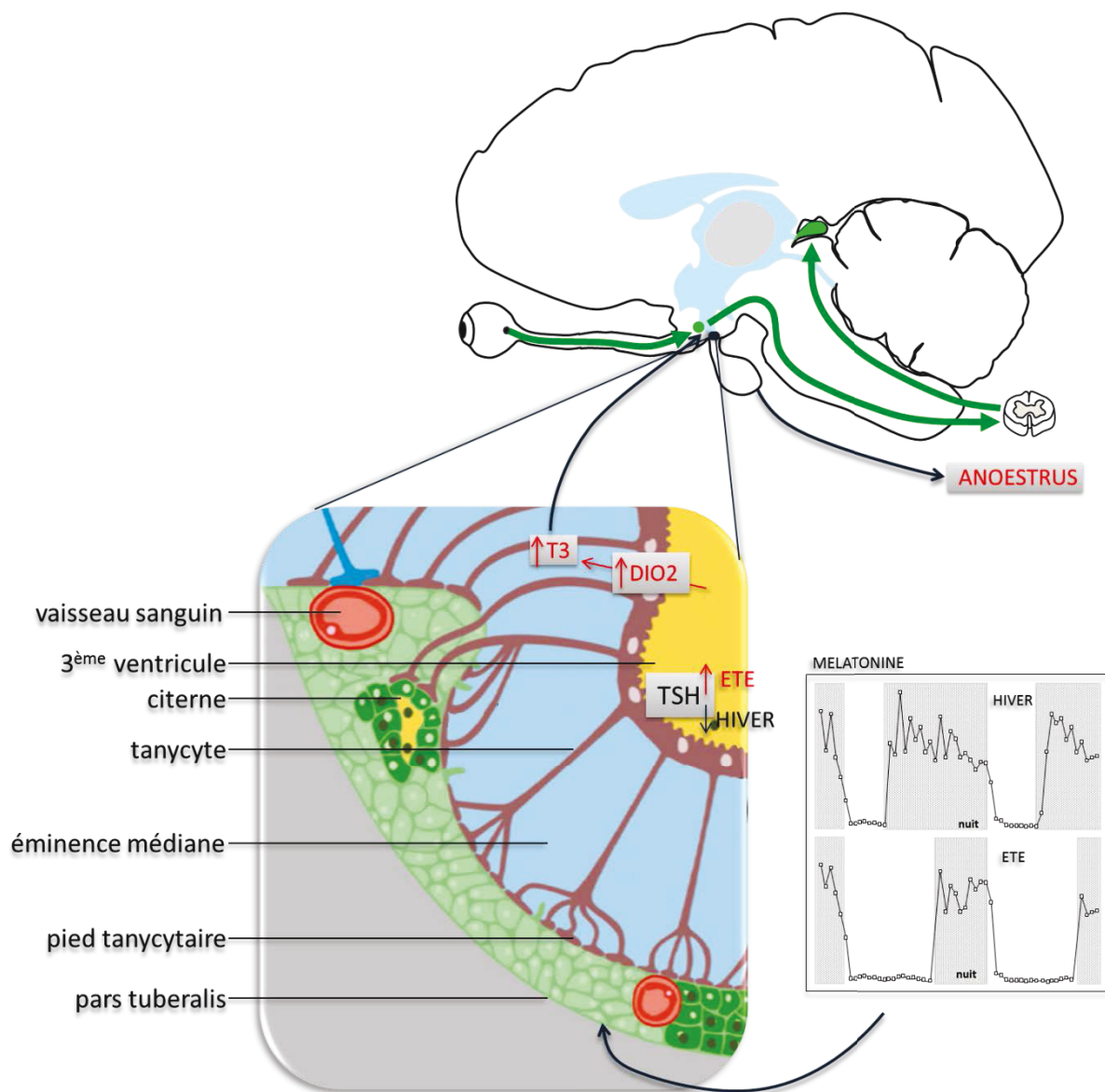


Figure 17 Représentation schématique du lien entre le mécanisme hypophysaire de mesure du temps photopériodique et la variation du catabolisme hypothalamique des hormones thyroïdiennes pour la mise en place des transitions saisonnières reproductives (d'après Hut, 2011; Barrett et Bolborea, 2012).

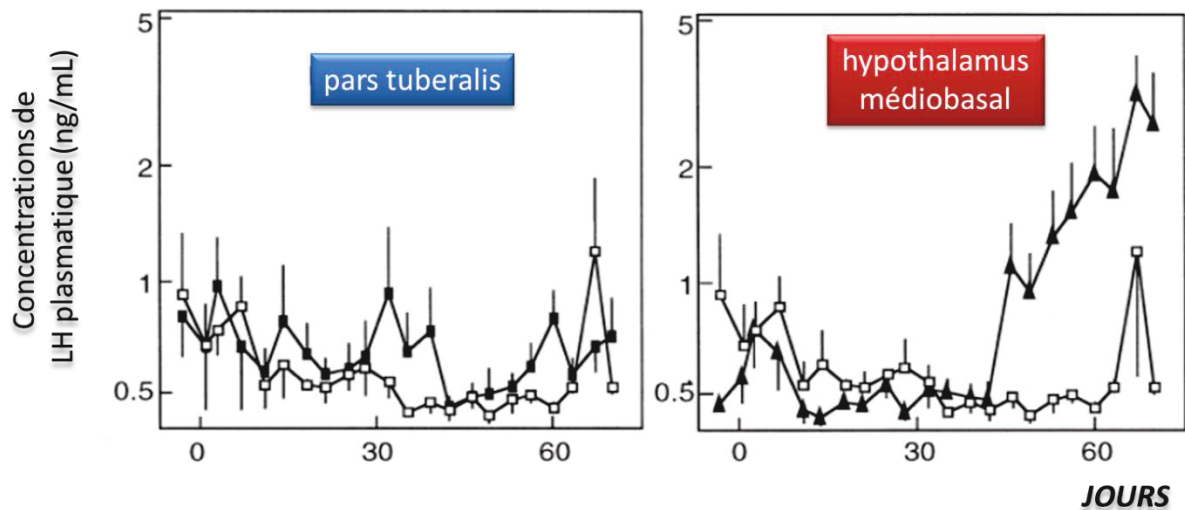


Figure 18 Mise en évidence d'un rôle pour l'hypothalamus médiobasal dans l'interprétation du signal mélatoninergique dans le contrôle de l'axe gonadotrope. A gauche : des micro-implants de mélatonine placés au niveau de la pars tuberalis [symboles pleins : mélatonine (n= 5), symboles creux : témoins (n = 5)] ne provoquent pas d'augmentation des concentrations plasmatiques de LH. A droite : la mise en place d'implants de mélatonine au niveau de l'HMB stimule la libération de LH [symboles pleins : mélatonine (n = 7), symboles creux : témoins (n = 5)] (Malpaux *et al.*, 1996).

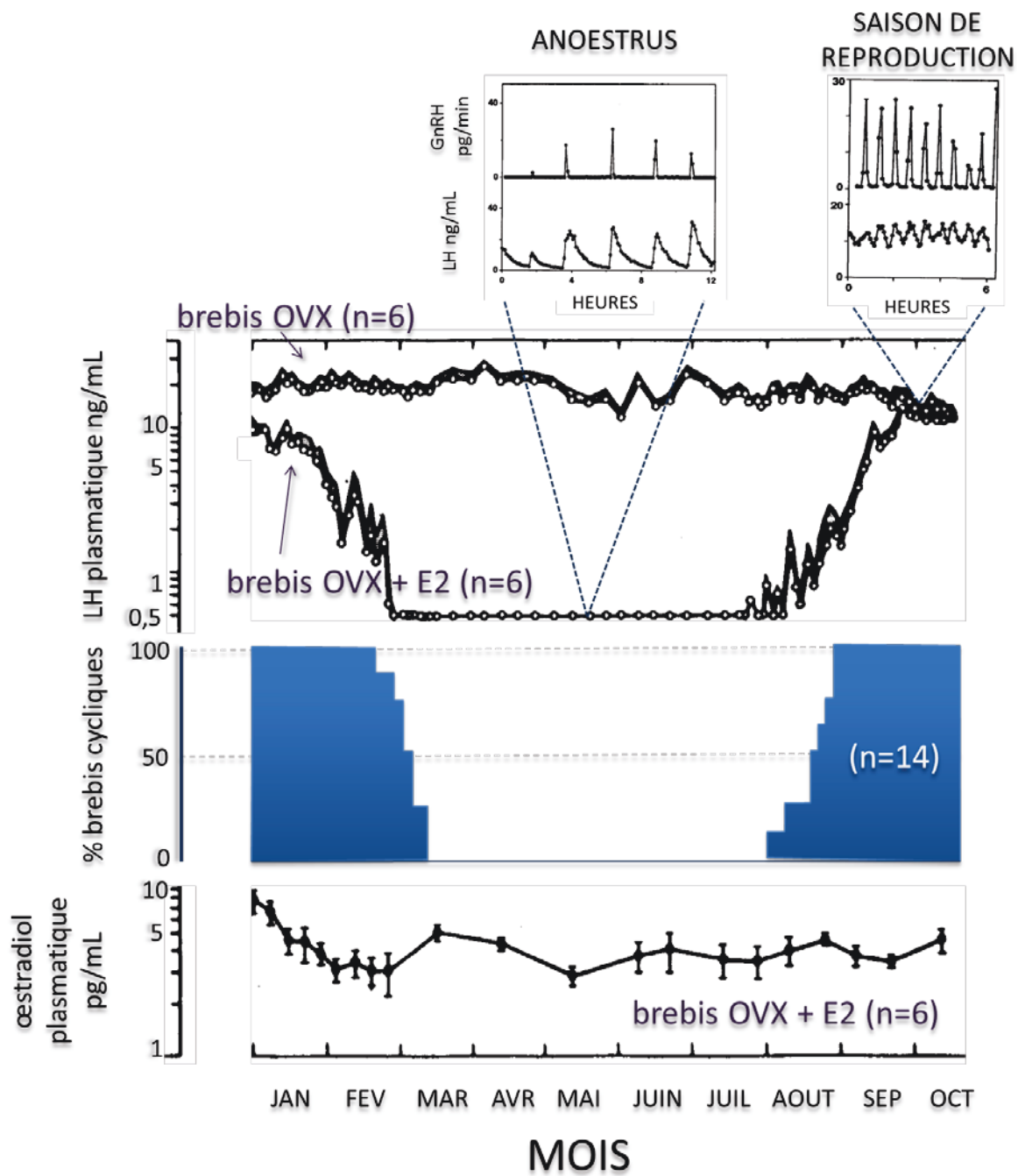


Figure 19 Variations photopériodiques du rétrocontrôle œstrogénique sur l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire mises en évidence chez la brebis ovariectomisée et recevant un implant sous-cutané d'œstradiol (d'après Karsch *et al.*, 1980; Karsch *et al.*, 1993).

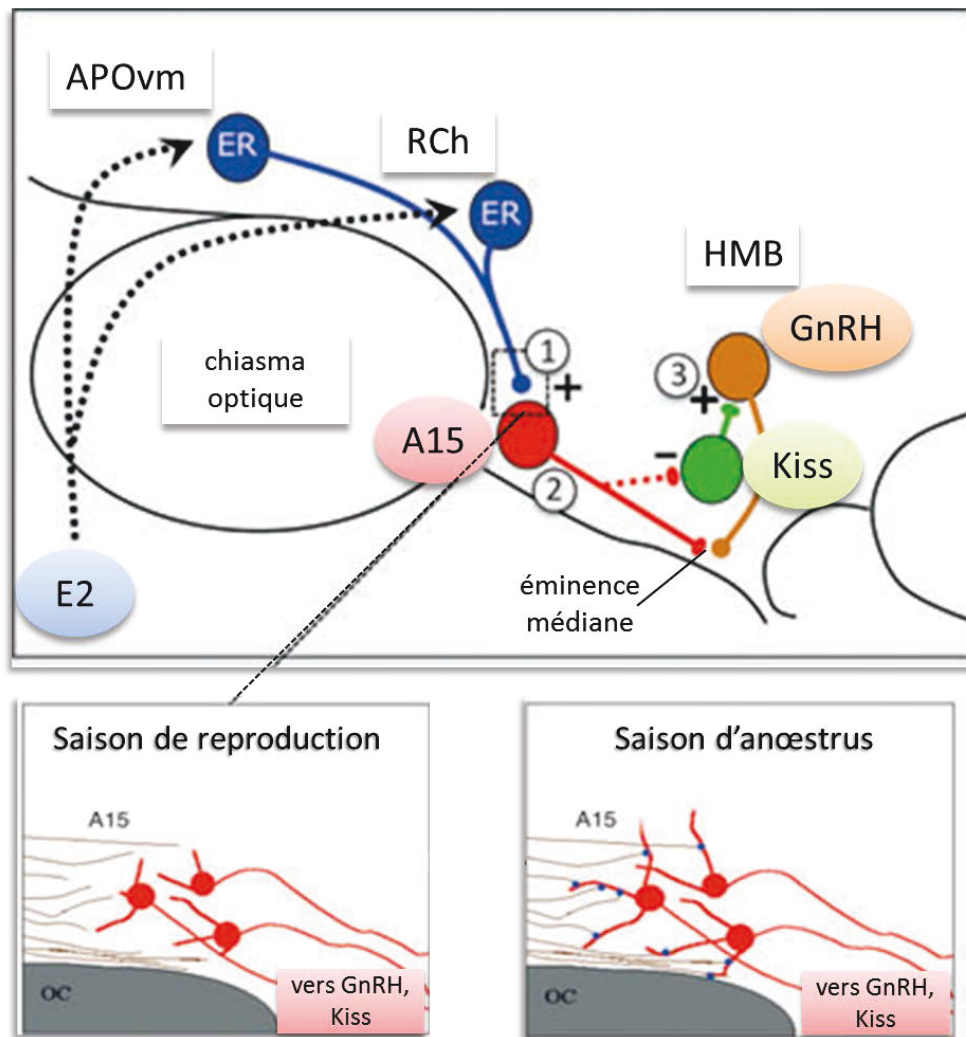


Figure 20 Représentation du circuit neuronal impliqué dans la transmission du signal œstrogénique vers les neurones à GnRH (en haut). Des phénomènes de neuroplasticité sont observés 1. sur les contacts synaptiques au niveau des neurones du noyau A15, 2. sur la morphologie des dendrites des neurones dopaminergiques du noyau A15 et 3. sur les corps cellulaires des neurones à kisséptine. En bas : les variations photopériodiques de la morphologie des dendrites des neurones du noyau A15 et de leurs afférences glutamatergiques (en bleu) seraient en partie responsables de la mise en place d'un circuit neuronal fonctionnel pour la transmission du signal œstrogénique (Lehman *et al.*, 2010b).

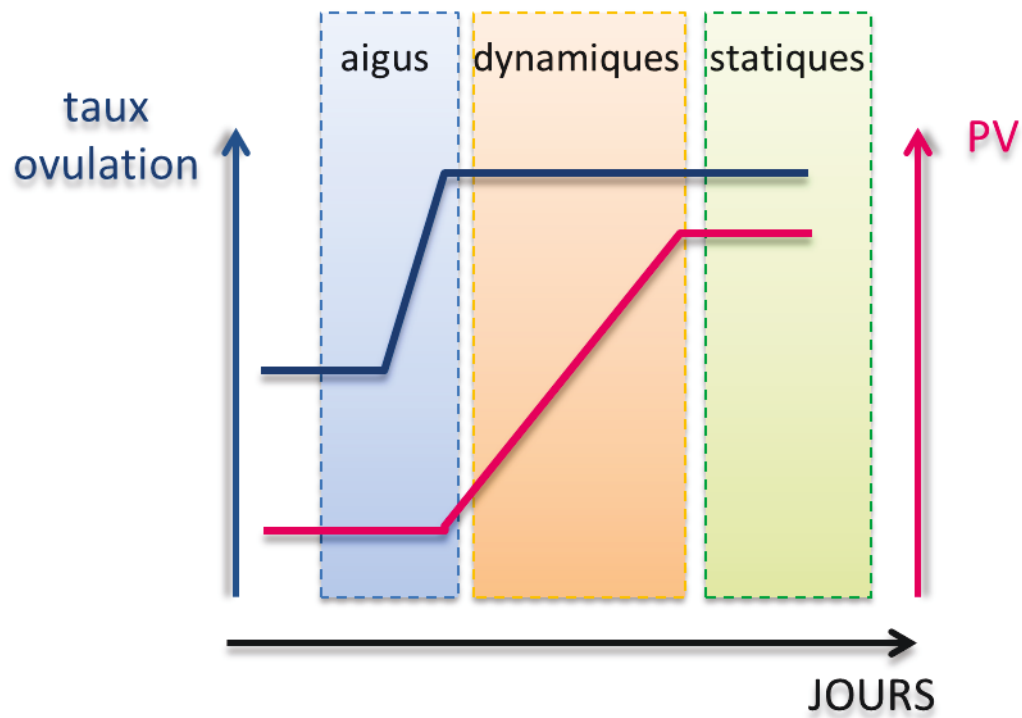
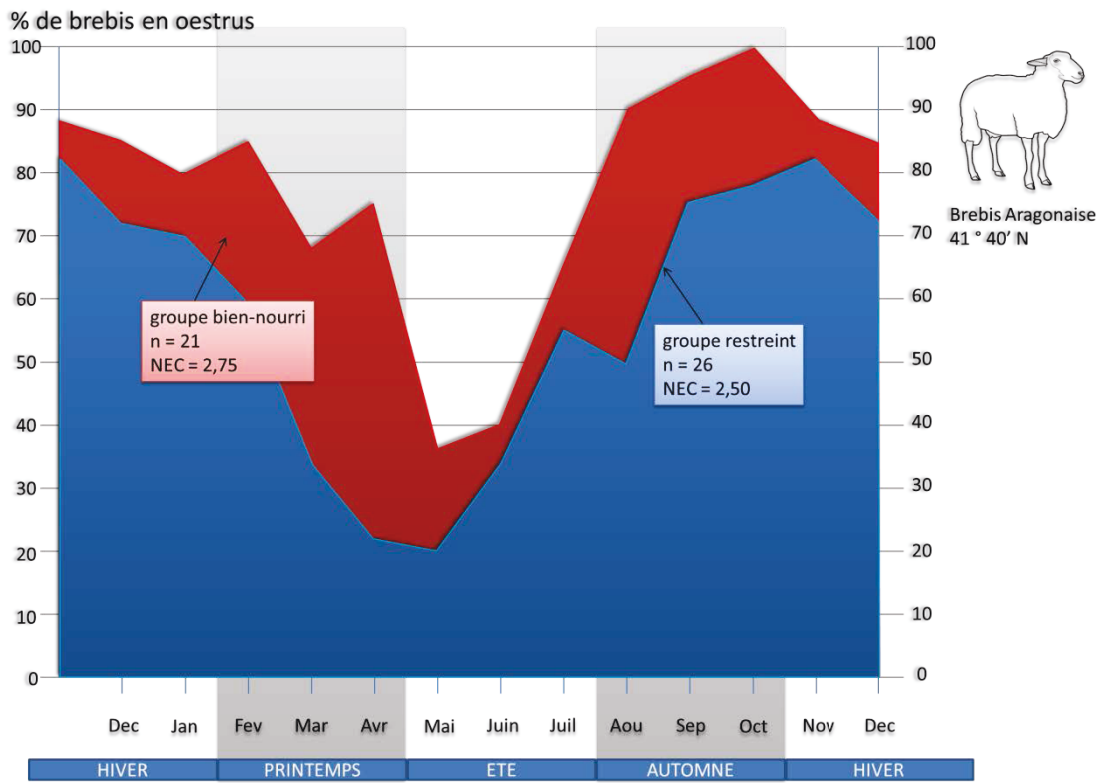
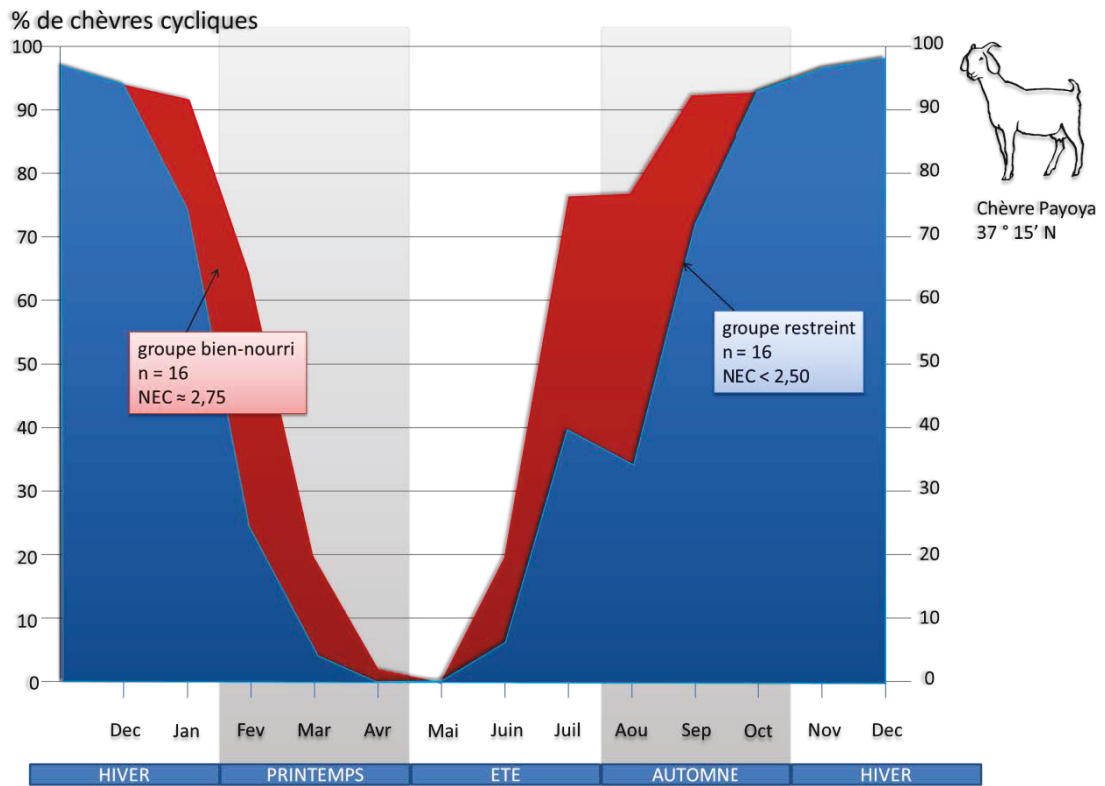


Figure 21 Les effets aigus, dynamiques et statiques de la nutrition : effets d'une supplémentation énergétique sur le taux d'ovulation (axe des ordonnées de gauche) et le poids vif (axe des ordonnées de droite) des ovins (d'après Scaramuzzi *et al.*, 2006).

A



B



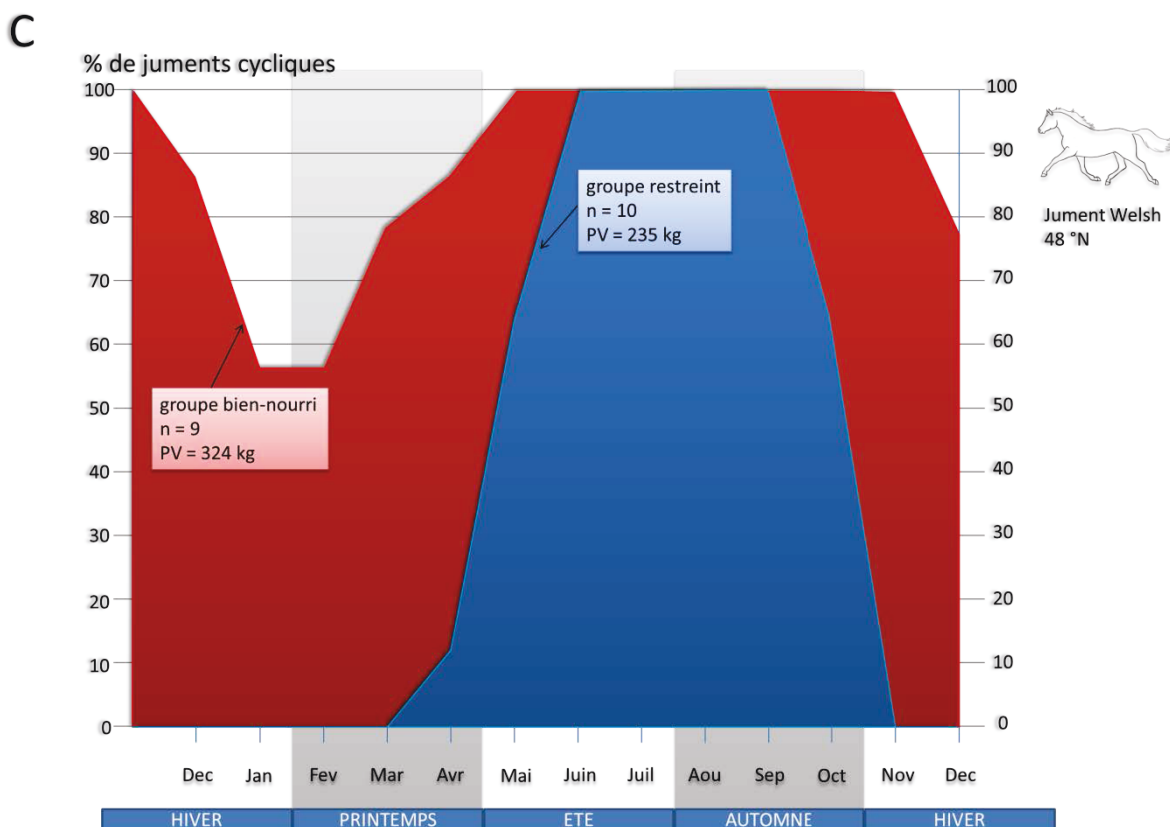


Figure 22 Les effets statiques de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction des deux espèces saisonnées de jours courts (A : brebis et B : chèvre) et d'une espèce de jours longs (C : jument). Les principaux effets d'un faible état d'engraissement en comparaison à un état d'engraissement supérieur sont :

- A. Un rallongement de la durée de la saison d'anœstrus de 49 jours ($p < 0,05$) ainsi qu'une chute du pourcentage de brebis détectées en œstrus aux périodes de transitions saisonnières reproductives (Avril : 74 vs. 34 % et Juillet : 92 vs. 50 % ; $ps < 0,01$) (Forcada *et al.*, 1992).
- B. Un rallongement de la durée de la saison d'inactivité ovarienne de 32 jours ($p < 0,01$) provoqué par une mise en place retardée (5-Août vs. 17-Août ; $p < 0,05$) et une fin précoce (11-Fév vs. 17-Jan ; $p < 0,01$) de la saison d'activité ovarienne (Zarazaga *et al.*, 2005).
- C. Une saison d'inactivité ovarienne généralisée à l'ensemble du groupe (100 % vs. 44 %) et rallongée de 148 jours ($p < 0,001$). La reprise et la fin de la saison d'inactivité ovarienne étaient respectivement avancées (31-Déc vs. 22-Sep ; $p < 0,01$) et retardées (28-Mars vs. 15-Mai ; $p < 0,001$). Entre les deux groupes la date de mi-saison restait inchangée (6-Fév ; $p > 0,05$) (Salazar-Ortiz *et al.*, 2011).

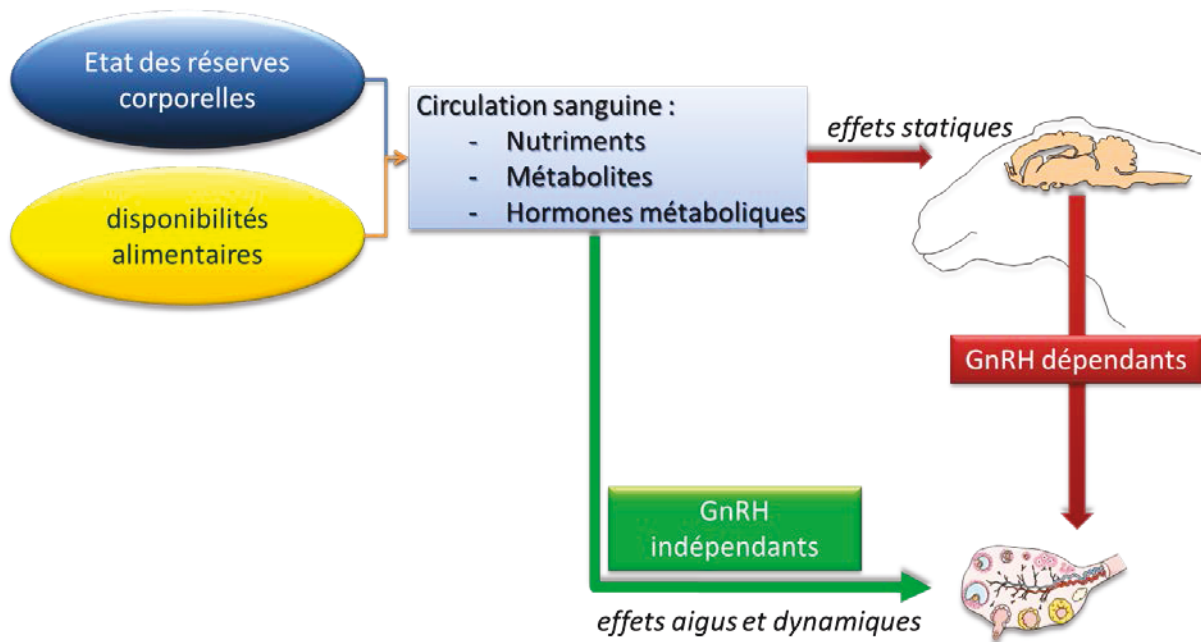


Figure 23 La transmission des effets de la nutrition sur l'activité gonadique des ovins (d'après Blache *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2010).

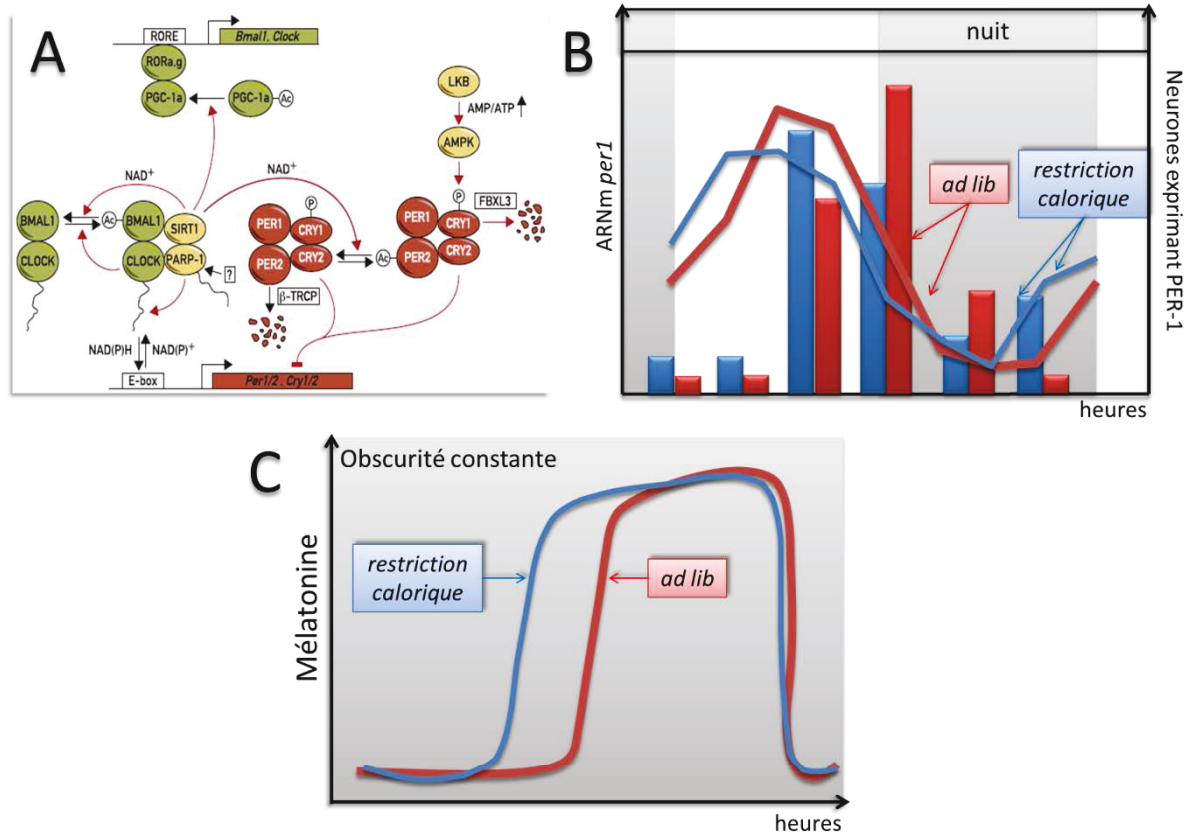


Figure 24 Les effets d'une restriction calorique sur le fonctionnement de l'horloge circadienne principale.

- Les interactions entre régulateurs métaboliques (en jaune) et la machinerie circadienne (en jaune et rouge : éléments de la boucle transcriptionnelle positive et négative respectivement). L'AMPK, enzyme de régulation du métabolisme cellulaire, affecte directement la stabilité des protéines CRY (active les protéines FBXL3 et β-TRCP, membres du complexe de l'ubiquitine ligase) et indirectement celle de PER2 via la CK1ε. Les protéines SIRT1 et PARG-1 sont des senseurs des niveaux de NAD⁺ (indicateur du statut redox cellulaire), l'activation de SIRT1 affecte la stabilité de PER2 et BMAL1 (via PGC-1α) tandis que les mécanismes d'action de PARG-1, notamment sur les protéines CLOCK, restent à déterminer (Asher et Schibler, 2011).
- Un régime hypocalorique provoque des avances de phase des profils circadiens des ARNm du gène *per1* (lignes) et des neurones immunoréactifs à la protéine PER1 (histogrammes) dans les NSC de souris (Mendoza, 2007).
- Profils du rythme circadien du contenu pinéalien en mélatonine chez des souris nourries ad-libitum (en rouge, n = 3 par point) ou subissant une restriction calorique (en bleu, n = 4 par point). Le principal effet de la restriction calorique consiste en une avance de phase de ce rythme (Mendoza *et al.*, 2005).

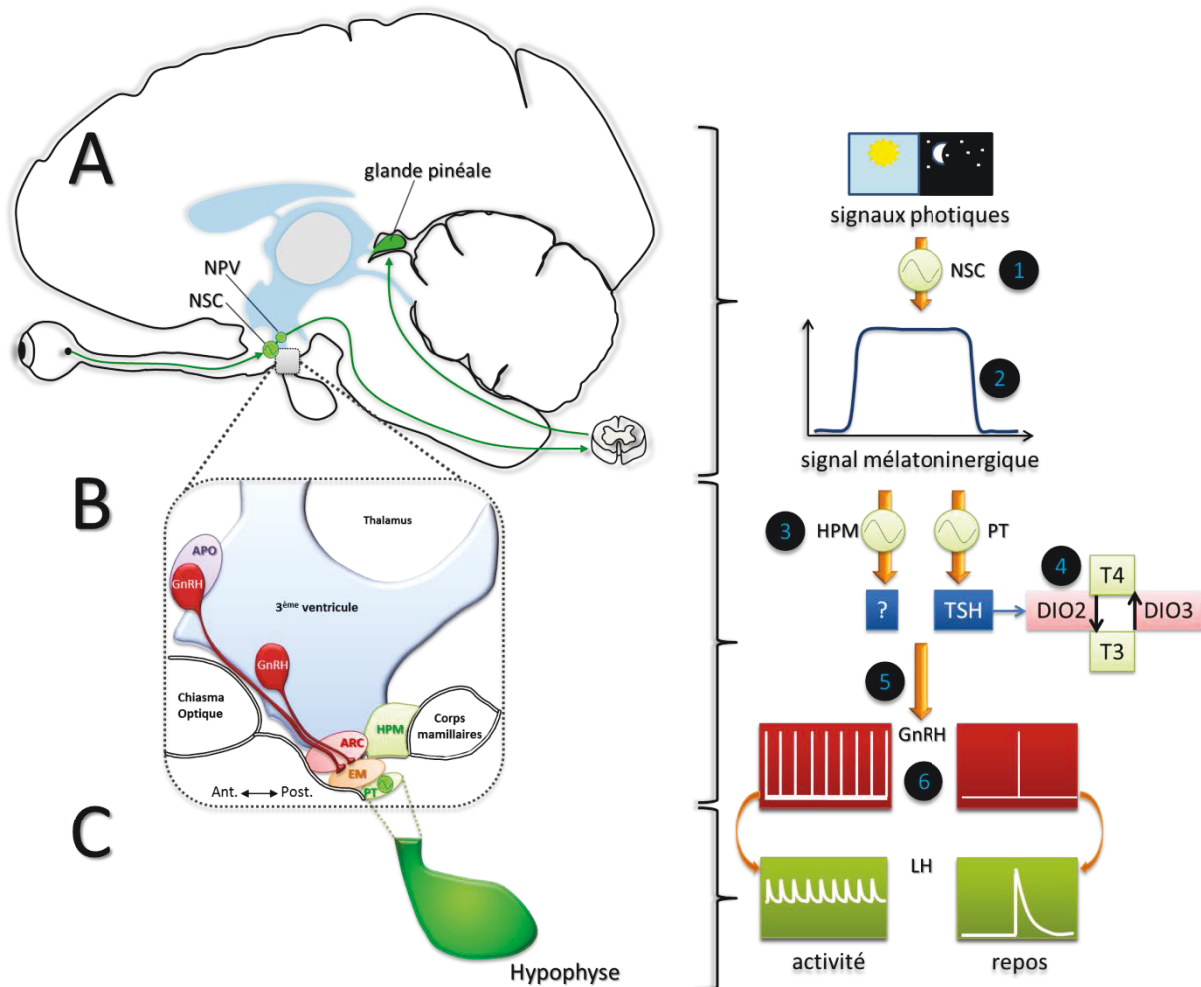


Figure 25 Mécanismes neuroendocriniens impliqués dans le contrôle saisonnier de l'axe hypothalamo-hypophysaire et interactions identifiées ou probables avec la nutrition. Sont distinguables trois principaux compartiments où le facteur nutrition est susceptible d'interagir pour moduler la transmission du signal :

- A. Sur la génération du signal mélatoninergique.
- B. Sur les cellules cibles de la mélatonine intégrant, interprétant (PTM) et transmettant le signal pour contrôler l'activité des neurones à GnRH.
- C. Sur l'activité neurosécrétoire de l'hypophyse (effets restant à déterminer).

La partie de gauche illustre les sites centraux et hypophysaires impliqués dans la transmission du signal saisonnier tandis que la partie de droite schématise la nature de la transmission du signal, de la perception de la lumière aux variations d'activité du couple GnRH/LH. Les différents points d'interactions entre cette transmission du signal avec les signaux nutritionnels, hormonaux et métaboliques liés à l'état d'engraissement de l'individu sont figurés par des ronds noirs dont les chiffres (de 1 à 6) renvoient au texte du manuscrit. Les flèches pleines indiquent des étapes de transmission du signal par voie nerveuse.

Objectifs du travail de thèse

Notre revue bibliographique a permis de souligner un certain manque de données concernant les effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction chez la brebis. De manière plus générale en considérant l'ensemble des espèces à reproduction saisonnée, peu d'informations sont disponibles à propos des sites et des mécanismes impliqués dans la transmission des effets du statut nutritionnel sur le contrôle photopériodique de l'activité de l'axe reproducteur.

En conséquence les études expérimentales engagées au cours de ces travaux de thèses se sont articulées autour d'un protocole alimentaire commun afin d'identifier :

- i) d'une part les interactions entre les effets statiques de la nutrition et la voie photopériodique du contrôle de l'axe reproducteur de la brebis
- ii) et d'autre part les effets de cette interaction sur la réponse à des signaux permettant de stimuler une transition reproductive précoce chez des brebis en anœstrus vers la saison de reproduction.

L'objectif de ces travaux consistait donc à améliorer nos connaissances des paramètres de contrôle de la saisonnalité de la reproduction chez les ruminants en vue de maîtriser ce caractère par l'intervention du facteur nutrition. Répondre à cet objectif participerait à définir l'importance du « levier nutrition » dans la gestion de la reproduction des élevages de petits ruminants et de façon plus large à alimenter des modèles prédictifs multicritères (économiques, techniques, environnementaux, ...) de l'expression phénotypique de ces espèces.

La première partie de nos travaux est donc consacrée à la caractérisation des effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction de la brebis. Le programme alimentaire mis en œuvre visait à obtenir deux groupes d'animaux ayant des états d'engraissement contrastés et maintenus sur le long terme. En conséquence les effets du statut nutritionnel correspondaient au suivi des effets dits statiques de la nutrition sur la saisonnalité de la reproduction des brebis. Ces suivis ont concerné deux races ovines de différents degrés de

saisonnalité afin d'identifier d'éventuels effets génétiques dans les modalités de cette interaction entre facteurs photopériodique et nutritionnel. La réalisation de ces suivis devait permettre de déterminer si les effets statiques de la nutrition affectaient la génération et/ou l'expression du rythme reproductif saisonnier.

Dans la deuxième partie nous avons émis et testé l'hypothèse selon laquelle certains des effets de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction étaient transmis en amont de l'axe d'intégration du signal photopériodique contrôlant l'activité des neurones à GnRH au niveau de l'horloge circadienne principale des NSC. Cette hypothèse a été testée en observant indirectement le fonctionnement de l'horloge circadienne principale via le suivi du rythme endogène de sécrétion de mélatonine et selon deux conditions, d'une part il s'agissait d'identifier les effets de l'état d'engraissement des animaux et d'autre part de vérifier si ces effets pouvaient être mimés par l'activation centrale et pharmacologique de la voie AMPK.

Enfin les objectifs de la troisième et dernière partie consistaient à identifier l'amplitude de la variabilité imputable aux effets du statut nutritionnel dans la réponse des brebis à un traitement (implants de mélatonine ou effet mâle) visant à contrôler les profils saisonniers de reproduction. L'origine de cette variabilité était ensuite analysée en fonction des résultats des deux premières parties.

Première partie

Établir les effets de l'interaction entre facteurs nutritionnel et photopériodique sur les profils saisonniers de reproduction des brebis

La première partie de ces travaux de thèse a été consacrée à la mise en évidence des effets statiques de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction des ovins. L'objectif ultime de ces études consistait en la caractérisation de ces effets afin de :

- i) Les comparer avec les données bibliographiques existantes chez les ovins et autres espèces de mammifères disposant d'un mécanisme de mesure du temps photopériodique comparable.
- ii) Identifier des sites d'interaction probables ainsi que des contraintes zootechniques apparentes en vue de les exploiter dans la suite de nos expérimentations (deuxième et troisième parties du manuscrit).

Chez les ovins relativement peu d'études ont contribué à la détermination des effets de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction. Selon notre revue bibliographique, chez l'ensemble des espèces étudiées (essentiellement ovins, caprins et équins), le statut nutritionnel agit pour modifier le moment d'une ou des deux transitions saisonnières entre états reproductifs. D'un autre côté est observé plus de variabilité quant aux effets de la nutrition sur l'activité de l'axe gonadotrope. Tandis que l'activité sécrétoire de l'hypophyse est plus ou moins affectée, au niveau ovarien la séquence des événements endocriniens et physiologiques conduisant à l'ovulation peut être modulée mais rarement interrompue.

I. Caractériser les effets de l'interaction entre facteurs photopériodique et nutritionnel chez la brebis Île-de-France : observations sur plusieurs cycles photopériodiques, identification du niveau des interactions

Pour l'ensemble de nos études les effets du statut nutritionnel ont été étudiés par le maintien à long terme de groupes d'animaux à des états d'engraissements contrastés : tandis qu'un premier lot de brebis était maintenu dans des conditions d'élevage standard (objectif de NEC de 3,00), un second lot subissait une restriction alimentaire énergétique pilotée par la mesure régulière de la NEC des animaux en vue d'atteindre puis de maintenir un faible état d'engraissement (objectif de NEC de 1,50). La restriction alimentaire s'effectuait en limitant les quantités d'un même aliment complet offert à chaque groupe nutritionnel. Les animaux étaient suivis individuellement afin de contrôler le processus de perte d'état corporel (**Annexe 2**). En parallèle la réponse reproductive des animaux était suivie et comparée entre ces deux groupes. Ce protocole expérimental a été standardisé, principalement du point de vue des conditions d'élevage et des interventions sur les animaux, afin de constituer une base commune à l'ensemble de nos expérimentations.

Dans cette première étude 31 brebis ont été utilisées (19 bien nourries et 12 restreintes). Les objectifs de cette étude consistaient dans un premier temps à identifier et caractériser les effets de l'état d'engraissement, représenté par les objectifs de NEC que nous avons fixés pour chaque groupe, sur les profils saisonniers d'activité ovarienne des brebis. Dans un second temps il s'agissait de vérifier si la magnitude de ces effets pouvait être résumée à une interaction centrale entre facteurs nutritionnel et photopériodique.

La pertinence de la notation de l'état corporel pour rendre compte de l'état d'engraissement des brebis a été préalablement vérifiée par la mesure échographique au niveau de la zone de palpations (dernières vertèbres lombaires) de l'épaisseur de gras sous-cutané. Dans un premier temps c'est la méthode de mesures par échographie de l'épaisseur de gras sous-cutané qui a elle-même été vérifiée en confrontant, chez 4 brebis destinées à l'abattage, la mesure échographique réalisée *in vivo* et la mesure *post mortem* directe de l'épaisseur de la couche de gras sous-cutané (**Tableau 1**). La validation de cette méthode a permis dans un second temps la comparaison nos notations d'état corporel avec la mesure échographique de l'épaisseur de gras sous-cutané réalisée sur chacune des 31 brebis et à 5 reprises en début d'expérimentation (**Figure 26**).

Au cours des deux premières années de suivi les brebis étaient soumises à un cycle photopériodique contrôlé et reproduisant les variations annuelles telles qu'enregistrées à la latitude de la station expérimentale (48°N). La première année était entièrement consacrée au suivi des profils saisonniers d'activité ovarienne. A la fin de cette période la moitié des brebis de chaque groupe a été ovariectomisée. Au cours de la seconde année alors que les profils saisonniers d'activité ovarienne étaient toujours suivis chez les brebis laissées intactes, en parallèle les profils saisonniers d'activité neuroendocrinienne (sécrétion de LH) étaient suivis chez les animaux ovariectomisés.

Lors d'une année supplémentaire à l'approche du solstice d'été (11-Mai), les brebis ovariectomisées étaient soumises à une transition photopériodique abrupte vers des jours courts (8h:16h) afin de stimuler une reprise d'activité neuroendocrinienne.

En parallèle de ces suivis des activités de reproduction, un suivi des concentrations plasmatiques à jeun de glucose et d'insuline était réalisé au cours des deux premières années de l'expérimentation. Au cours de l'année supplémentaire, seules les concentrations plasmatiques d'insuline étaient suivies.

1. Résultats

La forte corrélation entre les mesures échographiques de l'épaisseur de gras sous-cutané et la NEC attribuée a permis de valider cette dernière mesure comme représentative de l'état d'engraissement des animaux (**Figure 26**).

Au cours des deux premières années d'expérimentation, les résultats du suivi des profils d'activité ovarienne et neuroendocrinienne ont révélé des caractéristiques similaires. Ainsi l'instauration d'une activité reproductive généralisée à l'ensemble des animaux de chaque groupe nutritionnel était observée (à l'exception d'une brebis restreinte n'ayant pas exprimé d'activité ovarienne lors de la première année de suivi). De plus la durée de la saison de reproduction des brebis restreintes était significativement plus courte en comparaison de celle des brebis bien nourries ($p < 0,01$). Cet effet d'un faible état d'engraissement était équitablement réparti entre chaque transition saisonnière reproductive ($p < 0,01$). En conséquence la date de mi-saison de reproduction était similaire entre groupes nutritionnels lors de ces deux années de suivi.

Lors de la seconde année à quelques jours du solstice d'hiver (11-Déc), la détermination des paramètres de la sécrétion pulsatile de LH a mis en évidence un effet d'un faible état d'engraissement sur une diminution de l'amplitude des pulses de LH ($p < 0,05$) ainsi que sur la chute des concentrations plasmatiques moyennes de LH ($p < 0,001$) en comparaison des brebis maintenues à un état d'engraissement moyen.

Enfin au cours de l'année de suivi supplémentaire, la réponse des brebis au traitement photopériodique stimulateur en fonction de leur état d'engraissement présentait des caractéristiques similaires aux réponses reproductives suivies sous photopériode « naturelle ». Ainsi un faible état d'engraissement provoquait une reprise retardée de la période d'activité neuroendocrinienne ($p < 0,001$) et une fin précoce ($p < 0,01$). En conséquence la période d'activité neuroendocrinienne était plus courte ($p < 0,001$) chez ces brebis en comparaison de celle des brebis maintenues à un état d'engraissement moyen.

Concernant les paramètres métaboliques et hormonaux liés à l'état d'engraissement des animaux, les effets du statut nutritionnel sur les concentrations plasmatiques de glucose ont varié en fonction des années. Lors de la première année de suivi elles étaient plus importantes chez les brebis maintenues à un faible état d'engraissement ($p < 0,05$) en comparaison aux brebis maintenues à un état d'engraissement moyen. Cet effet c'est inversé lors de la seconde année ($p < 0,05$). Les effets du statut nutritionnel sur les concentrations plasmatiques d'insuline sont restées consistants entre les différentes années de suivi, c'est-à-dire qu'elles étaient plus faibles chez les brebis maintenues à un faible état d'engraissement en comparaison aux brebis maintenues à un état d'engraissement moyen (année 1 : $p < 0,05$; année 2 : $p < 0,001$; année supplémentaire : $p < 0,05$).

2. Conclusion

Les résultats de cette première étude caractérisent le rôle strictement modulateur de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction des ovins. Ainsi les différents signaux liés à l'état d'engraissement agissent pour moduler le moment des transitions saisonnières reproductives sans affecter la synchronisation annuel du rythme reproductif. Parmi ces signaux, les concentrations plasmatiques d'insuline apparaissent être un bon indicateur des effets de l'interaction entre signaux photopériodique et nutritionnel.

Le remarquable parallélisme établi entre profils d'activités ovarienne et neuroendocrinienne suggère que la majorité de ces effets de la nutrition sont intégrés au niveau central pour

altérer le contrôle photopériodique de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire. La réponse reproductive des brebis au traitement photopériodique stimulateur en fonction de leur état d'engraissement semble confirmer cette hypothèse.

Tableau 1 Comparaison de mesures par échographie ou mesure directe *post-mortem* de l'épaisseur de gras sous-cutané au niveau des dernières vertèbres lombaires chez 4 brebis de race Romanov. Les deux mesures étaient significativement corrélées, $r = 0,99$ ($p < 0,05$).

Animal	Mesure échographique (cm)	Mesure post-mortem (cm)
35405	1,50	1,41
35427	1,40	1,38
35434	1,20	1,14
35442	1,00	1,00

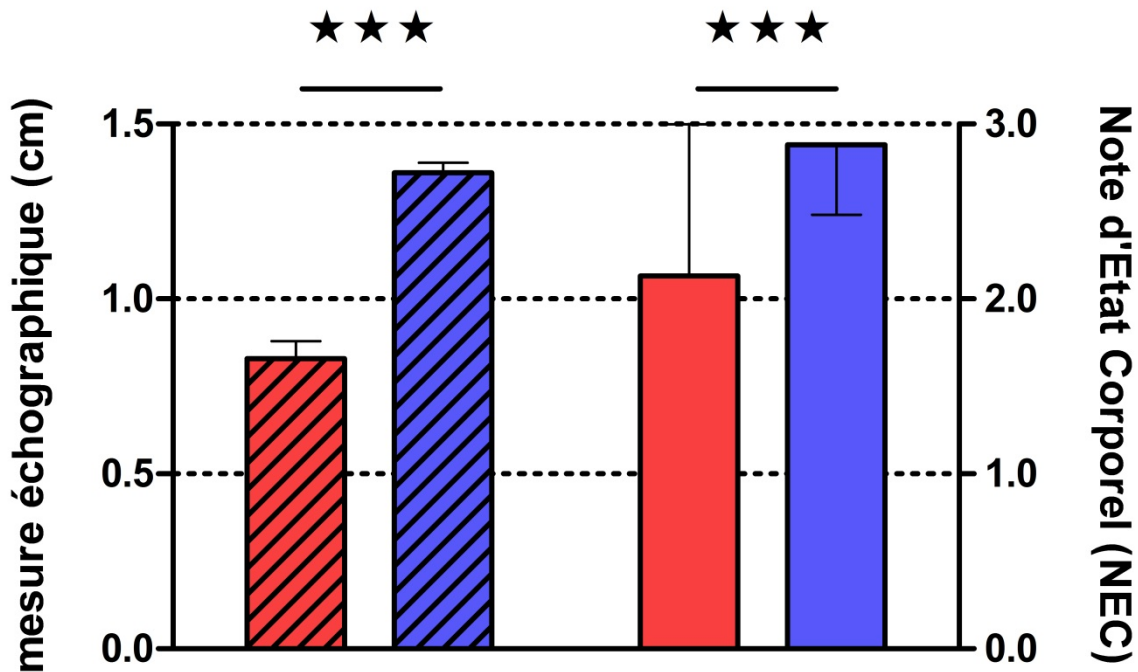


Figure 26 Comparaison d'estimation de l'état d'engraissement par mesure échographique (barres hachurées ; moyenne \pm sem) ou attribution d'une NEC (barres pleines ; médiane \pm interquartile) chez 31 brebis Île-de-France (19 bien nourries en bleu et 12 restreintes en rouge) au début de la première année d'étude (de Janvier à Novembre, chaque barre représente 5 points de mesure par animal). Les résultats des deux méthodes sont significativement corrélés, $r = 0,83$ ($p < 0,001$). *** : différence significative entre les groupes nutritionnels ($p < 0,001$).

The Interaction Between Photoperiod and Nutrition and Its Effects on Seasonal Rhythms of Reproduction in the Ewe¹

Jean-Baptiste Menassol,^{2,3,4,5,6} Armelle Collet,^{3,4,5,6} Didier Chesneau,^{3,4,5,6} Benoît Malpoux,^{3,4,5,6} and Rex J. Scaramuzzi^{3,4,5,6,7}

³INRA, Nouzilly, France

⁴CNRS, Nouzilly, France

⁵Université François Rabelais de Tours, Tours, France

⁶IFCE, Nouzilly, France

⁷Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, Herts, United Kingdom

ABSTRACT

In sheep, the seasonal patterns of reproductive activity are driven primarily by the annual photoperiodic cycle, but can also respond to other environmental factors, such as nutrition, yet little is known about the mechanisms underlying this interaction. This study was designed to define the interaction between photoperiodic and nutritional cues on seasonal patterns of ovarian activity, and to determine if there is a central interaction between these cues. Groups of Ile-de-France ewes were maintained in two nutritional states (restricted and well fed) under a simulated annual photoperiod of 8–16 h of light per day over two breeding seasons. At the end of the first breeding season, half of the animals of each group were ovariectomized (OVX) and fitted subcutaneously with estradiol implants. Low nutritional status shortened the season of ovarian activity, determined from the pattern of progesterone concentrations, by modifying the timing of seasonal transitions between periods of ovarian activity and anestrus. The same results were observed for the seasonal rhythm of neuroendocrine activity, assessed in the OVX ewes, from the pattern of luteinizing hormone concentrations. These results were then confirmed for neuroendocrine activity induced by a photoperiodic treatment. We conclude that nutrition centrally modulates the interpretation of photoperiod to affect seasonal reproductive transitions. The mechanisms of this interaction are discussed in the paper.

hypothalamus, metabolism, nutrition, ovary, photoperiod, seasonal reproduction, sheep

INTRODUCTION

Most mammals from temperate regions that experience seasonal fluctuations in their food supply have evolved patterns of reproduction that restrict their breeding activity to a defined period of the year. This adaptive phenomenon, often referred to as the seasonality of reproduction, ensures that births occur at the most appropriate time of the year, that is, when the quantity

and quality of naturally available feed is sufficient to support the nutritive demands of the mother and her offspring [1].

In temperate latitudes, the principal environmental factor controlling the pattern of seasonal reproductive activity is photoperiod, which synchronizes an endogenous circannual rhythm of reproduction with the time of year [2–4]. Photoperiodic information generated from the light-dark cycle exerts its effects on the hypothalamus-pituitary axis through the rhythmic, diurnal secretion of melatonin by the pineal gland [5]. This rhythm is driven by the circadian pacemaker located in the suprachiasmatic nucleus (SCN) [6], via a multisynaptic pathway. Thus, in the absence of light-dark cycles, the rhythm of melatonin secretion corresponds to that of the endogenous circadian rhythm generated by the SCN [7]. The perception of light both entrains the activity of the circadian pacemaker in the SCN to a period of 24 h and restricts melatonin secretion to periods of darkness [8, 9]. A consequence is the production of an annual rhythm in the pattern of melatonin secretion that functions as the neuroendocrine signal linking the annual rhythm of photoperiod with the reproductive axis [10, 11]. This signal links to the reproductive system at the level of the hypothalamo-pituitary axis, modifying its neuroendocrine activity in response to the negative-feedback action of estradiol [12].

The seasonal pattern of reproduction is the result of the integration of several secondary environmental stimuli that interact dynamically with the primary photoperiodic signal, and, as a consequence, they are considered as “modulators” of the primary photoperiodic signal [13]. Nutrition, acting through numerous hormonal signals (insulin, leptin, growth hormone, etc.) that reflect long-term changes in metabolic status, is one of the most significant of the secondary modulating factors [13]. Interactions between photoperiodic and nutritional factors on the seasonal pattern of ovarian activity have recently been established for the mare [14] and the doe [15], as examples of long-day (LD) and short-day (SD) breeding species, respectively. These studies were descriptive, and at this point there is little available evidence that establishes either the level or the mechanism of the interaction between these two factors.

In this study, we have used a sheep model to investigate the interactions between photoperiodic and nutritional factors on the pattern of ovarian activity in the ewe. This was achieved by maintaining two groups of ewes in different metabolic states (i.e., well fed and restricted) over a long period, and monitoring their patterns of reproductive seasonality over two breeding and nonbreeding seasons. Because we hypothesized, on the basis of previous studies [16], that the effects on ovarian activity were centrally mediated, we also monitored the seasonal transitions in luteinizing hormone (LH) secretion

¹R.J.S. was the recipient of European Union Marie Curie Chair of Excellence grant MEXC-CT-2006-042499 and J.B.M. was the recipient of a Ph.D. grant from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

²Correspondence: Jean-Baptiste Menassol, INRA, Centre de Tours UMR PRC, 37380 Nouzilly, France. E-mail: jbmenssol@gmail.com

Received: 17 May 2011.

First decision: 28 June 2011.

Accepted: 24 October 2011.

© 2012 by the Society for the Study of Reproduction, Inc.

eISSN: 1529-7268 <http://www.biolreprod.org>

ISSN: 0006-3363

under natural photoperiodic conditions in the same ewes following ovariectomy and estradiol replacement treatment. Finally, in the ovariectomized (OVX), estradiol-treated sheep, the neuroendocrine activity of the hypothalamo-hypophysial axis was also artificially driven by a transfer from LD to SD. This well-defined model of photoperiodic response [17, 18] was used to firmly distinguish the specific effects of nutrition. Along with the monitoring of the seasonal patterns of progesterone and LH secretion, we also estimated the metabolic state of the ewes by monitoring serum concentrations of glucose and insulin.

MATERIALS AND METHODS

All procedures were approved by the French Agricultural and Scientific Research Agencies for Animal Ethics, and were all conducted in accordance with European Union guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

General

A total of 37 sexually mature Ile-de-France ewes from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) breeding flock were assigned to two groups balanced for live weight (LW), body condition score (BCS), and age, and housed in one of four light-controlled rooms starting 1 mo prior to the beginning of the feeding program. Each room of 21 m² housed between five and nine animals as a single group, and the animals were free to interact with each other. The lighting program mimicked the local ambient photoperiod (48°N), and was operated by fluorescent lighting that provided at least 300 lux at head level and total darkness at night. Contacts with rams and bucks or their odors (e.g., on clothing) were rigorously avoided during the study, and social interactions among ewes were limited to ewes of the same treatment group, because they are factors known to modify the seasonal patterns of reproduction [19].

Diets and Nutritional Management

The ewes were weighed (LW) and their BCS recorded regularly; BCS was determined using a scale of 0 (emaciated) to 5 (grossly obese) [20]. The feeding system in each room was designed to provide individual access to feeders, thus limiting competition for access to feed and variations in feed consumption.

During the pre-experimental period, which lasted 17 wk, the ewes were acclimated to their new feeding system for 3 wk and then fed individual diets designed to produce the two experimental groups, with target median BCSs of 1.5 (restricted [R] group) and 3.0 (well-fed [WF] group). The diet consisted of a single feed made from pelleted, dehydrated lucerne, straw, and sugar cane treacle with nutritional values of 0.97 Mcal of net energy and 63.6 g of metabolizable protein per kilogram of dry matter. The diet was designed using the INRA recommendations for the growth and maintenance needs of adult, nonpregnant ewes [21]. The quantity of the diet offered was adjusted to the mean LW of the animals in each room. Therefore, the ewes of the R group were fed at 40%–55% of their energy maintenance needs (0.73 ± 0.11 kg of feed per animal), which corresponded to an average daily intake of 0.60 ± 0.07 Mcal of net energy and 39.3 ± 4.4 g of metabolizable protein, and the ewes in the WF group were fed at 85%–140% of their energy maintenance needs (1.72 ± 0.42 kg of feed per animal), which corresponded to an average daily intake of 1.42 ± 0.24 Mcal of net energy and 93.0 ± 16.1 g of metabolizable protein. The diets were designed to have a reduced impact on protein requirements, and the daily protein intake averaged 70% of requirements for the ewes in the R group during this period. At 1 mo after the start of the feeding program, the initial number of ewes was reduced to 31, since 6 ewes in the R group reached one of the humane endpoints defined for this experiment (i.e., an LW loss higher than 30% of the initial LW and/or a loss of more than 1 unit of BCS between two records).

Once the target BCSs were reached, the experimental period began and the groups were fed the diet at a level designed to maintain the desired nutritional status of the animals over a long period. For the R group, the diet provided, on average, 80% of the animals' maintenance needs for energy, as determined at the end of the pre-experimental period (1.04 ± 0.10 kg of feed per animal); that is to say, a daily intake of 0.86 ± 0.06 Mcal of net energy and 56.2 ± 3.8 g of metabolizable protein. This diet provided 116% of the daily protein needs of these animals. For the WF group, the maintenance diet provided, on average, 120% of the animals maintenance needs for energy, as determined at the end of the pre-experimental period (1.77 ± 0.15 kg of feed per animal), which is a daily intake of 1.45 ± 0.09 Mcal of net energy and 95.4 ± 3.8 g of

metabolizable protein. These data represent the overall average intake, since the diet was consistently readjusted to maintain the desired median BCS of the group. During winter, for example, feed intake was increased to account for low temperatures [21]. Feed was offered once a day, in the morning, and ewes had free access to water and mineral licks to provide essential micronutrients.

Experimental Design

Year 1. Ovarian activity was monitored in ewes from the WF ($n = 19$) and R ($n = 12$) groups by determining the concentration of progesterone in samples of jugular venous blood collected twice a week for the duration of the study. The same samples were used to monitor insulin. Glucose concentrations were monitored by determining the concentration of glucose in an additional sample of jugular venous blood collected weekly immediately before feeding.

Year 2. After the end of the breeding season in Year 1 (12 mo into the experimental period), half of the animals from each group were OVX and fitted subcutaneously with implants containing 17 β -estradiol (E₂; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The implants consisted of sealed 10-mm lengths of silastic tubing (3.3 mm i.d., 4.6 mm o.d.; Dow Corning, USA). The experiment now comprised four groups as follows: WF ($n = 10$), WF-OVX ($n = 9$), R ($n = 5$), and R-OVX ($n = 7$). The ewes continued to be monitored for ovarian activity, insulin secretion, and glucose levels as described for Year 1, while the OVX groups were also monitored for LH secretion by measuring the concentration of LH in twice-weekly samples of jugular venous blood. In the OVX groups, the frequency and other characteristics of pulsatile LH secretion were determined near the winter solstice, when both groups had elevated concentrations of plasma LH.

Year 3. At 2 mo after the end of the breeding season (May) in Year 2 (25 mo into the experimental period) when the ewes were experiencing long days (15L:9D), the OVX groups were abruptly switched to short days (8L:16D), a treatment known to stimulate LH secretion in anoestrus ewes within 45–60 days [22]. After transition to short days, LH concentrations were measured from Day 0 to Day 40 in twice-weekly samples, from Days 40 to 110 in thrice-weekly samples, and from Day 110 to the end of the experiment in twice-weekly samples. Insulin concentrations were measured as described for Year 2.

Blood Sampling and Assays

Blood samples (3 ml), taken by jugular venipuncture, were used to determine the concentrations of progesterone, LH, and insulin. They were always collected before feeding and placed in heparinized tubes (17 IU/ml sodium heparin, Vacutainer; Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ). Glucose was monitored in the same way, but the blood was placed in tubes containing inhibitors of glycolysis (2.5 mg/ml sodium fluoride and 2 mg/ml potassium oxalate, Vacutainer). After sampling, the plasma was separated by centrifugation ($3700 \times g$ for 30 min at 4°C) and stored at -20°C . For periods of more frequent sampling (i.e., for monitoring LH pulsatility), blood (2.5 ml) was collected via an indwelling jugular catheter, placed in tubes containing 100 IU heparin, and managed as described above.

Progesterone. Progesterone was assayed in singlicate measures of 10 μl of plasma using a double antibody ELISA [23]. The sensitivity of the assay averaged 0.25 ± 0.09 ng/ml (16 assays), the intra-assay coefficient of variation (CV) was 7% (16 assays), and inter-assay CV was 9%.

Luteinizing hormone. The concentration of LH was assayed in singlicate measures of 20 μl samples of plasma using a double antibody ELISA immunoassay [24]. The sensitivity of the assay averaged 0.10 ± 0.01 ng/ml (four assays), the intra-assay CV was 7% (four assays), and interassay CV was 7%.

The pulsatility of LH secretion was monitored in the OVX, estradiol-treated groups by measuring the concentrations of LH in plasma samples collected every 15 min for 6 h from 1000 to 1600 h. The concentrations of LH were determined in duplicate 100- μl samples of plasma in a single assay using a radioimmunoassay [25]. The sensitivity of the assay averaged 0.10 ± 0.02 ng/ml and the intra-assay CV was 4%.

Glucose. Glucose levels were determined in singlicate measures (50 μl samples) using a standard glucose enzymatic assay kit (GAGO20; Sigma-Aldrich). The sensitivity of the assay averaged 0.020 ± 0.003 mg/ml and the intra-assay CV was 3%.

Insulin. The concentrations of insulin were determined in duplicate 100- μl samples of plasma in a single assay using a radioimmunoassay developed in our laboratory. A commercial antibody to porcine insulin raised in guinea pig (Sigma, St. Louis, MO) was used as the primary antibody, and the secondary antibody was an anti-guinea pig IgG raised in horses. Porcine insulin was iodinated by the chloramine T method [26]. The assay buffer was 0.025 M barbital buffer (0.01% diethylbarbiturate, 0.05% sodium diethylbarbiturate) containing bovine serum albumin (3%; Sigma). Plasma samples were incubated (24 h at 4°C) with the primary antibody (300 μl ; final dilution, 1:80 000), Triton

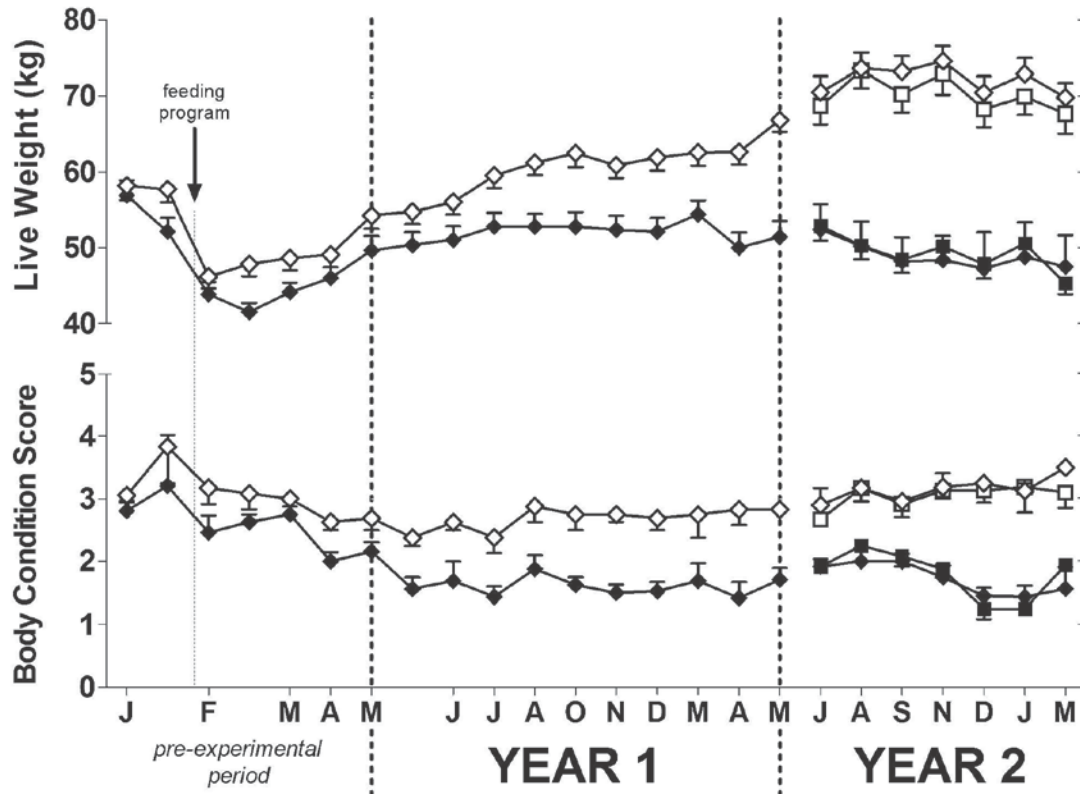


FIG. 1. The pattern over two breeding seasons of LW and BCS in WF and R groups of ewes, housed in light-controlled rooms that simulated the ambient photoperiod of 16L:8D at the summer solstice and 8L:16D at the winter solstice. Two groups of ewes, WF (\diamond [n = 19]) and R (\blacklozenge [n = 12]), were monitored during the pre-experimental period and Year 1, then each group was divided into an OVX (WF-OVX, \square [n = 9] and R-OVX, \blacksquare [n = 7]) and intact (WF, \diamond [n = 10] and R, \blacklozenge [n = 5]) groups for Year 2. Upper panel, mean \pm SEM LW; lower panel, median \pm interquartile range of BCS. The LW and BCS were assessed twice a month at the beginning of the pre-experimental period, then once every 2 mo. The arrow indicates the time of the beginning of the feeding program. The x axis indicates sidereal months.

X-100 (final dilution, 1:1000; Sigma), and normal rabbit serum (final dilution, 1:1250). Samples were then incubated (24 h) with 20000 cpm of iodinated porcine insulin (200 μ l). The secondary antibody was added (2 ml; final dilution, 1:333), with CaCl_2 (36 mmol/L) and polyethylene glycol (4 mmol/L) as precipitating factors, and incubated for 48 h at 4°C. Tubes were then centrifuged (3000 \times g for 30 min at 4°C), the supernatant was removed, and the radioactivity in the precipitate was counted with a Wallac Wizard gamma counter (PerkinElmer Inc., Waltham, MA) for 1 min. Assay sensitivity averaged 1.59 \pm 0.11 ng/ml. Intra-assay CV was 12%.

Estradiol. The concentrations of estradiol were determined in plasma samples collected twice weekly during the month following ovariectomy, in a single assay, using the ^{125}I E2 Diasorin RIA kit (Estradiol-2 kit P2210; Diasorin SA, Antony, France), modified for the analysis of estradiol in ovine plasma [27]. The sensitivity of the assay averaged 0.78 \pm 0.06 pg/ml and the intra-assay CV was 6%.

Methods Used to Calculate End Points

Ovarian activity. An animal was considered cyclic if the plasma concentration of progesterone was above 1 ng/ml in at least two consecutive samples, suggesting the presence of a functional corpus luteum [28]. The period of ovarian activity (breeding season) was defined for each animal as the time elapsed between the start of ovarian cyclicality in the autumn and the last plasma samples with a concentration of progesterone above 1 ng/ml, and that was followed by at least four consecutive samples in which the concentration of plasma progesterone was below 1 ng/ml. Using these data, we calculated, for each ewe, the dates of the start and end of the breeding season, as well as the duration of the breeding season and its midpoint.

Reproductive neuroendocrine activity. In OVX, estradiol-treated ewes, periods of LH secretion above 1 ng/ml were considered analogous with the breeding season of intact ewes [15, 17]. Similarly, we have defined, for each OVX, estradiol-treated animal, the period of reproductive neuroendocrine activity as the period between the first plasma sample with a concentration of LH above 1 ng/ml and the last plasma sample with a concentration of LH above 1 ng/ml that was followed by at least four plasma samples with a concentration of LH below 1 ng/ml. Using these data, we calculated, for each OVX, estradiol-treated ewe, the dates of the start and end of the period of reproductive neuroendocrine activity, as well as its duration and its midpoint.

LH pulsatility. The concentrations of LH were analyzed for pulses using the Munro algorithm (Zaristow Software, West Morham, Haddington, East Lothian, U.K.), a modified version of the Pulsar algorithm [29]. The G parameters G1–G5 were set at 3.98, 2.40, 1.68, 1.24, and 0.93, respectively, and the Baxter parameters B1–B3 were 0.055, 0.025, and 0.00039, respectively [30]. Thus, we calculated the pulse frequency, the mean pulse amplitude, and the mean concentration of LH for each profile.

Statistical Analysis

Data are presented as the mean \pm SEM, except for BCS data, which are presented as medians \pm interquartile ranges. All analyses were performed using SPSS statistical analysis software (SPSS Inc., IBM). Correlations between variables were measured using the Pearson correlation and presented as the Pearson product-moment correlation coefficient (r). Data were analyzed using either a one-way or a two-way ANOVA; post hoc paired comparisons were carried out, where appropriate, using the Bonferroni correction. Data that were not normally distributed were analyzed using the nonparametric Kruskal-

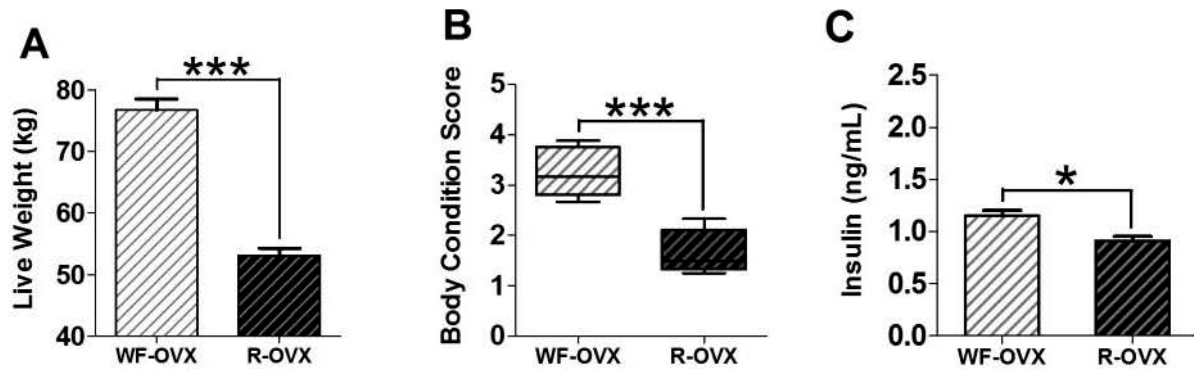


FIG. 2. The nutritional status of the ewes in the WF-OVX and R-OVX groups monitored during Year 3. Mean \pm SEM LW (kg) (A) and median \pm interquartile range BCS (B) for the ewes in the WF-OVX (white hatched bars [n = 9]) and R-OVX (black hatched bars [n = 7]) groups. The LW and BCS were determined twice at the beginning and the end of Year 3. C) Mean \pm SEM plasma concentrations of insulin, determined twice weekly in Year 3. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

Wallis ANOVA followed by the Mann-Whitney *U*-test for paired comparisons. Differences or correlations were regarded as significant at $P < 0.05$.

RESULTS

BCS and Weight

Year 1. At the start of the pre-experimental period, both groups had similar LW and BCS values (Fig. 1). During this period, the median BCS was higher for the ewes in the WF group compared with those in the R group (3.15 ± 0.08 vs. 2.60 ± 0.10 ; $P < 0.001$), and there was no significant difference in LW between nutritional groups (WF, 51.3 ± 1.5 kg vs. R, 47.4 ± 1.8 ; $P = 0.08$). In both groups, BCS and LW significantly decreased with time ($P < 0.001$); there was a significant interaction between nutritional status and time for LW only ($P < 0.001$), indicating that this decrease was higher for the ewes in the R group. The abrupt drop in LW and BCS observed in both groups after the start of the feeding program (Fig. 1) may be explained by two factors. First, the ewes were shorn right after the dietary transition, causing a direct drop of 4–6 kg in LW, possibly associated with a further loss of LW and BCS due to heat stress. Second, the abrupt transition in the quality of the feed offered required a period of adaptation for the ewes, during which they had a reduced feed intake.

During the experimental period in Year 1, BCS and LW were higher for the ewes in the WF group compared with those in the R group (BCS, 2.69 ± 0.04 vs. 1.67 ± 0.05 ; LW, 60.3 ± 1.5 kg vs. 51.8 ± 1.9 kg; $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively). During this period, there was a significant effect of time on both BCS and LW ($P < 0.001$), and the interaction between time and nutritional status ($P < 0.001$) indicated that BCS and LW increased in the ewes in the WF group, while only BCS decreased in the ewes in the R group (Fig. 1).

Year 2. During Year 2, BCS and LW were significantly higher for the ewes in the WF groups compared with those in the R groups (BCS: WF, 3.08 ± 0.07 and WF-OVX, 3.06 ± 0.08 vs. R, 1.70 ± 0.06 and R-OVX, 1.79 ± 0.05 ; LW: WF, 72.1 ± 2.1 kg and WF-OVX, 70.1 ± 2.2 kg vs. R, 48.5 ± 2.6 kg and R-OVX, 49.3 ± 2.2 kg; $P < 0.001$). During this period, BCS and LW did not differ with ovariectomy, but in each group there were significant variations of BCS and LW with time ($P < 0.001$), and the interaction between time and nutritional status ($P < 0.001$) indicated that BCS and LW significantly decreased in the R groups. Considering reproductive state (OVX or intact), the significant interaction with

time ($P < 0.001$) on median BCS indicated that the ewes in the OVX groups experienced more pronounced variations in BCS during this period (Fig. 1).

Year 3. During Year 3, BCS and LW were higher for the ewes in the WF-OVX group when compared with those in the R-OVX group (both $P < 0.001$; Fig. 2, A and B). During this period, BCS and LW significantly increased with time ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively), and the interaction between time and nutritional status ($P < 0.01$) on the median BCS indicated that this increase was significantly higher for the ewes in the WF-OVX group.

Seasonal Ovarian Activity

Year 1 and Year 2. Within Years 1 and 2 of the study, the effects of dietary treatment on the seasonal patterns of ovarian activity were similar, and, thus, data for both years are presented together. The duration of ovarian activity (Fig. 3) was significantly longer for the WF ewes compared with R ewes (Year 1, 133 ± 5 vs. 63 ± 12 days and Year 2, 176 ± 13 vs. 81 ± 21 days; both $P < 0.01$). This difference was caused by a delayed onset of the breeding season (Year 1, 29 August ± 2 days vs. 8 October ± 10 days and Year 2, 22 August ± 6 days vs. 12 October ± 19 days; both $P < 0.01$) and an earlier end to the breeding season (Year 1, 9 January ± 5 days vs. 10 December ± 10 days and Year 2, 14 February ± 11 days vs. 1 January ± 6 days; both $P < 0.01$) for the ewes in the R group. The two groups had indistinguishable midseason dates (Year 1: WF, 4 November ± 3 days vs. R, 8 November ± 8 days and Year 2: WF, 18 November ± 6 days vs. R, 21 November ± 10 days; both $P > 0.05$). There were no significant differences in the proportion of cycling ewes between nutritional groups (Year 1: WF, 19/19 vs. R, 11/11; Year 2: WF, 10/10 vs. R, 5/5). There was a significant correlation between BCS and LW (Year 1, $r = 0.57$; Year 2, $r = 0.85$; $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). The start and end times of ovarian activity were significantly correlated with BCS (Year 1, $r = -0.69$; $r = 0.42$; $P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively; Year 2, $r = -0.73$ and $r = 0.74$; both $P < 0.01$) and with LW only in Year 2 ($r = -0.81$ and $r = 0.64$; $P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively). Finally, only in Year 2 was there a significant correlation between the dates of the start and end of ovarian activity ($r = -0.54$; $P < 0.05$).

Year 1 vs. Year 2. The periods of ovarian activity were comparable for individual animals between the 2 yr of the

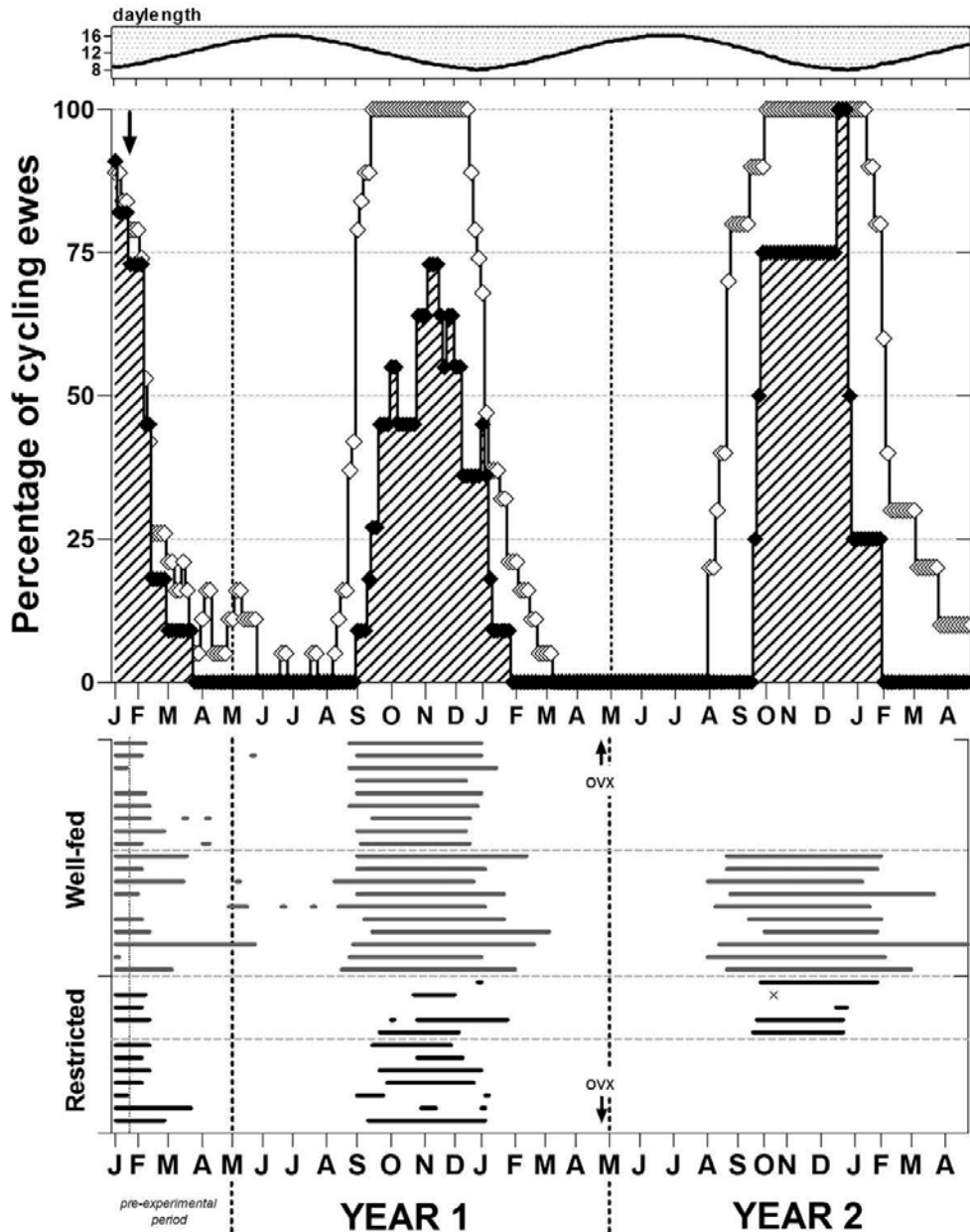


FIG. 3. The seasonal pattern over two breeding seasons of ovarian activity in WF and R groups of ewes, housed in light-controlled rooms that simulated the ambient photoperiod of 16L:8D at the summer solstice and 8L:16D at the winter solstice. Upper panel: the pattern of day length provided by the lighting program during the experimental period and Year 1. Middle panel: percentage of ewes with ovarian activity in the WF (\diamond [n = 19]) and R (\blacklozenge [n = 12]) groups during the pre-experimental period and Year 1. Note that, in Year 2, the number of intact ewes in each group is lower, because half of the ewes in each group were OVX at the end of Year 1 (WF, \diamond [n = 10] and R, \blacklozenge [n = 5]). The arrow indicates the beginning of the feeding program. Lower panel: individual periods of ovarian activity, with each row representing a single animal; periods of ovarian activity are represented by the gray (WF) or black (R) lines. Horizontal dotted lines separate the animals into their two (Year 1) or four (Year 2) experimental groups, and the time of ovariectomy is indicated by the arrows. The cross indicates the time of death for one ewe in the R group.

experiment ($P > 0.05$). There were also no within-group differences for the dates of the start, middle, and end of the period of ovarian activity ($P > 0.05$). During Year 1, three ewes in the R group exhibited erratic patterns of cyclicity; two ewes had a short and delimited period of ovarian activity (for

one ewe, this period did not overlap with the midseason date calculated for the ewes in the R group) before experiencing another ovarian cycle near the winter solstice, and another ewe exhibited only one ovarian cycle near the winter solstice (Fig. 3). Additionally, during Year 1, one ewe in the R group did not

have any ovarian activity, but was retained only in the data set for Figure 2. During Year 2, all of the ewes showed a clear and consistent seasonal pattern of ovarian activity (Fig. 3).

It is noteworthy that the anovulatory ewe in the R group during Year 1 had ovarian activity in Year 2 despite having a similar median BCS (Year 1, 1.63 ± 0.20 ; Year 2, 1.50 ± 0.50 ; $P > 0.05$).

The Pattern of LH Secretion During Seasonal Transitions

At 1 mo after ovariectomy, the WF-OVX and R-OVX groups had circulating concentrations of estradiol that were not significantly different (1.2 ± 0.1 pg/ml and 1.4 ± 0.1 pg/ml, respectively; $P > 0.05$). The presence of the implants was regularly confirmed over the period of the experiment, and none had to be replaced.

There was a difference between groups in the seasonal pattern of LH secretion (Fig. 4), with ewes in the WF-OVX group displaying a longer period of high concentrations of LH (>1.0 ng/ml) compared with ewes of the R-OVX group (188 ± 10 vs. 132 ± 3 days; $P < 0.001$). This difference was caused both by a delay in the onset of neuroendocrine activity (14 August ± 6 days vs. 5 September ± 3 days; $P < 0.01$) and an advance in the end of neuroendocrine activity (19 February ± 8 days vs. 16 January ± 3 days; $P < 0.01$) in the R-OVX group. The two groups had indistinguishable midperiod dates (WF-OVX, 16 November ± 4 days and R-OVX, 10 November ± 2 days; $P > 0.05$), and there were no differences in circulating concentrations of LH between groups during the period of neuroendocrine activity (WF-OVX, 5.1 ± 0.2 ng/ml and R-OVX, 4.5 ± 0.2 ng/ml; $P > 0.05$). BCS and LW of the OVX animals were highly correlated ($r = 0.94$; $P < 0.0001$). The beginning and end of the period of neuroendocrine activity were significantly correlated with BCS ($r = -0.62$ and $r = 0.71$; both $P < 0.01$), but only the end was significantly correlated with LW ($r = 0.76$; $P < 0.001$). There was a significant correlation between the dates of the start and end of the period of neuroendocrine activity ($r = -0.51$; $P < 0.05$).

LH Pulsatility

There was no difference in LH pulsatility between the ewes in the WF-OVX and R-OVX groups (1.04 ± 0.09 pulses/h vs. 0.76 ± 0.12 pulses/h; $P > 0.05$). However, the mean amplitude of the pulses was higher in the WF-OVX group (1.9 ± 0.1 ng/ml vs. 1.4 ± 0.3 ng/ml; $P < 0.05$), but there was no significant difference between groups in the nadir concentration of LH. The mean plasma concentration of LH was significantly higher in the WF-OVX group (5.2 ± 0.4 ng/ml vs. 4.6 ± 0.9 ng/ml; $P < 0.001$).

The Pattern of LH Secretion after Transfer to SD Photoperiod

The period of increased neuroendocrine activity induced by the photoperiodic switch from LD to SD (Fig. 5) was significantly longer for the WF-OVX ewes compared with the R-OVX ewes (159 ± 7 days vs. 86 ± 10 days; $P < 0.001$). In the latter group, the onset of neuroendocrine activity after transfer to SD was significantly delayed ($P < 0.0001$; Fig. 5), and its end significantly advanced (203 ± 8 days vs. 164 ± 7 days; $P < 0.01$). During the periods of increased neuroendocrine activity, the time to midperiod was not different between groups (WF-OVX, 124 ± 4 days and R-OVX, 121 ± 4 days; $P > 0.05$), and there were no differences in circulating concentrations of LH between groups (WF-OVX, 4.9 ± 0.2 ng/ml and R-OVX, 3.9 ± 0.2 ng/ml; $P > 0.05$). By the end of

the experimental period in Year 3, half of the ewes in the WF-OVX group did not end their breeding season. Considering that their plasma LH concentrations were low (≈ 1 ng/ml) and decreasing, the date of the end of the experimental period in Year 3 was used as their breeding season end date. One ewe in the R-OVX group did not have plasma LH concentrations over 1 ng/ml after transfer to SD photoperiod, and was excluded from the data set. The onset and the offset of LH secretion, following photoperiodic transition, were significantly correlated with both BCS ($r = -0.78$ and $r = 0.70$; both $P < 0.01$) and LW ($r = -0.82$ and $r = 0.78$; both $P < 0.001$).

Glucose

Year 1. From the start of the feeding program to the end of the pre-experimental period, the ewes in the WF group had lower plasma concentrations of glucose compared with ewes in the R group (0.55 ± 0.01 mg/ml vs. 0.57 ± 0.01 mg/ml; $P < 0.01$). In both groups, the plasma concentrations of glucose significantly decreased with time ($P < 0.05$) and there was no interaction between nutritional status and time on the plasma concentrations of glucose.

During the experimental period in Year 1, the differences between groups in plasma concentrations of glucose observed during the pre-experimental period persisted, and ewes from the WF group had lower concentrations of plasma glucose compared to ewes from the R group ($P < 0.05$; Fig. 6A). In both groups, the plasma concentrations of glucose significantly increased with time ($P < 0.001$); the interaction between nutritional status and time ($P < 0.001$) indicates that this increase was significantly higher for the ewes in the WF group. During Year 1, concentrations of plasma glucose were not correlated with either BCS or LW.

Year 2. The ewes in the WF and WF-OVX groups had higher plasma concentrations of glucose when compared with the ewes in the R and R-OVX groups ($P < 0.05$; Fig. 6A). During this period, the concentrations of plasma glucose did not differ significantly with ovariectomy, but, in each group, the plasma concentrations of glucose significantly decreased with time ($P < 0.001$), and the interaction between time and nutritional status ($P < 0.001$) indicates that this decrease was higher for the ewes in the R groups. There were significant interactions with time and the reproductive state of the ewes (OVX or intact; $P < 0.05$) and with nutritional status ($P < 0.05$), indicating that this decrease was higher with ovariectomy, but only for the ewes in the WF-OVX group. During Year 2, plasma concentrations of glucose were significantly correlated with BCS ($r = 0.41$; $P < 0.05$) and LW ($r = 0.48$; $P < 0.01$).

Insulin

Year 1. From the start of the feeding program to the end of the pre-experimental period, there was a trend toward significance for the ewes in the WF group to have higher concentrations of plasma insulin when compared with the ewes in the R group (0.84 ± 0.04 ng/ml vs. 0.64 ± 0.04 ng/ml; $P = 0.06$). In both groups, the plasma concentrations of insulin significantly decreased with time ($P < 0.001$), but there was no interaction of time with nutritional status.

During the experimental period, the ewes in the WF group had higher plasma insulin concentrations when compared with the ewes in the R group ($P < 0.05$; Fig. 6B). In both groups, the plasma concentrations of insulin significantly increased with time ($P < 0.001$); the interaction between nutritional status and time ($P < 0.01$) indicates that this increase was

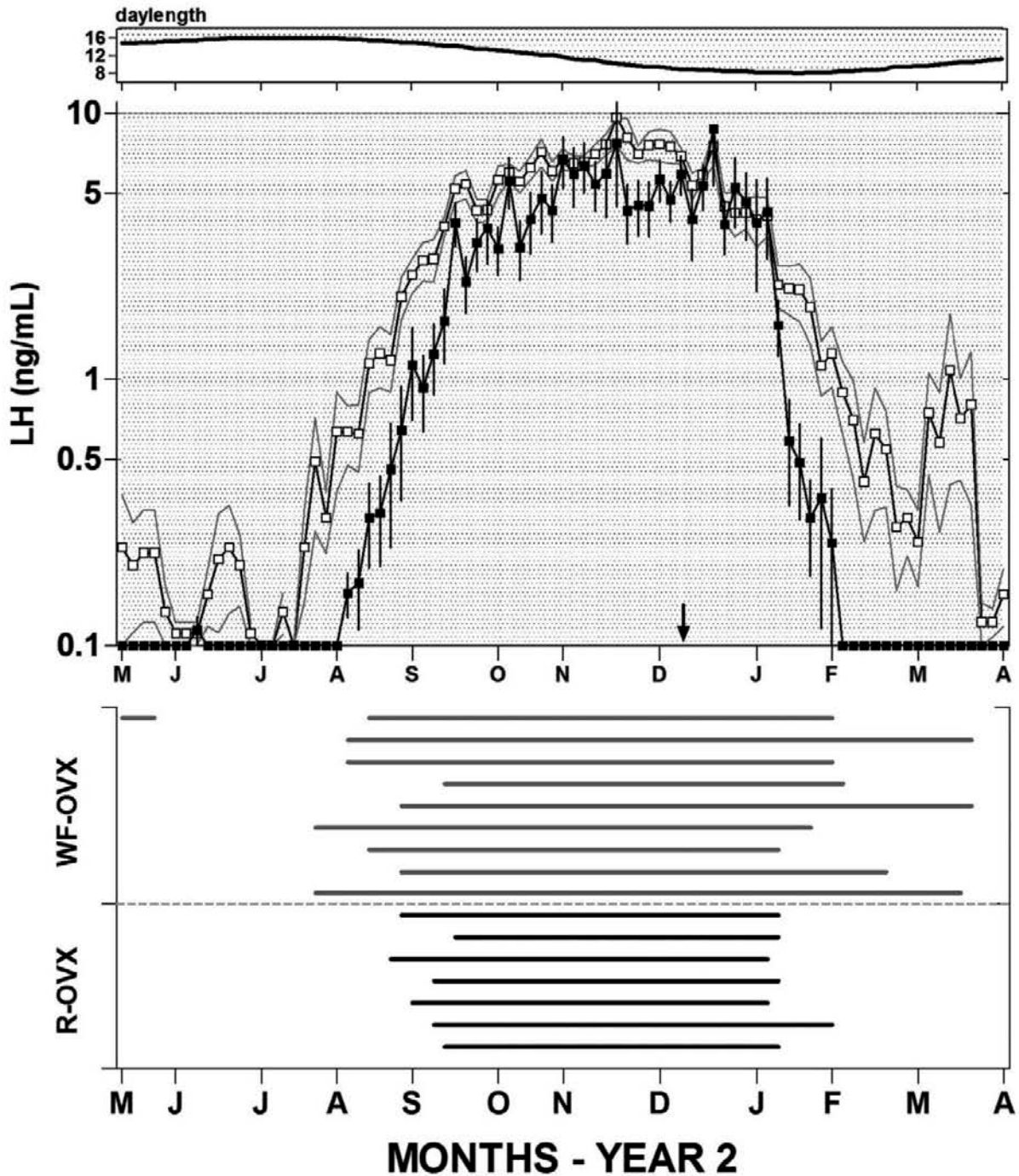


FIG. 4. The seasonal pattern of reproductive neuroendocrine activity (LH [ng/ml]) in OVX ewes fitted with estradiol implants from the WF (WF-OVX) and R (R-OVX) nutritional treatment groups. The ewes were housed in light-controlled rooms that simulated the ambient photoperiod of 16L:8D at the summer solstice and 8L:16D at the winter solstice during Year 2. Upper panel: the pattern of day length provided by the lighting program during Year 2. Middle panel: mean \pm SEM plasma concentrations of LH in ewes from the WF-OVX (\square [n=9]) and R-OVX (\blacksquare [n=7]) groups in Year 2 of the experiment. The arrow indicates the time when LH pulses frequencies were determined. Note that the LH data are plotted on a logarithmic scale. Lower panel: individual periods of reproductive neuroendocrine activity (i.e., LH > 1 ng/ml), with each row representing a single animal; periods of ovarian activity are represented by the gray (WF-OVX) or black (R-OVX) lines. Horizontal dotted lines separate the animals into their two experimental groups.

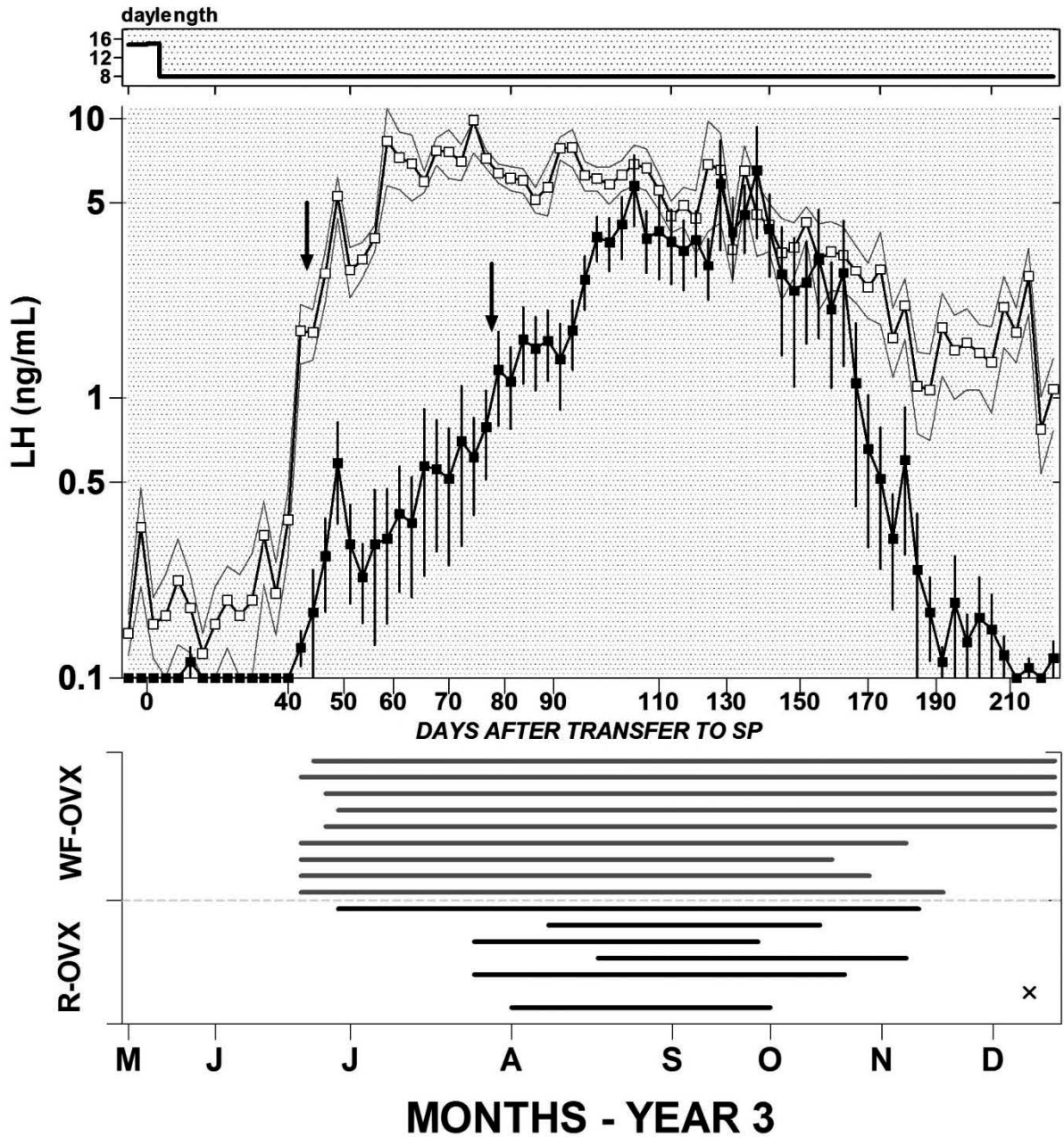


FIG. 5. The concentrations of LH in the ewes from the WF-OVX and R-OVX groups following the sudden transition from an inhibitory LD photoperiod to a stimulatory SD photoperiod. Upper panel: the pattern of day length provided by the lighting program during Year 3. Middle panel: mean \pm SEM plasma concentrations of LH in ewes from the WF-OVX (\square [n=9]) and R-OVX (\blacksquare [n=7]) groups in Year 2 of the experiment. The arrow indicates the time when LH pulse frequencies were determined. Note that the LH data are plotted on a logarithmic scale. Lower panel: individual periods of reproductive neuroendocrine activity (i.e., LH > 1 ng/ml), with each row representing a single animal; periods of ovarian activity are represented by the gray (WF-OVX) or black (R-OVX) lines. Horizontal dotted lines separate the animals into their two experimental groups. Note that an ewe in the R group did not respond to the photoperiod transition, and eventually died (indicated by a cross).

significantly higher for the ewes in the WF group. There were significant correlations between the plasma concentration of insulin and both BCS ($r = 0.60$) and LW ($r = 0.50$) (both $P < 0.01$).

Year 2. The ewes in the WF groups had higher plasma concentrations of insulin when compared with the ewes in the R groups ($P < 0.001$; Fig. 6B). Surprisingly, there was an effect of ovariectomy on the plasma concentrations of insulin

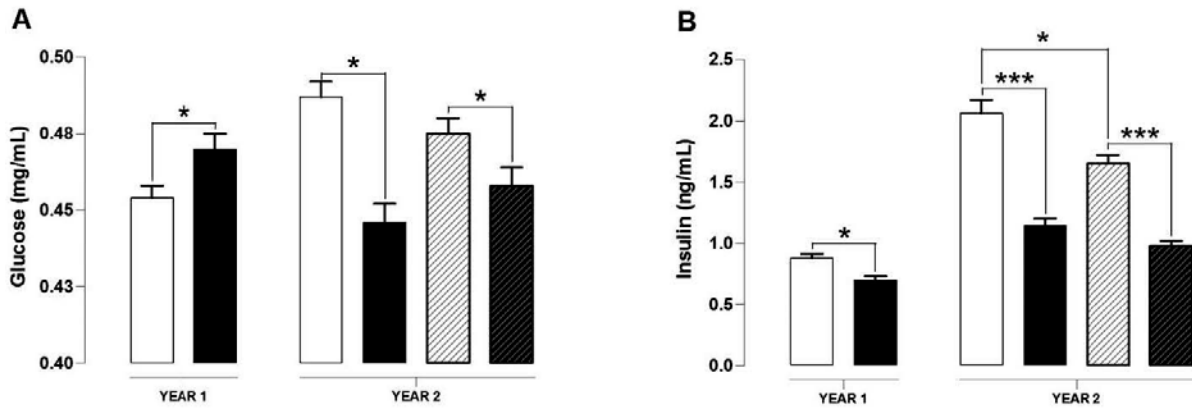


FIG. 6. The mean \pm SEM plasma concentrations of glucose (A) and insulin (B) in Year 1 for the ewes in the WF (white bars [$n = 19$]) and R (black bars [$n = 12$]) groups and in Year 2 for the ewes in the WF (white bars [$n = 10$]), WF-OVX (white hatched bars [$n = 9$]), R (black bars [$n = 5$]), and R-OVX (black hatched bars [$n = 7$]) groups. All statistical comparisons are with years. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$.

($P < 0.05$), with the animals of the WF group displaying higher concentrations when compared with the animals of the WF-OVX group ($P < 0.05$; Fig. 6B). This effect of ovariectomy on the plasma concentrations of insulin, although following the same trend, was not significant for the R groups ($P > 0.05$). There was a significant effect of time on the plasma concentrations of insulin ($P < 0.001$), and the interaction between time and nutritional status ($P < 0.001$) indicates that the plasma concentrations of insulin increased, but only in the ewes in the WF group. Considering reproductive state (OVX or intact), there were significant interactions with time ($P < 0.001$) and nutritional status ($P < 0.01$), indicating that this increase was lower for the ewes of the WF-OVX group. There were significant correlations between concentrations of insulin in plasma and both BCS ($r = 0.77$) and LW ($r = 0.78$) (both $P < 0.001$).

Year 3. The ewes in the WF-OVX group had higher plasma concentrations of insulin when compared with the ewes in the R-OVX group ($P < 0.05$; Fig. 2C). There was no effect of time, nor were there any interactions, but there were significant correlations with BCS ($r = 0.61$; $P < 0.05$) and LW ($r = 0.67$; $P < 0.01$).

DISCUSSION

This study describes an interaction between the daily photoperiod in a temperate zone and nutritional status, estimated from the animals' BCSs, and its subsequent effect on the seasonal patterns of ovarian and reproductive neuroendocrine activity in a seasonal breed of sheep.

During the first year of this study, we established an ovine model to investigate the effect of the interaction between photoperiod and nutritional status on the seasonal pattern of ovarian activity in the Ile-de-France breed of sheep. This model confirms most of the previous findings in other breeds of sheep (Rambouillet [31]; Rasa Aragonesa [32]) and in other seasonal species, including SD breeders (the doe [15]) and LD breeders (the mare [14]). Moreover, the model has determined that the main effect of nutrition was on seasonal transitions of ovarian activity, with no effect on the midpoint of the seasons of ovarian activity and ovarian quiescence. The same experiment, repeated in the second year of the study, but with only half of the animals from Year 1, again confirmed these results.

In order to explain the model, our hypothesis was that the interactions between photoperiodic and nutritional cues were centrally mediated. Therefore, we went on to assess the effects of the same nutritional and photoperiodic treatments on the seasonal pattern of reproductive neuroendocrine activity in the OVX groups as a reflection of the photoperiod-driven changes in the activity of the hypothalamo-pituitary axis [33]. The results of this experiment clearly show similar effects of the interaction between nutritional and photoperiodic cues at the level of the activity of the hypothalamo-pituitary axis, and confirm our hypothesis. Interestingly, in this ovine model of long-term dietary restriction, the so-called "gonadotropin-releasing hormone [GnRH]-independent" effect of nutrition [34] had a minor influence, at best, on seasonal reproductive patterns.

In sheep, the seasonal changes in LH secretion from the gonadotroph cells of the anterior pituitary are controlled by photoperiod-driven changes in the neurosecretory activity of the GnRH neurons within the hypothalamus [35]. Thus, the effects of the interaction between photoperiodic and nutritional cues on the seasonal patterns of LH secretion likely reflect the upstream integration of these cues with the neurosecretory activity of the hypothalamic GnRH neurons. The fact that, in the OVX groups, each ewe had a sustained period of elevated LH secretion, with similar average concentrations of LH between nutritional groups, strengthens this suggestion. However, from these results, we cannot exclude effects downstream of the GnRH neurons, such as a direct effect of nutritional cues on the activity of the gonadotroph cells (see [36] for review).

The reproductive neuroendocrine activity of the OVX groups was further analyzed by determining the pulse frequency of LH, a parameter known to reflect the pulsatile output of GnRH from the hypothalamic GnRH neurons [37]. The results suggest that the site of integration is hypothalamic. However, in our study, as for similar experiments [38–40], the conclusion concerning direct effects of nutrition on the characteristics of LH pulsatility may be biased, because it was not determined at the same physiological moment in the annual reproductive cycle for each nutritional group (i.e., the sampling window was closer to the termination of the active reproductive neuroendocrine season for the R-OVX group than it was for the WF-OVX group), a factor known to influence the characteristics of LH pulsatility [41]. In this regard, the only

suitable sampling window would have been the middate of the neuroendocrine active season, but this could not be determined until afterwards. Thus, the differences between nutritional groups in the amplitude of the LH pulses and the mean plasma concentration of LH have to be interpreted cautiously, because they may account for a direct effect of nutrition, the stage of the annual reproductive cycle, or both. On the other hand, the dietary restriction had no effect on LH pulsatility, which argues for little or no effect of nutritional cues on the expression of reproductive activities during the breeding season, and its effects appear to be confined to the seasonal transitions from the breeding season to anestrus and vice versa.

The comparison of the patterns of reproductive neuroendocrine activity between the ewes in the OVX groups, induced by the shift from LD to SD, confirmed that the effects of nutritional cues are on the seasonal reproductive mechanisms that initiate and terminate the breeding season. Indeed, while for the ewes in the WF-OVX group this pattern was in accordance with previous studies [17, 18], for the ewes in the R-OVX group the transitions between the start and the end of LH secretion were respectively delayed and advanced without significant effects on the average concentrations of LH or on the mid-date of the period of reproductive neuroendocrine activity.

Throughout the study, the overall significant correlations of BCS with the dates of seasonal reproductive transitions suggest that the circulating levels of fat-borne signals (e.g., leptin and/or adiponectin) are critical factors in the interaction between nutritional status and photoperiod. As expected, the mean plasma concentration of insulin, one endocrine mediator of adiposity [42, 43], was positively associated with the nutritional status of the animals, and may therefore also have a significant function in this interaction. The changes in the plasma concentrations of glucose and insulin reflect the long-term metabolic adaptations of the ewes in the WF and R groups to their respective nutritional statuses. These adaptations were particularly evident in the ewes of the R group, and confirmed the results of a previous study [44]. Thus, these animals had higher plasma concentrations of glucose, which increased with time during Year 1, probably as a consequence of the glucose-sparing mechanisms developed by ruminants to cope with nutritional challenges [42]. Indeed, the ewes in the R groups never were hypoglycemic. On the contrary, most of these ewes have experienced transient periods of hypoinsulinemia at the beginning of the experimental period. This was likely the consequence of the abrupt drop in energy intake and the subsequent mobilization of adipose tissue observed after the start of the feeding program that reciprocally favored gluconeogenesis [42, 45]. Interestingly between Years 1 and 2, despite apparent changes in nutrient signaling pathways, the seasonal reproductive patterns of the ewes in the WF and R groups were impacted in the same manner. This probably reflects the central integration of interactions between the level of adiposity (which appears to be the strongest signal in our model) and nutritional plane within a nutritional/metabolic memory [43, 46]; the latter in turn influences the activity of the GnRH pulse generator to produce the appropriate neuroendocrine response. This metabolic memory is likely involved in the erratic patterns of ovarian activity observed during Year 1 in three ewes of the R group (Fig. 3) that experienced a particularly significant loss of BCS in terms of amplitude, duration, or absolute value. Moreover, the low nutritional status of the ewes in the R group did not prevent the establishment of the breeding season, and had little effect on the pulsatile pattern of LH secretion. In accordance with a previous work by Miller et al. [47], it is then likely that

hormones, such as leptin and insulin, ultimately impacted the functioning of the GnRH pulse generator, but in a photoperiod-dependent manner. Together, these observations tend to confirm that the hypothalamus integrates both endogenous and environmental signals to modulate the effects of metabolic status on seasonal reproductive activities [46].

Our results confirm the role of nutritional cues as intrinsic modulators of the photoperiod-driven patterns of seasonal reproductive activities [13] and, tentatively, locate the level of interaction centrally, along the hypothalamic pathway of integration of the photoperiodic signal. Two mechanistic hypotheses may account for our observations. First, nutritional cues may act upstream in the integrative photoperiodic pathway (i.e., directly on the circannual rhythm that entrains the seasonal reproductive transitions [3, 48, 49]). Indeed, in rodents, the restriction of dietary energy can alter the function of the SCN clock [50]. If such an effect is confirmed in sheep, considering the putative dependency of circannual rhythms on the circadian system [51], then nutritional cues may directly alter the seasonal reproductive transitions. In this case, nutrition would act mainly as a disruptor of the seasonal breeding strategy (e.g., the erratic patterns observed in three ewes from the R group; Fig. 3). However, such alterations in the circannual reproductive rhythm would probably interfere with its correct decoding of the photoperiodic signal [52]; however, interestingly, in our study, the effects of nutrition were observed at both ends of the breeding season and, overall, the midpoint of the breeding season was not affected by nutrition, nor was the midpoint of anestrus. This indicates that the phase of the annual reproductive rhythm was not modified, and, as a consequence, the decoding of the photoperiodic cycle was not altered [4, 49]. The second hypothesis is that nutrition controls the width of the window of activity around the optimal period for breeding. In this case, nutritional cues would act on the integration of photoperiodic cues with GnRH-releasing neurons, possibly by modulating the threshold of stimulation necessary to switch the “on-off” mechanisms involved in seasonal reproductive transitions. In the ewes of the R group, this threshold would be greater compared with the ewes in the WF group; therefore, it would “mask” the expression of the photoperiodic drive until this latter became stronger, yielding a shorter breeding season centered on the same photoperiodic moment. One extreme situation would be a threshold so high that it could not be exceeded by the photoperiodic drive; this would lead to a complete loss of seasonal reproductive activities, as observed in one ewe of the R group in Year 1 (Fig. 3).

Potential integrators for metabolic cues involved in seasonal reproductive transitions in sheep include the kisspeptin [53, 54] and thyroid-hormone [55] systems, both of which, in rodents, are responsive to metabolic cues, as well as the mechanism regulating the sensitivity of the hypothalamo-pituitary axis to the negative-feedback action of estradiol that is responsive to nutrition [56]. This latter mechanism would be independent of the circulating concentrations of estradiol, because, in our study, the plasma concentrations of E_2 before (data not shown) and 1 mo after ovariectomy were not significantly different between the OVX groups.

In conclusion, nutritional cues interact with the photoperiodic cycle to modulate the seasonal patterns of reproductive activities, and we have determined that this interaction takes place mainly in central pathways that determine the seasonal patterns of the neurosecretion of GnRH. Further analyses are now required to determine whether nutritional cues act as disruptors of the seasonal reproductive rhythms (hypothesis 1), or as a final gateway controlling the emergence of the seasonal

reproductive rhythm to restrict breeding activity to an optimal period of the year (hypothesis 2).

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Prof. François Bocquier and Dr. Nathalie Debus (INRA, Montpellier Supagro) for their help in designing the diets provided to the animals, and Dr. Daniel Guillaume (INRA, Tours) for his help in developing and performing the ovine insulin assay. For their help in carrying out the statistical analysis, Dr. Sandrine Fréret (INRA, Tours) and Vincent Furstoss (INRA, Lusignan-Rouillé) are also acknowledged. The authors also acknowledge the staff of the assay platform laboratory (INRA, Tours) for carrying out the ELISA for progesterone and LH, the staff of the experimental unit of INRA Centre de Tours (UEPAO) for the very good care provided to the animals, and the staff of the Experimental Hospital (PRC) for surgical procedures.

REFERENCES

- Malpaux B. Seasonal regulation of reproduction in mammals In: Neill JD (ed.), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Birmingham: Elsevier; 2006:2231–2281.
- Karsch FJ, Bittman EL, Foster DL, Goodman RL, Legan SJ, Robinson JE. Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res* 1984; 40:185–232.
- Malpaux B, Robinson JE, Wayne NL, Karsch FJ. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *J Endocrinol* 1989; 122:269–278.
- Woodfill CJ, Wayne NL, Moenter SM, Karsch FJ. Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. *Biol Reprod* 1994; 50:965–976.
- Arendt J. Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 1986; 8:266–320.
- Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418:935–941.
- Lincoln GA, Ebling FJ, Almeida OF. Generation of melatonin rhythms. *Ciba Found Symp* 1985; 117:129–148.
- Moore RY. Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. *Prog Brain Res* 1996; 111:103–119.
- Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003; 55:325–395.
- Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 49:654–664.
- Wagner GC, Johnston JD, Clarke JJ, Lincoln GA, Hazlerigg DG. Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology* 2008; 149:32–39.
- Malpaux B, Viguie C, Skinner DC, Thierry JC, Pelletier J, Chemineau P. Seasonal breeding in sheep: mechanism of action of melatonin. *Anim Reprod Sci* 1996; 42:109–117.
- Rosa HJD, Bryant MJ. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin Res* 2003; 48:155–171.
- Salazar-Ortiz J, Camous S, Briant C, Lardic L, Chesneau D, Guillaume D. Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (*Equus caballus*). *Reprod Biol Endocrinol* 9:130.
- Zarazaga LA, Guzman JL, Dominguez C, Perez MC, Prieto R. Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim Reprod Sci* 2005; 87:253–267.
- Martin GB. Factors affecting the secretion of luteinizing hormone in the ewe. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1984; 59:1–87.
- Legan SJ, Karsch FJ. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod* 1980; 23:1061–1068.
- Malpaux B, Daveau A, Maurice F, Gayrard V, Thierry JC. Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol Reprod* 1993; 48:752–760.
- Martin GB, Rodger J, Blache D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2004; 16:491–501.
- Russel AJF, Doney JM, Gunn RG. Subjective assessment of body fat in live sheep. *The Journal of Agricultural Science* 1969; 72:451–454.
- INRA. Alimentation des bovins, ovins et caprins: besoins des animaux – valeurs des aliments [in French]. Versailles, France: Quae; 2010.
- Yellon SM, Bittman EL, Lehman MN, Olster DH, Robinson JE, Karsch FJ. Importance of duration of nocturnal melatonin secretion in determining the reproductive response to inductive photoperiod in the ewe. *Biol Reprod* 1985; 32:523–529.
- Canepa S, Laine AL, Fagu C, Flon C, Monniaux D. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins [in French]. *Cahier des Techniques de l'INRA* 2008; 64:19–30.
- Faure MO, Nicol L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly A, Taragnat C. BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol* 2005; 186:109–121.
- Niswender GD, Reichert LE Jr, Midgley AR Jr, Nalbandov AV. Radioimmunoassay for bovine and ovine luteinizing hormone. *Endocrinology* 1969; 84:1166–1173.
- Woltanski KP, Besch W, Keilacker H, Ziegler M, Kohnert KD. Radioiodination of peptide hormones and immunoglobulin preparations: comparison of the chloramine T and iodogen method. *Exp Clin Endocrinol* 1990; 95:39–46.
- Ben Said S, Lomet D, Chesneau D, Lardic L, Canepa S, Guillaume D, Briant C, Fabre-Nys C, Caraty A. Differential estradiol requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. *Biol Reprod* 2007; 76:673–680.
- Karsch FJ, Legan SJ, Ryan KD, Foster DL. Importance of estradiol and progesterone in regulating LH secretion and estrous behavior during the sheep estrous cycle. *Biol Reprod* 1980; 23:404–413.
- Merriam GR, Watcher KW. Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *Am J Physiol* 1982; 243:E310–E318.
- Martin GB, Tjondronegoro S, Boukhliq R, Blackberry MA, Briegel JR, Blache D, Fisher JA, Adams NR. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male merino and Suffolk sheep: modification of endogenous rhythms by photoperiod. *Reprod Fertil Dev* 1999; 11:355–366.
- Hulet CV, Shupe WL, Ross T, Richards W. Effects of nutritional environment and ram effect on breeding season in range sheep. *Theriogenology* 1986; 25:317–323.
- Forcada F, Abecia JA, Sierra I. Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Rumin Res* 1992; 8:313–324.
- Karsch FJ, Dahl GE, Evans NP, Manning JM, Mayfield KP, Moenter SM, Foster DL. Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod* 1993; 49:1377–1383.
- Hotzel MJ, Walkden-Brown SW, Blackberry MA, Martin GB. The effect of nutrition on testicular growth in mature Merino rams involves mechanisms that are independent of changes in GnRH pulse frequency. *J Endocrinol* 1995; 147:75–85.
- Barrell GK, Moenter SM, Caraty A, Karsch FJ. Seasonal changes of gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe. *Biol Reprod* 1992; 46:1130–1135.
- Schiullo KK. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J Anim Sci* 1992; 70:1271–1282.
- Clarke JJ, Cummins JT. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 1982; 111:1737–1739.
- Alkass JE, Bryant MJ, Walton JS. Some effects of level of feeding and body condition upon sperm production and gonadotropin concentrations in the ram. *Anim Prod* 1982; 34:265–277.
- Archer ZA, Rhind SM, Findlay PA, Kyle CE, Thomas L, Marie M, Adam CL. Contrasting effects of different levels of food intake and adiposity on LH secretion and hypothalamic gene expression in sheep. *J Endocrinol* 2002; 175:383–393.
- Rhind SM, McMillen S, McKelvey WAC. Effects of levels of food intake and body condition on the sensitivity of the hypothalamus and pituitary to ovarian steroid feedback in ovariectomized ewes. *Anim Prod* 1991; 52:115–125.
- Joseph IBJK, Currie WD, Rawlings NC. Effects of time after ovariectomy, season and oestradiol on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion in ovariectomized ewes. *Reproduction* 1992; 94:511–523.
- Chilliard Y, Bocquier F, Doreau M. Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev* 1998; 38:131–152.
- Miller DW, Harrison JL, Bennett EJ, Findlay PA, Adam CL. Nutritional influences on reproductive neuroendocrine output: insulin, leptin, and orexigenic neuropeptide signaling in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 2007; 148:5313–5322.
- Caldeira RM, Belo AT, Santos CC, Vazques MI, Portugal AV. The effect

- of long-term feed restriction and over-nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Rumin Res* 2007; 68:242–255.
45. Boukhliq R, Martin GB, White CL, Blackberry MA, Murray PJ. Role of glucose, fatty acids and protein in regulation of testicular growth and secretion of gonadotrophin, prolactin, somatotrophin and insulin in the mature ram. *Reprod Fertil Dev* 1997; 9:515–524.
 46. Blache D, Zhang S, Martin GB. Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod Nutr Dev* 2006; 46:379–390.
 47. Miller DW, Findlay PA, Morrison MA, Raver N, Adam CL. Seasonal and dose-dependent effects of intracerebroventricular leptin on LH secretion and appetite in sheep. *J Endocrinol* 2002; 175:395–404.
 48. Malpaux B, Wayne NL, Karsch FJ. Termination of the breeding season in the Suffolk ewe: involvement of an endogenous rhythm of reproduction. *Biol Reprod* 1988; 39:254–263.
 49. Wayne NL, Malpaux B, Karsch FJ. Photoperiodic requirements for timing onset and duration of the breeding season of the ewe: synchronization of an endogenous rhythm of reproduction. *J Comp Physiol A* 1990; 166:835–842.
 50. Mendoza J, Graff C, Dardente H, Pevet P, Challet E. Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci* 2005; 25:1514–1522.
 51. Lincoln GA, Andersson H, Loudon A. Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals—a unifying hypothesis. *J Endocrinol* 2003; 179:1–13.
 52. Dardente H, Wyse CA, Birnie MJ, Dupre SM, Loudon AS, Lincoln GA, Hazlerigg DG. A molecular switch for photoperiod responsiveness in mammals. *Curr Biol* 2010; 20:2193–2198.
 53. Smith JT, Acohido BV, Clifton DK, Steiner RA. Kiss-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 2006; 18:298–303.
 54. Wu M, Dumalska I, Morozova E, van den Pol A, Alreja M. Melanin-concentrating hormone directly inhibits GnRH neurons and blocks kisspeptin activation, linking energy balance to reproduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:17217–17222.
 55. Herwig A, Wilson D, Logie TJ, Boelen A, Morgan PJ, Mercer JG, Barrett P. Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296:R1307–R1315.
 56. Forcada F, Abecia JA. The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes. *Reprod Nutr Dev* 2006; 46:355–365.

II. Caractériser les effets génétiques de l'interaction nutrition / photopériode chez les ovins : étude comparative des effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction chez la brebis Mérinos d'Arles

Tel que mentionné dans la revue bibliographique, les effets de la génétique dans le contrôle de l'expression de la saisonnalité de la reproduction des ovins sont relativement bien établis. Si les activités de reproduction des races ovines originaires des latitudes intertropicales et observées leur environnement naturel sont essentiellement dirigées par un ensemble de facteurs environnementaux ultimes, il n'en demeure pas moins que ces mêmes animaux disposent d'un mécanisme de mesure du temps photopériodique fonctionnel capable d'interpréter un certain niveau de variations photopériodiques pour entraîner leurs activités de reproduction vers un rythme saisonnier. Toutefois, pour une latitude donnée, cette interprétation entraîne des profils saisonniers de reproduction moins prononcés en comparaison de ceux de brebis originaires des zones tempérées. Ce phénomène à composante génétique représente le « degré de saisonnalité » des espèces, plus les races sont originaires de latitudes élevées et plus ce degré est important.

En revanche relativement peu d'études ont abordé dans des conditions expérimentales comparables le rôle du degré de saisonnalité des races ovines dans les effets de l'interaction entre facteurs nutritionnel et photopériodique sur l'expression des profils saisonniers de reproduction. Selon les travaux de Martin *et al.* (2002) le moindre degré de saisonnalité des béliers Mérinos octroie à leur rythme reproductif une plus grande sensibilité aux effets du statut nutritionnel en comparaison à celui de béliers Suffolk. Ainsi la transmission des effets de la nutrition chez les béliers Mérinos, probablement via la voie GnRH-indépendante (**Figure 23**), permet à leur rythme reproductif d'être relativement indépendant de la photopériode pour suivre le rythme des disponibilités alimentaires.

Afin de vérifier le rôle du degré de saisonnalité (i.e. de la génétique) dans les effets de l'interaction entre statut nutritionnel et photopériode sur les profils saisonniers de reproduction des brebis, nous avons entrepris de déterminer les effets d'un faible état d'engraissement sur l'expression des profils saisonniers d'activité ovarienne de brebis Mérinos d'Arles. Les traits caractéristiques de cette interaction étaient ensuite comparés à

ceux de notre étude réalisée chez la brebis Île-de-France, une race présentant un plus fort degré de saisonnalité.

Pour cette étude 21 brebis Mérinos d'Arles ont été utilisées. Deux groupes d'animaux ayant des états d'engraissement contrastés (10 brebis bien nourries vs. 11 brebis restreintes) ont été obtenus en utilisant un protocole alimentaire similaire à celui de notre précédente étude (cf. ci-dessus). Les profils saisonniers d'activité ovarienne de ces brebis étaient suivis en fonction du statut nutritionnel pendant une année sous le régime photopériodique naturel de la station expérimentale (48°N). Ce suivi réalisé chez les brebis Mérinos d'Arles a été réalisé en parallèle de la seconde année de notre précédente étude. D'une manière générale nous nous sommes efforcés de maintenir ces animaux dans des conditions d'élevage (alimentation, interventions, ...) comparables à cette précédente étude.

1. Résultats

Un faible état d'engraissement a eu pour principal effet une réduction significative ($p < 0,001$) de la durée de la saison d'activité ovarienne en comparaison de celle observée chez des brebis maintenues à un état d'engraissement moyen. Cet effet était imputable à deux tendances observées chez les brebis restreintes à savoir une entrée en saison d'inactivité ovarienne précoce ($p = 0,09$) et une sortie tardive de cette même saison ($p = 0,06$) en comparaison des brebis bien nourries.

A statut nutritionnel comparable, les profils saisonniers d'activité ovarienne des brebis Mérinos d'Arles étaient moins marqués en comparaison de ceux des Île-de-France.

2. Conclusion

En dépit du moindre degré de saisonnalité des brebis Mérinos d'Arles, les principaux traits de l'interaction entre facteurs photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers d'activité ovarienne établis chez les brebis Île-de-France ont été retrouvés dans cette expérimentation.

Cette similitude peut suggérer des modalités d'intégration des effets statiques de la nutrition sur l'activité saisonnière de l'axe hypothalamo-hypophyséogonadique indépendantes du degré de saisonnalité de la race considérée et par conséquent généralisables à l'ensemble de l'espèce ovine.

The effect of nutrition on the seasonal pattern of ovarian activity in the Merinos d'Arles ewe: a comparative study

Jean-Baptiste Menassol^{1,2,3,4}, Benoît Malpoux^{1,2,3,4}, Rex J. Scaramuzzi^{1,2,3,4,5}.

¹. INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

². CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

³. Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

⁴. IFCE, F-37380 Nouzilly, France

⁵. Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, Herts, UK

Abstract

In a previous experiment we established that in temperate zone the nutritional status interacts with the photoperiodic signal to modulate the seasonal patterns of reproduction in the Ile-de-France breed of sheep. The present study was conducted in a similar environment to determine and compare the effects of this interaction on the seasonal patterns of ovarian activity in a less seasonal breed of sheep, the Merinos d'Arles. Twenty-one Merinos d'Arles ewes were transferred from a breeding flock located in the south of France (43°N) to our experimental facility (48°N) and were subjected to a nutritional program designed to achieve groups with contrasting nutritional statuses (well fed vs. restricted). The ovarian activity was monitored by determining concentrations of plasma progesterone.

The effect of a low nutritional status was a lengthening of the breeding season ($p < 0.001$) that essentially originated from shifts in the timing of reproductive transitions (both $p < 0.10$). In fact there was no difference between the groups in the mid-point of the season of ovarian quiescence.

Despite being less seasonal, in the Merinos d'Arles breed of sheep the effects of the interaction between the nutritional status and the photoperiod were similar to those from our previous experiment in the Ile-de-France breed. We conclude that the differences between breeds in the expression of seasonal patterns of ovarian activity are likely to lie within central

differences in the sensitivity of the hypothalamo-hypophyseal axis to a given nutritional status.

Introduction

Most mammals cope with variability of food in the environment by restricting their breeding activities to defined periods of the year. This adaptive phenomenon often referred as the seasonality of reproduction, results in the central integration of environmental inputs to drive reproductive activities. In temperate zones seasonal reproductive patterns are mainly driven by the photoperiod and other environmental factors merely act as “modulators” of the primary photoperiodic signal (Malpaux, 2006). However when considering seasonal mammals at low latitudes or seasonal mammals originating from these latitudes, the driving force of photoperiod becomes less evident and the role of secondary environmental cues in the control of reproductive activities is reinforced (Bronson, 1985; Bronson, 1988).

Small ruminants are seasonal breeders in which the main role of photoperiod is to synchronize an endogenous circannual rhythm of reproduction (Karsch *et al.*, 1989); however a minimum amplitude of photoperiodic change is required to elicit the seasonal response. As a matter of fact, breeds from low latitudes display weak seasonality of reproduction in their native environment but can exhibit more pronounced seasonal patterns of reproduction when transferred into temperate photoperiodic conditions (Chemineau *et al.*, 2004). In these species there is a strong effect of genotype (i.e. breed) upon the expression of seasonal reproductive patterns observed at the same latitude (Hafez, 1952). Since the endogenous circannual rhythm of reproduction is likely to be similar between breeds (Martin *et al.*, 1999), these breed-differences in the expression of the seasonality of reproduction probably originate from differences in the central integration of environmental factors. However the modality of integration and the interactions among environmental factors in the control of seasonal reproductive activities according to breed, are not established.

In a recent study we have identified that in a temperate zone (48°N), nutritional status interacts with photoperiod at a central level to phase-shift both seasonal reproductive transitions in the Ile-de-France breed of sheep (Menassol *et al.*, 2012). Therefore this study was conducted to identify the interaction between nutritional status and photoperiod upon the expression of seasonal reproductive patterns in a less seasonal breed of sheep, the Merinos d'Arles, in the same environmental conditions i.e. similar nutritional and photoperiodic

conditions. In order to achieve this, two groups of Merinos d'Arles ewes were maintained in different metabolic states (i.e. well-fed and restricted) at our experimental station (48°N) and their patterns of reproductive seasonality were monitored over one breeding and non-breeding season.

Material and methods

All procedures were approved by the French Agricultural and Scientific Research Agencies for Animal Ethics and they were all conducted in accordance with EU guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

General

Twenty-one sexually mature Merinos d'Arles ewes were transferred from the breeding flock of the *domaine du Merle* (INRA Montpellier SupAgro) an experimental facility located in the south of France (43°N), to a semi-open building of our experimental facility (48°N). These ewes were assigned to two groups balanced for live weight, body condition score and age, housed in one of two pens from one month before the beginning of the feeding program. Each pen of 35m², housed 11 and 10 animals as a single group and the animals were free to interact with each other. Contacts with rams or their odours (for example on clothing) were rigorously avoided during the study and social interactions among ewes were limited to ewes of the same treatment.

Diets and nutritional management

The ewes were weighed (LW) and their body condition score (BCS) recorded regularly at the beginning of the feeding program. Then, when the target BCS was reached for each group, BCS and LW were monitored at longer intervals. BCS was determined using a scale of 0 (emaciated) to 5 (grossly obese) (Russel *et al.*, 1969). The feeding system in each room was designed to provide individual access to feeders.

A pre-experimental period that lasted 24 weeks was used. The first 6 weeks were dedicated to the acclimatization of the animals (building, feed and feeding system) then during the following 18 weeks the ewes were fed individual diets designed to produce the two experimental groups with target median BCSs of 1.5 (restricted group; R_{MA}) and 3.0 (well-fed

group; WF_{MA}). The diet consisted of a single feed made from pelleted dehydrated lucerne, straw and sugar cane treacle with nutritional values of 0.97 Mcal of net energy and 63.6 g of metabolizable protein per kilogram of dry matter (DM). The diet was designed using the INRA recommendations for the growth and maintenance needs of adult, non-pregnant ewes (INRA, 2010). The quantity of the diet offered was adjusted to the mean LW of the animals in each room. The ewes of the R_{MA} group were fed at 65 % of their energy maintenance needs (0.92 kg of feed per animal), which corresponded to an average daily intake of 0.61 Mcal of net energy and 53.0 g of metabolizable protein and the ewes in the WF_{MA} group were fed at 120 % of their energy maintenance needs (1.69 kg of feed per animal), which corresponded to an average daily intake of 1.39 Mcal of net energy and 91.4 g of metabolizable protein.

Once the target BCSs were reached, the experimental period began and the groups were fed the diet at a level designed to maintain the desired nutritional status of the animals over a long period. For the R_{MA} group, the diet provided on average, 90 % of the animals maintenance needs for energy as determined at the end of the pre-experimental period (0.94 kg of feed per animal), that is to say a daily intake of 0.94 Mcal of net energy and 61.7 g of metabolizable protein. For the WF_{MA} group, the maintenance diet provided on average, 120 % of the animals maintenance needs for energy as determined at the end of the pre-experimental period (1.46 kg of feed per animal), corresponding to a daily intake of 1.46 Mcal of net energy and 95.9 g of metabolizable protein. The diet was consistently readjusted to maintain the desired median BCS of the group, for example, during winter, feed intake was increased to account for low temperatures (INRA, 2010) Feed was offered once a day, in the morning, and ewes had free access to water and mineral licks to provide essential micro-nutrients.

Experimental design

Ovarian activity was monitored in ewes from the WF_{MA} (n = 10) and R_{MA} (n = 11) groups by determining the concentration of progesterone in samples of jugular venous blood collected twice a week for the duration of the study (1 year and 3 months).

Blood sampling and assays

Blood samples (3 mL) taken by jugular venepuncture, were used to determine the concentrations of progesterone. They were always collected before feeding and placed in heparinised tubes (Sodium Heparin 17 IU/mL; Vacutainer®, Becton Dickinson and

Company, Franklin Lakes, USA). After sampling, the plasma was separated by centrifugation (3700g for 30min at 4°C) and stored at -20°C.

Ovarian activity was monitored by following the pattern of progesterone concentration in jugular venous plasma. Progesterone was assayed in single replicates of 10 µL of plasma using a double antibody enzyme-linked immunosorbent immunoassay (ELISA) (Canepa *et al.*, 2008). The sensitivity of the assay was 0.25 ± 0.11 ng/mL (19 assays), the intra-assay coefficient of variation was between 3 and 9 % (19 assays) and inter-assay CV was 6 %.

Method used to calculate end points of ovarian activity

For each ewe we calculated the date of the end and start of the breeding season as well as the duration of the non-breeding season and its mid-point. An animal was considered as cycling whenever the plasma concentration of progesterone was above 1 ng/mL in at least two consecutive samples. Using these data, the period of anovulation was calculated for each animal, as the time elapsed between the end of ovarian cyclicity and the first plasma sample with a concentration of progesterone above 1 ng/mL and that was followed by at least 4 consecutive samples in which the concentration of plasma progesterone was above 1 ng/mL. Using these criteria two animals in the WF_{MA} group did not experience a cessation in ovarian activity; therefore a threshold of 50 % of cycling animals within each group was used to determine the dates of end and start of the breeding season.

Statistical analysis

Data are presented as the means \pm the standard error of the means (SEM) except for BCS data, which are presented as medians \pm inter-quartile ranges. All analyses were performed using the statistical analysis software SPSS (SPSS Inc., IBM Company Headquarters, Illinois, USA). Correlations between variables were measured using the Pearson's correlation and presented as the Pearson product-moment correlation coefficient (r). Data were analysed using either a one-way or a two-way ANOVA. Differences or correlations were regarded as significant at $p < 0.05$.

Results

Body Condition Score and Weight

At the start of the pre-experimental period, the WF_{MA} group had a median BCS of 2.83 ± 0.44 and an average LW of 56.8 ± 1.9 kg while the R_{MA} group had a median BCS of 2.67 ± 0.25 and an average LW of 58.1 ± 1.6 kg, these differences were not significant (Figure 1).

At the end of the pre-experimental period, after 4 months of nutritional management, groups had achieved markedly and significantly different nutritional states with median BCSs of 2.81 ± 0.34 and 1.88 ± 0.25 ($p < 0.001$) and mean LWs of 61.2 ± 1.9 kg and 49.8 ± 1.9 kg ($p < 0.001$) for the WF_{MA} and R_{MA} groups respectively (Figure 1). During this period there was a significant effect of time ($p < 0.001$) and a significant interaction between time and nutritional group ($p < 0.001$) on both LW and BCS (Figure 1).

During the experimental period, median BCSs were 3.03 ± 0.27 and 1.68 ± 0.35 ($p < 0.001$) for the WF_{MA} and R_{MA} groups respectively while average LWs were 60.4 ± 1.1 kg for the WF_{MA} group and 51.7 ± 1.0 kg for the R_{MA} group ($p < 0.001$; Figure 1). During this period there was a significant effect of time on both LW and BCS in each group (both $p < 0.01$) but there was no interaction between time and nutritional group.

Seasonal ovarian activity

The duration of ovarian inactivity (Figure 2) was significantly reduced for the WF_{MA} ewes compared to R_{MA} ewes (81 ± 18 vs. 159 ± 18 days; $p < 0.001$). This difference was caused by a trend toward significance for both a delayed onset of the anoestrus season ($15\text{-Apr} \pm 12$ d vs. $09\text{-Mar} \pm 13$ d; $p = 0.09$) and an earlier beginning of the breeding season ($16\text{-Aug} \pm 8$ d; R: $24\text{-Sep} \pm 4$ d; $p = 0.06$). The two groups had indistinguishable mid-anoestrus dates (WF_{MA}: $04\text{-Jun} \pm 5$ d and R_{MA}: $28\text{-May} \pm 7$ d; $p > 0.05$). During both seasonal transitions, in the ewes of the R_{MA} group the proportion cycling was lower than in the WF_{MA} group (end: $9/10$ vs. $5/11$, start: $9/9$ vs. $6/11$; both $p < 0.05$).

Only the resumption of ovarian activity was significantly correlated with BCS, $r = -0.55$ ($p < 0.05$) and LW, $r = -0.47$ ($p < 0.05$). There was a significant correlation between BCS and LW,

$r = 0.73$ ($p < 0.001$), and between the dates of end and resumption of ovarian activity, $r = -0.50$ ($p < 0.05$).

Discussion

This study establishes that nutritional status and photoperiod interact to modulate the length of the breeding season in the less seasonal Merinos d'Arles breed of sheep and that this interaction mainly impacted the timing of both seasonal reproductive transitions. As a result the season of ovarian inactivity for the ewes in the R_{MA} group was 78 days longer on average in comparison with the ewes in the WF_{MA} group; as a consequence there was a corresponding shortening of the season of ovarian activity in the ewes of the R_{MA} group. There were no differences between nutritional groups in the time of the mid-point of the season of ovarian quiescence and therefore on the mid-point of the season of ovarian activity. With a short period of ovarian inactivity close to 3 months on average, and with 20% of the ewes not experiencing any period of anovulation, the seasonal pattern of ovarian activity in the WF_{MA} group is in agreement with previous studies (Chanvallon *et al.*, 2011).

Strikingly, these results can be compared to those of our previous study conducted during the same year in a similar nutritional and photoperiodic environment in the Ile-de-France breed of sheep (Menassol *et al.*, 2012). While this latter breed exhibited more pronounced patterns of ovarian activity, the effect of a low nutritional status on these patterns were very similar between breeds. This suggests that the nutritional and photoperiodic factors interacted in a same manner independently of the breed to modulate the seasonal patterns of reproduction. In fact if we consider that the endogenous reproductive rhythm is independent of breed and that photoperiod is transduced into a common melatonin signal (Martin *et al.*, 1999), then one can hypothesize that these differences between breeds originate from differences in the central interpretation of nutritional and metabolic cues related to a given nutritional status. Therefore the results of both experiments indicate that nutritional status may act by defining a threshold that is breed-dependent for the expression of the photoperiodic-driven rhythm of reproduction in sheep.

This interpretation is not inconsistent with the conclusions of a previous study that dealt with the comparison of the effects of an annual cycle in food supply on the seasonal patterns of gonadal activity in two breeds of ram (Martin *et al.*, 2002). In this latter study the authors have highlighted the involvement of GnRH-independent pathways that could be essential to

the control of seasonal reproductive activities in less seasonal breeds of ram. In fact when the animals are exposed to annual variations in the food supply they are confronted by the dynamic influences of nutrition upon reproductive activities which are known to directly alter the gonadal environment (Scaramuzzi *et al.*, 2006). However by maintaining the animals at a given body condition score throughout the study, our experiment mainly with the static influence of nutrition on reproductive activities that is centrally-mediated (Blache *et al.*, 2006; Menassol *et al.*, 2012). It is then probable that the main effects of the static and dynamic influences of nutrition on the seasonal patterns of gonadal activity are mediated through different pathways in sheep.

Conclusion

To conclude the photoperiod and nutritional status interacted to modulate the length of the breeding season in ewes of the Merinos d'Arles breed. When the results of this study are compared to those of our previous experiment (Menassol *et al.*, 2012), it appears on one hand that the physiological mechanisms controlling the depth of anestrus are likely not to interfere in this interaction and its effects on the seasonal reproductive patterns in sheep. On the other hand it seems that these species differ in the interpretation of a given nutritional state that would act to define a threshold dependent on breed, for the expression of the photoperiod-driven rhythm of reproduction. In the Merinos d'Arles ewe, further analyses are required to assess whether these effects of nutritional status are integrated mainly at a central level.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Pr. François Bocquier and Dr. Nathalie Debus (INRA, Montpellier Supagro) for their help in designing the diets provided to the animals as well as Pierre-Marie Bouquet (manager of the *domaine du Merle*) and Céline Maton (INRA, Montpellier Supagro) who provided the Merinos d'Arles ewes. They also would like to acknowledge the staff of the assay platform laboratory (INRA, Tours) for carrying out the ELISA for progesterone. They finally thank the staff of the experimental unit of INRA Centre de Tours (UEPAO) for the very good care provided to the animals. RJS was the recipient of an EU Marie Curie Chair of Excellence (MEXC-CT-2006-042499) and JBM a PhD grant from the “Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

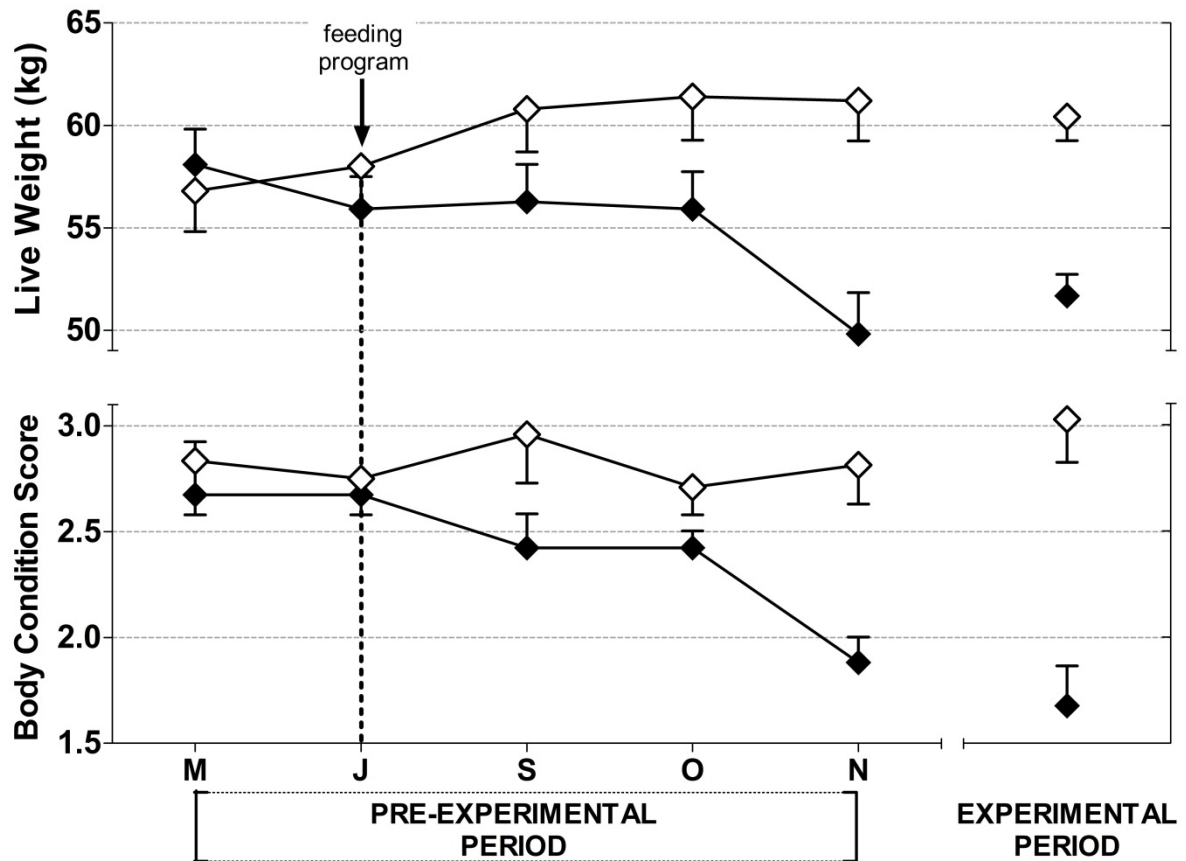


Figure 1 The patterns of live weight (LW) and body condition score (BCS) in the ewes of the well fed (WF_{MA} - ◇; n = 10) and restricted (R_{MA} - ◆; n = 11) groups, housed in a semi-open building (48°N). *Upper panel*: Mean ± SEM live weight. *Lower panel*: Median ± interquartile range of body condition score. The LW and BCS for the experimental period are representatives of four measurement points. The arrow indicates the beginning of the feeding program. The x-axis indicates sidereal months.

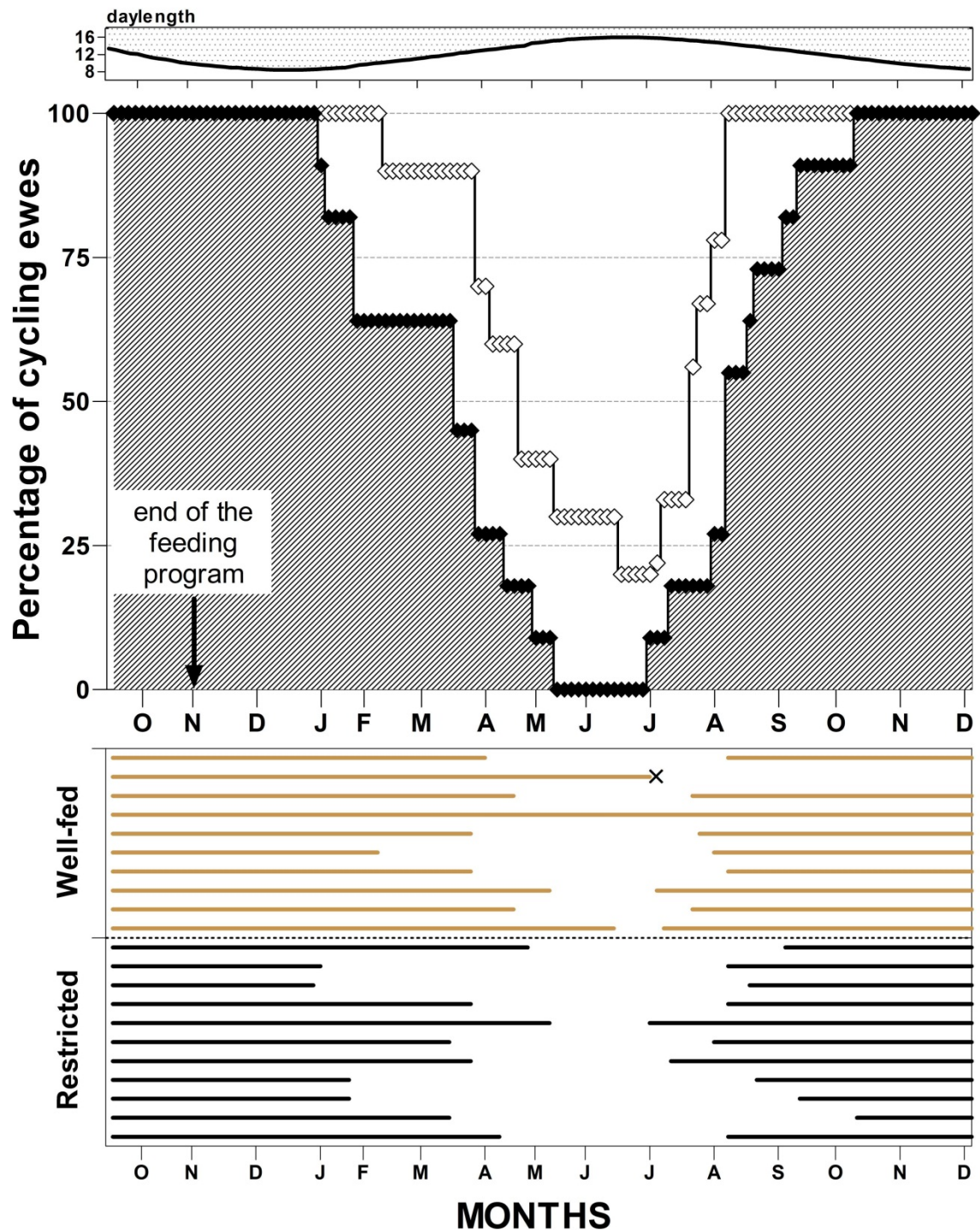


Figure 2 The seasonal pattern of ovarian activity in well fed (W_{MA}) and restricted (R_{MA}) groups of ewes over the experimental period, ewes were housed in a semi-open building and experienced the natural photoperiod. *Upper panel:* The pattern of day length experienced at the experimental station ($48^{\circ}N$). *Middle panel:* Percentage of ewes with ovarian activity in the WF_{MA} (\diamond ; $n = 10$) and R_{MA} (\blacklozenge ; $n = 11$) groups during the experimental period. The arrow indicates the end of the feeding program. *Lower panel:* Individual periods of ovarian activity.

Each row represents a single animal and nutritional groups are identified by the grey (WF_{MA}) or black (R_{MA}) lines. The cross indicates the time of death for one ewe in the R_{MA} group.

Deuxième partie

Un effet de la nutrition en amont de la voie d'intégration du signal photopériodique ?

La première partie du manuscrit nous a permis de caractériser les effets de l'interaction entre statut nutritionnel et photopériode sur les profils saisonniers de reproduction des ovins ainsi que d'identifier le niveau central en tant que site privilégié pour ces interactions. Le long de la voie d'intégration du signal photopériodique sont ainsi envisageables différents niveaux pour ces interactions, de la perception du signal lumineux à la libération hypophysaire de LH (**Figure 25**), c'est-à-dire au niveau de :

- i) la transduction du signal photopériodique
- ii) l'intégration du signal mélatoninergique
- iii) le fonctionnement du ou des mécanisme(s) de mesure du temps photopériodique
- iv) l'activité de l'hypophyse.

Notre approche expérimentale s'est focalisée sur l'étude des effets du statut nutritionnel en amont de la voie d'intégration du signal photopériodique, plus précisément sur le fonctionnement de l'horloge circadienne principale impliquée dans l'entraînement de l'activité sécrétoire de la glande pinéale.

Ce choix se justifiait notamment en considérant les travaux réalisés chez les rongeurs et identifiant le rôle majeur d'une restriction calorique dans la synchronisation du rythme généré par les noyaux suprachiasmatiques (pour revue cf. Mendoza, 2007).

Différentes expérimentations ont ainsi été menées, chacune observant le fonctionnement de l'horloge des NSC via le suivi du rythme de sécrétion endogène de mélatonine (Matthews *et al.*, 1992). Ces expérimentations ont été regroupées en deux parties en fonction de leurs objectifs. Ainsi les expérimentations regroupées dans la première partie avaient pour objectif l'identification des effets de l'état d'engraissement des animaux (tels que décrit ci-dessus)

tandis que l'expérimentation présentée en seconde partie avait pour objectif la détermination de l'implication de la voie AMPK dans la transmission des effets du statut nutritionnel.

Notre hypothèse de travail était que la perturbation de l'horloge circadienne des NSC pouvait en partie transmettre les effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction des ovins. Cette implication pourrait être directe via des perturbations de la génération du rythme de sécrétion de mélatonine et/ou indirecte via des perturbations des horloges circadiennes périphériques impliquées dans l'interprétation du signal mélatoninergique.

I. Identifier l'influence du statut nutritionnel sur l'activité des NSC

Le suivi du rythme endogène de sécrétion de mélatonine en fonction du statut nutritionnel a été réalisé au cours de deux expérimentations distinctes.

La première a utilisé 16 (8 brebis bien nourries vs. 8 brebis restreintes) des 31 brebis Île-de-France engagées dans un protocole déjà présenté (cf. ci-dessus). Au cours de ce dernier et à trois occasions, c'est-à-dire aux solstices d'été (17-Juin) et d'hiver (20-Décembre) de la première année puis au solstice d'été (08-Juillet) de la seconde année de suivi du rythme reproductif, le rythme de sécrétion de mélatonine était suivi chez ces animaux pendant 24 heures en conditions photopériodiques ambiantes puis pendant 24 heures en obscurité constante le lendemain. Les objectifs de cette expérimentation étaient d'observer d'éventuels effets du statut nutritionnel associés avec une modulation des profils saisonniers de reproduction :

- i) Sur les paramètres du rythme journalier de sécrétion de mélatonine c'est-à-dire sur la traduction du signal photopériodique.
- ii) Sur les paramètres du rythme endogène de sécrétion de mélatonine c'est-à-dire sur l'interprétation du signal photopériodique.

La seconde expérimentation concernait 10 brebis Île-de-France placées sous un régime photopériodique neutre (12h:12h). Au cours d'une première partie les brebis étaient toutes maintenues à un état d'engraissement moyen. Le rythme endogène de sécrétion de mélatonine était alors suivi de façon continue pendant 72 heures en obscurité constante. Pour sa seconde partie la moitié des animaux était placée à un faible état d'engraissement selon le protocole alimentaire décrit ci-dessus. Le rythme endogène de sécrétion de mélatonine était de nouveau

suivi selon un protocole expérimental similaire à celui de la première partie. Les objectifs de cette seconde expérimentation étaient :

- i) Identifier les effets propres au statut nutritionnel en suivant le rythme de sécrétion de mélatonine avant et après restriction alimentaire.
- ii) Observer avec une bonne précision les éventuels effets du statut nutritionnel sur la période du rythme endogène de sécrétion de mélatonine.
- iii) Confirmer les résultats de la première expérimentation.

1. Résultats

La première expérimentation n'a pas permis de mettre en évidence un effet répétable du statut nutritionnel sur les moments de fin et de reprise du rythme journalier et endogène de sécrétion de mélatonine. En revanche les concentrations plasmatiques de mélatonine apparaissaient comme étant systématiquement plus faibles chez les brebis maintenues à un faible état d'engraissement en comparaison de celles des brebis maintenues à un état d'engraissement moyen (**Figure 27**).

Quant aux résultats de la seconde expérimentation, ils ne démontrent pas d'effet net de la chute de l'état d'engraissement ($p > 0,05$) ou d'un faible état d'engraissement ($p = 0,10$) sur la période du rythme endogène de sécrétion de mélatonine. En revanche l'état d'engraissement influence significativement l'amplitude du rythme endogène de sécrétion de mélatonine ($p < 0,05$), chez les brebis restreintes ce paramètre est plus faible en comparaison de celui des brebis bien nourries.

2. Conclusion

Les résultats de ces deux expérimentations sont concordants en identifiant un effet de l'état d'engraissement des brebis sur les concentrations plasmatiques nocturnes de mélatonine ou sur l'amplitude du rythme endogène de sécrétion de mélatonine. Ce paramètre n'est vraisemblablement pas sous le contrôle direct de l'horloge circadienne des NSC et impliquerait des perturbations de l'activité métabolique de la glande pinéale.

L'absence d'effets de l'état d'engraissement sur les moments de transitions entre périodes de sécrétion ou d'absence de sécrétion de la mélatonine ou sur la période du rythme endogène de

sécrétion de mélatonine semble également écarter tout effet de la nutrition sur l'activité circadienne des NSC.

Reste à déterminer cette perturbation dans l'interprétation du signal photopériodique en fonction de l'état d'engraissement peut jouer un rôle fonctionnel dans la transmission des effets modulateurs de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction des ovins.

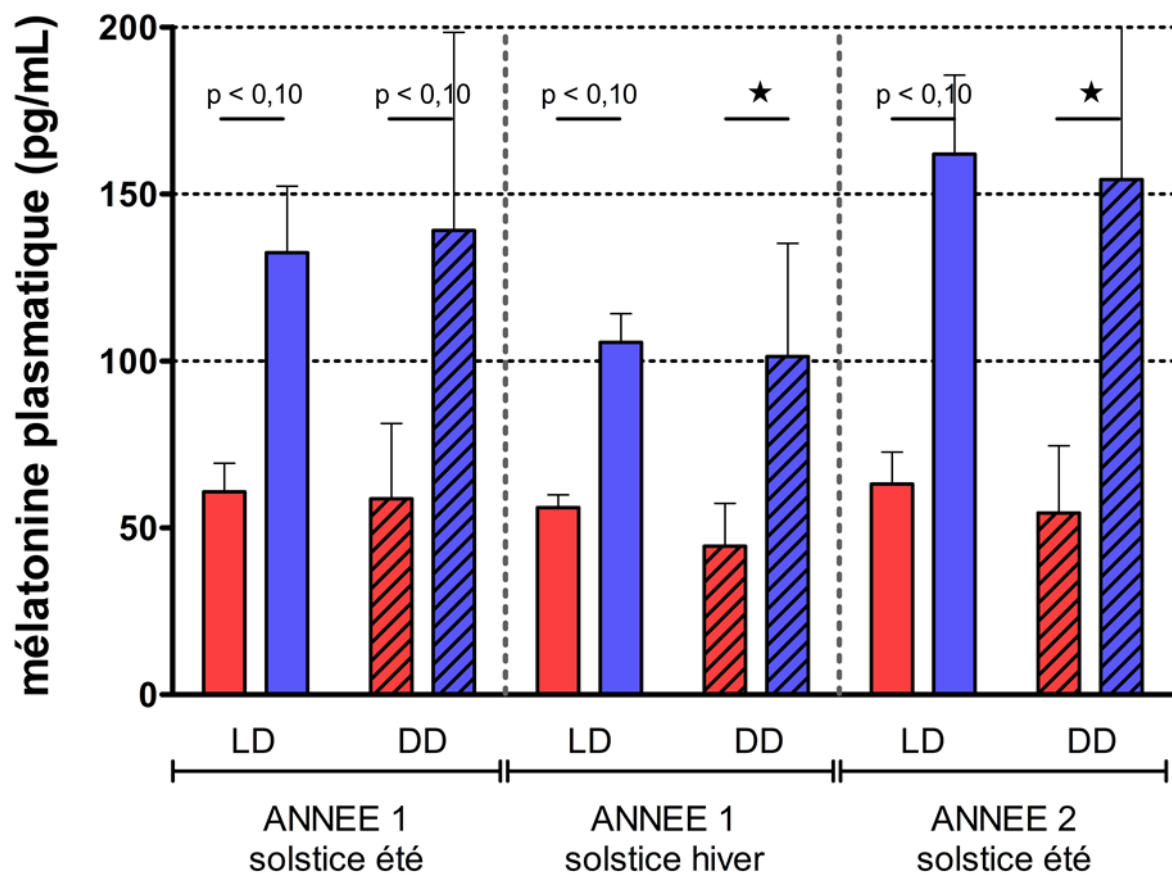


Figure 27 Concentrations plasmatiques moyennes (\pm sem) de mélatonine chez 16 brebis Île-de-France (8 bien nourries en bleu et 8 restreintes en rouges) suivies pendant 24 heures en rythme L:D ambiant (barres pleines) puis le lendemain en obscurité constante (barres hachurées) à différents moments de l'expérimentation présentée en Première partie – *Article 1*. * : $p < 0,05$.

The effect of nutrition on the endogenous rhythm of melatonin secretion in sheep

Jean-Baptiste Menassol^{1,2,3,4}, Laurent Oujagir^{1,2,3,4}, Armelle Collet^{1,2,3,4}, Didier Chesneau^{1,2,3,4}, Benoît Malpoux^{1,2,3,4}, Rex J. Scaramuzzi^{1,2,3,4,5}.

¹. INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

². CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

³. Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

⁴. IFCE, F-37380 Nouzilly, France

⁵. Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, Herts, UK

Abstract

In sheep, nutrition interacts with the photoperiod to modulate seasonal reproductive patterns. Similarly, studies in rodents suggest that the master circadian pacemaker located in the suprachiasmatic nucleus is a putative site of integration of nutritional cues. Since the SCN clock drives the secretion of melatonin we investigated whether a dietary restriction could alter daily and circadian (monitored before and after feeding restriction) patterns of melatonin secretion, monitored over 24 and 72 hrs respectively, in the Ile-de-France sheep.

The circadian rhythm of melatonin had a mean period close to 23 hrs which confirmed previous studies in sheep. The timing of transitions in melatonin secretion under daily light/dark regimes was not modified by nutrition. Concerning the period of the endogenous rhythm of melatonin secretion, the ewes that experienced dietary restriction tended ($p < 0.10$) to have a longer period (i.e. close to 24 hrs) in comparison with the ewes in the control group. However, this period was not different when compared before and after feeding restriction. Both daily and circadian rhythms of melatonin secretion had their amplitude modulated by nutrition ($ps < 0.05$).

Taken together these results indicate that in sheep the daily and circadian rhythms of melatonin secretion integrate nutritional information. This effect is seen mainly as an effect

on the amplitude of the rhythm. Underlying mechanisms and eventual downstream effects are discussed in this paper.

Introduction

In seasonal breeding species reproductive patterns are the result of the central integration of environmental factors that shape the expression of a circannual reproductive rhythm (Malpaux, 2006). Amongst these factors the photoperiodic cycle is the main synchroniser of the circannual rhythm and exerts its effects on the hypothalamo-hypophyseal axis through the annual variations in the diurnal rhythm of melatonin secretion by the pineal gland (Arendt, 1986; Malpaux *et al.*, 1996). Other factors are considered as secondary cues that act as modulators of the primary photoperiodic signal (Rosa et Bryant, 2003). Indeed in a previous study (Menassol *et al.*, 2012) we have shown that nutritional cues are potent signals that interact with the photoperiodic signal at a central level to alter the timing of the seasonal reproductive transitions.

Nutritional cues are integrated potentially at various levels along the photoperiodic pathway involved in the entrainment of the circannual rhythm of reproduction; one of these putative sites is the circadian clock. Located upstream in the integration of the photoperiodic signal, the circadian clock has a central role by driving both pineal activity (Lincoln *et al.*, 1985) and decoding the melatonin signal in the pars tuberalis (Dardente *et al.*, 2010). In this regard, it is of interest that several pieces of evidence indicate that in mammals the circadian system is sensitive to nutrition (Bass et Takahashi, 2010) and particularly in mice where most studies have been undertaken (Challet *et al.*, 2003; Kohsaka *et al.*, 2007; Mendoza, 2007). Therefore we hypothesized that similar alterations in the circadian system exist in sheep to explain the observed shifts in seasonal reproductive transitions caused by nutrition.

In order to test this hypothesis we performed continuous and precise monitoring of the melatonin rhythm over three consecutive days in constant darkness before and after feeding restriction in ewes of the Ile-de-France breed. In fact under conditions of constant darkness the activity of the pineal gland is the sole expression of the endogenous drive from the master circadian pacemaker located in the suprachiasmatic nucleus of the anterior hypothalamus (Lincoln *et al.*, 1985). Thus any effect of nutritional treatment on the master circadian pacemaker would result in alterations of the circadian rhythm of melatonin secretion.

Moreover, during an already published study (Menassol *et al.*, 2012) we monitored the 24h rhythm of melatonin secretion under a normal light/dark cycle in two groups of ewes with different nutritional statuses. This pre-experiment was conducted to assess whether nutrition could alter daily melatonin rhythm in association with the modulation of the seasonal reproductive patterns in sheep.

Material and methods

All procedures were approved by the French Agricultural and Scientific Research Agencies for Animal Ethics and they were all conducted in accordance with EU guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

General

The pre-experiment was conducted on thirty-one Ile-de-France ewes used in a previous experiment (Menassol *et al.*, 2012). This pre-experiment was conducted over 24 hrs at the summer solstice during the second year of a nutritional regime that maintained the animals in two nutritionally-different groups. Animals were housed in groups of 5 to 9 animals maintained in four light-control rooms of 21 m². The lighting program mimicked the local ambient photoperiod (48°N) and was operated by fluorescent lighting that provided at least 300 lux at head level and total darkness at night.

In the main experiment ten sexually mature Ile-de-France ewes, from the INRA breeding flock were assigned to two groups balanced for live weight, body condition score, age and night-time plasma concentrations of melatonin. In mid-February (i.e. increasing short days and at the end of the breeding season for this breed (Menassol *et al.*, 2012)) animals were transferred from outdoor into a light-control room. Animals were housed in individual pens of 0.9 m² under 12/12 light/dark (L:D) conditions. Contacts with rams or their odours (for example on clothing) were rigorously avoided during the study and social interactions among ewes were limited to ewes of the same treatment group because social interactions are known to modify the seasonal patterns of reproduction (Martin *et al.*, 2004).

Diets and nutritional management

The ewes were weighed (LW) and their body condition score (BCS) recorded regularly; BCS was determined using a scale of 0 (emaciated) to 5 (grossly obese) (Russel *et al.*, 1969). From mid-February to the end of March (*period 1*) the ewes were fed individual diets designed to maintain their BCS at 3.0 for each group. At the beginning of April (*period 2*) diets were re-designed to achieve different nutritional statuses between the two groups with target median BCSs of 1.75 (restricted group; WF-R) and 3.0 (well-fed group; WF-WF). For each period the diet consisted of a single feed made from pelleted dehydrated lucerne, straw and sugar cane treacle with nutritional values of 0.97 Mcal of net energy and 63.6 g of metabolizable protein per kilogram of dry matter (DM). The diet was designed using the INRA recommendations for the growth and maintenance needs of adult, non-pregnant ewes (INRA, 2010). The quantity of the diet offered was adjusted to the mean LW of the animals in each group. Therefore, during *period 1* the ewes were fed at 100-110 % of their energy maintenance needs (1.40 ± 0.07 kg of feed per animal), which corresponded to an average daily intake of 1.12 ± 0.03 Mcal of net energy and 74.3 ± 1.7 g of metabolizable protein. During *period 2* the quantities offered were unchanged for the ewes in the WF-WF group and the ewes of the WF-R group were fed at 40 % of their energy maintenance needs (0.53 kg of feed per animal), which corresponded to an average daily intake of 0.44 Mcal of net energy and 28.8 g of metabolizable protein. The diet for the ewes in the WF-R group was designed to have a minimum effect on protein requirements. Feed was offered once a day, in the morning, and ewes had free access to water and mineral licks to provide essential micro-nutrients.

Experimental design

Pre-experiment

The pattern of melatonin secretion was monitored in ewes from well-fed (WF_{pe}; n = 19) and restricted (R_{pe}; n = 12) groups by determining the concentration of melatonin in samples of jugular venous blood collected hourly for 24 hrs (from 04:45 to 04:45 the next day) when the ewes were experiencing long-days (16:8 L:D cycle).

Period 1 and Period 2

Ovarian activity was monitored in ewes from the WF-WF (n = 5) and WF-R (n = 5) groups by determining the concentration of progesterone in samples of jugular venous blood collected twice a week for the duration of the study. Glucose concentrations were monitored by determining the concentration of glucose in an additional sample of jugular venous blood collected weekly immediately before feeding.

The endogenous rhythm of melatonin secretion was monitored before (16th-19th March in *period 1*) and after (19th-22nd July in *period 2*) feeding restriction in ewes from WF-WF (n = 5) and WF-R (n = 5) groups by determining the concentration of melatonin in samples of jugular venous blood collected for 72 hrs in constant darkness. For these two periods the sampling procedure was similar. The day before, each ewe was fitted with an indwelling catheter (1.19 mm i.d., 1.70 mm o.d.; Dutscher, Brumath, France) in each jugular vein. Thereby each jugular was connected to a peristaltic pump (Dutscher, Brumath, France) that was used to sample blood (right jugular) or infuse a saline solution (left jugular), the sampling/infusion flow was set to 8.1 mL/h. Heparin sodium (Sanofi-Aventis, Paris, France) was used to prevent blood coagulation in the catheters as a bolus (15,000 IU) delivered prior sampling and as a continuous infusion of 10,000 IU/h added to the saline solution (adapted from (Zarazaga *et al.*, 2010)). High levels of circulating heparin and surgical complications at the time of catheter implantation caused the formation of oedema at the level of the jugular in two ewes of the WF-WF group (one per sampling period) that eventually died at the end of the sampling period. The sheep that died during the first period was immediately replaced.

Blood sampling and assays

Pre-experiment

The blood (2.5 mL) was collected via an indwelling jugular catheter, placed in tubes containing 100 IU heparin and the plasma was separated by centrifugation (3700 g, 20 min, 4 °C) and stored at - 20 °C.

Period 1 and Period 2

Blood samples (3 mL) taken by jugular venipuncture were used to determine the concentrations of progesterone and glucose. They were always collected before feeding and placed in heparinised tubes to monitor progesterone (Sodium Heparin 17 IU/mL; Vacutainer®, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) and in tubes containing inhibitors of glycolysis to monitor glucose (Sodium Fluoride 2.5 mg/mL and Potassium Oxalate 2 mg/mL; Vacutainer®, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA); these samples were managed as described above. For periods of continuous blood sampling, each sample corresponded to 20 min of collection (2.7 mL). After collection, the blood was placed in tubes containing 100 IU of heparin; these samples were managed as described above.

Progesterone

Progesterone was assayed singly in 10 µL of plasma using a double antibody enzyme-linked immunosorbent immunoassay (ELISA) (Canepa *et al.*, 2008). The sensitivity of the assay averaged 0.25 ± 0.08 ng/mL and the intra-assay coefficient of variation (CV) was 7 %.

Glucose

Glucose levels were determined singly in 50 µL of plasma using a standard glucose enzymatic assay kit (GAGO20; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The sensitivity of the assay averaged 0.020 ± 0.005 mg/mL and the intra-assay CV was 2.8 %.

Melatonin

Melatonin was assayed using a radioimmunoassay (RIA) described by Fraser *et al.* [20], with an antibody raised by Tillet *et al.* [21]. The assay sensitivity was 4 pg/mL, the intra-assay CV ranged between 4-11 % and the inter-assay CV was 7 % (5 assays).

Methods used to calculate end points

Ovarian activity

An animal was considered cyclic if the plasma concentration of progesterone was above 1 ng/mL in at least two consecutive samples suggesting the presence of a functional corpus luteum.

Melatonin rhythm

The endogenous rhythm of melatonin secretion was characterized by fitting the log-transformed values of plasma melatonin concentrations to the sinusoidal function:

$$y = y_0 + a \sin(2\pi x \div b + c)$$

In this function “y” is the log-transformed value of plasma melatonin concentrations (pg/mL) at time “x” (min), “y₀” the mean plasma concentration of melatonin, “a” the amplitude, “b” the period and “c” the phase. These parameters were estimated by a non-linear regression using the SigmaPlot software (Systat Software Inc., Cranes Software International Ltd., Illinois, USA). To determine the periods of melatonin secretion melatonin profiles were analysed using the method of Malpoux et al. (Malpoux *et al.*, 1988b).

Statistical analyses

Data are presented as the means ± the standard error of the means (SEM) except for BCS data, which are presented as medians ± inter-quartile ranges. All analyses were performed using the statistical analysis software SPSS (SPSS Inc., IBM Company Headquarters, Illinois, USA). Data were analysed using either a one-way or a two-way ANOVA. Data that were not normally distributed were analysed using the non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA followed by the Mann-Whitney U-test for paired comparisons. Differences were regarded as significant at $p < 0.05$.

Results

Body Condition Score and Weight

Pre-experiment

At the summer solstice the ewes in the WF_{pe} group had higher median BCS and mean LW in comparison with the ewes in the R_{pe} group (BCS: 2.83 ± 0.50 vs. 1.92 ± 0.23 and LW: 69.6 ± 1.6 kg vs. 52.7 ± 1.7 kg; $p_s < 0.001$).

Period 1 and Period 2

In *period 1*, during the monitoring of the endogenous rhythm of melatonin secretion the ewes in the WF-WF and WF-R groups had similar median BCSs (3.25 ± 0.38 vs. 3.25 ± 0.50 respectively; $p > 0.05$) and mean LWs (54.0 ± 2.3 kg vs. 49.0 ± 2.7 kg respectively; $p > 0.05$). After dietary restriction, during the monitoring of the endogenous rhythm of melatonin secretion in *period 2* the ewes in the WF-R group had lower median BCS (2.88 ± 0.25 vs. 1.88 ± 0.31 ; $p < 0.001$) and mean LW (59.2 ± 1.7 kg vs. 44.2 ± 1.8 kg; $p < 0.001$). Therefore during the experimental period there was a significant effect of nutritional status on both BCS and LW ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively), a significant interaction between nutritional status and time for both BCS and LW ($p_s < 0.001$) and a significant effect of time on BCS ($p < 0.001$) (Figure 1).

Ovarian activity

At the beginning of the experiment there were no differences in ovarian activity between groups as the animals had already entered anoestrus except one ewe in the WF-WF group (ewe 82180) that experienced ovarian cycles until the end of *period 1*. At the end of *period 2*, before the second monitoring of the endogenous rhythm of melatonin secretion, there was a resumption of ovarian activity in 4 ewes of the WF-WF group and 2 ewes of the WF-R group (80 % vs. 40 % respectively).

Glucose

During the experiment there were no differences in plasma concentrations of fasting glucose between groups (WF-WF: 0.60 ± 0.01 mg/mL and WF-R: 0.59 ± 0.01 mg/mL; $p > 0.05$), there was a significant effect of time in each group ($p < 0.001$) but there was no interaction between the nutritional groups and time on the plasma concentrations of glucose.

Melatonin secretion

Pre-experiment

The ewes in the *Rpe* group had significantly lower night-time plasma concentrations of melatonin in comparison with the ewes in the *WFpe* group (153.51 ± 27.08 pg/mL vs. 78.35 ± 13.44 pg/mL; $p < 0.05$) (Figure 2). There were no differences between groups in the timing of the end and re-start of melatonin secretion and both were closely related to lighting transitions (data not shown).

Period 1 and Period 2

The sinusoidal function suited the mathematical modelling of the endogenous rhythm of melatonin secretion in the ewes of both nutritional groups (Figure 3A and 3B). Three phases of secretion were seen in each ewe over the 72 hrs monitoring, with some ewes (82180, 82244, 82037 and 82211) experiencing an additional short period of melatonin secretion between phases 2 and 3 (Figure 3A and 3B). Finally the period of this rhythm was different for each ewe indicating that it was not synchronised by any environmental cue and was the expression of the endogenous circadian control over pineal activity.

Period 1

During *Period 1* there were no differences in the period of the endogenous rhythm of melatonin secretion between nutritional groups (WF-WF: 22.69 ± 0.40 h and WF-R: 23.23 ± 0.19 h; $p > 0.05$) (Figure 3A and 3B). Likewise during periods of secretion there were no differences in the night-time plasma concentrations of melatonin between nutritional groups (WF-WF: 168.29 ± 61.22 pg/mL and WF-R: 142.81 ± 41.06 pg/mL; $p > 0.05$) (Table 1).

Period 2

During *Period 2* there was only a trend toward significance for the ewes in the WF-R group to have a longer period for their endogenous rhythm of melatonin secretion (22.75 ± 0.30 h vs. 23.58 ± 0.20 h; $p = 0.10$) (Figure 3A and 3B). During periods of secretion, the plasma concentrations of melatonin were lower for the ewes in the WF-R group (157.87 ± 37.04 pg/mL vs. 76.62 ± 21.16 pg/mL; $p < 0.05$) (Table 1).

Period 1 vs. Period 2

Comparing the endogenous rhythm of melatonin secretion in *period 1* and *period 2* there were no differences in the period of this rhythm for both WF-WF and WF-groups (Figure 3A and 3B). In the ewes of the WF-R group only one animal (ewe 82211) had a shorter period of its endogenous rhythm of melatonin secretion after feeding restriction (23.76 h vs. 22.79 h). During periods of secretion, the plasma concentrations of melatonin were similar for the ewes in the WF-WF group (Table 1). However the plasma concentrations of melatonin were lower in *period 2* for the ewes in the WF-R group ($p < 0.05$) (Figure 4).

Discussion

The present results establish that nutrition altered the daily light/dark and endogenous rhythms of melatonin secretion in the Ile-de-France sheep. More precisely, nutrition affected the amplitude of this rhythm while having little or no effect on its period. Any effect of nutrition on one of these two main features of the rhythm ultimately corresponds to an alteration in pineal activity; however the underlying mechanisms and their downstream effects are distinct according to which feature is altered. On one hand any effect on the period underlies alterations in the circadian system and potential effects on the transmission of the photoperiodic information (Dardente *et al.*, 2010). On the other hand the integration of nutritional cues on the amplitude of this rhythm and resulting conflicts with the photoperiodic signal are yet to be determined.

In regard with previous studies in sheep (Almeida et Lincoln, 1982; Ebling *et al.*, 1988; Maeda et Lincoln, 1990) this study provides a more detailed conceptual analysis of the circadian rhythm of melatonin secretion; it confirms that the endogenous rhythm of melatonin secretion is ultradian (i.e. with a period < 24 hrs) with a mean period close to 23 hrs (22.92 h)

under normal nutritional conditions. There was only a trend toward significance for the ewes that experienced a dietary restriction in *period 2* to have a longer period of the rhythm of melatonin secretion, close to 24 hrs (23.6 h). However this effect was not significant when periods were compared before and after feeding restriction. Thus the results concerning the effect of nutrition on the period of the rhythm of melatonin secretion remain inconclusive.

The patterns also reveal in four out of ten ewes (WF-WF: 82180, 82244 and 82037; WF-R: 82211), short periods of secretion occurring between phases 2 and 3. Because of their recurrence in animals between the two periods as well as their asynchronous nature among animals, these short periods of secretion are likely to be non-artefactual. However they are difficult to interpret, since earlier studies have not reported this kind of event and because they require the use of mathematical modeling to analyze the patterns of secretion. They were not associated with food restriction and could be the result of the decompression of the molecular events underlying the mechanisms of photoperiodic entrainment of the SCN following the transfer under conditions of constant darkness (Hofman et Swaab, 2002; Lincoln *et al.*, 2002).

Since the period of the melatonin rhythm was not clearly affected by nutrition this strongly suggests that both environmental and endogenous drives of transitions in pineal activity are not sensitive to the nutritional conditions of our experimental protocol. This result is in contrast with studies in rodents where caloric restriction had phase-shifting effects on the daily rhythm of melatonin secretion (Challet *et al.*, 1997b) and was a potent disruptor of the circadian machinery and circadian output from the NSC (Mendoza, 2007).

Three main hypotheses may account for these differences between sheep and rodents:

- Firstly, if we consider that the relative roles of light and circadian output from the SCN in driving pineal activity vary between these mammals (Stehle *et al.*, 2001). Then one can hypothesize that in sheep a strong inhibitory effect of light upon pineal activity could mask this effect under daily light/dark cycles.

- Secondly, since the sensitivity of the suprachiasmatic clock to nutritional signals may vary between species, the nutritional conditions of our experiment may have been inappropriate to affect the SCN clock in sheep.

These first two assumptions dwell upon a potential “masking” effect of both pineal and SCN sensitivities on the expression of nutritional effects on the circadian system of sheep.

- A third hypothesis is the unresponsiveness of the suprachiasmatic clock to nutrition in small ruminants. This could be partly explained by the remarkable capacity of ruminants to withstand hypoglycaemia. This effect could be limited at the level of the suprachiasmatic clock only or at the level of the whole circadian system. In the first case, an effect of nutrition on the circadian system at a post-pineal level could be considered (e.g. in the pars tuberalis (Dardente *et al.*, 2010)). This would imply an uncoupling of peripheral clocks from the master circadian pacemaker as seen in some peripheral structures of mice under conditions of temporally restricted feeding (Damiola *et al.*, 2000). In the second case the effect of nutrition upon seasonal reproduction in sheep would be essentially mediated through non-circadian mechanisms.

This study establishes that the amplitude of the rhythm of melatonin secretion is sensitive to nutrition in sheep; and that such an alteration is associated with shifts in the timing of seasonal reproductive transitions (Menassol *et al.*, 2012). Furthermore it determines that when mean night-time plasma melatonin concentrations fall below a certain threshold (≈ 100 pg/mL) this effect of nutrition diminished and eventually fades. In previous studies in small ruminants both the nature of the dietary restriction (Martin *et al.*, 2002) and the already naturally-low melatonin levels of the animals (mean: 38.4 ± 1.6 pg/mL) (Zarazaga *et al.*, 2011) in rams and goats respectively may have masked this effect.

Different hypotheses may be proposed concerning its underlying mechanisms and eventual physiological effects. Since the release of melatonin is essentially controlled by the SCN clock through central effector neurons in the paraventricular nucleus (PVN), these two structures are likely to be involved in the integration of nutritional information (Saper *et al.*, 2005) as well as the pineal gland itself.

Amongst these structures the PVN is particularly interesting since it is believed to play a major role in the control of the amplitude of the rhythm of melatonin secretion (Kalsbeek *et al.*, 1993; Perreau-Lenz *et al.*, 2003; Perreau-Lenz *et al.*, 2004). Moreover in a recent study we have identified this structure as being also involved in the lowering of the night-time plasma concentrations of melatonin through the activation of the AMPK system (Menassol *et al.*, 2011). Given the role of the AMPK system in the integration of signals on nutritional

status to coordinate metabolic processes (Kahn *et al.*, 2005) we can speculate that this system is involved in the integration of nutritional information within the PVN to lower the amplitude of the rhythm of melatonin secretion. In this scenario a non-circadian mechanism is involved in the integration of nutritional information within the circadian signal that drives pineal activity. Another possibility is that this effect of nutrition on the amplitude of the endogenous rhythm of melatonin secretion is the sole expression of the central activation of AMPK whose main targets are the peripheral brain clocks (e.g. the pars tuberalis) and the circadian disruption of reproductive responses (Coyral-Castel *et al.*, 2008; Hazlerigg et Loudon, 2008).

The role played by the reduction of the amplitude of the rhythm of melatonin secretion can be discussed. Indeed whether this feature of the rhythm carries any environmental information that affects reproductive functions is far from established. Thus this feature of the rhythm does not seem to carry any photoperiodic information (Bittman et Karsch, 1984; Guerin *et al.*, 2000) and under optimal nutritional conditions the seasonal reproductive patterns is not associated with the plasma melatonin concentrations (Zarazaga *et al.*, 2003) in sheep. Furthermore since this effect of nutrition is not present when the endogenous levels of melatonin are already low under standard nutritional conditions, this alteration is probably not obligatory for the transmission of nutritional effects on seasonal reproductive patterns. In fact there is only one study in sheep that reports a correlation between reproductive functions (i.e. a selection for out-of-season fertility) with the amplitude of the nocturnal peak of melatonin (Notter et Chemineau, 2001).

Conclusion

To conclude, the main effect of dietary restriction on the daily and circadian rhythms of melatonin secretion are on its amplitude. While the functional effects of such an alteration are not known, it probably merely consists of an association with the shortening of the season of reproduction as observed in diabetes in rats and humans (Peschke *et al.*, 2006). We suggest that the main effects of nutrition are integrated through the AMPK system and its interactions with the pineal gland and/or peripheral circadian clocks.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Dr Sandrine Fréret, Didier Lomet and Vincent Robert for their technical help. They also thank the staff of the experimental unit of INRA Centre de

Tours (UEPAO) for the care provided to the animals, as well as the staff of the Experimental Hospital (PRC) for surgical procedures. RJS was the recipient of an EU Marie Curie Chair of Excellence (MEXC-CT-2006-042499) and JBM a PhD grant from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

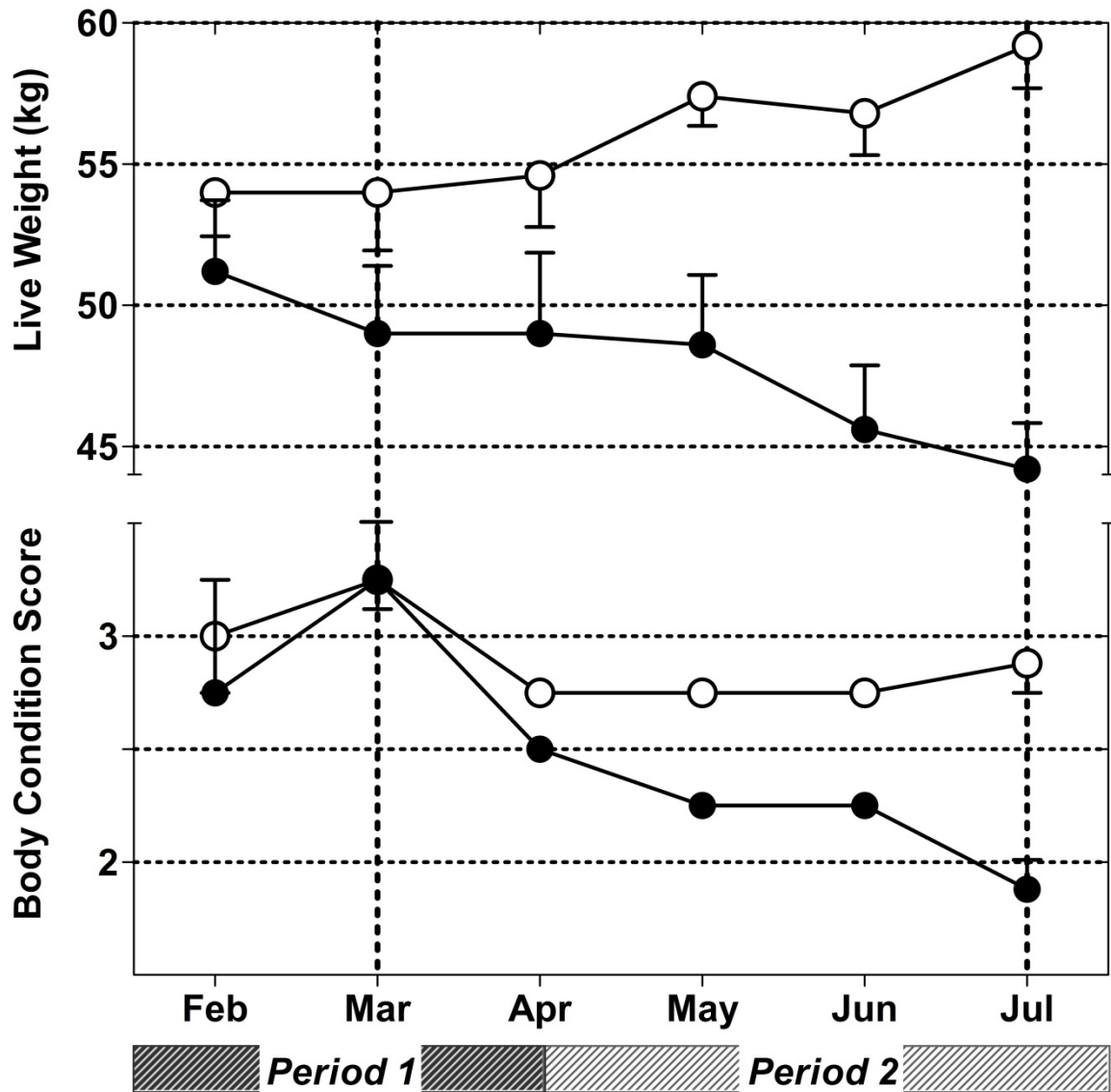


Figure 1 The pattern over *period 1* and *period 2* of LW and BCS in the ewes of the WF-WF and WF-R groups, housed in light-controlled rooms under 12/12 light/dark cycles. Upper panel, mean \pm SEM of LW; lower panel, median \pm interquartile range of BCS for the ewes in the WF-WF (○ [n = 5]) and WF-R (● [n = 5]) groups. The LW and BCS were assessed monthly throughout the experimental period. The vertical dotted lines are indicative of the time of the 72 hrs sampling periods. The x-axis indicates sidereal months.

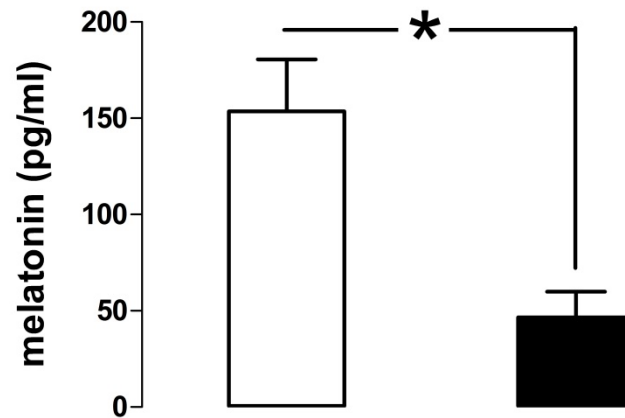
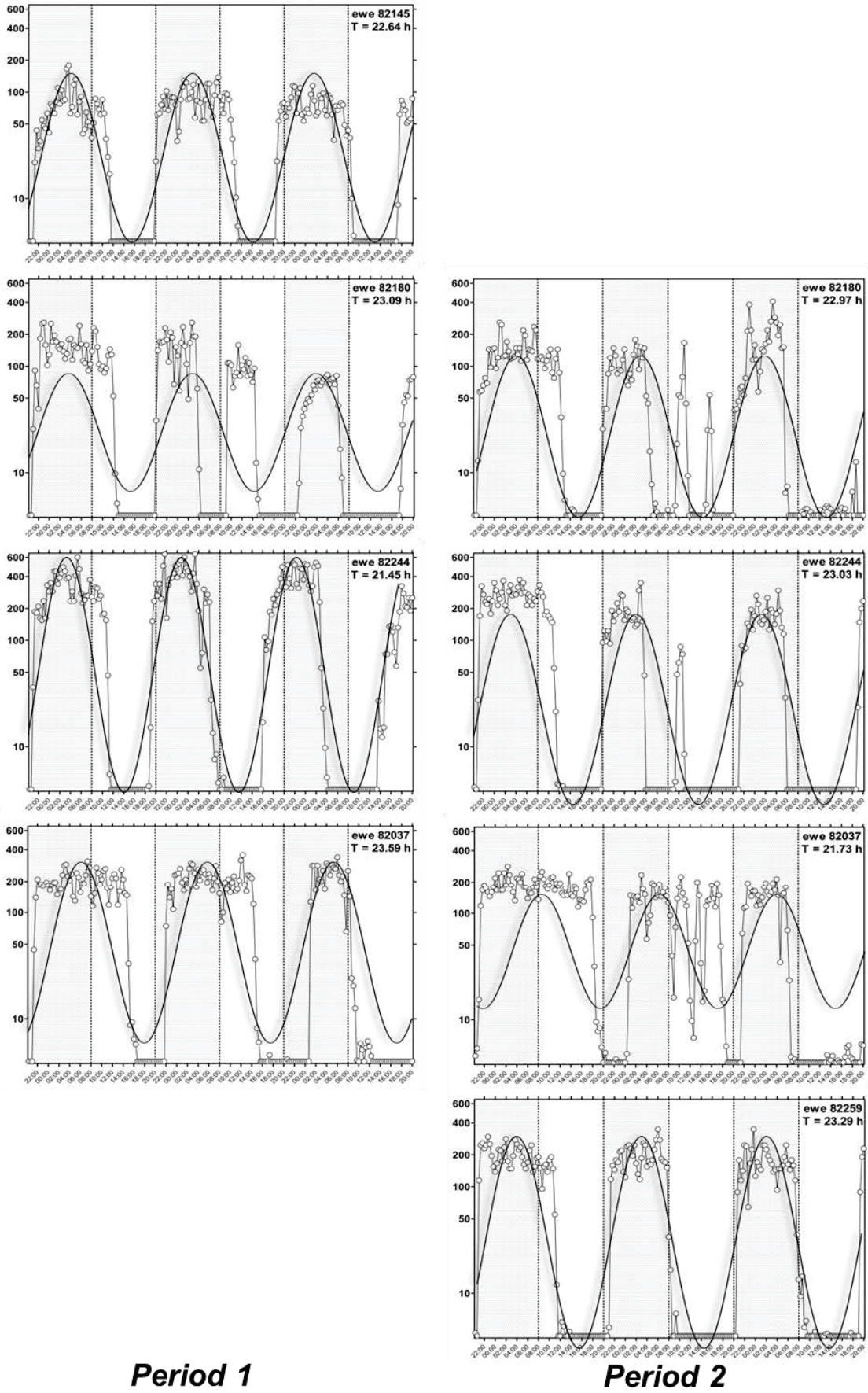


Figure 2 Comparison of the night-time plasma concentrations of melatonin during the pre-experiment between nutritional groups. Mean \pm SEM for the ewes in the WFpe (white bar [n = 19]) and Rpe (black bar [n = 12]) groups. * P < 0.05.

A**melatonin (pg/mL)**

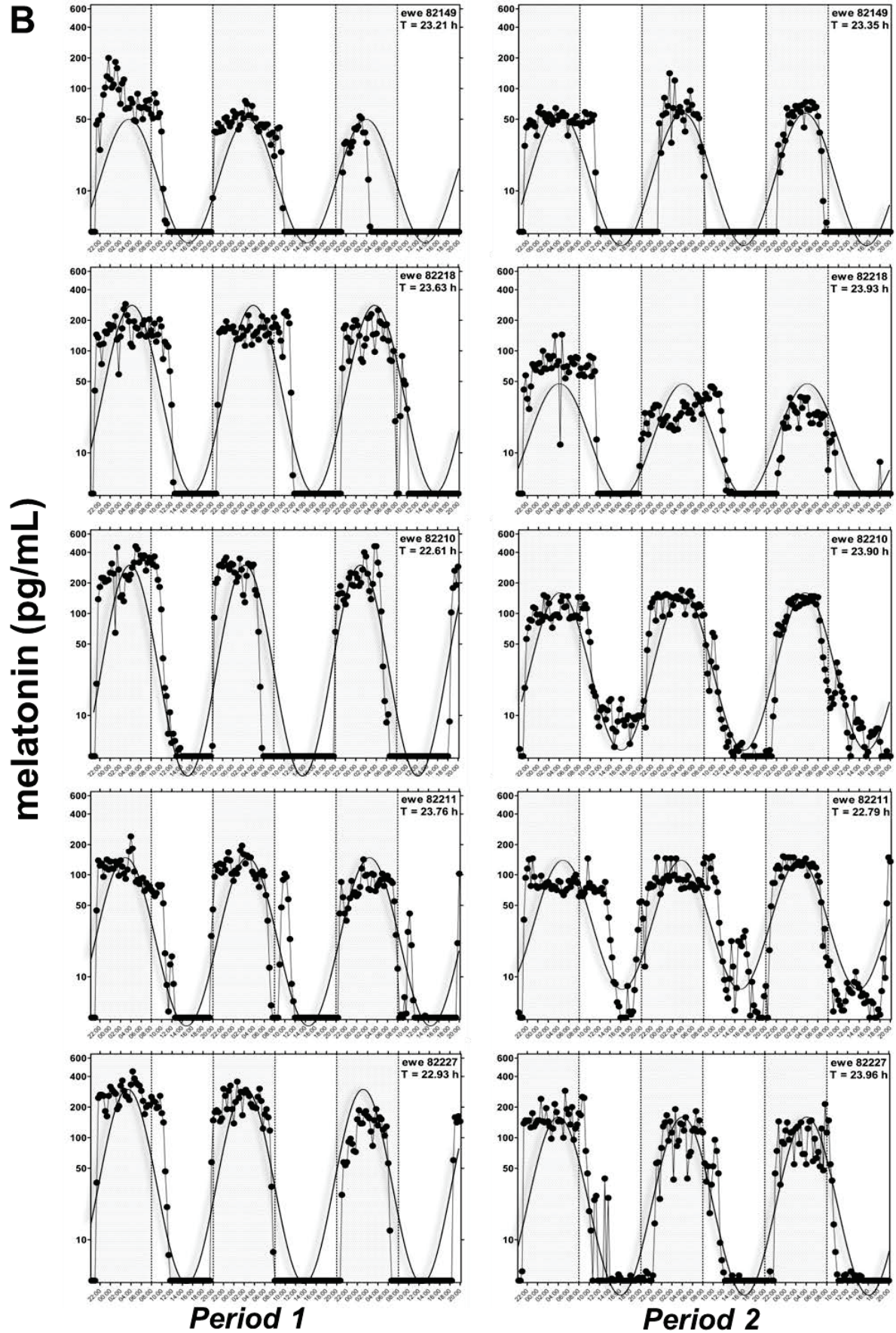
B

Figure 3 The endogenous rhythm of melatonin secretion for each individual and its mathematical modeling during *period 1* and *period 2*. A: individual patterns for the ewes in the WF-WF group (○ [n = 5]); B: individual patterns for the ewes in the WF-R group (● [n = 5]). Animals were housed in constant darkness for 72 hrs before (*period 1*) and after (*period 2*) feeding restriction. Each dot is representative of 20 min of continuous blood sampling. The log-transformed data were fitted to a sinus equation (waveform line) using a non-linear regression. With each pattern is indicated the period T (h) of the sinusoidal curve. Shaded areas depict theoretical nights. Ewes 82133 (replaced by the ewe 82259) and 82145 died during *period 1* and *period 2* respectively, therefore their profiles are not available for these periods. Note the log-scale y-axis.

ewe	group	<i>Period 1</i>	<i>Period 2</i>
82145	WF-WF	74.18 ± 2,41	
82180	WF-WF	113.54 ± 5.54	116.09 ± 6.52
82144	WF-WF	284.57 ± 13.48	190.96 ± 8.28
82037	WF-WF	198.24 ± 5.96	147.07 ± 4,60
82259	WF-WF		174.11 ± 5.45
82149	WF-R	58.34 ± 3.33	52.02 ± 1.76
82218	WF-R	147.21 ± 4.72	40.09 ± 2.22
82210	WF-R	226.36 ± 10.43	89.51 ± 3.82
82211	WF-R	90.82 ± 3.68	78.33 ± 2.56
82227	WF-R	192.99 ± 8.34	107.40 ± 5.08

Table 1 The individual mean ± SEM plasma concentrations of melatonin (pg/mL) during *period 1* and *period 2* for the ewes in the WF-WF and WF-R groups. Hatched lines depict missing values.

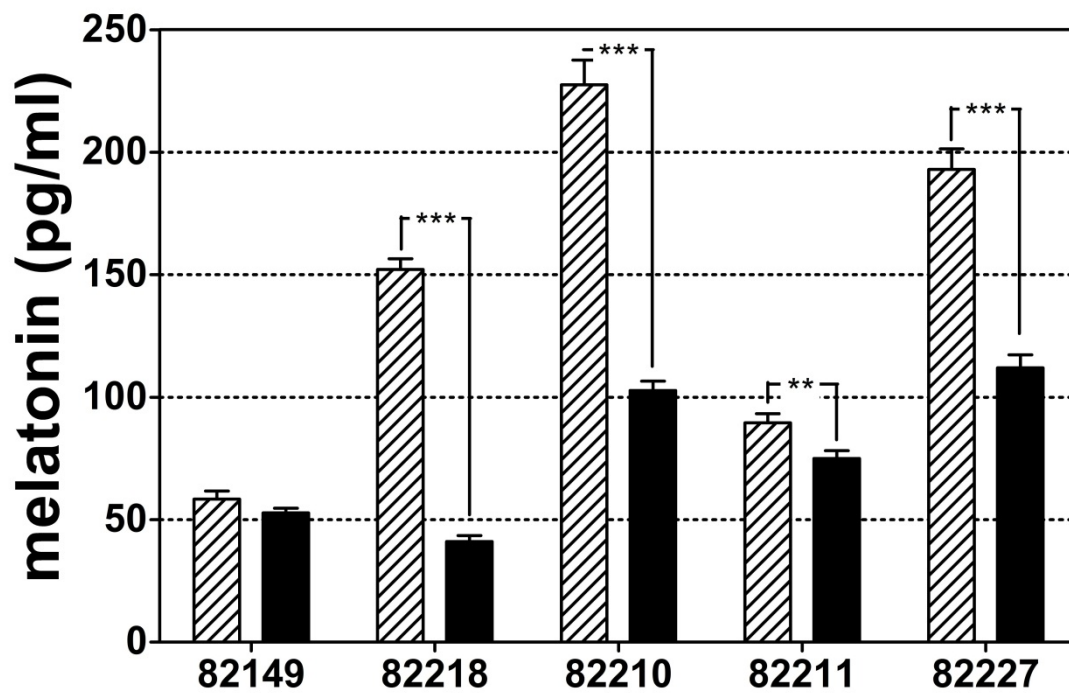


Figure 4 The effect of feeding restriction on the plasma concentrations of melatonin. Mean \pm SEM for each ewe in the WF-R group before (hatched bars; *period 1*) and after (black bars; *period 2*) feeding restriction. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

II. La voie AMPK est-elle impliquée dans la transmission des effets du statut nutritionnel en amont de la voie d'intégration du signal photopériodique ?

Ainsi qu'abordé dans la revue bibliographique, la voie AMPK permet d'intégrer une information liée au statut énergétique cellulaire au sein de la boucle principale de l'horloge circadienne des mammifères (**Figure 24-A**). L'hypothèse sous-jacente à cette étude était qu'une activation de la voie AMPK pouvait altérer l'horloge circadienne des NSC et ainsi participer à la transmission des effets de la nutrition en amont de la voie d'intégration de la photopériode chez les ruminants.

Deux expérimentations complémentaires ont été menées chez la brebis Île-de-France dont les objectifs consistaient à :

- Déterminer le niveau et les effets de l'activation centrale de la voie AMPK sur le rythme endogène de sécrétion de mélatonine.
- Déterminer si les effets de cette activation pouvaient mimer ceux du statut nutritionnel sur le contrôle de l'activité de la glande pinéale, tels que déterminés ci-dessus.

Au cours de la première expérimentation 8 brebis Île-de-France maintenues à un état d'engraissement moyen (objectif de NEC de 3.0) ont été engagées dans un protocole expérimental croisé. Le rythme endogène de mélatonine était suivi pendant 22 heures en obscurité constante. Trois heures avant le moment théorique du crépuscule (13 heures après le début du suivi) la moitié des animaux recevait une injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) d'un activateur de l'AMPK tandis que l'autre moitié recevait i.c.v. une solution de liquide céphalorachidien (LCR) artificiel ; neuf jours plus tard le même protocole était répété en inversant les groupes d'injection. Deux activateurs de l'AMPK ont ainsi été testés avec un mois d'écart à savoir la metformine puis l'AICAR.

La seconde expérimentation concernait 11 brebis Île-de-France maintenues à un état d'engraissement moyen en conditions photopériodiques ambiantes. Tandis que la moitié des brebis recevait une injection i.c.v. d'AICAR (n = 6), l'autre moitié recevait une injection i.c.v. de LCR artificiel (n = 5). Une heure après l'injection les brebis étaient abattues puis leur encéphale récupéré, conditionné et disséqué en vue de déterminer l'état d'activation de la voie

AMPK dans certaines structures centrales d'intérêt. Cet état d'activation était déterminé par la mesure en western blot du taux de phosphorylation de la protéine AMPK ainsi que celui de l'acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC), une enzyme cible de l'AMPK.

1. Résultats

La première expérimentation a pu déterminer que les concentrations plasmatiques de mélatonine étaient significativement réduites chez les brebis recevant une injection i.c.v. d'un activateur de l'AMPK (metformine : $p < 0,001$ et AICAR : $p < 0,01$) en comparaison des brebis recevant une injection i.c.v. de LCR artificiel. D'un autre côté l'injection i.c.v. des activateurs de l'AMPK était sans effets sur le moment endogène de la reprise de sécrétion de mélatonine.

La seconde expérimentation a mis en évidence un taux de phosphorylation de l'AMPK ($p = 0,10$) et de l'ACC ($p < 0,001$) supérieur dans les noyaux paraventriculaires (NPV) suite à l'injection i.c.v. d'AICAR en comparaison à l'injection i.c.v. de LCR artificiel. De plus dans la glande pinéale seul le taux de phosphorylation de l'ACC était significativement augmenté ($p < 0,05$) par cette même injection.

2. Conclusion

Les résultats de ces deux expérimentations suggèrent que l'activation de la voie AMPK dans les NPV et dans une moindre mesure directement dans la glande pinéale, est responsable de la chute des concentrations plasmatiques de mélatonine. En revanche cette activation est absente dans les NSC et n'altère pas l'activité de l'horloge des NSC.

En conclusion l'activation de la voie AMPK est capable de mimer les effets du statut nutritionnel déterminés ci-dessus sur le contrôle de l'activité métabolique de la glande pinéale.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The effect of an intracerebroventricular injection of metformin or AICAR on the plasma concentrations of melatonin in the ewe: potential involvement of AMPK?

Jean-Baptiste Menassol^{1,2,3,4*}, Claire Tautou^{1,2,3,4}, Armelle Collet^{2,3,4}, Didier Chesneau^{2,3,4}, Didier Lomet^{1,2,3,4}, Joëlle Dupont^{1,2,3,4}, Benoît Malpoux^{1,2,3,4} and Rex J Scaramuzzi^{1,2,3,4,5}

Abstract

Background: It is now widely accepted that AMP-activated protein kinase (AMPK) is a critical regulator of energy homeostasis. Recently, it has been shown to regulate circadian clocks. In seasonal breeding species such as sheep, the circadian clock controls the secretion of an endogenous rhythm of melatonin and, as a consequence, is probably involved in the generation of seasonal rhythms of reproduction. Considering this, we identified the presence of the subunits of AMPK in different hypothalamic nuclei involved in the pre- and post-pineal pathways that control seasonality of reproduction in the ewe and we investigated if the intracerebroventricular (i.c.v.) injection of two activators of AMPK, metformin and AICAR, affected the circadian rhythm of melatonin in ewes that were housed in constant darkness. In parallel the secretion of insulin was monitored as a peripheral metabolic marker. We also investigated the effects of i.c.v. AICAR on the phosphorylation of AMPK and acetyl-CoA carboxylase (ACC), a downstream target of AMPK, in brain structures along the photoneuroendocrine pathway to the pineal gland.

Results: All the subunits of AMPK that we studied were identified in all brain areas that were dissected but with some differences in their level of expression among structures. Metformin and AICAR both reduced ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively) the amplitude of the circadian rhythm of melatonin secretion independently of insulin secretion. The i.c.v. injection of AICAR only tended ($p = 0.1$) to increase the levels of phosphorylated AMPK in the paraventricular nucleus but significantly increased the levels of phosphorylated ACC in the paraventricular nucleus ($p < 0.001$) and in the pineal gland ($p < 0.05$).

Conclusions: Taken together, these results suggest a potential role for AMPK on the secretion of melatonin probably acting through the paraventricular nucleus and/or directly in the pineal gland. We conclude that AMPK may act as a metabolic cue to modulate the rhythm of melatonin secretion.

Background

The serine-threonine kinase, AMPK integrates energy homeostasis at both cellular [1] and whole-body levels [2]. It exists as a heterotrimeric complex of a catalytic α subunit and two regulatory β and γ subunits. In mammals there are two or three isoforms of each subunit ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$), encoded by different genes,

allowing for a variety of heterotrimeric combinations [3]. The treatment with pharmacological agents such as metformin and 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) activates the AMPK complex both *in vitro* and *in vivo* [4-6]. This mechanism is central in the action of metformin when used as an insulin-sensitizing agent to treat type II diabetes [7]. Recent evidence points to an emerging role for AMPK as a critical element linking metabolism and reproduction [8]. Indeed, we demonstrated that treatment with either metformin or AICAR significantly inhibited the release

* Correspondence: jbménassol@gmail.com

¹Physiologie de la Reproduction et des Comportements UMR85, INRA, Nouzilly F-37380, France

Full list of author information is available at the end of the article



© 2011 Menassol et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

of GnRH from immortalised GnRH neurones (GT1-7 cells) and *in vivo*, it shortened the inter-oestrus interval in mice [6]. In sheep as in all seasonal breeding species, the daily rhythm of melatonin secretion is the critical element mediating the synchronising effect of photoperiod on reproduction. This rhythm is endogenously controlled by the activity of the master circadian pacemaker located in the suprachiasmatic nucleus [9]. However, how this endogenous rhythm of melatonin affects the seasonal activity of the GnRH/LH/gonadal axis remains unclear.

Um *et al.* [10] demonstrated that the peripheral activation of AMPK with metformin induced phase-shifts in some of the core clock proteins thus suggesting a role for AMPK in the control of circadian rhythms. In support of these observations we have identified AMPK in the sheep brain and we have tested, the effects of i.c.v. injections of metformin or AICAR on the secretion of melatonin in ewes housed in constant darkness. In parallel, because of the functional interrelationships between melatonin and insulin [11,12], we also monitored the secretion of insulin as a potential metabolic marker of peripheral AMPK activation [13]. Our results suggest that i.c.v. injections of metformin and AICAR both affect the amplitude of the circadian rhythm of melatonin secretion without altering the patterns of plasma insulin secretion.

Methods

Hormones and reagents

The metformin and AICAR used for the i.c.v. injections were obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). The dose injected by means of an intracerebroventricular catheter, was 128 mM for metformin (adapted to sheep from [14]) and 12 mM for AICAR (similar to [6]) in a total volume of 50 μ l. Untreated control ewes were injected with the same volume of an artificial cerebrospinal fluid (CSF) solution, prepared in the laboratory. All solutions had an equivalent osmolarity (\approx 305 mOsm).

Antibodies

Rabbit polyclonal antibodies to phospho-AMPK α Thr172, AMPK α 1/2, AMPK β 1/ β 2, AMPK γ 2, phosphoacetyl-CoA carboxylase (ACC) Ser79 and ACC were purchased from New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, USA). A mouse monoclonal antibody to vinculin was obtained from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) and used as an internal standard.

Animals and experimental designs

Nineteen multiparous ewes were surgically fitted with cannulae in the anterodorsal region of their third ventricles [15]. Animals were housed in individual pens in a

light-sealed room under a lightning program mimicking a long-day photoperiod (LP) (16 hours of light/day). All ewes had free access to food, water and mineral licks.

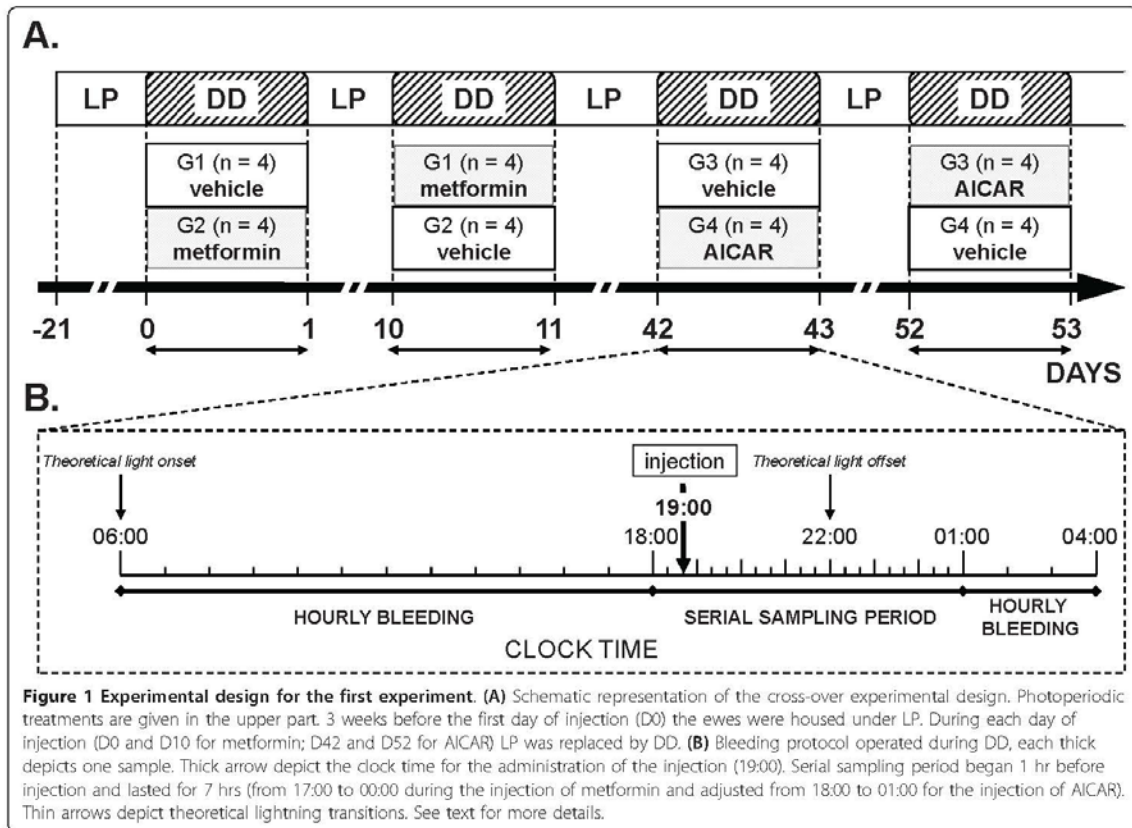
In the first experiment, two groups of ewes (G1, G2, n = 4) balanced for body condition score and live weight were used in a cross-over design so that each group received in random order 9 days apart (day 0 or D0 and D10), either artificial CSF or metformin. Forty days later, groups were re-balanced for their night-time plasma concentrations of melatonin (G3, G4, n = 4), and the experiment was repeated using AICAR with the same cross-over design (D42 and D52) (Figure 1A). For each i.c.v. injection, the ewes were fitted with an indwelling catheter in the left jugular vein and housed in constant darkness (DD) for one whole light/dark (L/D) cycle. The ewes were bled every 60 min for 22 hrs, from 06:00 to 04:00 the next day, with a period of more intensive blood sampling (every 20 min) around the time of the i.c.v. injection at 19:00 (Figure 1B). Blood (3 ml) was collected into heparinised tubes and the plasma was separated by centrifugation (3700 g, 20 min, 4°C) and stored at -20°C.

For the second experiment, two groups of ewes balanced as for experiment 1, were injected with either AICAR (n = 6) or artificial CSF (n = 5). One hour after injection the animals were slaughtered by decapitation, the brain was removed quickly and frozen in isopentane (SDS, Val De Rueil, France). The pituitary (PIT) and pineal (PIN) glands were immediately dissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Frontal sections (1 mm thick) were sliced from the diencephalon and other structures of interest were dissected using a sterile scalpel, all were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The hypothalamic structures of interest (suprachiasmatic nucleus [SCN], arcuate nucleus [ARC], median eminence [ME], paraventricular nucleus [PVN], dorsomedial hypothalamic nucleus [DMH], tanycytes [TAN] and premammillary hypothalamic nucleus [PMH]) were identified using sheep brain atlases [16,17].

All these procedures were approved by the French Agricultural and Scientific Research Agencies and conducted in accordance with the EU guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

Western-blotting

Western-blotting procedures were conducted as previously described [6] using 60 μ g of protein per sample. The data for the phosphorylation of AMPK and ACC are expressed as the ratio of phosphorylated AMPK to total AMPK and phosphorylated ACC to total ACC respectively. The data for the AMPK subunits have been normalised against an internal standard (vinculin).



Assays

Melatonin was assayed using a radioimmunoassay (RIA) described by Fraser *et al.* [18], with an antibody raised by Tillet *et al.* [19]. The assay sensitivity was 4 pg/mL, the intra-assay coefficient of variation (CV) ranged between 9-14% and the inter-assay CV was 12%. Insulin was also assayed using a RIA that was developed in our laboratory. Plasma concentrations of insulin were determined in duplicate 100 μ L samples. The assay buffer was 0.025 M barbital buffer containing 3% bovine serum albumin (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France). Plasma samples were incubated (24 hrs at 4°C) with 300 μ L of the primary antibody (anti-porcine insulin antibody raised in guinea pig, final dilution 1/80000; Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) added with 0.6 μ L of Triton X-100 and 0.5 μ L of normal rabbit serum. Samples were then incubated (24 hrs) with 20,000 cpm of iodinated porcine insulin. The next day, samples were incubated for 48 hrs at 4°C with 2 mL of the secondary antibody (anti-guinea pig IgG raised in horses, final dilution 1/333), 4 g/L of CaCl₂ and 30 g/L of polyethylene glycol. Tubes were then centrifuged (3,000 g for 30 min at 4°C), the supernatant was removed, and the radioactivity in

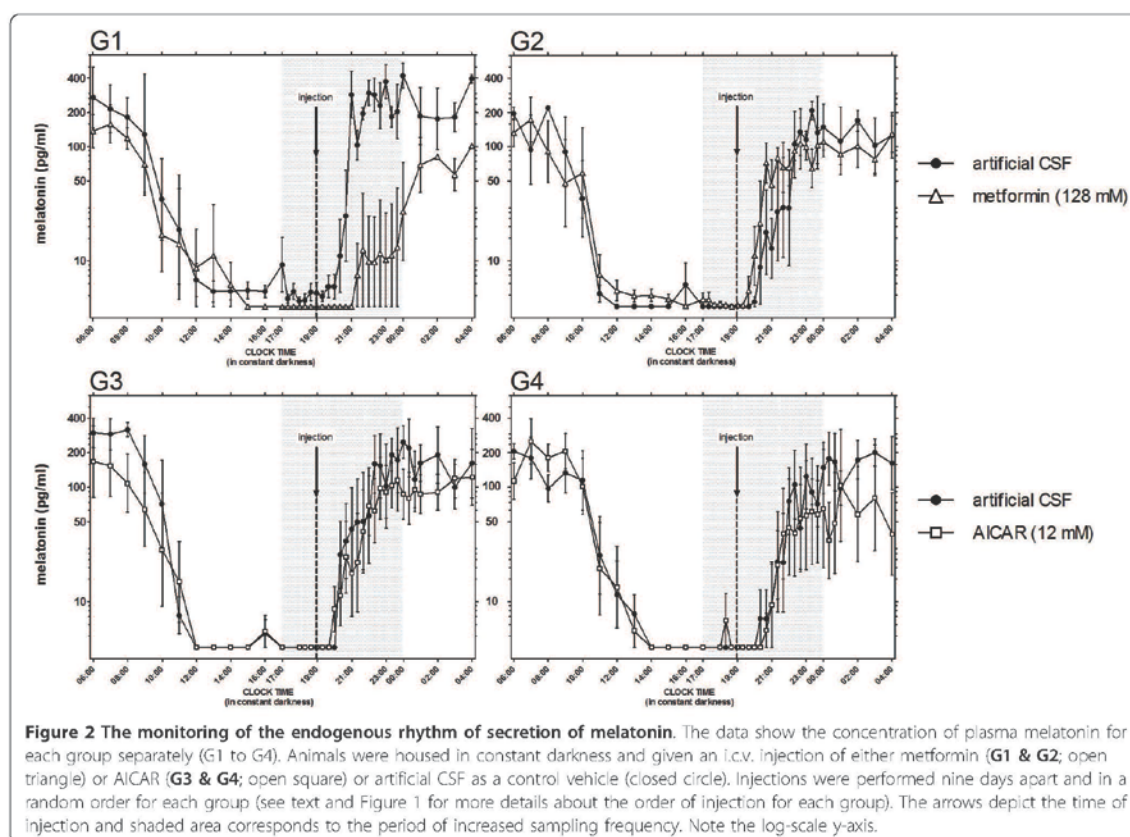
the precipitate was counted with a Wallac Wizard gamma counter (PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) for 1 min. The sensitivity of the assay was 0.95 ± 0.06 ng/mL and the intra-assay CV was 12%.

Data and Statistical analysis

Melatonin profiles were analysed by comparing the timing of resumption and the amplitude, of the circadian rhythm of melatonin secretion. These criteria were determined using the method of Malpoux *et al.* [20]. Statistical analyses were performed using the statistical software package, R [21]. Data for insulin were analysed using a mixed-effects model and other data, after log transformation for normalization, were analysed using an analysis of variance. All results are presented as means \pm sem. Differences were considered statistically significant whenever $p < 0.05$.

Results

The amplitude of the endogenous rhythm of melatonin was reduced significantly by both metformin ($p < 0.001$) and AICAR ($p < 0.01$) (Figure 2) but the timing of resumption was not affected by either (data not shown).



After each i.c.v. injection of metformin at D0 and D10 (Figure 2A), the amplitude of the endogenous rhythm of melatonin was reduced when compared to controls ($p < 0.001$). This was also the case between D0 and D10 for the ewes in G1 ($p < 0.001$), that is those ewes injected first with the vehicle solution, but not for the ewes in G2 that is those ewes injected first with metformin. After injection of AICAR (Figure 2B), the amplitude of the endogenous rhythm of melatonin was reduced at D42 compared to controls ($p < 0.001$) but not at D52. However, when compared between D42 and D52, the amplitude of the endogenous rhythm of melatonin was consistently reduced after the injection of AICAR in both groups ($p < 0.05$). There was no significant effect of metformin or AICAR on the concentrations of insulin (Figure 3).

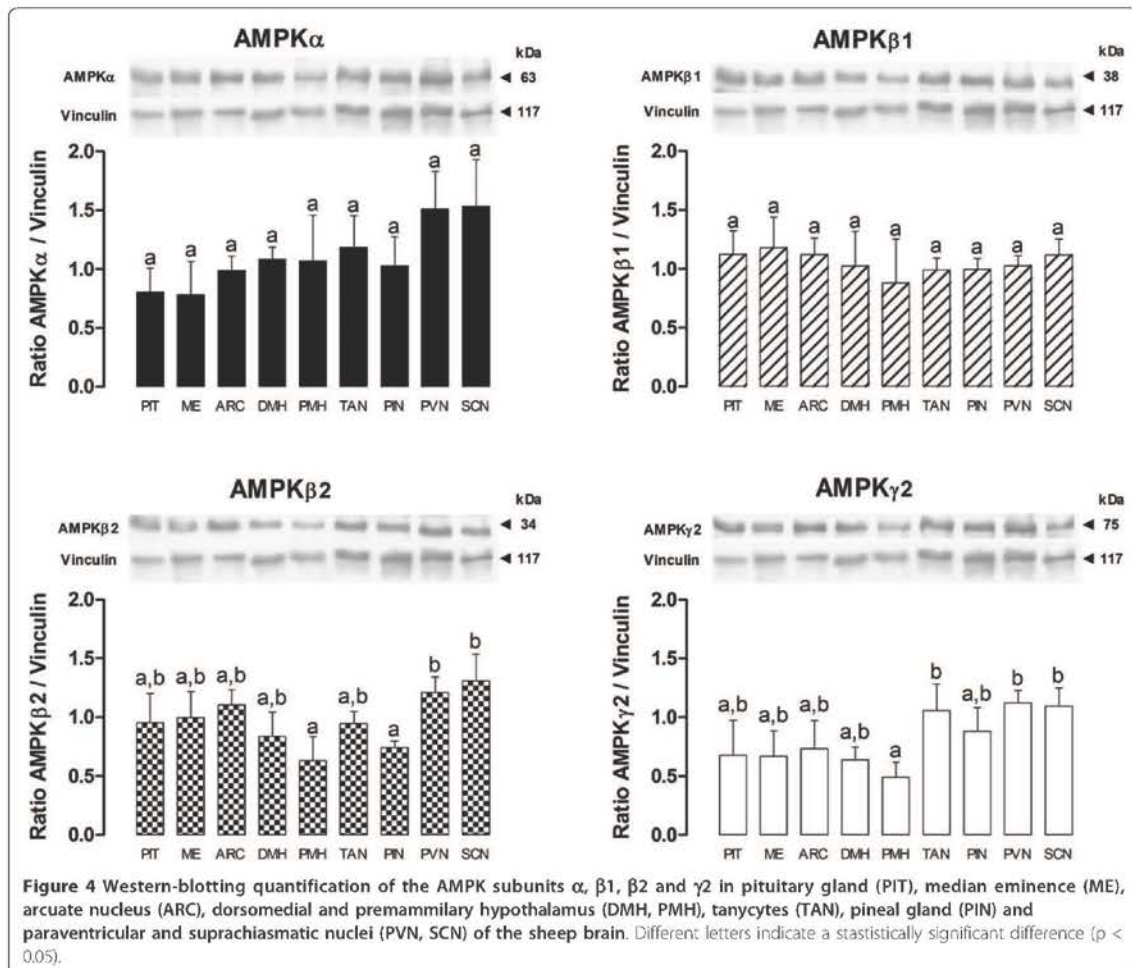
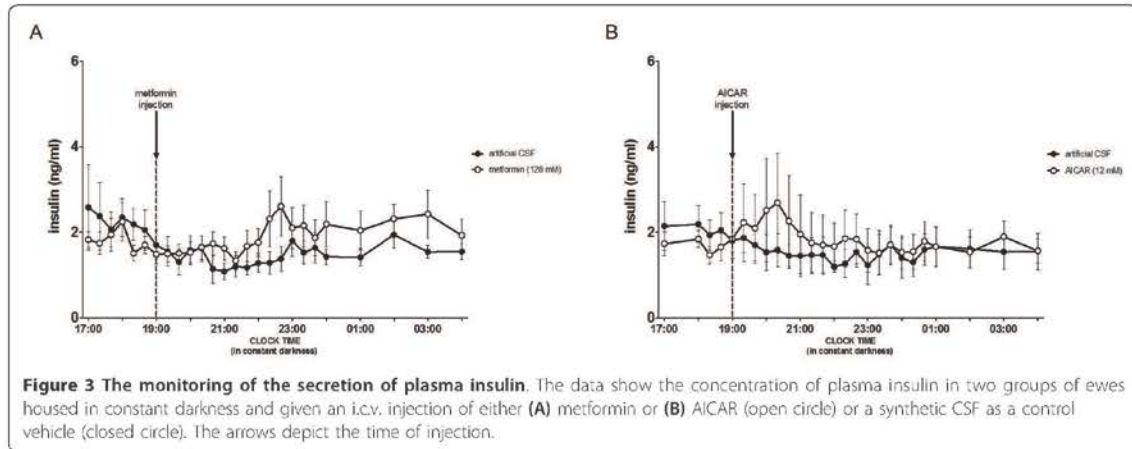
The results of experiment 2 show that the expression levels of the AMPK subunits (Figure 4) were different among hypothalamic structures. The expression of the $\beta 2$ subunit was lower in the PMH/PIN when compared to the PVN/SCN ($p < 0.05$) and the expression of the $\gamma 2$ subunit was lower in the PMH when compared to the

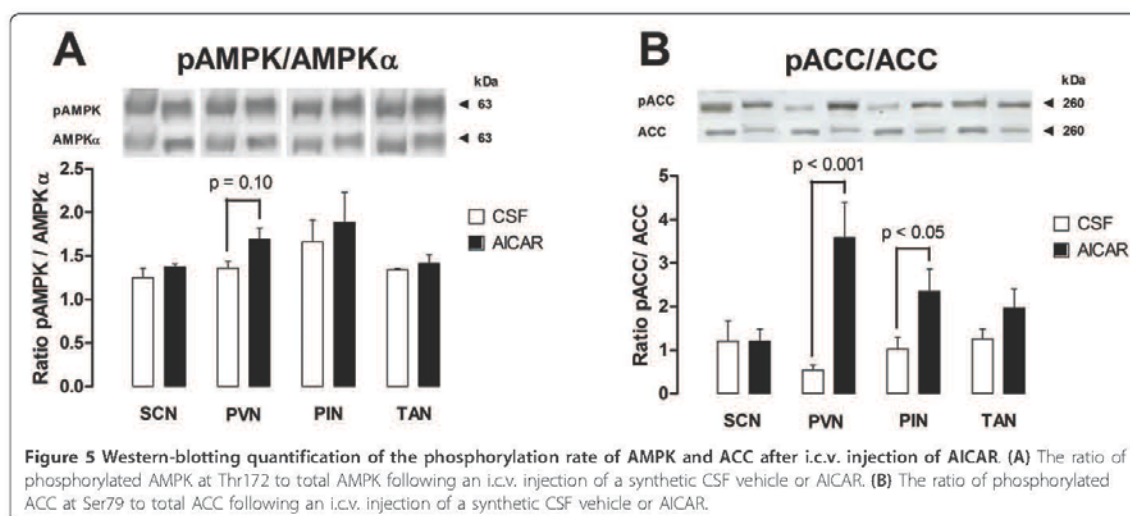
PVN/SCN/TAN ($p < 0.05$). After i.c.v. injection of AICAR, the phosphorylation rate of AMPK tended ($p = 0.1$) to be higher only in the PVN (Figure 5A) but the phosphorylation rate of ACC at Ser79 was significantly higher in both the PVN ($p < 0.001$) and PIN ($p < 0.05$) (Figure 5B).

Discussion

The hypothesis tested in this study, developed from the findings of Um et al. [10], was that central activation of AMPK could disrupt the circadian machinery located in the SCN and thus, alter the endogenous timing of the resumption of melatonin secretion by the pineal gland. In our study, such an effect was not observed after i.c.v. treatment with metformin or AICAR, both known activators of AMPK. Surprisingly we found that another component of the endogenous rhythm of melatonin, its amplitude, was altered by these compounds.

There are three main possibilities to account for the rejection of our hypothesis. First, the i.c.v. treatment with either metformin or AICAR was ineffective and did not stimulate AMPK in the hypothalamic structures we





examined. Indeed, the similarities of the effects between the i.c.v. injections of both drugs on the amplitude of the rhythm of melatonin secretion suggest that they might be mediated by the activation of AMPK, as a common element along their distinct signalling pathways [22]. However, we do not exclude possible AMPK-independent effects [23]. Second, the treatment effectively activated AMPK within the SCN, but in DD when the SCN is released from entrainment by the prevailing LP produced conflicting signals because of the persistence of entrainment by the preceding LP [24] and the expected SCN-driven phase shift in the resumption of melatonin secretion. Third, the treatment effectively activated AMPK but not within the SCN or without triggering phase-shifts in the master circadian machinery perhaps because of functional differences [25] between the master circadian clock and the peripheral-slaves clock that was studied by Um *et al.* [10].

The biological relevance of the lowering effects of both metformin and AICAR on the amplitude of the endogenous rhythm of melatonin is difficult to interpret. Indeed, in sheep as in most photoperiodic species, the duration of melatonin secretion is the critical feature of the rhythm of melatonin secretion that transmits photoperiodic information to the reproductive axis [26]; the role played by the amplitude, the other main feature of this rhythm, remains controversial [27-29]. Some authors have suggested that the amplitude of the melatonin rhythm acts as a potent integrator of environmental factors, other than photoperiod for example, temperature and the food supply (for review see [30]). In relation to this theory, a complementary study (Menassol *et al.*, unpublished data) has established that feed restriction can alter the seasonal reproductive patterns of the Île-de-France ewe as has been

reported in a previous study on sheep [31], and that this alteration is associated with lower concentrations of plasma melatonin. Therefore we speculate that the central activation of AMPK is involved in the integration of metabolic-related cues that alter the amplitude of the rhythm of melatonin secretion. We speculate further that this effect is mediated by neuropeptides or peptidergic hormones that regulate the amplitude of the rhythm of melatonin secretion such as Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide (PACAP) or Vasopressin (VP) (for review see [32]) and particularly Neuropeptide Y (NPY) which is activated by AMPK [33].

The effect of metformin and AICAR on the amplitude of the rhythm of melatonin secretion was not associated with immediate changes in insulin secretion and thus, was not attributable to the interrelationship that exists between these two hormones [11,12,34]. Interestingly, some studies have reported a decrease in melatonin concentrations associated with the development of diabetes [35,36]. Thus, assuming that metformin crosses the blood-brain barrier, one can ask if therapeutic treatment with metformin could not have unreported side-effects on the secretion of melatonin.

The characterization of the expression of AMPK within the hypothalamus, pituitary and pineal glands of the ewes suggests a potentially wide range of action for metformin and AICAR since all subunits were identified in each of the structures that we examined. The differences among structures in the level of expression of the $\beta 2$ and $\gamma 2$ subunits may indicate structural specificities in the sensitivity or functionality of the AMPK complex [2]. Indeed, our investigation of the potential central sites of actions of the AMPK complex, point preferentially to the PVN as a

structure of particular interest because some of its neurons that express melatonin-regulating peptides project to the pineal gland [32]. In this particular structure, the direct assessment of the phosphorylation rate of AMPK only reveals a trend toward significance ($p = 0.1$) for a greater activation after i.c.v. injection of AICAR. However the indirect measurement of AMPK activity, through the assessment of the phosphorylation rate of its downstream target ACC [37,38], shows that AICAR treatment significantly inhibited ACC activity in both the paraventricular nucleus ($p < 0.001$) and the pineal gland ($p < 0.05$). Therefore the PVN is strongly suggested as a key structure that mediates metabolic influences on the rhythm of secretion of melatonin. Moreover, it seems that direct effects of AMPK on the pineal gland activity itself can not be excluded.

In this experiment, the failure to demonstrate significant direct activation of the AMPK complex following treatment with AICAR might be explained by the time elapsed between tissue fixation and injection (1 hr) and the possible action of endogenous phosphatases [39].

Conclusion

To conclude, the i.c.v. administration of AMPK-activators had an unexpected insulin-independent effect on the amplitude of the endogenous rhythm of secretion of melatonin that retrospectively, might have also been observed in natural photoperiodic conditions, on the daily pattern of melatonin secretion. This effect probably involves the AMPK system through the paraventricular nucleus and/or directly within the pineal gland. This mechanism remains to be precisely determined but we suggest that it involves the integration of metabolic-related cues with the photoperiodic signal that synchronizes the annual rhythm of reproduction in sheep.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Dr Laurence Dufourny for her help with brain dissections as Dr Jean-Claude Thiéry for his help in pre-experimental studies. Dr Sébastien Ellis and Christelle Ramé are acknowledged for their technical help. The authors also thank the staff of the experimental unit of INRA Centre de Tours (UEPAO) for the care provided to the animals, as well as the staff of the Experimental Hospital (PRC) for surgical procedures. RJS was the recipient of an EU Marie Curie Chair of Excellence (MEXC-CT-2006-042499) and JBM a PhD grant from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche".

Author details

¹Physiologie de la Reproduction et des Comportements UMR85, INRA, Nouzilly F-37380, France. ²Physiologie de la Reproduction et des Comportements UMR6175, INRA, Nouzilly F-37380, France. ³Université François Rabelais de Tours, Tours F-37041, France. ⁴IFCE, Nouzilly F-37380, France. ⁵Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, Herts, UK.

Authors' contributions

The authors contributed equally to this study. JBM conceived the study, carried out the experiment, collected data, and drafted the manuscript. CT collected data and performed the melatonin assays. AC and DC followed

the experiment and performed melatonin assays. DL performed the injection of drugs and blood sampling. JD, BM and RJS designed the study. JBM, CT, JD, BM and RJS were involved in the analysis and interpretation of the data. JBM and JD revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 22 March 2011 Accepted: 29 July 2011

Published: 29 July 2011

References

- Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D, Small CJ: **AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake.** *J Biol Chem* 2004, **279**(13):12005-12008.
- Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG: **AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.** *Cell Metab* 2005, **1**(1):15-25.
- Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER: **Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system.** *FEBS Lett* 2003, **546**(1):113-120.
- Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE: **Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action.** *J Clin Invest* 2001, **108**(8):1167-1174.
- Corton JM, Gillespie JG, Hawley SA, Hardie DG: **5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells?** *Eur J Biochem* 1995, **229**(2):558-565.
- Coyral-Castel S, Tosca L, Ferreira G, Jeanpierre E, Rame C, Lomet D, Caraty A, Monget P, Chabrolle C, Dupont J: **The effect of AMP activated kinase activation on gonadotrophin-releasing hormone secretion in GT1-7 cells and its potential role in hypothalamic regulation of the oestrous cyclicity in rats.** *J Neuroendocrinol* 2008, **20**(3):335-346.
- Long YC, Zierath JR: **AMP activated protein kinase signaling in metabolic regulation.** *J Clin Invest* 2006, **116**:1776-1783.
- Tosca L, Chabrolle C, Dupont J: **AMPK: a link between metabolism and reproduction?** *Med Sci (Paris)* 2008, **24**(3):297-300.
- Malpoux B: **Seasonal regulation of reproduction in mammals.** In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Volume 1-2*. Third edition. Edited by: Neill JD. The University of Alabama, Birmingham, U.S.A.: Elsevier; 2006:2231-2281.
- Um JH, Yang S, Yamazaki S, Kang H, Viollet B, Foretz M, Chung JH: **Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iepsilon (CKIepsilon) dependent degradation of clock protein mPer2.** *J Biol Chem* 2007, **282**(29):20794-20798.
- Atkins TW, Bailey CJ, Matty AJ: **The effect of melatonin on insulin secretion in rat and mouse.** *J Endocrinol* 1973, **58**:XVII-XVIII.
- Bailey CJ, Atkins TW, Matty AJ: **Melatonin inhibition of insulin secretion in the rat and mouse.** *Hormone Research* 1974, **5**:21-28.
- Salt IP, Johnson G, Ashcroft SJ, Hardie DG: **AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic beta cells, and may regulate insulin release.** *Biochem J* 1998, **335**(533-539).
- Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, Zaminpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B: **Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state.** *J Clin Invest* 2010, **120**(7):2355-2369.
- Thiéry JC, Lomet D, Bougoin S, Malpoux B: **Turnover rate of cerebrospinal fluid in female sheep: changes related to different light-dark cycles.** *Cerebrospinal Fluid Res* 2009, **6**:9.
- Richard P: *Atlas stéréotaxique du cerveau de brebis pré-alpes du sud Paris*: INRA; 1967.
- Yoshikawa T: **The brain of the sheep.** *Atlas of the Brains of Domestic Animals* Tokyo: University of Tokyo Press; 1968.
- Fraser S, Cowen P, Franklin M, Franey C, Arendt J: **Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma.** *Clin Chem* 1983, **29**(2):396-397.
- Tillet Y, Ravault JP, Selve C, Evin G, Castro B, Dubois MP: **[Conditions for the use of specific antibodies for immunohistochemical visualization of serotonin and melatonin in the pineal gland of sheep].** *C R Acad Sci III* 1986, **303**(3):77-82.

20. Malpoux B, Wayne NL, Karsch FJ: Termination of the breeding season in the Suffolk ewe: involvement of an endogenous rhythm of reproduction. *Biol Reprod* 1988, **39**(2):254-263.
21. R-Development-Core-Team: **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2010.
22. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D: The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2002, **277**(28):25226-25232.
23. Guigas B, Bertrand L, Taleux N, Foretz M, Wiernsperger N, Vertommen D, Andreelli F, Violette B, Hue L: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside and metformin inhibit hepatic glucose phosphorylation by an AMP-activated protein kinase-independent effect on glucokinase translocation. *Diabetes* 2006, **55**(4):865-874.
24. Matthews CD, Seemark RF, Guerin MV: Plasma melatonin profiles of Romney Marsh sheep in natural photoperiod and in acutely extended darkness. *J Reprod Fertil* 1992, **95**(3):869-875.
25. Challet E, Caldelas I, Graff C, Pevet P: Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol Chem* 2003, **384**(5):711-719.
26. Wayne NL, Malpoux B, Karsch FJ: How does melatonin code for day length in the ewe: duration of nocturnal melatonin release or coincidence of melatonin with a light entrained sensitive period? *Biol Reprod* 1988, **39**(1):66-75.
27. Vivien-Roels B, Pitrosky B, Zitouni M, Malan A, Canguilhem B, Bonn D, Pevet P: Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 1997, **106**(1):85-94.
28. Garidou ML, Vivien-Roels B, Pevet P, Miguez J, Simonneaux V: Mechanisms regulating the marked seasonal variation in melatonin synthesis in the European hamster pineal gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003, **284**(4):R1043-1052.
29. Zarazaga LA, Malpoux B, Chemineau P: Amplitude of the plasma melatonin nycthemeral rhythms is not associated with the dates of onset and offset of the seasonal ovulatory activity in the Ile-de-France ewe. *Reprod Nutr Dev* 2003, **43**(2):167-177.
30. Vivien-Roels B: Seasonal variations in the amplitude of the daily pattern of melatonin secretion in mammalian and non-mammalian vertebrates: Possible physiological consequences. In *Comparative Endocrinology and Reproduction*. Edited by: Joy KP, Krishna A, Haldar C. New-Dehli: Narosa Publishing House; 1999:529-542.
31. Forcada F, Abecia JA, Sierra I: Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Ruminant Res* 1992, **8**(4):313-324.
32. Simonneaux V, Ribelayga C: Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 2003, **55**(2):325-395.
33. Claret M, Smith MA, Batterham RL, Selman C, Choudhury AI, Fryer LG, Clements M, Al-Qassab H, Heffron H, Xu AW, Speakman JR, Barsh GS, Violette B, Vaulont S, Ashford ML, Carling D, Withers DJ: AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 2007, **117**(8):2325-2336.
34. Conti A, Maestroni GJ: Role of the pineal gland and melatonin in the development of autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *J Pineal Res* 1996, **20**:164-172.
35. Peschke E, Stumpf I, Bazwinsky I, Litvak L, Dralle H, Mühlbauer E: Melatonin and type 2 diabetes - a possible link? *J Pineal Res* 2007, **42**(4):350-358.
36. Peschke E, Frese T, Chankiewicz E, Peschke D, Preiss U, Shreyer U, Spessert R, Mühlbauer E: Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin receptor status. *J Pineal Res* 2006, **40**(1):135-143.
37. Carling D, Zammit VA, Hardie DG: A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 1987, **223**(2):217-222.
38. Park SH, Gammon SR, Knippers JD, Paulsen SR, Rubink DS, Winder WW: Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J Appl Physiol* 2002, **92**(6):2475-2482.
39. Voss M, Paterson J, Kelsall IR, Martin-Granados C, Hastie CJ, Pegg MW, Cohen PTW: Ppm1E is an *in cellulo* AMP-activated protein kinase phosphatase. *Cell Signal* 2011, **23**:114-124.

doi:10.1186/1471-2202-12-76

Cite this article as: Menassol et al: The effect of an intracerebroventricular injection of metformin or AICAR on the plasma concentrations of melatonin in the ewe: potential involvement of AMPK? *BMC Neuroscience* 2011 **12**:76.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Troisième partie

Identifier les limites imposées par le statut nutritionnel sur les performances de certaines techniques visant à maîtriser la saisonnalité de la reproduction

Les techniques naturelles de maîtrise de la saisonnalité de la reproduction des petits ruminants se basent sur l'exploitation de facteurs environnementaux, principalement la photopériode ou les interactions sociales voire une combinaison des deux. De la réussite de ces techniques dépend directement le degré des contraintes de production imposées par la saison d'œstrus et indirectement la rentabilité économique de l'exploitation (pour revue cf. Martin et Kadokawa, 2006).

Afin de tendre vers des performances zootechniques optimales, ces techniques doivent offrir un certain degré de précision quant à leur mise en œuvre pratique. Il s'agit essentiellement de définir une intensité (ex. : une amplitude de variation de la photopériode, un niveau d'augmentation des concentrations plasmatiques de mélatonine, un ratio mâle/femelle, ...) (Chemineau, 1987; Chemineau *et al.*, 1992) ainsi qu'un moment (Haresign *et al.*, 1990; Chanvallon *et al.*, 2011) adaptés pour la réalisation du traitement.

Les conclusions des deux premières parties de ces travaux de thèse suggèrent que l'état d'engraissement des animaux pourrait constituer une source de variabilité importante dans la réponse des brebis à ces différentes pratiques. En effet selon la première partie de nos travaux le rôle modulateur de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction pourrait, à l'échelle d'un groupe d'animaux hétérogène en termes d'état d'engraissement, perturber le moment idéal de la réalisation d'un traitement. La deuxième partie de nos travaux indique également que les altérations dans la traduction du signal photopériodique liées au statut nutritionnel des brebis, pourraient perturber l'intensité des traitements se basant sur la manipulation du signal mélatoninergique.

Une partie de ces effets peut être illustrée par la manipulation photopériodique réalisée dans l'étude présentée en Première partie – *Article 1* de ce manuscrit (**Figure 28**). Au cours de cette dernière, l'état d'engraissement des animaux était négativement corrélé à la latence d'expression d'une réponse reproductive (**Figure 28-1**). Toutefois, à partir du moment où cette réponse était stimulée, la réponse reproductive était similaire entre groupes nutritionnels (**Figure 28-2**). Ces résultats suggèrent donc que l'état d'engraissement peut affecter la durée avant l'interprétation d'une stimulation. Toutefois dès lors que cette dernière est interprétée, elle est capable de stimuler la réponse reproductive des animaux indépendamment de leur état d'engraissement.

Deux études ont été réalisées confrontant la réalisation pratique classique de techniques visant à maîtriser la saisonnalité de la reproduction des ovins, à savoir un traitement d'implants sous-cutanés de mélatonine et la réalisation d'un effet mâle, avec des groupes de brebis maintenus à des états d'engraissement différents. Leurs objectifs consistaient à :

- Identifier la variabilité induite par le statut nutritionnel dans la réponse reproductive des brebis.
- Appréhender l'origine de cette éventuelle variabilité en utilisant les résultats des deux premières parties de ces travaux de thèse.

L'accomplissement de ces objectifs nous permettrait de définir l'importance du levier nutrition dans la réponse reproductive des brebis à ces techniques naturelles de maîtrise de la saisonnalité.

I. Identifier les effets du statut nutritionnel sur la réponse ovarienne à un traitement d'implants sous-cutanés de mélatonine

Le succès d'un traitement de mélatonine dans la maîtrise des profils saisonniers de reproduction dépend à la fois du moment de la réalisation du traitement mais également de l'augmentation du ratio entre concentrations plasmatiques exogène (i.e. apports des implants) et endogène de mélatonine.

D'une façon assez remarquable nos travaux démontrent que ces deux paramètres sont susceptibles d'être altérés en fonction de l'état d'engraissement des brebis (Première et Deuxième parties). En conséquence cette expérimentation a été conduite afin de vérifier les

effets de l'état d'engraissement dans la réponse ovarienne des brebis à un traitement d'implants sous-cutanés de mélatonine réalisé en fin de saison d'ancestrus.

Ce sont 17 brebis Île-de-France ont été utilisées pour cette expérimentation réalisée sous photopériode ambiante. Deux groupes d'animaux ayant des états d'engraissement contrastés (9 brebis bien nourries vs. 8 brebis restreintes) ont été obtenus en utilisant un protocole alimentaire similaire à celui décrit en première partie de ce manuscrit (cf. ci-dessus). Le 12-Mai chaque brebis recevait deux implants de mélatonine (Melovine®) en sous-cutané à la base de l'oreille. En parallèle la réponse ovarienne de ces animaux était suivie via la détermination des concentrations plasmatiques de progestérone.

L'objectif de cette expérimentation était double puisqu'il s'agissait de :

- Déterminer si le statut nutritionnel agit en perturbant le moment idéal du traitement d'implants de mélatonine pour créer de la variabilité dans la réponse ovarienne des brebis.
- Vérifier si la chute des concentrations plasmatiques induite par un faible état d'engraissement peut être contrebalancée par l'augmentation induite par les implants de mélatonine. La réponse à cet objectif nous permettra de statuer sur l'implication fonctionnelle des concentrations de mélatonine pour définir le moment des transitions reproductives.

1. Résultats

Le statut nutritionnel a eu un effet majeur sur la capacité des brebis à exprimer une avance de saison en réponse aux implants de mélatonine. En effet seules 50 % des brebis maintenues à un faible état d'engraissement ont présenté une réponse ovarienne aux implants de mélatonine contre 100 % des brebis maintenues à un état d'engraissement moyen ($p < 0,05$).

Il est apparu que, parmi les brebis maintenues à un faible état d'engraissement, étaient associées de faibles concentrations plasmatiques de mélatonine aux 4 brebis n'exprimant pas de réponse ovarienne aux implants de mélatonine en comparaison de celles ayant exprimé cette réponse ($p < 0,05$).

2. Conclusion

L'état d'engraissement joue un rôle majeur dans la variabilité de l'expression d'une réponse ovarienne aux implants de mélatonine chez la brebis Île-de-France. Notre étude a mis en évidence un seuil constitué à la fois par le statut nutritionnel des animaux et par leurs concentrations plasmatiques endogènes de mélatonine au-delà duquel cette réponse est compromise.

L'origine de cette variabilité est probablement liée aux effets du statut nutritionnel sur la modulation des profils saisonniers de reproduction des ovins et en conséquence, une mauvaise coïncidence entre le moment d'application du traitement et l'état reproductif des animaux chez les brebis maintenues à un faible état d'engraissement.

Il est également envisageable que la nutrition ait perturbée la perception de l'intensité du signal mélatoninergique fournit par les implants chez les brebis maintenues à un faible état d'engraissement. Cet effet découlerait alors d'altérations au sein des voies centrales chargées de transmettre le signal mélatoninergique ou dans les structures cibles de la mélatonine.

Bien que l'association d'un faible état d'engraissement avec de faibles concentrations plasmatiques endogènes de mélatonine soit favorable au ratio entre concentrations plasmatiques exogènes et concentrations plasmatiques endogènes de mélatonine, la réponse ovarienne de ces brebis ne s'en trouve pas améliorée. Ce résultat nous suggère que les concentrations plasmatiques de mélatonine ne jouent pas de rôle fonctionnel pour définir le moment des transitions reproductives.

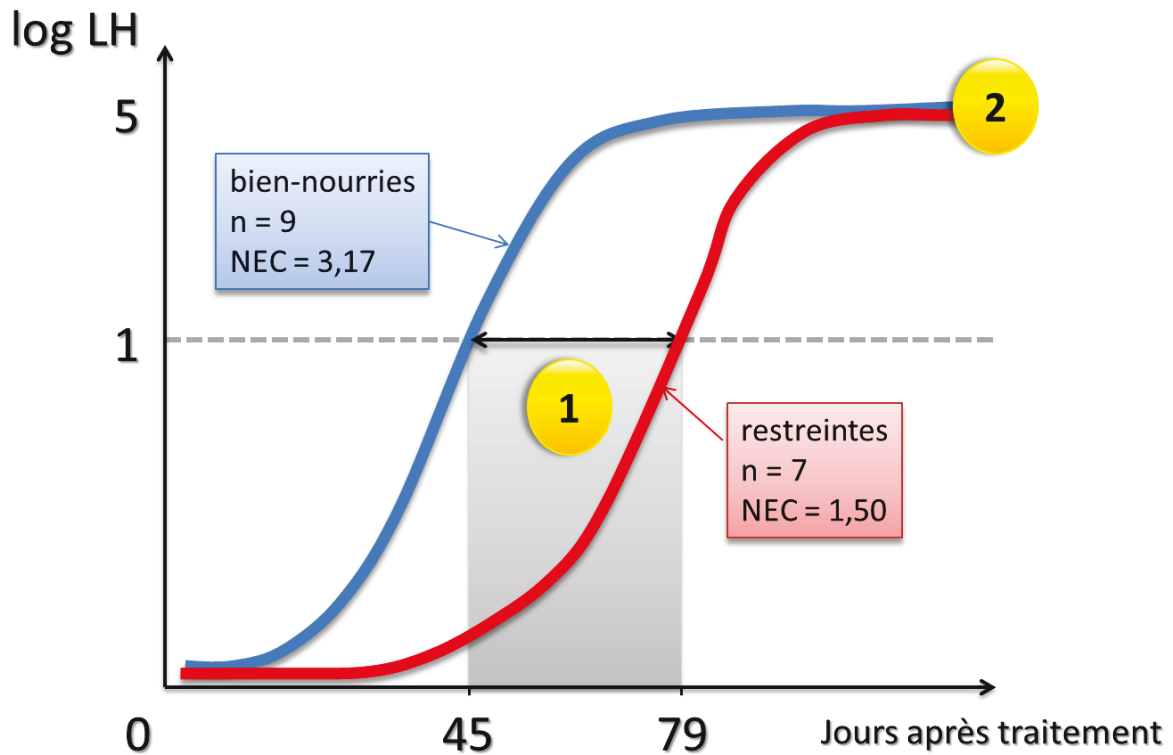


Figure 28 Profils de sécrétion de LH en fonction du statut nutritionnel en réponse à un traitement photopériodique (passage depuis des JL vers des JC). Figure adaptée d’une expérimentation présentée en Première partie *Article 1*.

En réponse au traitement photopériodique la réponse des brebis maintenues à un faible état d’engraissement était retardée (1 ; $p < 0,001$) en comparaison des brebis maintenues à un état d’engraissement moyen. Une fois la réponse neuroendocrinienne stimulée (seuil en pointillés) ses caractéristiques étaient similaires entre groupes nutritionnels (2).

The effect of nutrition on the ovarian response to a treatment with melatonin implants in the ewe

Jean-Baptiste Menassol^{1,2,3,4}, Benoît Malpoux^{1,2,3,4}, Rex J. Scaramuzzi^{1,2,3,4,5}.

¹. INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

². CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

³. Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

⁴. IFCE, F-37380 Nouzilly, France

⁵. Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, Herts, UK

Abstract

Melatonin implants are commonly used to advance the breeding season in sheep. However, factors such as the nutritional status of the animals are likely to effect the quality of their response. Therefore this study was undertaken to analyze and compare the ovarian response of two groups of Ile-de-France ewes maintained under different nutritional states (well-fed vs. restricted) over a long period to treatment with melatonin implants in the late anestrus season. During this experiment the plasma concentrations of melatonin were monitored before and after melatonin treatment.

The ewes in the well-fed group had a significant advance of 52 days on average, in the resumption of ovarian activity in comparison with their previous breeding season ($p < 0.05$). This effect was not present in the ewes of the restricted group. As a consequence the resumption of ovarian activity following melatonin treatment occurred 57 days earlier on average, in the ewes of the well-fed group ($p < 0.05$). However half of the animals of the restricted group also had earlier ovarian responses that were similar to those of the well-fed animals. Comparing these sub-groups of the restricted group, the night-time plasma concentrations of melatonin before and after the melatonin treatment were significantly lower for the sub-group that did not have early ovarian responses ($p < 0.001$ and $p < 0.05$ respectively).

This study establishes the existence of a nutritional threshold for the ovarian response to melatonin in late anestrus for the Ile-de-France breed of sheep. This threshold was clearly identified on the basis of the individual night-time plasma concentrations of melatonin. The functional implication of this alteration in pineal functions is discussed.

Introduction

Breeds of small ruminants originating from mid-latitudes display seasonal variations in their reproductive activities, an adaptive phenomenon known as the seasonality of reproduction. These seasonal reproductive patterns are the result of the central integration of various environmental factors, the major one being photoperiod that exerts its effects on the reproductive axis through annual variations in the diurnal rhythm of melatonin secretion by the pineal gland (Malpoux, 2006).

Because the seasonality of reproduction imposes temporal constraints on the yearly availability of fresh farm products, various techniques have been developed to induce out-of-season fertility mainly for economic reasons (Chemineau *et al.*, 2008). These techniques are based on the manipulation of the environmental factors involved in the control of seasonal reproductive rhythms, such as photoperiod (Chemineau *et al.*, 1992) and socio-sexual interactions (Ungerfeld *et al.*, 2004), or factors that simulate the endocrine events associated with these environmental variations, such as progestagen (Robinson, 1965) and melatonin (English *et al.*, 1986).

Among these techniques, melatonin treatment, usually given in the form of subcutaneous implants, is effective in mimicking the stimulating effects of photoperiod upon reproductive activities (O'Callaghan *et al.*, 1991) and are therefore used to advance the resumption of the breeding season (English *et al.*, 1986). The practical efficacy of this technique essentially depends upon the timing of the treatment which is determined by the degree of seasonality of the breed considered (English *et al.*, 1986; Haresign, 1992b; Haresign, 1992a).

However, the seasonal patterns of reproduction in sheep vary accordingly to various factors. As a matter of facts we established in a previous study, that nutrition was a potent factor that can phase-shift seasonal reproductive transitions (Menassol *et al.*, 2012). Therefore we hypothesized that such an effect of nutritional status would interfere with the response of ewes to a melatonin treatment.

In order to test this hypothesis we inserted subcutaneous melatonin implants in two groups of Ile-de-France ewes maintained in different nutritional statuses over a long period. The ovarian responses of these animals were precisely monitored through the determination of plasma concentrations of progesterone as well as their daytime and night-time plasma concentrations of melatonin before and after the insertion of the implants.

Material and methods

All procedures were approved by the French Agricultural and Scientific Research Agencies for Animal Ethics and they were all conducted in accordance with EU guidelines for Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching.

General

Seventeen sexually mature Ile-de-France ewes, from the INRA breeding flock were assigned to two groups balanced for live weight, body condition score and age, and housed in one of two pens in a semi-open building at our experimental facility. The animals were exposed to natural photoperiod (48°N). Each pen of 35m², housed 9 and 8 animals as a single group and the animals were free to interact with each other. Contact with rams or their odours (for example on clothing) were rigorously avoided during the study and social interactions among ewes were limited to ewes of the same treatment.

Diets and nutritional management

One year and two months before the beginning of the experiment the animals were placed on a nutritional program designed to reach different body condition scores between groups. The main characteristics of the nutritional program, i.e. the feed and the level of the dietary restriction have already been described in a previous chapter (Première partie). The target median BCSs for the two experimental groups were set at 1.5 (restricted group; R_{MEL}) and 3.0 (well-fed group; WF_{MEL}). Once both groups had reached their target body condition score, the diet was readjusted to maintain the desired nutritional statuses until the beginning of the experiment.

At the start of the experiment in May the ewes were weighed (LW) and their body condition score (BCS) recorded. BCS was determined using a scale of 0 (emaciated) to 5 (grossly

obese) (Russel *et al.*, 1969). The diet consisted of a single feed made from pelleted dehydrated lucerne, straw and sugar cane treacle with nutritional values of 0.97 Mcal of net energy and 63.6 g of metabolizable protein per kilogram of dry matter (DM). The diet was designed using the INRA recommendations for the growth and maintenance needs of adult, non-pregnant ewes (INRA, 2010). At this time the WF_{MEL} group was fed 2.22 kg of feed per animal which corresponded to an average daily intake of 2.72 Mcal and 119.9 g of metabolizable protein and the R_{MEL} group was fed 1.11 kg of feed per animal which corresponded to an average daily intake of 1.36 Mcal and 59.8 g of metabolizable protein; providing on average 1.6 and 1.1 times their respective energy maintenance needs. Feed was offered once a day, in the morning, and ewes had free access to water and mineral licks to provide essential micro-nutrients.

Experimental design

During a pre-experimental period that lasted 10.5 months (from July 02nd to May 12th), when the animals were managed to produce the target BCS, ovarian activity was monitored in ewes from the WF_{MEL} (n = 9) and R_{MEL} (n = 8) groups by determining the concentration of progesterone in samples of jugular venous blood collected twice a week.

During the experimental period lasted 7.5 months [from May 12th (day 0) to December 20th (day 222)], ovarian activity was monitored in the same manner as during the pre-experimental period. Except between day 40 and day 60 where the sampling frequency was increased to one sample every 2 days.

On May 12nd (day 0) each ewe received at the base of the right ear, two subcutaneous melatonin implants each containing 18 mg of melatonin (Melovine®; CEVA Santé Animale, Libourne, France). Implants were inserted by the mean of a special gun fitted with a needle (o.d. 3.5 mm). The choice of the date of implantation was based on the mean date of resumption of ovarian activity in the WF_{MEL} group during the previous breeding season as well as the timing of a stimulatory photoperiodic treatment used in another experiment in the same breed (Menassol *et al.*, 2012).

Individual melatonin levels were monitored before (d-1) and after (d77) implant insertion by determining the concentrations of melatonin in samples of jugular blood collected from the

left jugular vein every half hour for 5 and 6 hours respectively, around dusk (d-1: 2 samples before and 6 samples after dusk; d77: 3 samples before and 7 samples after dusk).

Blood sampling and assays

Blood samples (3 mL) taken by jugular venepuncture, were used to determine the concentrations of progesterone and melatonin. They were placed in heparinised tubes (Sodium Heparin 17 IU/mL; Vacutainer®, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) and after sampling the plasma was separated by centrifugation (3700g for 30min at 4°C) and stored at -20°C.

Ovarian activity was monitored by following the pattern of progesterone concentrations in jugular venous plasma. Progesterone was assayed in singly of 10 µL of plasma using a double antibody enzyme-linked immunosorbent immunoassay (ELISA) (Canepa *et al.*, 2008). The sensitivity of the assay was 0.25 ± 0.12 ng/mL (29 assays), the intra-assay coefficient of variation was between 3 and 11 % (29 assays) and inter-assay CV was 8 %. Plasma melatonin concentrations were determined in duplicate in one assay using a radioimmunoassay (RIA) described by Fraser *et al.* (Fraser *et al.*, 1983), with an antibody raised by Tillet *et al.* (Tillet *et al.*, 1986). The assay sensitivity was 4 pg/mL and the intra-assay coefficient of variation (CV) was 6 %.

Method used to calculate end points of ovarian activity

An animal was considered as cycling whenever the plasma concentration of progesterone was above 1 ng/mL in at least two consecutive samples. Using these data we calculated for each ewe, the date of resumption of ovarian activity after the insertion of melatonin implants as well as the dates of the start and end of the previous breeding season. The period of ovarian activity was calculated for each animal as the time elapsed between the first and last plasma samples with a concentration of progesterone above 1 ng/mL.

Statistical analysis

Data are presented as the means \pm the standard error of the means (SEM) except for BCS data, which are presented as medians \pm inter-quartile ranges. All analyses were performed using the statistical analysis software SPSS (SPSS Inc., IBM Company Headquarters, Illinois,

USA). Correlations between variables were measured using the Pearson's correlation and presented as the Pearson product-moment correlation coefficient (r). Data were analysed using either a one-way or a two-way ANOVA and data that were not normally distributed were analysed using the Mann-Whitney U-test for paired comparisons. Differences or correlations were regarded as significant at $p < 0.05$.

Results

Body Condition Score and Weight

Pre-experimental period

During the pre-experimental period both groups were still managed to produce the target BCSs. Therefore the ewes in the WF_{MEL} experienced significant losses in LW ($p < 0.001$) while the ewes in the R_{MEL} group experienced a significant loss in BCS ($p < 0.001$).

Still, there were significant differences between groups in median BCSs, 3.60 ± 0.56 vs. 1.90 ± 0.55 and mean LWs, 80.8 ± 2.6 kg vs. 54.4 ± 1.7 kg for the WF_{MEL} and R_{MEL} groups respectively (both $p < 0.001$; data not shown).

Experimental period

At the start of the experiment the nutrition groups had achieved markedly and significantly different nutritional states, the WF_{MEL} group had a median BCS of 3.13 ± 0.63 and an average LW of 81.3 ± 2.9 kg while the R_{MEL} group had a median BCS of 1.50 ± 0.28 and an average LW of 59.6 ± 2.5 kg (both $p < 0.001$; Figure 1A & 1B).

Ovarian activity

Pre-experimental period

Considering the breeding season during the pre-experimental period, there was no difference between groups in the date of the onset of ovarian activity (WF_{MEL} : 26-Aug \pm 5 d and R_{MEL} : 11-Sep \pm 10 d; $p > 0.05$). However there was a trend toward significance for an earlier ending of the ovarian activity in the ewes of the R_{MEL} group (21-Feb \pm 8 d vs. 29-Jan \pm 9d; $p = 0.09$). As a result there was only a trend for the ewes in the WF_{MEL} group towards a longer breeding

season of about one month on average, in comparison with the ewes of the R_{MEL} group (178 ± 10 d vs. 140 ± 19 d; $p = 0.11$; data not shown).

Experimental period

The treatment with melatonin implants induced an early resumption of ovarian activity of 52 days on average (≈ 1 month and 3 weeks) in the ewes of the WF_{MEL} group when compared with the mean date of onset of their previous breeding season (04-Jul ± 3 d vs. 26-Aug ± 5 d; $p < 0.001$; Figure 2). However in the ewes of the R_{MEL} group this same parameter was not effected by treatment with melatonin (after treatment: 30-Aug ± 22 d, previous season: 11-Sep ± 10 d; $p > 0.05$). Therefore the resumption of ovarian activity after the treatment with melatonin was significantly delayed in the ewes of the R_{MEL} group when compared with the ewes of the WF_{MEL} group [04-Jul (d53) ± 3 d vs. 30-Aug (d110) ± 22 d; $p < 0.05$; Figure 2].

A strong heterogeneity was identified in the timing of resumption of ovarian activity after treatment in the ewes of the R_{MEL} group. This heterogeneity was tested using a discriminant analysis based on the tests of Wilks' lambda and Box's M statistics that confirmed (both $p < 0.01$) the existence of two subgroups within the R_{MEL} group.

The first subgroup or R_{MEL-R} group, comprised 4 animals [resumption of ovarian activity: 08-Jul (d57) ± 3 d; BCS: 1.56 ± 0.28 ; LW: 64.3 ± 5.0 kg]. The ewes of this group exhibited a synchronous response to the treatment with melatonin that was similar to that of the ewes in the WF_{MEL} group. The second subgroup or R_{MEL-NR} group, comprised the other 4 animals [resumption of ovarian activity: 22-Oct (d163) ± 22 d; BCS: 1.44 ± 0.19 ; LW: 55.0 ± 7.2 kg]. This group was heterogeneous and comprised the animals that exhibited an asynchronous resumption of ovarian activity after treatment with melatonin. The ewes in the R_{MEL-R} group exhibited an earlier response to melatonin treatment ($p < 0.01$) and had a trend toward a higher mean LW ($p = 0.08$) in comparison with the ewes in the R_{MEL-NR} group. Therefore the ewes in the R_{MEL-R} group were considered as responsive and the ewes in the R_{MEL-NR} group unresponsive, to the treatment with melatonin implants.

When all the responsive animals were considered (i.e. irrespectively of their nutritional group) the advance of the mean date of onset of ovarian activity following melatonin treatment averaged 54 days (≈ 1 month and 3 weeks) when compared with the mean date of onset of ovarian activity during the previous breeding season ($p < 0.001$).

Each responsive animal experienced a period of anoestrus between its ovarian activity induced by the treatment with melatonin and the resumption of its breeding season. The length of the period of ovarian activity induced by the treatment with melatonin was not significantly altered by the nutritional state of the animals (WF_{MEL} : 56 ± 13 d, R_{MEL-R} : 26 ± 9 d; $p > 0.05$). Following the treatment with melatonin, the timing of resumption of the breeding season was not significantly altered by the nutritional state of the animals (WF_{MEL} : 19-Oct \pm 13 d, R_{MEL-R} : 21-Nov \pm 9 d; $p > 0.05$).

In the ewes of the R_{MEL-NR} group when the dead ewe was removed from the analyses, the timing of resumption of ovarian activity following the melatonin treatment was similar to the timing of resumption of the breeding season for the ewes in the R_{MEL-R} and WF_{MEL} groups (13-Nov \pm 14 d; both $p > 0.05$). In comparison with their previous breeding season, this reproductive transition occurred \approx 62 days later (13-Nov \pm 14 d vs. 12-Sep \pm 3 d; $p < 0.05$).

Plasma concentrations of melatonin before and after treatment

At d-1 there were no differences between nutritional groups in their mean daytime (each sample had plasma concentrations of melatonin below the assay sensitivity) and night-time (WF_{MEL} : 154.20 ± 32.87 pg/mL, R_{MEL} : 154.50 ± 38.51 pg/mL; $p > 0.05$) plasma concentrations of melatonin. Within the food-restricted animals, the ewes of the R_{MEL-NR} group had significantly lower night-time plasma concentrations of melatonin (250.88 ± 24.33 pg/mL vs. 57.88 ± 11.79 pg/mL; $p < 0.001$; Figure 3).

In a similar manner at d77 after melatonin treatment, there were no differences between nutritional groups in terms of their daytime (WF_{MEL} : 48.75 ± 17.28 pg/mL, R_{MEL} : 39.10 ± 12.96 pg/mL; $p > 0.05$), night-time (WF_{MEL} : 158.05 ± 19.90 pg/mL, R_{MEL} : 164.37 ± 21.55 pg/mL; $p > 0.05$) and overall (WF_{MEL} : 125.26 ± 16.70 pg/mL, R_{MEL} : 126.79 ± 16.64 pg/mL; $p > 0.05$) plasma concentrations of melatonin. Within the restricted animals the R_{MEL-R} and R_{MEL-NR} groups could not be distinguished on the basis of their daytime plasma concentrations of melatonin (R_{MEL-R} : 43.10 ± 20.40 pg/mL, R_{MEL-NR} : 35.10 ± 18.88 pg/mL; $p > 0.05$). However, after melatonin treatment the ewes of the R_{MEL-R} group had significantly greater night-time (210.45 ± 24.68 pg/mL vs. 118.30 ± 11.94 pg/mL; $p < 0.05$; Figure 3) and overall (160.24 ± 19.80 pg/mL vs. 93.34 ± 12.45 pg/mL; $p < 0.05$) plasma concentrations of melatonin.

After melatonin treatment by d77, in 3 out of 9 ewes of the WF_{MEL} group (33 %) and 3 out of 8 ewes of the R_{MEL} group (38 %) the daytime plasma concentrations of melatonin did not exceed the assay sensitivity (data not shown). Since this phenomenon was independent of the ability of the ewes to respond to the melatonin treatment, it was likely due to technical constraints i.e. an early cessation of melatonin release by the implants (estimated at 80 ± 10 days).

Correlations

When all the animals were considered independently of their nutritional status, there was a significant correlation between BCS and LW, $r = 0.90$ ($p < 0.001$).

In the ewes of the R_{MEL} group there was a significant correlation between LW and the nocturnal/overall melatonin concentrations monitored at d77, both $r = 0.77$ (both $p < 0.05$). In this same group the expression of an earlier ovarian response to melatonin was negatively correlated with BCS, $r = -0.75$ ($p < 0.05$) and LW, $r = -0.80$ ($p < 0.05$). Furthermore this parameter was negatively correlated with the nocturnal, $r = -0.77$ ($p < 0.05$) and overall, $r = -0.70$ ($p = 0.05$) melatonin concentrations on d77.

Discussion

The results of this study establish that nutritional status is a major factor affecting the ovarian response to melatonin treatment during the late anoestrus in Ile-de-France ewes. On the one hand, the ewes maintained in optimal breeding conditions had a generalized response to the treatment that allowed the advancement of their breeding season. In this group the ovarian response to the treatment with melatonin was similar to that reported in previous experiments (Haresign *et al.*, 1990; Staples *et al.*, 1991; Malpaux *et al.*, 1995). On the other hand, the same treatment was not effective in advancing the breeding season of the animals maintained in low nutritional conditions. This result appears to contradict previous studies that reported a beneficial effect of a low nutritional status on the reproductive performance of sheep in response to melatonin (Robinson *et al.*, 1991; Forcada *et al.*, 1995; Vazquez *et al.*, 2010a; Vazquez *et al.*, 2010b).

However, in this group the response to melatonin was heterogeneous because half of its individuals actually had an early ovarian response that was similar in all respects to that of the

well-fed ewes; the other half had a late resumption of ovarian activity. These two subgroups could both be distinguished on the basis of their night-time plasma concentrations of melatonin before and after the insertion of the melatonin implants. The responsive animals showed consistently greater plasma concentrations of the hormone. This finding is consistent with a previous study where a lower nutritional status was associated with lower plasma concentrations of melatonin in the Ile-de-France ewe (Menassol *et al.*, Deuxième Partie Article 1). In addition there was a negative correlation between the response to treatment with melatonin and the BCS and LW of the animals maintained in a low nutritional status.

Given the differences within the food restricted animals in their night-time plasma concentrations of melatonin and the known phase-shifting effect of nutritional status on the photoperiodic-induced reproductive transitions in the Ile-de-France ewe (Menassol *et al.*, 2012). Two main hypotheses may account for the effects of low nutritional status, on the response to melatonin.

Firstly their low nutritional status may have desensitized the non-responding animals to the melatonin signal. Indeed, since the optimal timing of the melatonin treatment is dependent upon the seasonal reproductive rhythm of the breed of sheep (English *et al.*, 1986; Haresign *et al.*, 1990; Abecia *et al.*, 2007) then potential alterations in the seasonal reproductive rhythm due to nutritional status may have resulted in an inappropriate timing of implant insertion. In this case, the late resumption of ovarian activity in the non-responding animals would merely reflect the phase-shifting effect of a low nutritional status. During the previous breeding season this effect was not evident probably because of better nutritional conditions for the ewes in the restricted group.

The second hypothesis suggests a masking effect of a low nutritional status on the ovarian response to melatonin. This is supported by the striking similarity in the dates of resumption of ovarian activity whether the animal had an early ovarian response or not and irrespectively of their nutritional groups. Under this hypothesis, the alteration of pineal functions indicated by lower melatonin levels in unresponsive animals could have a functional role.

A more detailed monitoring of the endocrine events accompanying the putative ovarian response to melatonin (i.e. between d40 and d60) would allow one to determine whether the reproductive axis is effected by melatonin and help to decide between these two hypotheses.

The fact remains that within the group of animals maintained in a low nutritional status, there probably is a threshold that determines whether the animal will have a standard or masked/non-existent response to melatonin. Given the relative homogeneity of nutritional statuses within the ewes of the restricted group, this threshold is limited to a narrow range of BCS/LW but is clearly identified on the basis of the night-time plasma concentrations of melatonin.

Still, it remains to be determined whether this alteration in pineal functions has direct consequences on the ovarian response to melatonin or merely reflects side-effects of low nutritional conditions. In this regard, it is noteworthy that the efficacy of treatment with melatonin implants in advancing the breeding season in small ruminants depends on an increase in the exogenous/endogenous ratio of plasma concentrations of melatonin (Chemineau *et al.*, 1992). Because the low nutritional state of the animals in the R_{MEL-NR} group was associated with lower plasma concentrations of melatonin, this ratio was probably increased without being associated with a better ovarian response to melatonin. In our study the low nutritional state of the animals has completely overridden this effect. Therefore, the alteration of pineal functions is not likely to be involved directly in the negative response to the treatment with melatonin implants. The fact that there were no significant differences in the night-time plasma concentrations of melatonin between the ewes of the well-fed and restricted (both subgroups) groups would argue in favor of this conclusion.

Conclusion

In conclusion, this study has established the existence of a threshold in the nutritional status of the Ile-de-France ewes that can dramatically influence the ovarian response to melatonin designed to advance the resumption of the breeding season. Considering farm practices, these results would recommend not exceeding a certain limit of nutritional state i.e. below a LW of 60 kg and a BCS of 1.5 for the Île-de-France breed, in order to obtain a good ovarian response to melatonin.

The effect of the low nutritional status on the night-time plasma concentrations of melatonin is coherent with some of our previous studies but whether it has a functional role in the response to the treatment cannot be firmly established.

The “masking” effect or the absence of an endocrine response to the treatment with melatonin implants due to the low nutritional status remains to be determined.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Dr Maria-Teresa Pellicer-Rubio as well as Laurent Oujagir for their technical help. They also thank the staff of the experimental unit of INRA Centre de Tours (UEPAO) for the care provided to the animals. RJS was the recipient of an EU Marie Curie Chair of Excellence (MEXC-CT-2006-042499) and JBM a PhD grant from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

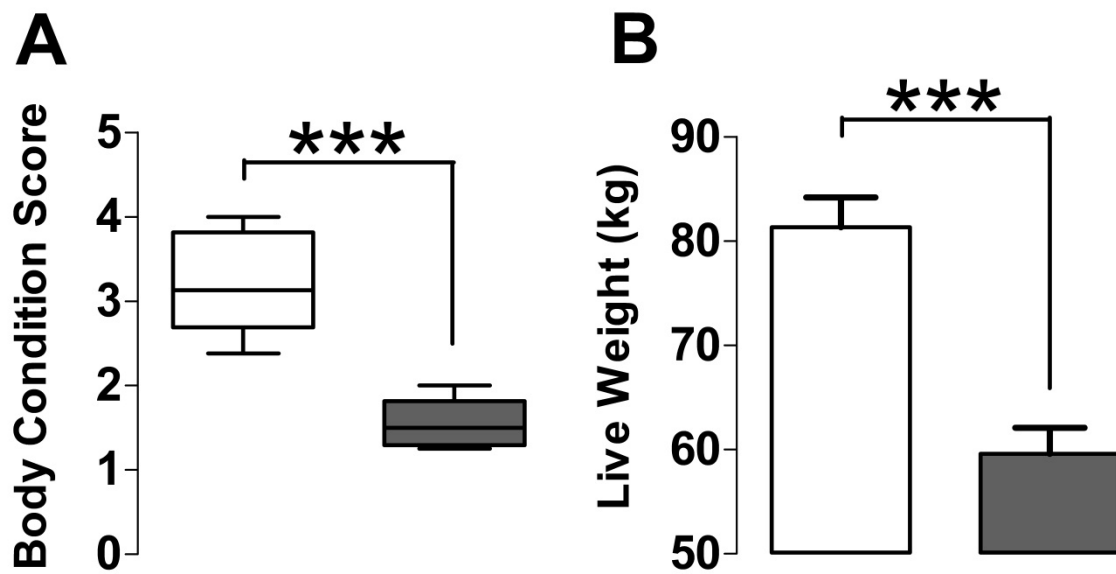


Figure 1 The nutritional status of the ewes in the WF_{MEL} and R_{MEL} groups. A. Median \pm interquartile range body condition score (BCS) and B. Mean \pm SEM live weight (LW) for the ewes in the WF_{MEL} (white bars; n = 9) and R_{MEL} (black bars; n = 8) groups. The BCS and LW were determined once at the beginning of the experimental period. *** P < 0.001.

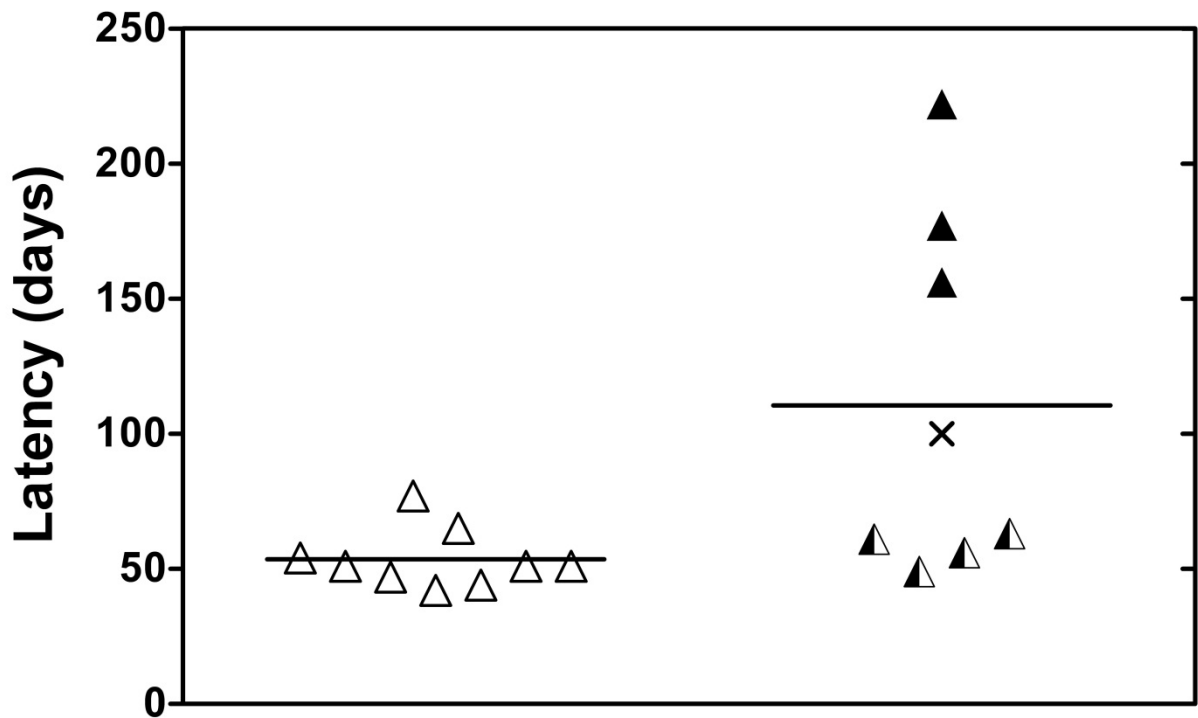


Figure 2 Individual latencies (in days) to the first ovarian cycle after the treatment with melatonin (d0) in the ewes of the WF_{MEL} (Δ; n = 9) and R_{MEL} groups (▲; n = 8). The horizontal bars depicts the mean latency for each group (see text for more details). Within the ewes of the R_{MEL} group the ewes of the R_{MEL-R} group (n = 4) were identified by a different pattern (hatched ▲). The cross indicates the time of death for one ewe in the R_{MEL} group.

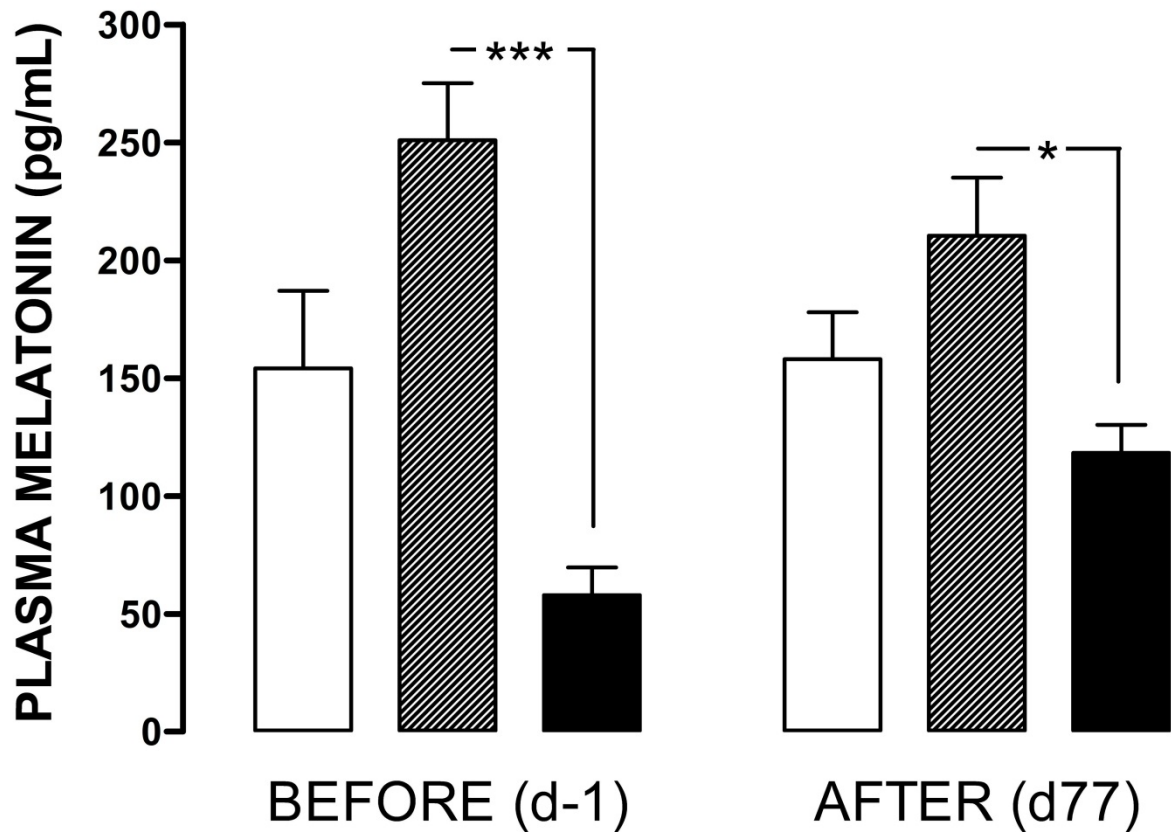


Figure 3 Comparison of the night-time plasma concentrations of melatonin between nutritional groups before (d-1) and after (d77) the treatment with melatonin (d0). Mean \pm SEM for the ewes in the WF_{MEL} (white bars [n = 9]), R_{MEL-R} (hatched black bars [n = 4]) and R_{MEL-NR} (black bars [n = 4]) groups. Bars are representative of 6 (d-1) or 7 (d77) samples of jugular venous blood collected every half hour from dusk. * P < 0.05 and *** P < 0.001.

II. Identifier les effets du statut nutritionnel sur la réponse à un effet mâle

Certaines études ont déjà pu déterminer que chez les petits ruminants, un faible état corporel diminue la proportion de chaleurs induites en réponse à un effet mâle (Lassoued et Khaldi, 1990; Veliz *et al.*, 2006). En revanche l'implication des effets statiques de la nutrition sur les différents éléments de la séquence endocrinienne et physiologique conduisant à l'expression des chaleurs ne sont pas déterminés.

La stimulation phéromonale liée au mâle court-circuite la voie d'intégration du signal mélatoninergique pour agir directement sur l'activité du générateur de pulses de GnRH (Okamura *et al.*, 2010). Ainsi les interactions entre les signaux liés à l'état d'engraissement des animaux et la stimulation induite par le mâle peuvent relativement s'affranchir des événements localisés en amont de la voie d'intégration du signal photopériodique. Il apparaît donc probable que les effets de l'état d'engraissement sur les concentrations plasmatiques de mélatonine (Deuxième Partie) n'interviennent pas pour moduler la qualité de la réponse au mâle.

En revanche les effets modulateurs de l'état d'engraissement sur les profils saisonniers de reproduction des brebis (Première Partie) pourraient altérer la réponse des brebis au mâle en perturbant le moment idéal de la réalisation du traitement. Une telle perturbation pourrait conduire à une chute de la proportion de chaleurs induites par l'effet mâle, à la manière d'un traitement réalisé au milieu de la saison d'anœstrus (Chanvallon *et al.*, 2011).

L'objectif de cette expérimentation consistait donc en la détermination des effets de l'état d'engraissement des brebis dans la variabilité de leur réponse à un effet mâle, réalisé en fin de saison d'anœstrus. Le suivi des événements de la séquence endocrinienne et physiologique impliquée dans cette réponse avait également pour objectif de localiser les principaux sites de cette interaction.

Pour cette étude 48 brebis Île-de-France ont été utilisées et maintenues sous photopériode ambiante. Deux groupes d'animaux avec des états d'engraissement différents (33 brebis bien nourries vs. 15 brebis restreintes) ont été obtenus en utilisant un protocole alimentaire similaire à celui décrit en première partie de ce manuscrit (cf. ci-dessus). Seule la nature de la ration alimentaire était différente. Les mâles ont été introduits le 16-Juin. La veille, les

caractéristiques de la libération de LH en réponse à une injection intraveineuse de GnRH étaient déterminées. A partir de l'introduction des mâles, la réponse endocrinienne et physiologique des brebis à court (pulsatilité et pic préovulatoire de LH) et long terme (taux d'ovulation, cycles ovariens et chaleurs) était suivie en fonction de leur statut nutritionnel.

Cette expérimentation a fait partie intégrante d'une étude plus vaste, analysant les effets d'une supplémentation alimentaire et ses interactions avec l'état d'engraissement des animaux sur les performances de la réponse à un effet mâle. Notre contribution à cette étude s'est limitée au protocole de restriction alimentaire et à la réalisation pratique des expérimentations. En conséquence l'article scientifique réalisé sur l'ensemble de ces travaux sera fourni en annexe du présent manuscrit (Annexe 3).

1. Résultats

L'ensemble des paramètres de la réponse hypophysaire à l'injection iv de GnRH (moyenne et concentrations plasmatiques maximales de LH) ont été affecté par l'état d'engraissement des brebis en étant diminués chez les brebis maintenues à un faible état d'engraissement en comparaison des brebis maintenues à un état d'engraissement moyen ($p < 0,05$). Ce suivi de l'activité hypophysaire a également révélé un effet de l'état d'engraissement avant l'injection de GnRH, sur la réduction des concentrations plasmatiques moyennes de LH chez les brebis maintenues à un faible état d'engraissement ($p < 0,05$).

L'état d'engraissement des brebis a affecté les réponses à court et long terme à l'effet mâle. Tandis que la majorité des paramètres de la réponse à court terme ont été sensibles au statut nutritionnel des animaux, la plupart des éléments de la réponse à long terme ont été comparables entre groupes nutritionnels.

Concernant la réponse à court terme, l'ensemble des paramètres du suivi de la pulsatilité de la LH (moyenne, amplitude et concentrations plasmatiques maximales de LH ; latence au premier pulse ; différentiel de pulses de LH après et avant introduction des mâles) étaient négativement affecté par la réduction de l'état corporel des animaux ($p < 0,05$). Ainsi selon les critères utilisés, 77 % des brebis restreintes exprimaient un accroissement significatif de l'activité pulsatile hypophysaire en réponse au mâle contre 100 % des brebis bien nourries ($p < 0,05$). En revanche, l'état d'engraissement des brebis n'a eu d'influence sur l'expression du pic préovulatoire de LH.

Concernant la réponse à long terme, seuls le taux d'ovulation et les concentrations plasmatiques de progestérone sécrétées au cours d'un cycle normal étaient significativement réduits ($p < 0,001$ et $p < 0,05$ respectivement) chez les brebis maintenues à un faible état d'engraissement en comparaison des brebis maintenues à un état d'engraissement moyen.

2. Conclusion

La variabilité de la réponse à un effet mâle imputable aux effets de l'état d'engraissement des animaux est relativement faible si l'on considère la qualité de la réponse ovarienne. Elle concerne essentiellement la modulation du taux d'ovulation. La distribution temporelle ainsi que la proportion des chaleurs induites par cette technique ne sont pas affectés par l'état d'engraissement des brebis.

En revanche, le suivi de la réponse hypophysaire avant et à court terme après l'introduction du mâle a révélé que les premières étapes de la réponse endocrinienne sont des paramètres sensibles à l'état d'engraissement des animaux. Ces résultats suggèrent que i) l'intensité de la stimulation des signaux en provenance du mâle et/ou ii) le pool de LH hypophysaire, sont des paramètres réduits par la chute de l'état corporel des animaux.

L'absence d'effets de l'état d'engraissement des animaux sur la proportion des cycles courts ou encore la proportion d'expression des chaleurs en réponse au mâle, est probablement révélateur du fait que les signaux en provenance du mâle sont correctement interprétés. Ainsi cette interprétation permet le développement d'une séquence endocrinienne et physiologique complète chez les brebis restreintes, d'une façon tout à fait comparable à celle des brebis bien nourries.

Discussion Générale

L'établissement des effets de l'interaction entre statut nutritionnel et photopériode sur les profils saisonniers d'activité neuroendocrinienne et ovarienne des ovins a permis de structurer notre champ de recherche, en relativisant par exemple la contribution des effets GnRH-indépendants. Dans un premier temps, les principaux traits physiologiques des effets de cette interaction ont dirigé nos travaux vers l'étude des potentiels mécanismes neuroendocriniens sous-jacents. Dans un second temps, l'ensemble des résultats de nos travaux était mobilisé afin d'identifier le rôle de l'état d'engraissement des brebis dans la variabilité de leur réponse à deux techniques actuelles de maîtrise de la reproduction (i.e. l'utilisation d'implants de mélatonine et de l'effet mâle).

La présente discussion s'articulera donc autour de deux points :

- Le premier point discutera de l'expression phénotypique et des mécanismes neuroendocriniens sous-jacents aux effets de l'interaction entre signaux photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction des ovins. Il s'appuiera sur les résultats des deux premières parties du présent manuscrit.
- Le second point discutera de l'intérêt zootechnique de l'étude de ces interactions en s'appuyant sur les résultats des expérimentations regroupées dans la troisième partie du manuscrit.

Puisque la structuration du champ de nos recherches s'est accompagnée de choix quant aux démarches expérimentales engagées, chacun de ces points fera l'objet d'une approche critique concernant notre parti-pris expérimental.

I. Le statut nutritionnel module l'expression du rythme saisonnier de reproduction des ovins

Les différentes études engagées au cours de ce travail de thèse ont eu pour point commun un protocole expérimental basé sur le maintien à long terme de différents niveaux d'apports énergétiques entre deux groupes de brebis. Ce type de protocole alimentaire révèle deux choix expérimentaux fondamentaux.

Tout d'abord le régime alimentaire de chaque groupe nutritionnel était de même nature et la restriction énergétique se réalisait en limitant les quantités d'aliment offertes. Ceci permettait d'éliminer d'éventuels effets liés à des différences de qualité nutritionnelles du régime alimentaire de chaque groupe. D'un autre côté cette restriction des quantités offertes s'est effectuée en limitant au maximum les déficiences en apports protéiques du régime alimentaire. Ce second point est d'importance puisque de cette manière, sont limités des effets directs du régime sur les différentes voies de synthèse hormonales. Ainsi la mise en place de la restriction alimentaire visait à mettre en évidence les seuls effets de l'activation des mécanismes d'épargne énergétique de l'organisme.

Les résultats de nos études ont alors révélé certains traits caractéristiques de la mise en place des mécanismes du maintien de l'homéostasie énergétique sur le fonctionnement de l'axe reproductif.

1. Des traits caractéristiques

Le principal trait des effets de l'interaction entre statut nutritionnel et photopériode sur les profils saisonniers de reproduction de la brebis Île-de-France est une modulation du moment des transitions saisonnières entre états reproductifs (Première Partie *Article 1*). Ainsi l'état d'engraissement des animaux n'altère pas la phase et la période du rythme annuel de reproduction. En d'autres termes, le statut nutritionnel perturbe la synchronisation photopériodique des transitions reproductives sans affecter la synchronisation du rythme circannuel de reproduction.

Le remarquable parallélisme établi entre les effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers d'activité neuroendocrinienne et ovarienne chez la brebis Île-de-France (Première partie *Article 1*), nous a permis de relativiser la contribution des effets directs de la nutrition sur l'activité ovarienne, c'est-à-dire les effets GnRH/LH-indépendants (**Figure 23**). Aussi et conformément aux résultats reportés dans notre étude bibliographique (Blache *et al.*, 2000), les effets statiques de la nutrition se transmettent essentiellement au niveau central pour affecter l'axe reproductif.

A ce stade, nous pouvons résumer notre hypothèse à une transmission centrale des effets statiques de la nutrition essentiellement dirigée sur les mécanismes photopériodiques conditionnant la durée d'expression du rythme reproductif. Les mécanismes photopériodiques

impliqués dans la synchronisation du rythme circannuel de reproduction ne seraient pas ou peu sensibles aux effets du statut nutritionnel.

Ainsi dans les limites de nos conditions expérimentales, la durée de la saison de reproduction est positivement corrélée au statut nutritionnel de l'individu. De plus, il est remarquable de constater que pour un statut nutritionnel donné, le moment des transitions saisonnières entre états reproductifs possède une faible variabilité.

Les travaux de Malpaux *et al.* (1988a; 1990) ainsi que ceux de Woodfill *et al.* (1994), établissent clairement que la durée, la période et la phase du rythme saisonnier de reproduction sont des paramètres contrôlés par des portions distinctes du cycle photopériodique. Aussi notre hypothèse de recherche pourrait être affinée en limitant les effets du statut nutritionnel à une perturbation de la portion du cycle photopériodique contrôlant la durée de la saison de reproduction, c'est-à-dire les jours décroissants automnaux qui agissent sur le maintien des activités reproductives.

Si une interaction entre facteurs photopériodique et nutritionnel aussi localisée dans le temps pourrait expliquer certains effets unidirectionnels du statut nutritionnel sur la modulation d'un des deux moments de transition entre états reproductifs chez la brebis (Forcada *et al.*, 1992), elle s'avèrerait insuffisante pour rendre compte de la symétrie des effets du statut nutritionnel sur chacune des deux transitions reproductives observés dans nos études. Il apparaît davantage vraisemblable que le facteur nutritionnel agisse sur différentes portions du cycle photopériodique, probablement celles où la durée du jour est intermédiaire (i.e. printemps et automne). En effet, ces portions intermédiaires du cycle photopériodique favorisent la transmission des effets des facteurs environnementaux non-photiques chez le hamster Sibérien (Paul *et al.*, 2009).

Ces différents traits identifiés chez la brebis peuvent être rapprochés d'études similaires (**Figure 22**) réalisées chez une autre race de brebis (Forcada *et al.*, 1992), chez la jument (Salazar-Ortiz *et al.*, 2011) ou encore chez la chèvre (Zarazaga *et al.*, 2005; Zarazaga *et al.*, 2011).

D'un point de vue théorique la manifestation des activités saisonnières de reproduction chez la brebis Île-de-France apparaît être dépendante d'un rapport de forces entre facteurs photopériodiques et nutritionnels. Au sein de ce rapport de forces, l'état d'engraissement des brebis agit comme un seuil constant opposé à l'entraînement photopériodique du rythme

reproductif. L'intensité de la photopériode doit alors être suffisamment puissante pour permettre l'expression du rythme reproductif. Cette formulation théorique peut être traduite en un modèle graphique (**Figure 29**).

Un des intérêts de ce modèle est d'identifier une fenêtre annuelle pour l'expression des activités de reproduction, déterminée en fonction du statut nutritionnel de l'individu. Ce modèle met également en évidence les effets de variations d'amplitude de l'état d'engraissement des individus sur les profils saisonniers de reproduction. Sont ainsi expliqués les résultats de certaines études qui identifiaient ou n'identifiaient pas d'effets d'une diminution du statut nutritionnel sur l'activité des gonadotrophines selon la période où elles étaient conduites (Barker-Gibb et Clarke, 1996; Renquist *et al.*, 2008b; Caraty A., communication personnelle).

Ce modèle est toutefois limité par nos conditions expérimentales puisque nous ne pouvons pas présumer de la réponse reproductive d'animaux placés dans des situations nutritionnelles extrêmes. Les quelques données dont nous disposons indiquent que conformément à de précédentes études (Allen et Lamming, 1961; Caldeira *et al.*, 2007), un trop faible état d'engraissement est un facteur susceptible de dépasser l'entraînement photopériodique des activités de reproduction pour maintenir une saison d'anœstrus constante.

2. Un modèle généralisable à l'ensemble des races ovines ?

Le suivi du profil saisonnier d'activité ovarienne chez la brebis Mérinos d'Arles, a permis de vérifier le moindre degré de saisonnalité de cette race comparée à l'Île-de-France (Première partie *Article 2*). A conditions d'élevage comparables (cycle photopériodique, état d'engraissement, alimentation, ...) ces brebis ont systématiquement exprimé une saison de reproduction plus longue. Cette différence de sensibilité au facteur photopériodique, propre au degré de saisonnalité de la race ovine considérée, vérifie les résultats de certaines études précédentes (Martin *et al.*, 1999; Chemineau *et al.*, 2004).

Concernant les effets de l'interaction entre facteurs nutritionnel et photopériodique sur ces mêmes profils, de nombreuses similitudes avec le modèle établi chez l'Île-de-France ont été identifiées. En effet l'état d'engraissement des brebis Mérinos d'Arles n'affecte pas la synchronisation photopériodique de la période du rythme circannuel de reproduction. En

revanche ce facteur agit sur le moment de chacune des transitions saisonnières pour *in fine* moduler la durée de la saison de reproduction.

Les interactions entre facteurs nutritionnel et photopériodiques semblent donc affecter l'expression du rythme reproductif des ovins indépendamment de leur degré de saisonnalité. Ceci nous permet de suggérer que les mécanismes neuroendocriniens impliqués dans la transmission des effets de l'état d'engraissement sur les voies photopériodiques du contrôle de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire, sont généralisables à l'ensemble de l'espèce ovine.

Entre les deux races ovines étudiées au cours ces travaux, l'harmonisation du modèle d'interaction entre facteurs nutritionnel et photopériodique sur la saisonnalité de la reproduction se réalise soit en modulant la sensibilité du rythme reproductif aux signaux nutritionnels (**Figure 30A**) soit par une modulation de l'amplitude du rythme circannuel de reproduction (**Figure 30B**).

Ces modèles généralisés révèlent la meilleure capacité d'expression du rythme reproductif des races moins saisonnées dans des conditions nutritionnelles défavorables voire une certaine capacité au désaisonnement dans des conditions nutritionnelles optimales. Ces phénomènes sont considérés comme reflétant l'adaptabilité de ces races aux effets du statut nutritionnel et sont exploités dans différents systèmes d'élevages (Molénat *et al.*, 1993).

Toujours en considérant ces modèles généralisés, une étude réalisée chez le bélier a suggéré l'existence de différents mécanismes, fonctions du degré de saisonnalité de la race considérée, pour l'intégration des effets de la nutrition sur l'axe reproductif (Martin *et al.*, 2002). Cette étude suggérait notamment l'intervention prépondérante des effets GnRH-indépendants pour moduler les profils saisonniers de reproduction chez les races moins saisonnées. Sans entrer en contradiction avec nos conclusions, il nous apparaît probable que cette intervention des effets GnRH-indépendants soit la conséquence des effets dynamiques de la nutrition associés aux variations du statut nutritionnel des béliers.

Afin de concilier ces résultats avec nos hypothèses, il nous apparaît que l'entraînement photopériodique des activités de reproduction peut être masqué chez certaines races moins saisonnées à la faveur des effets GnRH-indépendants. Ainsi l'amplification des variations d'amplitude du rythme annuel de reproduction chez les races moins saisonnées, favoriseraient

l'apparition de stratégies reproductives davantage opportunistes au sein d'une même espèce, et cela conformément au modèle développé par Bronson (2009).

3. Une interaction en amont de l'axe d'intégration du signal photopériodique

Les effets de l'interaction entre facteurs nutritionnel et photopériodique sur les profils saisonniers de reproduction des ovins suggèrent que le statut nutritionnel n'agit pas au niveau de la synchronisation photopériodique du rythme circannuel de reproduction mais essentiellement sur les mécanismes neuroendocriniens initiant les variations de sensibilité du générateurs de pulses de GnRH au rétrocontrôle négatif de l'œstradiol. Notre approche expérimentale a privilégié l'étude d'un site probable d'interactions localisé en amont de la voie centrale d'intégration du signal photopériodique, l'horloge circadienne principale.

Dans un premier temps nos études ont pu exclure un tel niveau d'interaction puisque le statut nutritionnel ne perturbe pas de façon évidente l'entraînement de l'activité métabolique de la glande pinéale par l'horloge des noyaux suprachiasmatiques. En revanche nous avons pu identifier un effet très net du statut nutritionnel sur l'amplitude du rythme endogène de sécrétion de mélatonine (Deuxième partie *Article 1*) impliquant probablement l'activation centrale de la voie AMPK (Deuxième partie *Article 2*).

Cette diminution des concentrations plasmatiques de mélatonine est attribuable à une modulation du métabolisme pinéalien et non pas à une variation du catabolisme de l'hormone. Cette déduction tient en deux observations principales :

- D'une part cet effet a pu être mimé par l'administration d'une substance pharmacologique et en l'occurrence deux substances, la metformine et l'AICAR.
- D'autre part, une éventuelle modification de la clairance hormonale liée à l'état corporel impliquerait l'effet inverse, i.e. des concentrations plasmatiques supérieures chez les brebis restreintes.

Cet effet est vraisemblablement indépendant du fonctionnement de l'horloge circadienne principale ainsi que laisse à penser l'absence déjà signalée de variations photopériodiques de l'amplitude du rythme de sécrétion de mélatonine chez les ovins (Chemineau *et al.*, 2002) et également vérifiée dans nos études.

En conséquence nos résultats suggèrent une action des signaux nutritionnels, métaboliques et hormonaux liés à l'état d'engraissement des animaux sur le circuit neuronal contrôlant l'activité métabolique pinéaliennne. L'action de ces différents facteurs, notamment via la voie de l'AMPK, concoure à intégrer une information propre au statut nutritionnel des animaux au niveau du rythme de sécrétion de mélatonine.

L'implication de la leptine dans la transmission de effets du statut nutritionnel sur les concentrations plasmatique de mélatonine est suggérée par de précédentes études réalisées *in vitro* (Zieba *et al.*, 2007) ou *in vivo* (Zieba *et al.*, 2008a) chez la brebis. En revanche nos résultats ne lui confirment pas une action photopériode-dépendante (i.e. inhibitrice en JL et stimulatrice en JC). Cette dernière était alors inexistante ou simplement dépassée par l'intervention d'autres facteurs restant à déterminer.

Statuer sur la participation de cette altération du rythme de sécrétion de mélatonine dans la transmission des effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction des ovins est délicat, le rôle tenu par l'amplitude du rythme étant sujet à controverse :

- D'un côté une étude réalisée chez la brebis Île-de-France écarte toute contribution de ce paramètre dans le contrôle des activités saisonnières de reproduction des ovins (Zarazaga *et al.*, 2003). De plus d'autres études n'identifient pas d'effet de la nutrition sur l'activité de la glande pinéale chez les ovins (Martin *et al.*, 2002) ou chez les caprins (Zarazaga *et al.*, 2011).
- D'un autre côté certains résultats suggèrent que les variations d'amplitude du rythme de sécrétion de mélatonine puissent être un moyen d'intégration d'une information de nature environnementale voire photopériodique pour contrôler les activités de reproduction (pour revue cf. Pévet *et al.*, 1991).

Concernant les études précédemment citées et excluant tout rôle de l'amplitude du rythme de sécrétion de mélatonine dans le contrôle du rythme reproductif saisonnier, certaines limites peuvent être constatées. Il s'agit de conditions nutritionnelles insuffisamment restrictives (Martin *et al.*, 2002) ou encore de concentrations plasmatiques endogènes de mélatonine déjà très faibles en conditions nutritionnelles standards (Zarazaga *et al.*, 2011). Effectivement nos résultats indiquent que la diminution des concentrations plasmatiques de mélatonine ne se manifeste que lorsqu'une certaine limite de note d'état d'engraissement est dépassée (NEC <

1.75) chez des animaux dont les concentrations plasmatiques de mélatonine en conditions standards sont suffisamment élevées (> 50 pg/ml) (Troisième partie *Article 1*).

Ainsi en l'état des connaissances actuelles nous sommes limités à trois hypothèses pour déterminer l'importance physiologique de nos résultats :

- i) il s'agit d'une simple association d'effets liés au statut nutritionnel sans rôle fonctionnel vis-à-vis de l'axe reproductif
- ii) l'effet est permissif et affecte indirectement les fonctions reproductives
- iii) l'effet perturbe le décodage du signal photopériodique pour affecter les profils saisonniers de reproduction.

Supposer la validité de cette troisième hypothèse impliquerait que le circuit d'intégration du signal mélatoninergique dispose de mécanismes capables d'identifier une chute de l'intensité de son signal puisque, ainsi que confirmé dans nos études, la valeur absolue des concentrations plasmatiques de mélatonine n'est pas un prédicteur pertinent des profils saisonniers de reproduction (Zarazaga *et al.*, 2003).

Deux scénarii peuvent être envisagés afin d'expliquer la transmission des effets d'une diminution de l'amplitude du rythme de sécrétion de mélatonine sur les profils saisonniers de reproduction :

- Premièrement pourrait être incriminé un effet directement dépendant des faibles niveaux de mélatonine qui *de facto* modulent la quantité totale de mélatonine libérée, pour une durée de sécrétion restant inchangée. Cet effet serait alors moins présent en jours longs, ne perturbant pas leur action de synchronisation du rythme de reproduction, mais s'amplifierait à mesure que la durée du jour diminue au cours du cycle annuel. Il interviendrait alors pour modifier la lecture de ces portions du cycle photopériodique notamment impliquées dans le contrôle de la durée de la saison de reproduction. Ce premier scénario est en contradiction avec certaines études excluant tout rôle des quantités totales de mélatonine sécrétées dans le contrôle des activités de reproduction notamment chez le hamster Syrien (Pitrosky *et al.*, 1995).
- Un second scénario résiderait dans les interrelations complexes existant entre les niveaux de mélatonine et la densité d'expression de son/ses récepteur(s) (pour revue

cf. Witt-Enderby *et al.*, 2003). Ainsi il serait envisageable que la chute des niveaux de sécrétion de mélatonine entraîne des variations d'expression de son récepteur qui *in fine* pourraient soit directement moduler l'interprétation du signal photopériodique, soit renforcer l'effet des signaux nutritionnels sur l'activité du générateur de pulses de GnRH (Hastings *et al.*, 1997; Heideman *et al.*, 2001).

Un moyen de confirmer ou d'infirmer l'ensemble de ces hypothèses consisterait d'une part à vérifier les effets du statut nutritionnel sur les concentrations de mélatonine dans le liquide cérébrospinal et d'autre part, à observer les effets d'une manipulation pharmacologique de ces concentrations sur l'expression de la saisonnalité de la reproduction. Soit en maintenant des niveaux constamment élevés chez des brebis restreintes, soit en maintenant des niveaux constamment faibles chez des brebis bien-nourries. Concernant ce dernier point, un début de réponse peut être apporté en considérant le fait que des brebis ayant subi une pinéalectomie incomplète ont exprimé un rythme reproductif saisonnier normal malgré une chute de leurs concentrations plasmatiques de mélatonine (Bittman *et al.*, 1983b).

Une limite considérable de nos travaux réside dans l'interprétation de variations centrales des concentrations de mélatonine via la mesure de ses concentrations plasmatiques. Si cette dernière semble bien refléter l'activité métabolique globale de la glande pinéale (Coon *et al.*, 1999; Skinner et Malpaux, 1999), il est nécessaire de garder à l'esprit que la biodisponibilité centrale de l'hormone puisse varier selon des facteurs non révélés par nos mesures (Legros *et al.*, 2006).

4. Autres sites d'interactions envisageables

Les résultats de nos travaux n'identifient pas l'horloge circadienne principale des ovins comme étant un lieu privilégié pour transmettre les effets des interactions entre facteurs photopériodique et nutritionnel sur l'activité des neurones à GnRH. Aussi, d'autres sites d'interactions localisés plus en aval de la voie d'intégration du signal photopériodique sont envisageables. Le long de cette voie ce sont alors l'ensemble des éléments capable de coupler signaux mélatoninergique et signaux liés à l'état d'engraissement des animaux, qui sont susceptibles de participer à la transmission des effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction des ovins.

Si nos résultats ne révèlent pas une participation de l'horloge circadienne principale des NSC, ils n'excluent pas une implication des horloges circadiennes périphériques de la *pars tuberalis*

et/ou de l'hypothalamus prémamillaire dans la transmission des effets de l'état d'engraissement sur les profils saisonniers de reproduction des ovins. Notamment parce que dans certaines conditions de restriction alimentaire temporelle, le fonctionnement des horloges périphériques peut être découplé de celui de l'horloge principale chez les rongeurs (Damiola *et al.*, 2000). Il serait ainsi envisageable que les effets de l'activation centrale de la voie AMPK sur les concentrations plasmatiques de mélatonine (Deuxième partie *Article 2*), ne constituent qu'un effet secondaire et que la cible principale de cette activation soit les horloges périphériques centrales.

Les variations d'expression de GPR50 en fonction du statut nutritionnel qui ont été constatées chez la souris (Ivanova *et al.*, 2008), ont également été étudiées au cours de cette thèse chez les ovins. L'objectif de notre expérimentation consistait en la comparaison des niveaux d'expression de la protéine au sein de différentes structures centrales, en fonction du statut nutritionnel chez la brebis Mérinos d'Arles. Toutefois, les résultats de ces travaux n'ont pas pu être exploités en considérant le manque de spécificité de l'anticorps développé chez le lapin (Hamouda *et al.*, 2007) et utilisé en Western blot chez l'ovin. Si des effets du statut nutritionnel sur les niveaux d'expression de GPR50 sont identifiés chez les ovins, ils pourraient intervenir conjointement avec la modulation des niveaux de mélatonine pour perturber la lecture du signal photopériodique et *in fine* affecter les profils saisonniers de reproduction.

Dans nos études la mise en évidence de la symétrie des effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction (Première partie) indique que le ou les mécanismes initiant les transitions saisonnières reproductives sont pareillement affectés par le statut nutritionnel. Ces résultats peuvent être rapprochés de la symétrie des phénomènes de neuroplasticité accompagnant chaque transition reproductrice et observés dans différentes structures hypothalamiques (principalement APO et ARC) (Chalivoix *et al.*, 2013). En effet cette neuroplasticité photopériodique serait impliquée dans la mise en place d'un circuit neuronal susceptible de moduler l'activité des neurones à GnRH et serait potentiellement sensible aux effets du statut nutritionnel (Horvath, 2006). Ainsi une perturbation de la neuroplasticité photopériodique hypothalamique par le statut nutritionnel pourrait en partie expliquer nos résultats.

Finalement, même si nos études n'apportent à ce sujet que peu d'éléments, il est vraisemblable que les populations de neurones à RFRP soit un site privilégié d'interaction

pour l'établissement des profils saisonniers de reproduction compte tenu de leur rôle dans le contrôle photopériodique et métabolique de l'activité des neurones à GnRH (Backholer *et al.*, 2010; Clarke *et al.*, 2012; Simonneaux et Ancel, 2012).

II. Le statut nutritionnel exerce une influence majeure sur la réponse des brebis à différentes techniques de maîtrise de la reproduction

La caractérisation des effets du statut nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction (Première partie) ainsi que la détermination de certains des sites centraux d'interaction entre facteurs photopériodique et nutritionnel (Deuxième partie), nous permettent d'émettre deux hypothèses afin d'expliquer la variabilité d'origine nutritionnelle dans la réponse aux traitements visant à maîtriser la saisonnalité de la reproduction des ovins (Troisième Partie) :

- Premièrement, en modulant le moment des transitions saisonnières reproductives, les effets statiques de la nutrition pourraient perturber le moment optimal d'application du traitement stimulateur. Cette hypothèse considère qu'une telle perturbation pourrait avoir lieu en l'absence d'effets du statut nutritionnel sur la synchronisation photopériodique du rythme reproductif, les résultats de nos études nous incitant à exclure de tels effets. Dans ce cas les signaux hormonaux, nutritionnels et métaboliques liés à un faible état d'engraissement agiraient i) sur **la capacité de l'axe hypothalamo-hypophysaire à interpréter une stimulation** ponctuelle (ex. la stimulation neuroendocrinienne à court terme induite par l'effet mâle) et/ou ii) **pour freiner l'interprétation d'une stimulation** maintenue (ex. le maintien de concentrations plasmatiques élevées de mélatonine, ...).

- D'un autre côté l'effet seuil d'un faible état d'engraissement pour limiter la manifestation de la saison reproductive peut ne pas interagir avec la capacité de l'organisme à interpréter un signal stimulateur, mais affecter l'intensité de sa réponse i.e. altérer la sensibilité de l'organisme pour une stimulation donnée. Ainsi certains éléments de la séquence endocrinienne et physiologique initiée par la stimulation pourraient être affectés voire les performances zootechniques globales du traitement. Cet effet qualitatif de la nutrition sur l'expression d'une réponse reproductive pourrait se transmettre via i) des modifications de **la capacité de l'axe reproducteur à être stimulé** (ex. via la diminution des concentrations plasmatiques d'insuline et son rôle central au sein des régulations endocrines des fonctions ovariennes (Scaramuzzi *et al.*, 2006)) et/ou ii) **des modifications plus ou moins**

directes de l'intensité du signal (ex. via la diminution du métabolisme de la glande pinéale dans le cadre de traitements à base de mélatonine).

Constatée dans nos expérimentations, cette variabilité d'origine nutritionnelle sera discutée en fonction de ces deux hypothèses. Ces dernières ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives et peuvent même se confondre lorsqu'un animal ne présente pas de réponse apparente à une stimulation donnée (**Figure 31**).

1. Implication de l'état d'engraissement dans la variabilité de la réponse à un traitement d'implants de mélatonine

Le statut nutritionnel des brebis a eu un effet considérable sur la variabilité de la réponse ovarienne à un traitement d'implants sous-cutanés de mélatonine réalisé en fin d'anœstrus chez la race Île-de-France (Troisième partie *Article 1*). Tandis que l'ensemble des brebis maintenues à un état d'engraissement moyen ont exprimé une réponse ovarienne correcte, seule la moitié des brebis maintenues à un faible état d'engraissement a présenté ce type de réponse. Au sein de ce dernier groupe a pu être identifié un seuil nutritionnel, matérialisé par les concentrations plasmatiques de mélatonine. Ainsi les brebis ne présentaient pas de réponse au traitement dès lors qu'un faible état corporel ($NEC < 1,50$) était associé à de faibles concentrations plasmatiques de l'hormone (< 100 pg/ml).

A notre connaissance, un tel effet de l'état corporel sur la réponse à un traitement de mélatonine n'avait jamais été identifié, probablement du fait de conditions nutritionnelles insuffisamment restrictives. Dans l'ensemble des études réalisées chez la brebis, il est majoritairement reporté que l'interaction entre un traitement de mélatonine et un faible état corporel provoque une meilleure réponse (Robinson *et al.*, 1991; Forcada *et al.*, 1995; Rondon *et al.*, 1996). Dans notre étude, une telle stimulation n'a pas été identifiée.

A première vue, nos résultats suggèrent qu'un trop faible état corporel a affecté la capacité des animaux à interpréter l'augmentation des concentrations plasmatiques de mélatonine en tant que signal stimulateur de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophysaire (**Figure 31**). Cette conclusion serait à rapprocher des effets d'un mauvais moment d'application du traitement ne permettant pas d'avancer la date de reprise d'une activité ovarienne (Forcada *et al.*, 2002a).

Cependant certaines caractéristiques des profils d'activité ovarienne des brebis ne répondant pas aux implants de mélatonine n'excluent pas une diminution de l'intensité de leur réponse

vers un niveau indétectable, plutôt qu'une absence totale de réponse endocrinienne (**Figure 31**).

Les résultats de cette étude nous ont renseignés quant à l'implication de faibles concentrations plasmatiques de mélatonine dans la transmission des effets de l'état d'engraissement sur les profils saisonniers de reproduction. En effet chez les brebis présentant un faible état corporel, il eut été vraisemblable d'obtenir une réponse correcte au traitement de mélatonine en réponse à une augmentation plus importante du ratio entre concentrations nocturnes (i.e. exogènes + endogènes) et concentrations diurnes (i.e. exogènes) de l'hormone (Forcada *et al.*, 1995), en comparaison aux brebis maintenues à un état d'engraissement moyen.

Dans la pratique, un tel effet est loin d'être obtenu et l'augmentation des concentrations plasmatiques de mélatonine induite par les implants ne permet pas de renverser les effets délétères d'un trop faible état d'engraissement sur la réponse ovarienne des brebis. En conclusion, il semblerait que la modulation de l'activité métabolique de la glande pinéale par la nutrition ne joue pas de rôle direct dans le contrôle de l'activité de l'axe reproductif.

2. Implication de l'état d'engraissement dans la variabilité de la réponse à un effet mâle

L'effet du statut nutritionnel sur la réponse au mâle en fin d'ancestrus chez la brebis Île-de-France (Troisième partie et *Annexe 3*), s'apparente à une modulation de la latence d'apparition ainsi que de l'intensité de certains des événements critiques de la séquence endocrinienne et physiologique initiée par cette stimulation. En revanche, la réponse physiologique des brebis en termes d'expression du pic préovulatoire de LH, de la proportion des cycles courts ainsi que de la manifestation des chaleurs ne pouvait pas être caractérisée en fonction du statut nutritionnel. La variabilité induite par la nutrition est ainsi essentiellement d'ordre qualitatif.

L'absence d'effets de l'état d'engraissement des brebis sur la manifestation des chaleurs suggère que la stimulation est correctement interprétée (Chanvallon *et al.*, 2011). Alors qu'une étude comparable réalisée chez la chèvre suggère le contraire (Veliz *et al.*, 2006). L'effet du statut nutritionnel sur les concentrations plasmatiques de LH avant la réalisation de l'effet mâle suggère que c'est la capacité de l'axe hypothalamo-hypophysaire à être stimulé qui est mise en jeu dans la variabilité qualitative de la réponse observée. De plus, la réponse au test de GnRH indique que cet effet peut s'exprimer directement au niveau de l'hypophyse.

La chute des concentrations plasmatiques d'insuline associée aux brebis maintenues à un faible état d'engraissement pouvant en partie expliquer ces effets (Miller *et al.*, 1995).

L'absence d'effets du statut nutritionnel sur la proportion de cycles courts observés en réponse à l'effet mâle suggère que ce paramètre, contrôlé par la photopériode (Pellicer-Rubio *et al.*, 2012), est indépendant de la nutrition. Cette conclusion est en contradiction avec une étude réalisée chez la chèvre (De Santiago-Miramontes *et al.*, 2008) ainsi que des travaux réalisés chez la brebis Limousine dans des conditions nutritionnelles toutefois peu comparables (Tournadre *et al.*, 2009).

3. Quelle variabilité liée aux effets statiques de la nutrition dans la réponse aux techniques visant à maîtriser la saisonnalité de la reproduction

Dans l'ensemble, les résultats de la troisième partie de nos travaux de thèse indiquent que l'état d'engraissement est source d'une importante variabilité de la réponse des brebis aux techniques visant à maîtriser le caractère saisonnier de leurs activités de reproduction. La principale origine de cette variabilité consistant en des modifications de l'intensité de la réponse aux différents stimuli (**Figure 31**). Cependant, certains effets statiques de la nutrition sur la capacité de l'organisme à répondre à une stimulation donnée ne sont pas à écarter.

Ces effets sont probablement observés au niveau de la réponse neuroendocrinienne des brebis soumises à une transition photopériodique stimulatrice (Première partie *Article 1* ; **Figure 28**). De plus, l'altération de l'interprétation d'un signal stimulateur est présente en réponse au traitement de mélatonine (Troisième partie *Article 1* ; **Figure 31**). Dans ce cas, des analyses approfondies sont tout de même nécessaires afin de vérifier l'absence totale d'une réponse endocrinienne précoce chez les brebis maintenues à un faible état et considérées comme ne répondant pas au traitement. Enfin, la baisse de l'intensité de la réponse à l'effet mâle observée chez les brebis maintenues à un faible état d'engraissement pourrait être rapprochée des effets du statut nutritionnel pour freiner l'interprétation d'une transition photopériodique stimulatrice. Cependant dans ce premier cas, la stimulation serait assez intense pour dépasser ce frein et provoquer *in fine* le déclenchement de la séquence endocrinienne complète.

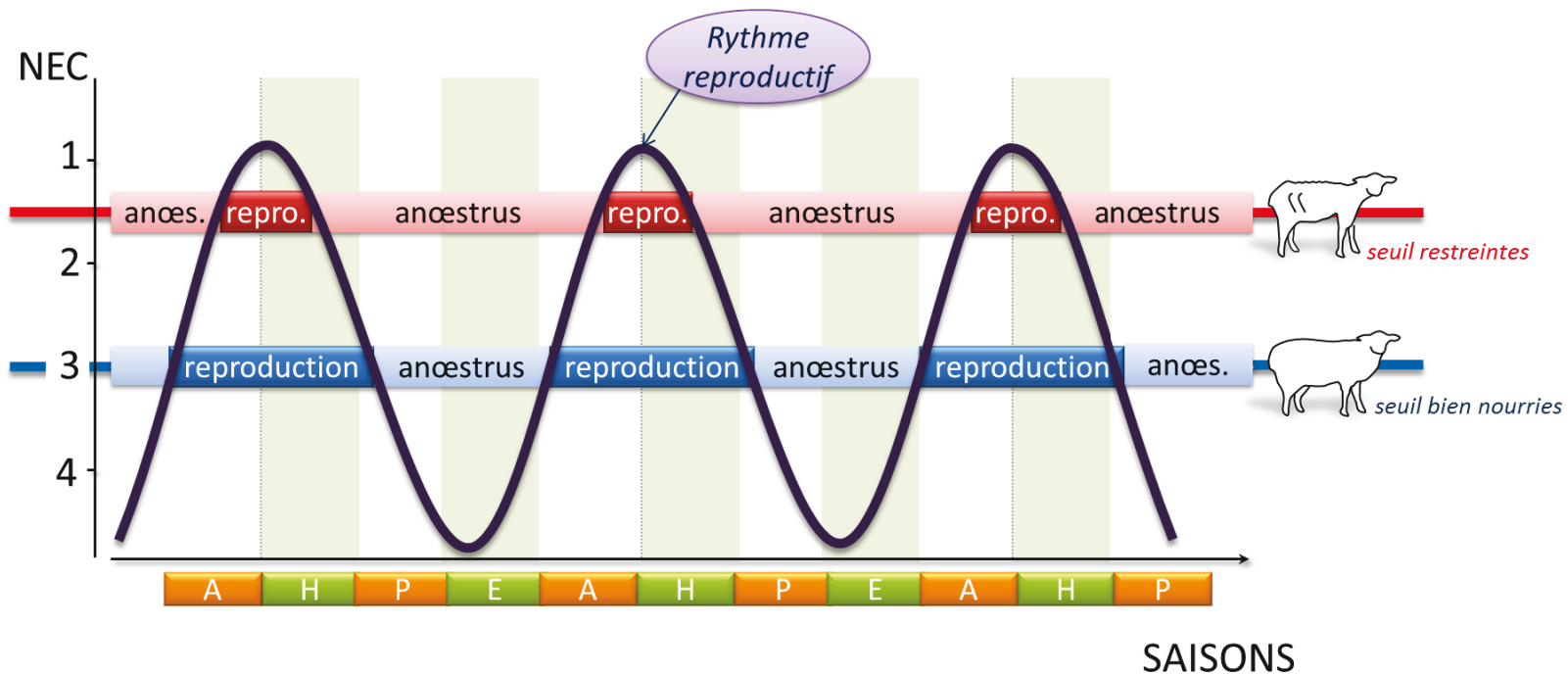


Figure 29 Modèle théorique des interactions entre signaux photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction chez la brebis Île-de-France, établi selon les résultats de la Première partie *Article 1*. Les barres horizontales représentent l’alternance des saisons d’anœstrus/reproduction au cours des saisons en fonction du statut nutritionnel des brebis (maintenues à un état d’engraissement moyen : barres rouges et maintenues à un faible état d’engraissement : barres bleues). Le rythme reproductif est entraîné par le cycle photopériodique, en conséquence son intensité est variable (courbe sinusoïdale). L’état d’engraissement des animaux agit comme un seuil (matérialisé par les lignes horizontales) conditionnant l’émergence du rythme reproductif. Aux périodes où l’intensité du rythme reproductif dépasse le seuil nutritionnel correspondent les saisons de reproduction et inversement pour les saisons d’anœstrus.

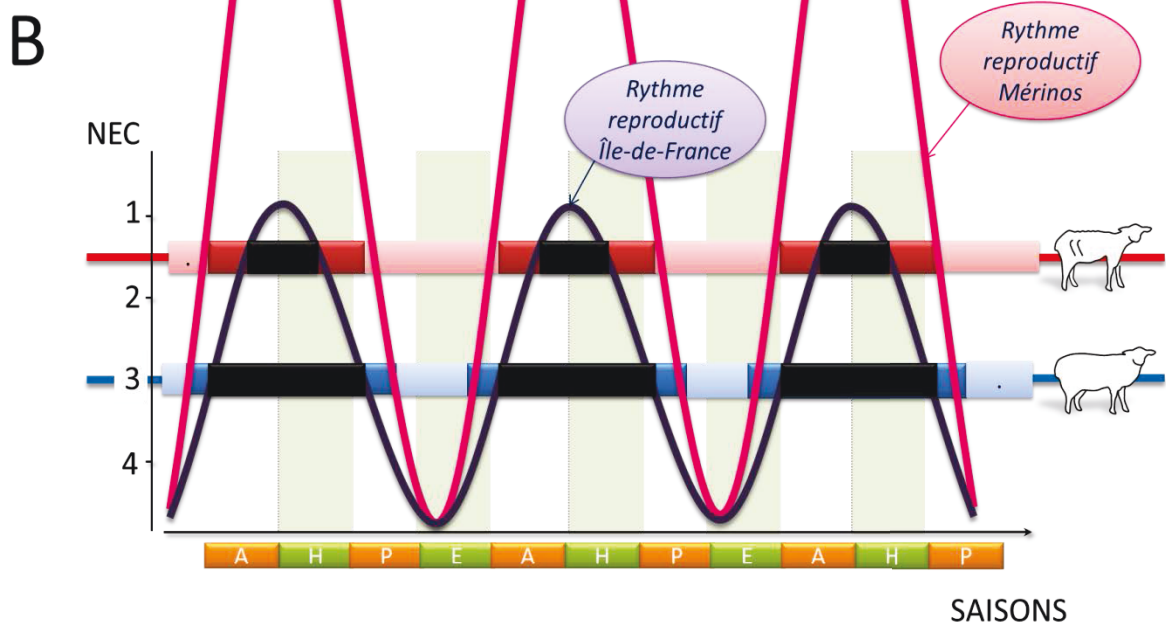
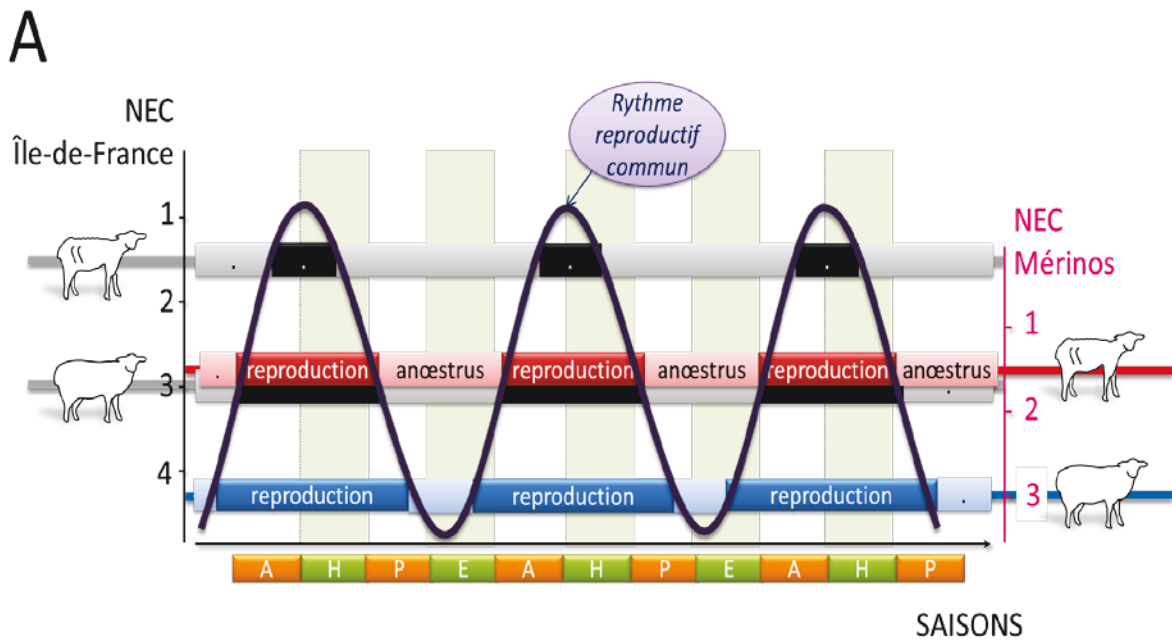


Figure 30 Modèle théorique généralisé des interactions entre signaux photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction des ovins, établi selon les résultats de la Première partie *Articles 1 & 2*. L'alternance des saisons d'anæstrus/reproduction est

représentée en barres grisées pour les brebis Île-de-France, en barres de couleurs (bleues et rouges pour les brebis maintenues à un état d'engraissement moyen et faible respectivement) pour les brebis Mérinos d'Arles.

L'harmonisation du modèle entre races de différents degrés de saisonnalité s'opère de deux manières, i) en conservant des caractéristiques communes du rythme reproductif et en modifiant sa sensibilité aux niveaux d'état d'engraissement (A) ou ii) en modifiant l'amplitude du rythme reproductif (B). Chaque modèle révèle certaines limites.

Le modèle A met en avant une certaine capacité au désaisonnement liée à l'état d'engraissement des races à faible degré de saisonnalité. En revanche, des valeurs de NEC élevées permettraient de s'affranchir complètement du rythme reproductif pour maintenir une saison de reproduction continue, un phénomène qui n'est pas observé dans la pratique.

Le modèle B met en avant une capacité génétique d'adaptation du rythme reproductif aux situations nutritionnelles défavorables chez des espèces à faible degré de saisonnalité. En revanche, il semble limité pour des valeurs de NEC trop faibles qui ne dépassent théoriquement jamais l'entraînement photopériodique du rythme reproductif.

Ce dernier type de modèle serait à rapprocher des résultats des travaux de Dardente *et al.* (2010) où des variations génétiques dans la séquence promotrice de la TSH β semblent contribuer à définir le degré de saisonnalité pour chaque espèce. De telles variations sont alors envisageables au sein même de l'espèce ovine et contribueraient à définir génétiquement l'amplitude du rythme reproductif.

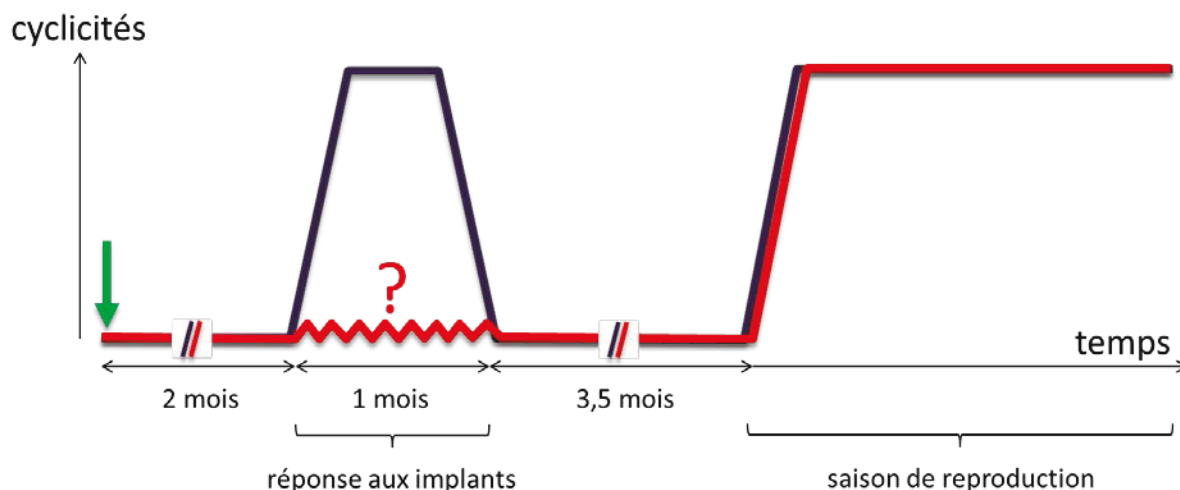


Figure 31 Représentation schématique de la réponse ovarienne à un traitement d'implants de mélatonine réalisé en fin de saison d'anœstrus chez des brebis Île-de-France maintenues à un faible état d'engraissement (Troisième partie *Article 1*). La flèche verte indique le moment de la pose des implants. Deux groupes sont identifiés, les brebis présentant une réponse au traitement (en bleu) et celles ne présentant pas de réponse (en rouge).

Dans le cadre des brebis répondant au traitement, l'état d'engraissement n'a eu d'effet ni sur l'interprétation du signal ni sur l'intensité de la réponse ovarienne de ces animaux.

Concernant les brebis non-répondantes, si aucun évènement endocrinien n'est identifiable en réponse aux implants de mélatonine (période marquée d'un point d'interrogation), l'état d'engraissement perturbe probablement l'interprétation du traitement. En revanche, si une réponse est identifiée (augmentation de la pulsativité de LH, ...) un effet de l'état d'engraissement sur l'intensité de la réponse des brebis peut être mis en avant.

Conclusion Générale

La caractérisation des effets, ainsi que l'identification de certains des sites et mécanismes, de l'interaction entre facteurs photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction des ovins a permis :

- i) D'observer le fruit des régulations homéostatiques et téléopporétiques sur l'expression du rythme reproductif en réponse aux effets statiques d'un faible état d'engraissement.
- ii) D'identifier le rôle des effets statiques de la nutrition dans la variabilité de la réponse reproductive à certaines techniques visant à maîtriser ce caractère saisonnier.

Nos résultats contribuent à améliorer l'état des connaissances de l'animal *en tant* que système. Ainsi, ils apportent des marqueurs contribuant à l'élaboration de modèles prédictifs de l'expression des phénotypes. En particulier des modèles visant à diriger cette expression dans des contraintes environnementales données en tenant compte de certaines contraintes (socio-économiques, éthiques, ...).

Ainsi la première partie de nos travaux a mis en évidence des traits caractéristiques des effets de l'interaction entre facteurs photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers de reproduction de deux races de brebis (Première partie – *Articles 1 & 2*), et a permis d'en établir un modèle susceptible d'être généralisable à l'ensemble de l'espèce ovine. Selon ce modèle (**Figure 29**) les signaux hormonaux, nutritionnels et métaboliques liés à un faible état d'engraissement agissent au niveau central pour masquer l'expression du rythme reproductif sans affecter sa synchronisation saisonnière. La généralisation du modèle aux différentes races ovines s'effectue en modulant la sensibilité du rythme reproductif aux signaux nutritionnels ou en modulant l'amplitude du rythme circannuel de reproduction (**Figure 30 A & B**), en fonction du degré de saisonnalité de la race considérée.

D'une façon remarquable malgré le maintien d'une situation nutritionnelle défavorable, les brebis restent en mesure d'exprimer une brève période d'activité ovarienne. D'un point de vue

écologique, la réduction de la période fertile au cours du cycle annuel qui accompagne la perte d'état corporel garantit une fenêtre de mises-bas centrée sur la période environnementale la plus favorable. Cette stratégie reproductive peut être exploitée dans des pratiques alimentaires réalisées en systèmes d'élevages ovins et conciliant différents critères de durabilités. Il s'agirait notamment de maximiser leur rentabilité économique en raisonnant le niveau des intrants puisqu'il n'est pas nécessaire de maintenir les animaux à un fort état d'engraissement pour assurer la présence d'une saison de reproduction (**Figure 32-1**).

La mise en évidence des effets statiques de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction des ovins donne également certaines perspectives quant au pilotage de l'alimentation en vue de contrôler cette expression phénotypique. Ainsi la période où l'expression du rythme reproductif est masquée par l'état nutritionnel des animaux pourrait représenter une zone de sensibilité accrue de l'axe reproducteur aux stimuli d'origine alimentaire (**Figure 32-2**). De plus, par le contrôle de l'état d'engraissement des animaux peut être réalisée l'uniformisation de l'état physiologique des animaux (**Figure 32-3**), un phénomène dont peuvent tirer avantages les techniques visant à maîtriser la saisonnalité de la reproduction des ovins (Fisher *et al.*, 1993).

Ce contrôle de la saisonnalité de la reproduction par l'alimentation présente un intérêt tout particulier pour les races moins saisonnées capables d'exprimer des stratégies reproductives davantage opportunistes (**Figure 32-4**). Il doit évidemment tenir compte de l'adaptabilité des ruminants aux situations nutritionnelles défavorables et solliciter les remarquables propriétés d'élasticité de leur organisme (Atti *et al.*, 2004).

Dans la deuxième partie de nos travaux nous avons mis en évidence un effet du statut nutritionnel en amont de la voie d'intégration du signal photopériodique, sur l'amplitude du rythme journalier endogène de sécrétion de mélatonine (Deuxième partie *Article 1*). Ce phénomène reste probablement indépendant du fonctionnement de l'horloge circadienne principale des NSC. Si ses implications fonctionnelles restent à déterminer, il apparaît que ce phénomène puisse servir d'un marqueur robuste pour rendre compte de l'expression phénotypique des activités de reproduction chez la brebis l'Île-de-France.

L'implication de la voie AMPK (Deuxième partie *Article 2*) suggère une potentielle intervention des mécanismes de maintien de l'homéostasie énergétique au niveau du fonctionnement des horloges circadiennes périphériques, notamment au niveau de la *pars*

tuberalis et de son mécanisme de mesure du temps photopériodique. Une telle régulation de l'activité de cette horloge circadienne par la nutrition et la transmission de ses effets sur les profils saisonniers de reproduction des ovins, représente un sujet d'étude qu'encouragent nos résultats.

Enfin, concernant la troisième partie de nos travaux, nos résultats ont pu mettre en évidence l'intérêt des travaux réalisés au cours des deux premières parties afin d'identifier le rôle de la nutrition dans la variabilité de la réponse aux techniques visant à contrôler la saisonnalité de la reproduction des brebis. Il apparaît ainsi que ses effets statiques puissent affecter l'intensité de la réponse à la stimulation mais également son interprétation, en fonction du signal considéré.

L'utilisation d'implants de mélatonine pour avancer la saison de reproduction (Troisième partie *Article 1*) a mis en évidence les effets délétères d'un trop faible état d'engraissement sur la réponse ovarienne des brebis. D'un autre côté, la réalisation d'un effet mâle (Troisième partie *Article 2*) semble être une stimulation assez puissante pour induire une réponse œstrale, indépendamment du statut nutritionnel. Ces effets pourraient impliquer la diminution des concentrations plasmatiques d'hormones telles l'insuline et indirectement la mélatonine, et se transmettre notamment au niveau de l'hypophyse.

Il serait intéressant en reprenant un protocole expérimental proche du notre, d'établir des corrélations entre cette variabilité et la réponse finale aux traitements en termes de produits d'élevage. Ce genre d'études permettrait d'obtenir des informations directement transférables pour la gestion des systèmes d'élevage.

A l'issue de ces travaux de thèse nous avons pu mettre en évidence :

- i) Le phénomène de masquage du rythme reproductif par les effets statiques de la nutrition.
- ii) Différents marqueurs pertinents des interactions entre facteurs nutritionnel et photopériodique.
- iii) La variabilité d'origine nutritionnelle de la réponse reproductive des brebis à des techniques naturelles de maîtrise de la saisonnalité de leur reproduction.

Ces résultats confèrent des perspectives intéressantes d'amélioration et/ou de valorisation de la durabilité des systèmes d'élevages ovins par la seule manipulation leur état d'engraissement et confirment l'importance du levier nutrition dans la gestion des systèmes d'élevages ovins. Ils ont évidemment vocation à être intégrés au sein d'une approche pluridisciplinaire afin d'alimenter des modèles prédictifs complexes capables d'apporter des réponses aux exigences de durabilité de ces systèmes d'élevage.

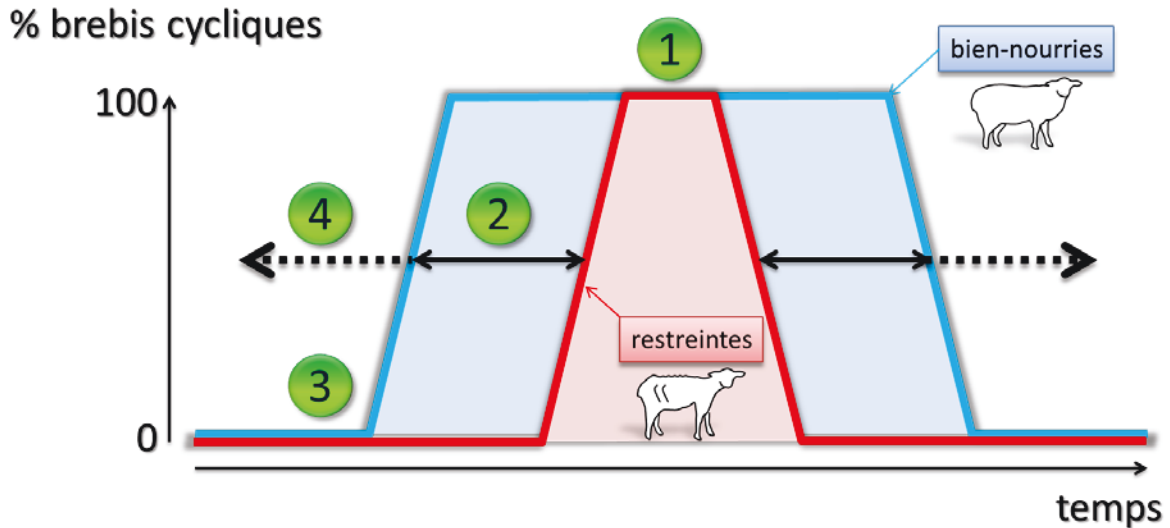


Figure 32 Représentation schématique des effets de l'interaction entre signaux photopériodique et nutritionnel sur les profils saisonniers d'activité ovarienne des ovins. Les différentes caractéristiques de cette interaction peuvent être exploitées en vue de maîtriser la saisonnalité de cette espèce :

1. Tout d'abord il n'apparaît pas nécessaire de maintenir les brebis à un état d'engraissement trop élevé pour qu'elles expriment une saison de reproduction.
2. Au cours de la période où se transmettent les effets de l'état d'engraissement sur l'expression du rythme reproductif, une réponse reproductive élastique à une stimulation nutritionnelle est vraisemblable.
3. La manipulation de l'état d'engraissement des animaux peut être utilisée en vue d'homogénéiser leur statut reproductif à un moment donné du cycle annuel. Cette homogénéisation serait profitable pour la réalisation d'un traitement de maîtrise de la saisonnalité, en maximisant les chances d'une interprétation correcte du signal.
4. Dans une certaine mesure, principalement en fonction des races considérées, l'intervention des effets statiques et dynamiques de la nutrition peut être mis à profit afin de limiter le degré d'expression de la saisonnalité des races ovines.

Bibliographie

- Abecia, J. A., J. A. Valares, F. Forcada, I. Palacín, S. Martín et A. Martino (2007). The effect of melatonin on the reproductive performance of three sheep breeds in Spain. *Small Ruminant Research* 69(1): 10-16.
- Adam, C. L. et P. A. Findlay (2010). Decreased blood-brain leptin transfer in an ovine model of obesity and weight loss: resolving the cause of leptin resistance. *Int J Obes (Lond)*.
- Adam, C. L., P. A. Findlay, R. P. Aitken, J. S. Milne et J. M. Wallace (2012). In vivo changes in central and peripheral insulin sensitivity in a large animal model of obesity. *Endocrinology* 153(7): 3147-3157.
- Adam, C. L., P. A. Findlay et D. W. Miller (2006). Blood-brain leptin transport and appetite and reproductive neuroendocrine responses to intracerebroventricular leptin injection in sheep: influence of photoperiod. *Endocrinology* 147(10): 4589-4598.
- Adams, N. R., J. A. Abordi, J. R. Briegel et M. R. Sanders (1994). Effect of diet on the clearance of estradiol-17 beta in the ewe. *Biol Reprod* 51(4): 668-674.
- Adams, N. R., J. R. Briegel, M. R. Sanders, M. A. Blackberry et G. B. Martin (1997). Level of nutrition modulates the dynamics of oestradiol feedback on plasma FSH in ovariectomized ewes. *Anim Reprod Sci* 47(1-2): 59-70.
- Adams, V. L., R. L. Goodman, A. K. Salm, L. M. Coolen, F. J. Karsch et M. N. Lehman (2006). Morphological plasticity in the neural circuitry responsible for seasonal breeding in the ewe. *Endocrinology* 147(10): 4843-4851.
- Al-Shorepy, S. R. et D. R. Notter (1997). Response to selection for fertility in a fall-lambing sheep flock. *Journal of Animal Science* 75: 2033-2040.
- Alaerts, M., T. Venken, A. S. Lenaerts, S. De Zutter, K. F. Norrback, R. Adolfsson et J. Del-Favero (2006). Lack of association of an insertion/deletion polymorphism in the G protein-coupled receptor 50 with bipolar disorder in a Northern Swedish population. *Psychiatr Genet* 16(6): 235-236.
- Allen, D. M. et G. E. Lamming (1961). Nutrition and reproduction in the ewe. *The Journal of Agricultural Science* 56(01): 69-79.
- Almeida, O. F. et G. A. Lincoln (1982). Photoperiodic regulation of reproductive activity in the ram: evidence for the involvement of circadian rhythms in melatonin and prolactin secretion. *Biol Reprod* 27(5): 1062-1075.
- Amstalden, M., H. J. Billings, S. M. Hileman, C. J. McManus, M. Valent, L. M. Coolen, R. L. Goodman et M. N. Lehman (2005). Location of dynorphin neurons that project to the external zone of the median eminence in the sheep. Abstract 759.14. 35th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington DC.
- Anderson, G. M., J. M. Connors, S. L. Hardy, M. Valent et R. L. Goodman (2001). Oestradiol microimplants in the ventromedial preoptic area inhibit secretion of luteinizing hormone via dopamine neurones in anoestrous ewes. *J Neuroendocrinol* 13(12): 1051-1058.
- Anderson, G. M., S. L. Hardy, M. Valent, H. J. Billings, J. M. Connors et R. L. Goodman (2003). Evidence that thyroid hormones act in the ventromedial preoptic area and the premammillary region of the brain to allow the termination of the breeding season in the ewe. *Endocrinology* 144(7): 2892-2901.
- Araujo, R. L., B. M. Andrade, M. L. da Silva, A. C. Ferreira et D. P. Carvalho (2009). Tissue-specific deiodinase regulation during food restriction and low replacement dose of leptin in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(5): E1157-1163.

- Araujo, R. L. et D. P. Carvalho (2011). Bioenergetic impact of tissue-specific regulation of iodothyronine deiodinases during nutritional imbalance. *J Bioenerg Biomembr* 43(1): 59-65.
- Archer, Z. A., P. A. Findlay, S. R. McMillen, S. M. Rhind et C. L. Adam (2004). Effects of nutritional status and gonadal steroids on expression of appetite-regulatory genes in the hypothalamic arcuate nucleus of sheep. *J Endocrinol* 182(3): 409-419.
- Archer, Z. A., S. M. Rhind, P. A. Findlay, C. E. Kyle, L. Thomas, M. Marie et C. L. Adam (2002). Contrasting effects of different levels of food intake and adiposity on LH secretion and hypothalamic gene expression in sheep. *J Endocrinol* 175(2): 383-393.
- Arendt, J. (1986). Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 8: 266-320.
- Arendt, J., A. Symons et C. Laud (1981). Pineal function in the sheep: evidence for a possible mechanism mediating seasonal reproductive activity. (6): 584-586.
- Armario, A. et T. Jolin (1986). Effects of water restriction on circadian rhythms of corticosterone, growth hormone and thyroid stimulating hormone in adult male rats. *Physiol Behav* 38(3): 327-330.
- Asher, G. et U. Schibler (2011). Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metab* 13(2): 125-137.
- Atti, N. (1991). Relations entre l'état corporel et les dépôts adipeux chez la brebis Barbarine. *Options Méditerranéennes* 13: 31-34.
- Atti, N., F. Bocquier et G. Khaldi (2004). Performance of the fat-tailed Barbarine sheep in its environment: adaptive capacity to alternation of underfeeding and re-feeding periods. A review. *Animal Research* 53: 165-176.
- Atti, N., A. Nefzaoui et F. Bocquier (1995). Influence de l'état corporel à la mise bas sur les performances, le bilan énergétique et l'évolution des métabolites sanguins de la brebis Barbarine. *Options Méditerranéennes série A*: 25-33.
- Backholer, K., J. T. Smith, A. Rao, A. Pereira, J. Iqbal, S. Ogawa, Q. Li et I. J. Clarke (2010). Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Endocrinology* 151(5): 2233-2243.
- Baker, J. R. (1938). The evolution of breeding season dans *Evolution: Essays on Aspects of Evolutionary Biology*. Eds G. R. de Beer. London, Oxford University Press: 161-177.
- Baker, R. R. (1978). The evolutionary ecology of animal migration. New York, Holmes & Meier Publishers.
- Balasse, M., A. B. Smith, S. H. Ambrose et S. R. Leigh (2003). Determining sheep birth seasonality by analysis of tooth enamel oxygen isotope ratios: the late stone age site of Kasteelberg (South Africa). *Journal of Archaeological Science* 30: 205-215.
- Balasse, M. et A. Tresset (2007). Environmental constraints on the reproductive activity of domestic sheep and cattle: what latitude for the herder? *Anthropozoologica* 42(2): 71-88.
- Banks, E. M. (1964). Some Aspects of Sexual Behavior in Domestic Sheep, *Ovis aries*. *Behaviour* 23: 249-279.
- Banks, W. A., B. O. Burney et S. M. Robinson (2008). Effects of triglycerides, obesity, and starvation on ghrelin transport across the blood-brain barrier. *Peptides* 29(11): 2061-2065.
- Banks, W. A., A. B. Coon, S. M. Robinson, A. Moinuddin, J. M. Shultz, R. Nakaoke et J. E. Morley (2004). Triglycerides induce leptin resistance at the blood-brain barrier. *Diabetes* 53(5): 1253-1260.
- Banks, W. A., S. A. Farr et J. E. Morley (2006). The effects of high fat diets on the blood-brain barrier transport of leptin: failure or adaptation? *Physiol Behav* 88(3): 244-248.

- Banks, W. A. et C. L. Farrell (2003). Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity is acquired and reversible. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(1): E10-15.
- Banks, W. A., J. B. Jaspan et A. J. Kastin (1997). Selective, physiological transport of insulin across the blood-brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 18(8): 1257-1262.
- Barker-Gibb, M. L. et I. J. Clarke (1996). Increased galanin and neuropeptide-Y immunoreactivity within the hypothalamus of ovariectomised ewes following a prolonged period of reduced body weight is associated with changes in plasma growth hormone but not gonadotropin levels. *Neuroendocrinology* 64(3): 194-207.
- Barrell, G. K. et K. R. Lapwood (1979). Effects of pinealectomy on the secretion of luteinizing hormone, testosterone and prolactin in rams exposed to various lighting regimes. *Journal of Endocrinology* 80: 397-405.
- Barrell, G. K., L. A. Thrun, M. E. Brown, C. Viguie et F. J. Karsch (2000). Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the ewe. *Biol Reprod* 63(3): 769-774.
- Barrett, P. et M. Bolborea (2012). Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *J Pineal Res* 52(4): 376-388.
- Barrett, P., F. J. Ebling, S. Schuhler, D. Wilson, A. W. Ross, A. Warner, P. Jethwa, A. Boelen, T. J. Visser, D. M. Ozanne, Z. A. Archer, J. G. Mercer et P. J. Morgan (2007). Hypothalamic thyroid hormone catabolism acts as a gatekeeper for the seasonal control of body weight and reproduction. *Endocrinology* 148(8): 3608-3617.
- Barrett, P., E. Ivanova, E. S. Graham, A. W. Ross, D. Wilson, H. Ple, J. G. Mercer, F. J. Ebling, S. Schuhler, S. M. Dupre, A. Loudon et P. J. Morgan (2006). Photoperiodic regulation of cellular retinol binding protein, CRBP1 [corrected] and nestin in tanycytes of the third ventricle ependymal layer of the Siberian hamster. *J Endocrinol* 191(3): 687-698.
- Bartlewski, P. M., A. P. Beard, S. J. Cook et N. C. Rawlings (1998). Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil* 113: 275-285.
- Bartlewski, P. M., A. P. Beard et N. C. Rawlings (1999a). Ovarian function in ewes at the onset of the breeding season. *Anim Reprod Sci* 57(1-2): 67-88.
- Bartlewski, P. M., A. P. Beard et N. C. Rawlings (1999b). Ovarian function in ewes during the transition from breeding season to anoestrus. *Anim Reprod Sci* 57(1-2): 51-66.
- Bartness, T. J., J. B. Powers, M. H. Hastings, E. L. Bittman et B. D. Goldman (1993). The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *J Pineal Res* 15(4): 161-190.
- Bass, J. et J. S. Takahashi (2010). Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 330(6009): 1349-1354.
- Bhattacharyya, S., J. Luan, B. Challis, J. Keogh, C. Montague, J. Brennan, J. Morten, S. Lowenbeim, S. Jenkins, I. S. Farooqi, N. J. Wareham et S. O'Rahilly (2006). Sequence variants in the melatonin-related receptor gene (GPR50) associate with circulating triglyceride and HDL levels. *J Lipid Res* 47(4): 761-766.
- Billings, H. J., C. Viguie, F. J. Karsch, R. L. Goodman, J. M. Connors et G. M. Anderson (2002). Temporal requirements of thyroid hormones for seasonal changes in LH secretion. *Endocrinology* 143(7): 2618-2625.
- Bishaw, F. et S. Melaku (2008). Effects of supplementation of Farta sheep fed hay with sole or mixtures of noug seed meal and wheat bran on feed intake, digestibility and body weight change. *Trop Anim Health Prod* 40(8): 597-606.

- Bittman, E. L., R. J. Dempsey et F. J. Karsch (1983a). Pineal melatonin secretion drives the reproductive response to daylength in the ewe. *Endocrinology* 113(6): 2276-2283.
- Bittman, E. L. et F. J. Karsch (1984). Nightly duration of pineal melatonin secretion determines the reproductive response to inhibitory day length in the ewe. *Biol Reprod* 30(3): 585-593.
- Bittman, E. L., F. J. Karsch et J. W. Hopkins (1983b). Role of the pineal gland in ovine photoperiodism: regulation of seasonal breeding and negative feedback effects of estradiol upon luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 113(1): 329-336.
- Bittman, E. L., A. H. Kaynard, D. H. Olster, J. E. Robinson, S. M. Yellon et F. J. Karsch (1985). Pineal melatonin mediates photoperiodic control of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe. *Neuroendocrinology* 40(5): 409-418.
- Blache, D., C. L. Adam et G. B. Martin (2002). The mature male sheep: a model to study the effects of nutrition on the reproductive axis. *Reprod Suppl* 59: 219-233.
- Blache, D., L. M. Chagas, M. A. Blackberry, P. E. Vercoe et G. B. Martin (2000). Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. *J Reprod Fertil* 120(1): 1-11.
- Blache, D., S. Zhang et G. B. Martin (2006). Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod Nutr Dev* 46(4): 379-390.
- Blanc, F., F. Bocquier, J. Agabriel, P. D'Hour et Y. Chilliard (2006). Adaptive abilities of the females and sustainability of ruminant livestock systems. A review. *Animal Research* 55: 489-510.
- Blanc, F., B. Dumont, G. Brunschwig, F. Bocquier et J. Agabriel (2010). Robustesse, flexibilité, plasticité : des processus adaptatifs révélés dans les systèmes d'élevage extensifs de ruminants. *INRA Productions Animales* 23(1): 65-80.
- Bockmann, J., T. M. Bockers, B. Vennemann, P. Niklowitz, J. Muller, W. Wittkowski, B. Sabel et M. R. Kreutz (1996). Short photoperiod-dependent down-regulation of thyrotropin- α and - β in hamster pars tuberalis-specific cells is prevented by pinealectomy. *Endocrinology* 137: 1804-1813.
- Bockmann, J., T. M. Bockers, C. Winter, W. Wittkowski, H. Winterhoff, T. Deufel et M. R. Kreutz (1997). Thyrotropin expression in hypophyseal pars tuberalis-specific cells is 3,5,3'-triiodothyronine, thyrotropin-releasing hormone, and pit-1 independent. *Endocrinology* 138: 1019-1028.
- Bocquier, F., N. Atti, A. Purroy et Y. Chilliard (2000). The role of body reserves in the metabolic adaptation of different breeds of sheep to food shortage. *Livestock production and climatic uncertainty in the Mediterranean*. European Association of Animal Production, Agadir, Morocco, Wageningen Academic Publishers.
- Bocquier, F., G. Caja, L. M. Oregui, A. Ferret, E. Molina et F. Barillet (2002). Nutrition et alimentation des brebis laitières. *Options Méditerranéennes Série B* 42: 37-55.
- Bocquier, F. et Y. Chilliard (1994). Effect of severe undernutrition on body weight and fat tissue changes in dry Lacaune ewes. *Annales de Zootechnie* 43: 300.
- Bocquier, F. et E. González-García (2010). Sustainability of ruminant agriculture in the new context: feeding strategies and features of animal adaptability into the necessary holistic approach. *Animal* 4(Special Issue 07): 1258-1273.
- Boelen, A., W. M. Wiersinga et E. Fliers (2008). Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid* 18(2): 123-129.
- Bogusz, A. L., S. L. Hardy, M. N. Lehman, J. M. Connors, S. M. Hileman, J. H. Sliwowska, H. J. Billings, C. J. McManus, M. Valent, S. R. Singh, C. C. Nestor, L. M. Coolen et R. L. Goodman (2008). Evidence that gamma-aminobutyric acid is part of the neural circuit mediating estradiol negative feedback in anestrus ewes. *Endocrinology* 149(6): 2762-2772.

- Boukhliq, R., R. L. Goodman, S. J. Berriman, B. Adrian et M. N. Lehman (1999). A subset of gonadotropin-releasing hormone neurons in the ovine medial basal hypothalamus is activated during increased pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 140: 5929-5936.
- Bronson, F. H. (1985). Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biol Reprod* 32(1): 1-26.
- Bronson, F. H. (1988). Mammalian reproductive strategies: genes, photoperiod and latitude. *Reprod Nutr Dev* 28(2B): 335-347.
- Bronson, F. H. (1989). *Mammalian Reproductive Biology*. London, The University of Chicago Press.
- Bronson, F. H. (2009). Climate change and seasonal reproduction in mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences* 364: 3331-3340.
- Bronson, F. H. et P. D. Heideman (1994). Seasonal regulation of reproduction in mammals dans *The Physiology of Reproduction*. Eds E. Knobil et J.D. Neill. New-York, Raven Press: 542-583.
- Bronson, F. H. et J. M. Manning (1991). The energetic regulation of ovulation: a realistic role for body fat. *Biol Reprod* 44(6): 945-950.
- Bruford, M. W., D. G. Bradley et G. Luikart (2003). DNA Markers Reveal the Complexity of Livestock Domestication. *Nature Reviews Genetics* 4: 900-910.
- Bünning, E. (1960). Circadian rhythms and time measurement in photoperiodism. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 25: 249-256.
- Bur, I. M., S. Zouaoui, P. Fontanaud, N. Coutry, F. Molino, A. O. Martin, P. Mollard et X. Bonnefont (2010). The comparison between circadian oscillators in mouse liver and pituitary gland reveals different integration of feeding and light schedules. *PLoS One* 5(12): e15316.
- Burrin, D. G., C. L. Ferrell, J. H. Eisemann, R. A. Britton et J. A. Nienaber (1989). Effect of level of nutrition on splanchnic blood flow and oxygen consumption in sheep. *Br J Nutr* 62(1): 23-34.
- Butler, M. P., K. W. Turner, J. H. Park, E. E. Schoomer, I. Zucker et M. R. Gorman (2010). Seasonal regulation of reproduction: altered role of melatonin under naturalistic conditions in hamsters. *Proc Biol Sci* 277(1695): 2867-2874.
- Butler, W. R., P. V. Malven, L. B. Willett et D. J. Bolt (1972). Patterns of pituitary release and cranial output of LH and prolactin in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 91: 793-801.
- Caldani, M., M. Batailler, J. C. Thiery et M. P. Dubois (1988). LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry* 89: 129-139.
- Caldeira, R. M., A. T. Belo, C. C. Santos, M. I. Vazques et A. V. Portugal (2007). The effect of long-term feed restriction and over-nutrition on body condition score, blood metabolites and hormonal profiles in ewes. *Small Ruminant Research* 68(3): 242-255.
- Campbell, B. K. et D. T. Baird (2001). Inhibin A is a follicle stimulating hormone-responsive marker of granulosa cell differentiation, which has both autocrine and paracrine actions in sheep. *Journal of Endocrinology* 169: 333-345.
- Campbell, R. E., G. Gaidamaka, S. K. Han et A. E. Herbison (2009). Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(26): 10835-10840.
- Canepa, S., A. L. Laine, C. Fagu, C. Flon et D. Monniaux (2008). Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cahier des Techniques de l'INRA* 64: 19-30.
- Cao, R. et K. Obrietan (2010). mTOR Signaling and Entrainment of the Mammalian Circadian Clock. *Mol Cell Pharmacol* 2(4): 125-130.

- Caraty, A., C. Fabre-Nys, B. Delaleu, A. Locatelli, G. Bruneau, F. J. Karsch et A. Herbison (1998). Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 139(4): 1752-1760.
- Caraty, A., I. Franceschini et G. E. Hoffman (2010). Kisspeptin and the preovulatory gonadotrophin-releasing hormone/luteinising hormone surge in the ewe: basic aspects and potential applications in the control of ovulation. *J Neuroendocrinol* 22(7): 710-715.
- Caraty, A. et A. Locatelli (1988). Effect of time after castration on secretion of LHRH and LH in the ram. *Journal of Reproduction and Fertility* 82: 263-269.
- Caraty, A., A. Locatelli, S. M. Moenter et F. J. Karsch (1994). Sampling of hypophyseal portal blood of conscious sheep for direct monitoring of hypothalamic neurosecretory substances. *Methods in Neurosciences* 20: 162-183.
- Caraty, A. et D. C. Skinner (1999). Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 140(1): 165-170.
- Caro, J. F., J. W. Kolaczynski, M. R. Nyce, J. P. Ohannesian, I. Opentanova, W. H. Goldman, R. B. Lynn, P. L. Zhang, M. K. Sinha et R. V. Considine (1996). Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348(9021): 159-161.
- Castaneda, T. R., J. Tong, R. Datta, M. Culler et M. H. Tschop (2010). Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol* 31(1): 44-60.
- Castellano, J. M., J. Roa, R. M. Luque, C. Dieguez, E. Aguilar, L. Pinilla et M. Tena-Sempere (2009). KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications. *Peptides* 30(1): 139-145.
- Chalivoix, S. (2010). Transition photopériodique et plasticité neuronale dans l'hypothalamus ovin : aspects neuranatomiques et fonctionnels Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Tours, Université François-Rabelais de Tours.
- Chalivoix, S., A. Bagnolini, A. Caraty, J. Cognie, B. Malpaux et L. Dufourny (2010a). Effects of photoperiod on kisspeptin neuronal populations of the ewe diencephalon in connection with reproductive function. *J Neuroendocrinol* 22(2): 110-118.
- Chalivoix, S., D. Guillaume, J. Cognie, J. C. Thiery, B. Malpaux et L. Dufourny (2013). Photoperiodic variations of the polysialylated form of neural cell adhesion molecule within the hypothalamus and related reproductive output in the ewe. *Cell Tissue Res*.
- Chalivoix, S., B. Malpaux et L. Dufourny (2010b). Relationship between polysialylated neural cell adhesion molecule and beta-endorphin- or gonadotropin releasing hormone-containing neurons during activation of the gonadotrope axis in short daylength in the ewe. *Neuroscience* 169(3): 1326-1336.
- Challet, E., I. Caldelas, C. Graff et P. Pevet (2003). Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals. *Biol Chem* 384(5): 711-719.
- Challet, E., P. Pévet et A. Malan (1997a). Effect of prolonged fasting and subsequent refeeding on free-running rhythms of temperature and locomotor activity in rats. *Behav Brain Res* 84: 275-284.
- Challet, E., P. Pevet, B. Vivien-Roels et A. Malan (1997b). Phase-advanced daily rhythms of melatonin, body temperature, and locomotor activity in food-restricted rats fed during daytime. *J Biol Rhythms* 12(1): 65-79.
- Chanvallon, A., L. Sagot, E. Pottier, N. Debus, D. Francois, T. Fassier, R. J. Scaramuzzi et C. Fabre-Nys (2011). New insights into the influence of breed and time of the year on the response of ewes to the 'ram effect'. *Animal* 5(10): 1594-1604.

- Chelikani, P. K., D. R. Glimm et J. J. Kennelly (2003). Short communication: Tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. *J Dairy Sci* 86(7): 2369-2372.
- Chemineau, P. (1987). Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats - a review. *Livestock Production Science* 17(0): 135-147.
- Chemineau, P., I. Beltran de Heredia, A. Daveau et L. Bodin (1996). High repeatability of the amplitude and duration of the nycthemeral rhythm of the plasma melatonin concentration in the Ile-de-France ewe. *J Pineal Res* 21(1): 1-6.
- Chemineau, P., A. Daveau, L. Bodin, L. Zarazaga, A. Gomez-Brunet et B. Malpoux (2002). Sheep as a mammalian model of genetic variability in melatonin. *Reprod Suppl* 59: 181-190.
- Chemineau, P., A. Daveau, Y. Cognié, G. Aumont et D. Chesneau (2004). Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. *BMC Physiology* 4(12).
- Chemineau, P., D. Guillaume, M. Migaud, J. C. Thiery, M. T. Pellicer-Rubio et B. Malpoux (2008). Seasonality of Reproduction in Mammals: Intimate Regulatory Mechanisms and Practical Implications. *Reproduction in Domestic Animals* 43(Suppl. 2): 40-47.
- Chemineau, P., B. Malpoux, J. A. Delgadillo, Y. Guérin, J. P. Ravault, J. Thimonier et J. Pelletier (1992). Control of sheep and goats reproduction: use of light and melatonin. *Animal reproduction science* 30: 157-184.
- Chik, C. L., A. K. Ho et G. M. Brown (1987). Effect of food restriction on 24-h serum and pineal melatonin content in male rats. *Acta Endocrinologica* 115(4): 507-513.
- Childs, G. V., G. Unabia et D. Rougeau (1994). Cells that express luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) beta-subunit messenger ribonucleic acids during the estrous cycle: the major contributors contain LH beta, FSH beta, and/or growth hormone. *Endocrinology* 134(2): 990-997.
- Chilliard, Y. (1999). Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal dans *Biology of lactation*. Eds J. Martinet, L. M. Houdebine et H. H. Head. Paris, France, INRA Éditions: 503-552.
- Chilliard, Y., F. Bocquier et M. Doreau (1998). Digestive and metabolic adaptations of ruminants to undernutrition, and consequences on reproduction. *Reprod Nutr Dev* 38(2): 131-152.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, Y. Faulconnier, M. Bonnet, J. Rouel et F. Bocquier (2000). Adipose tissue metabolism and its role in adaptations to undernutrition in ruminants. *Proc Nutr Soc* 59(1): 127-134.
- Clarke, I. J. (2008). Models of 'obesity' in large animals and birds. *Front Horm Res* 36: 107-117.
- Clarke, I. J. (2011). Control of GnRH secretion: One step back. *Front Neuroendocrinol* 32: 367-375.
- Clarke, I. J. et J. T. Cummins (1982). The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111(5): 1737-1739.
- Clarke, I. J., Y. Qi, I. Puspita Sari et J. T. Smith (2009). Evidence that RF-amide related peptides are inhibitors of reproduction in mammals. *Front Neuroendocrinol* 30(3): 371-378.
- Clarke, I. J., I. P. Sari, Y. Qi, J. T. Smith, H. C. Parkington, T. Ubuka, J. Iqbal, Q. Li, A. Tilbrook, K. Morgan, A. J. Pawson, K. Tsutsui, R. P. Millar et G. E. Bentley (2008). Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 149(11): 5811-5821.

- Clarke, I. J. et J. T. Smith (2010). The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) in the seasonality of reproduction in sheep. *Soc Reprod Fertil Suppl* 67: 159-169.
- Clarke, I. J., J. T. Smith, B. A. Henry, B. J. Oldfield, A. Stefanidis, R. P. Millar, I. P. Sari, K. Chng, C. Fabre-Nys, A. Caraty, B. T. Ang, L. Chan et G. S. Fraley (2012). Gonadotropin-inhibitory hormone is a hypothalamic peptide that provides a molecular switch between reproduction and feeding. *Neuroendocrinology* 95(4): 305-316.
- Clarkson, J., X. d'Anglemont de Tassigny, A. S. Moreno, W. H. Colledge et A. E. Herbison (2008). Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 28(35): 8691-8697.
- Coge, F., S. P. Guenin, I. Fery, M. Migaud, S. Devavry, C. Slugoeki, C. Legros, C. Ouvry, W. Cohen, N. Renault, O. Nosjean, B. Malpaux, P. Delagrance et J. A. Boutin (2009). The end of a myth: cloning and characterization of the ovine melatonin MT(2) receptor. *Br J Pharmacol* 158(5): 1248-1262.
- Cohen, D. (1967). Optimizing reproduction in a varying environment. *J. theor. Biol.* 16: 1-14.
- Cokelaere, M., E. Decuypere, G. Flo, V. M. Darras et E. R. Kuhn (1996). Influence of feeding pattern on thyroid hormones in long-term food-restricted rats. *Horm Metab Res* 28(7): 315-318.
- Colas, G. (1981). Variations saisonnières de la qualité du sperme chez le bélier Île-de-France. II. Fécondance : relation avec les critères qualitatifs observés *in vitro*. *Reproduction Nutrition Development* 21(3): 399-407.
- Coon, S. L., L. A. Zarazaga, B. Malpaux, J. P. Ravault, L. Bodin, P. Voisin, J. L. Weller, D. C. Klein et P. Chemineau (1999). Genetic variability in plasma melatonin in sheep is due to pineal weight, not to variations in enzyme activities. *Am J Physiol* 277(5 Pt 1): E792-797.
- Coppola, A., J. Hughes, E. Esposito, L. Schiavo, R. Meli et S. Diano (2005a). Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting. *FEBS Lett* 579(21): 4654-4658.
- Coppola, A., R. Meli et S. Diano (2005b). Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology* 146(6): 2827-2833.
- Corander, M. P., B. G. Challis, E. L. Thompson, Z. Jovanovic, Y. C. Loraine Tung, D. Rimmington, I. T. Huhtaniemi, K. G. Murphy, A. K. Topaloglu, G. S. Yeo, S. O'Rahilly, W. S. Dhillon, R. K. Semple et A. P. Coll (2010). The effects of neurokinin B upon gonadotrophin release in male rodents. *J Neuroendocrinol* 22(3): 181-187.
- Cornil, C. A., G. F. Ball et J. Balthazart (2006). Functional significance of the rapid regulation of brain estrogen action: where do the estrogens come from? *Brain Res* 1126(1): 2-26.
- Coyral-Castel, S., L. Tosca, G. Ferreira, E. Jeanpierre, C. Rame, D. Lomet, A. Caraty, P. Monget, C. Chabrolle et J. Dupont (2008). The effect of AMP-activated kinase activation on gonadotrophin-releasing hormone secretion in GT1-7 cells and its potential role in hypothalamic regulation of the oestrous cyclicity in rats. *J Neuroendocrinol* 20(3): 335-346.
- Crown, A., D. K. Clifton et R. A. Steiner (2007). Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology* 86(3): 175-182.
- Cunningham, M. J., D. K. Clifton et R. A. Steiner (1999). Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol Reprod* 60(2): 216-222.
- d'Anglemont de Tassigny, X. et W. H. Colledge (2010). The role of kisspeptin signaling in reproduction. *Physiology (Bethesda)* 25(4): 207-217.

- Daan, S. et C. S. Pittendrigh (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. II. The variability of phase response curves. *Journal of Comparative Physiology* 106, 253 – 266.: 253-266.
- Dacheux, J. L., C. Pisselet, M. R. Blanc, M. T. Hochereau-de-Reviers et M. Courot (1981). Seasonal variations in rete testis fluid secretion and sperm production in different breeds of ram. *J Reprod Fertil* 61: 363-371.
- Dafny, N. (1980). Two photic pathways contribute to pineal evoked responses. *Life Sciences* 26: 737-742.
- Damiola, F., N. Le Minh, N. Preitner, B. Kornmann, F. Fleury-Olela et U. Schibler (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14(23): 2950-2961.
- Dardente, H., M. Birnie, G. A. Lincoln et D. G. Hazlerigg (2008). RFamide-related peptide and its cognate receptor in the sheep: cDNA cloning, mRNA distribution in the hypothalamus and the effect of photoperiod. *J Neuroendocrinol* 20(11): 1252-1259.
- Dardente, H., J. M. Fustin et D. G. Hazlerigg (2009). Transcriptional feedback loops in the ovine circadian clock. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Molecular & Integrative Physiology* 153: 391-398.
- Dardente, H., P. Klosen, P. Pevet et M. Masson-Pevet (2003). MT1 melatonin receptor mRNA expressing cells in the pars tuberalis of the European hamster: effect of photoperiod. *Journal of Neuroendocrinology* 15: 778-786.
- Dardente, H., C. A. Wyse, M. J. Birnie, S. M. Dupre, A. S. Loudon, G. A. Lincoln et D. G. Hazlerigg (2010). A Molecular Switch for Photoperiod Responsiveness in Mammals. *Curr Biol*.
- De Santiago-Miramontes, M. A., B. Malpaux et J. A. Delgadillo (2009). Body condition is associated with a shorter breeding season and reduced ovulation rate in subtropical goats. *Anim Reprod Sci* 114(1-3): 175-182.
- De Santiago-Miramontes, M. A., R. Rivas-Munoz, M. Munoz-Gutierrez, B. Malpaux, R. J. Scaramuzzi et J. A. Delgadillo (2008). The ovulation rate in anoestrous female goats managed under grazing conditions and exposed to the male effect is increased by nutritional supplementation. *Anim Reprod Sci* 105(3-4): 409-416.
- Delezie, J. et E. Challet (2011). Interactions between metabolism and circadian clocks: reciprocal disturbances. *Ann N Y Acad Sci* 1243: 30-46.
- Desjardins, C. et M. J. Lopez (1983). Environmental cues evoke differential responses in pituitary-testicular function in deer mice. *Endocrinology* 112: 1398–1406.
- Dessie, J., S. Melaku, F. Tegegne et K. J. Peters (2010). Effect of supplementation of Simada sheep with graded levels of concentrate meal on feed intake, digestibility and body-weight parameters. *Trop Anim Health Prod* 42(5): 841-848.
- Diano, S., F. Naftolin, F. Goglia et T. L. Horvath (1998). Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 139(6): 2879-2884.
- Dibner, C., U. Schibler et U. Albrecht (2010). The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology* 72: 517-549.
- Dierschke, D. J., A. N. Bhattacharya, L. E. Atkinson et E. Knobil (1970). Circoral oscillations of plasma LH levels in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 87: 850-853.
- Dockray, G. J. (2004). The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp Physiol* 89(3): 229-235.
- Dorling, A. A., M. G. Todman, K. S. Korach et A. E. Herbison (2003). Critical role for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing

- hormone mRNA expression in the female mouse. *Neuroendocrinology* 78(4): 204-209.
- Downing, J. A., J. Joss, P. Connell et R. J. Scaramuzzi (1995). Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *Journal of Reproduction and Fertility* 103(1): 137-145.
- Downing, J. A. et R. J. Scaramuzzi (1991). Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 43: 209-227.
- Driancourt, M. A. (2001). Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55(6): 1211-1239.
- Ducret, E., G. M. Anderson et A. E. Herbison (2009). RFamide-related peptide-3, a mammalian gonadotropin-inhibitory hormone ortholog, regulates gonadotropin-releasing hormone neuron firing in the mouse. *Endocrinology* 150(6): 2799-2804.
- Dufourny, L., A. Caraty, I. J. Clarke, J. E. Robinson et D. C. Skinner (2005a). Progesterone-receptive beta-endorphin and dynorphin B neurons in the arcuate nucleus project to regions of high gonadotropin-releasing hormone neuron density in the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology* 81(3): 139-149.
- Dufourny, L., A. Caraty, I. J. Clarke, J. E. Robinson et D. C. Skinner (2005b). Progesterone-receptive dopaminergic and neuropeptide Y neurons project from the arcuate nucleus to gonadotropin-releasing hormone-rich regions of the ovine preoptic area. *Neuroendocrinology* 82(1): 21-31.
- Duittoz, A. H. et M. Batailler (2000). Pulsatile GnRH secretion from primary cultures of sheep olfactory placode explants. *J Reprod Fertil* 120(2): 391-396.
- Dumont, B., L. Fortun-Lamothe, M. Jouven, M. Thomas et M. Tichit (2012). Prospects from agroecology and industrial ecology for animal production in the 21st century. *Animal*: 1-16.
- Dupont, J., C. Chabrolle, C. Rame, L. Tosca et S. Coyral-Castel (2008). Role of the peroxisome proliferator-activated receptors, adenosine monophosphate-activated kinase, and adiponectin in the ovary. *PPAR Res* 2008: 176275.
- Dupré, S. M., D. W. Burt, R. Talbot, A. Downing, D. Mouzaki, D. Waddington, B. Malpoux, J. R. Davis, G. A. Lincoln et A. S. Loudon (2008). Identification of melatonin-regulated genes in the ovine pituitary pars tuberalis, a target site for seasonal hormone control. *Endocrinology* 149(11): 5527-5539.
- Dupré, S. M., K. Miedzinska, C. V. Duval, L. Vu, R. L. Goodman, G. A. Lincoln, J. R. Davis, A. S. McNeilly, D. D. Burt et A. S. Loudon (2010). Identification of *Eya3* and *TAC1* as long-day signals in the sheep pituitary. *Current Biology* 20: 829-835.
- Durgan, D. J., B. M. Pat, B. Laczy, J. A. Bradley, J. Y. Tsai, M. H. Grenett, W. F. Ratcliffe, R. A. Brewer, J. Nagendran, C. Villegas-Montoya, C. Zou, L. Zou, R. L. Johnson, Jr., J. R. Dyck, M. S. Bray, K. L. Gamble, J. C. Chatham et M. E. Young (2011). O-GlcNAcylation, novel post-translational modification linking myocardial metabolism and cardiomyocyte circadian clock. *J Biol Chem* 286(52): 44606-44619.
- Earl, C. R., M. J. D'Occhio, D. J. Kennaway et R. F. Seamark (1990). Temporal changes in the pattern of melatonin secretion in sheep held in constant darkness. *J Pineal Res* 8(2): 115-121.
- Ebling, F. J. et P. Barrett (2008). The regulation of seasonal changes in food intake and body weight. *J Neuroendocrinol* 20(6): 827-833.
- Ebling, F. J., G. A. Lincoln, F. Wollnik et N. Anderson (1988). Effects of constant darkness and constant light on circadian organization and reproductive responses in the ram. *J Biol Rhythms* 3(4): 365-384.

- Engelhardt, H., K. B. Smith, A. S. McNeilly et D. T. Baird (1993). Expression of mRNA for inhibin subunits and ovarian secretion of inhibin and estradiol throughout the sheep estrous cycle. *Biology of Reproduction* 49: 281-294.
- English, J., A. L. Poulton, J. Arendt et A. M. Symons (1986). A comparison of the efficiency of melatonin treatments in advancing oestrus in ewes. *J Reprod Fertil* 77(2): 321-327.
- Ensminger, M. E. et R. F. Behlow (1978). *The stockman's handbook*. Danville, Illinois, Interstate Printers and Publishers.
- Estrada-Cortes, E., H. R. Vera-Avila, J. Urrutia-Morales, E. Villagomez-Amezcuca, H. Jimenez-Severiano, C. A. Mejia-Guadarrama, M. T. Rivera-Lozano et H. G. Gamez-Vazquez (2009). Nutritional status influences reproductive seasonality in Creole goats: 1. Ovarian activity during seasonal reproductive transitions. *Anim Reprod Sci* 116(3-4): 282-290.
- Evans, N. P., G. E. Dahl, B. H. Glover et F. J. Karsch (1994). Central regulation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion by estradiol during the period leading up to the preovulatory GnRH surge in the ewe. *Endocrinology* 134(4): 1806-1811.
- Evans, N. P., G. E. Dahl, D. Mauger et F. J. Karsch (1995). Estradiol induces both qualitative and quantitative changes in the pattern of gonadotropin-releasing hormone secretion during the presurge period in the ewe. *Endocrinology* 136(4): 1603-1609.
- Fabre-Nys, C. et H. Gelez (2007). Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Hormones and Behavior* 52: 18-25.
- Farner, D. S. (1985). Annual rhythms. *Annual Review of Physiology* 47: 65-82.
- Faulconnier, Y., M. Bonnet, F. Bocquier, C. Leroux, J. F. Hocquette, P. Martin et Y. Chilliard (1999). Régulation du métabolisme lipidique des tissus adipeux et musculaires chez le ruminant. Effets du niveau alimentaire et de la photopériode. *INRA Prod. Anim.* 12: 287-300.
- Feillet, C. A. (2010). Food for thoughts: feeding time and hormonal secretion. *Journal of Neuroendocrinology* 22(6): 620-628.
- Feillet, C. A., U. Albrecht et E. Challet (2006). "Feeding time" for the brain: a matter of clocks. *J Physiol Paris* 100(5-6): 252-260.
- Fernald, R. D. et R. B. White (1999). Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20: 224-240.
- Fisher, J. S., G. B. Martin, C. M. Oldham et S. J. Gray (1993). Long-term effects of nutrition on spontaneous ovulation in Merino ewes and their responses to the "ram effect". VII World Conference on Animal Production, Edmonton (Canada), University of Alberta.
- Follett, B. K. et D. E. Follett (1981). *Biological Clocks in Seasonal Reproductive Cycles*. Bristol, John Wright & Sons Ltd.
- Forcada, F. et J. A. Abecia (2006). The effect of nutrition on the seasonality of reproduction in ewes. *Reprod Nutr Dev* 46(4): 355-365.
- Forcada, F., J. A. Abecia, O. Iga et J. M. Lozano (2002a). Variation in the ability of melatonin implants inserted at two different times after the winter solstice to restore reproductive activity in reduced seasonality ewes. *Australian Journal of Agricultural Research* 53(2): 167-173.
- Forcada, F., J. A. Abecia et I. Sierra (1992). Seasonal changes in oestrus activity and ovulation rate in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different body condition levels. *Small Ruminant Research* 8(4): 313-324.
- Forcada, F., J. M. Lozano, J. A. Abecia et L. Zarazaga (1997). Control of luteinizing hormone secretion in ewes by endogenous opioids and the dopaminergic system during short seasonal anestrus: role of plane of nutrition. *Anim Sci* 65: 217-224.

- Forcada, F., L. Zarazaga et J. A. Abecia (1995). Effect of exogenous melatonin and plane of nutrition after weaning on estrous activity, endocrine status and ovulation rate in Salzwedden ewes lambing in the seasonal anestrus. *Theriogenology* 43(7): 1179-1193.
- Forcada, F., O. Zuniga et J. A. Abecia (2002b). The role of nutrition in the regulation of LH secretion during anestrus by the serotonergic and dopaminergic systems in Mediterranean ewes treated with melatonin. *Theriogenology* 58(7): 1303-1313.
- Franceschini, I., D. Lomet, M. Cateau, G. Delsol, Y. Tillet et A. Caraty (2006). Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett* 401(3): 225-230.
- Fraser, S., P. Cowen, M. Franklin, C. Franey et J. Arendt (1983). Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. *Clin Chem* 29(2): 396-397.
- Friggens, N. C. (2003). Body lipid reserves and the reproductive cycle: towards a better understanding. *Livestock Production Sciences* 83: 219-236.
- Fu, L. Y. et A. N. van den Pol (2010). Kisspeptin directly excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons but inhibits orexigenic neuropeptide Y cells by an indirect synaptic mechanism. *J Neurosci* 30(30): 10205-10219.
- Gallego, M. et D. M. Virshup (2007). Post-translational modifications regulate the ticking of the circadian clock. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(2): 139-148.
- Gallegos-Sanchez, J., B. Delaleu, A. Caraty, B. Malpoux et J. C. Thiery (1997). Estradiol acts locally within the retrochiasmatic area to inhibit pulsatile luteinizing hormone release in the female sheep during anestrus. *Biology of Reproduction* 56: 1544-1549.
- Gallegos-Sanchez, J., B. Malpoux et J. C. Thiery (1998). Control of pulsatile LH secretion during seasonal anoestrus in the ewe. *Reprod Nutr Dev* 38(1): 3-15.
- Gallet, C., J. Dupont, B. K. Campbell, D. Monniaux, D. Guillaume et R. J. Scaramuzzi (2011). The infusion of glucose in ewes during the luteal phase increases the number of follicles but reduces oestradiol production and some correlates of metabolic function in the large follicles. *Anim Reprod Sci* 127(3-4): 154-163.
- Garcia, A., T. Landete-Castillejos, L. Zarazaga, J. Garde et L. Gallego (2003). Seasonal changes in melatonin concentrations in female Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *J Pineal Res* 34(3): 161-166.
- Garidou, M. L., B. Vivien-Roels, P. Pevet, J. Miguez et V. Simonneaux (2003). Mechanisms regulating the marked seasonal variation in melatonin synthesis in the European hamster pineal gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284(4): R1043-1052.
- Gayrard, V., B. Malpoux, Y. Tillet et J. C. Thiery (1994). Estradiol increases tyrosine hydroxylase activity of the A15 nucleus dopaminergic neurons during long days in the ewe. *Biol Reprod* 50(5): 1168-1177.
- Gayrard, V., J. C. Thiery, J. Thibault et Y. Tillet (1995). Efferent projections from the retrochiasmatic area to the median eminence and to the pars nervosa of the hypophysis with special reference to the A15 dopaminergic cell group in the sheep. *Cell Tissue Res* 281(3): 561-567.
- Gerozissis, K., M. Orosco, C. Rouch et S. Nicolaidis (1993). Basal and hyperinsulinemia-induced immunoreactive hypothalamic insulin changes in lean and genetically obese Zucker rats revealed by microdialysis. *Brain Res* 611(2): 258-263.
- Gibson, E. M., S. A. Humber, S. Jain, W. P. Williams, S. Zhao, G. E. Bentley, K. Tsutsui et L. J. Kriegsfeld (2008). Alterations in RFamide-related peptide expression are coordinated with the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 149: 4958-4969.
- Gilles, R., M. Anctil, F. Baguet, M. Charmantier, G. Charmantier, R. Gilles Jr., A. Péqueux, J. C. Plumier et P. Sébert (2006). Sémimolécules et communication chimique dans *Physiologie Animale*. Eds R. Gilles. Bruxelles, De Boeck & Larcier: 529-605.

- Girardet, C., D. Becquet, M. P. Blanchard, A. M. François-Bellan et O. Bosler (2010). Neuroglial and synaptic rearrangements associated with photic entrainment of the circadian clock in the suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience* 32: 2133-2142.
- Goldman, B. D. (2001). Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms* 16(4): 283-301.
- Gomez Brunet, A., B. Malpoux, A. Daveau, C. Taragnat et P. Chemineau (2002). Genetic variability in melatonin secretion originates in the number of pinealocytes in sheep. *J Endocrinol* 172(2): 397-404.
- Gómez, J. D., S. Balasch, L. D. Gómez, A. Martino et N. Fernández (2006). A comparison between intravaginal progestagen and melatonin implant treatments on the reproductive efficiency of ewes. *Small Ruminant Research* 66(1): 156-163.
- Goodman, R. L. (1994). Neuroendocrine control of the ovine estrous cycle dans *The Physiology of Reproduction*. Eds E. Knobil et J. D. Neill. New-York, Raven Press.
- Goodman, R. L., L. M. Coolen, G. M. Anderson, S. L. Hardy, M. Valent, J. M. Connors, M. E. Fitzgerald et M. N. Lehman (2004). Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology* 145(6): 2959-2967.
- Goodman, R. L., M. Gibson, D. C. Skinner et M. N. Lehman (2002). Neuroendocrine control of pulsatile GnRH secretion during the ovarian cycle: evidence from the ewe. *Reprod Suppl* 59: 41-56.
- Goodman, R. L., I. Holaskova, C. C. Nestor, J. M. Connors, H. J. Billings, M. Valent, M. N. Lehman et S. M. Hileman (2011). Evidence that the Arcuate Nucleus Is an Important Site of Progesterone Negative Feedback in the Ewe. *Endocrinology*.
- Goodman, R. L. et E. K. Inskeep (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the sheep dans *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Eds Jimmy D. Neill, Elsevier. Third Edition: 2389-2445.
- Goodman, R. L., H. T. Jansen, H. J. Billings, L. M. Coolen et M. N. Lehman (2010). Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. *Journal of Neuroendocrinology* 22: 674-681.
- Goodman, R. L., M. N. Lehman, J. T. Smith, L. M. Coolen, C. V. de Oliveira, M. R. Jafarzadehshirazi, A. Pereira, J. Iqbal, A. Caraty, P. Ciofi et I. J. Clarke (2007). Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148(12): 5752-5760.
- Gorman, M. R., B. D. Goldman et I. Zucker (2001). Mammalian photoperiodism dans *Handbook of behavioral neurobiology: circadian clocks*. Eds J. S. Takahashi, F. W. Turek et R. Y. Moore. New-York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 12: 481-508.
- Gorman, M. R. et I. Zucker (1995). Seasonal adaptations of Siberian hamsters. II. Pattern of change in daylength controls annual testicular and body weight rhythms. *Biology of Reproduction* 53: 116-125.
- Gorman, M. R. et I. Zucker (1997). Pattern of change in melatonin duration determines testicular response in Siberian hamsters, *Phodopus sungorus*. *Biology of Reproduction* 56: 668-673.
- Gorman, M. R. et I. Zucker (1998). Mammalian photoperiodism: new perspectives from the use of simulated natural photoperiod dans *Biological Clocks. Mechanisms and Applications*. Eds Y. Touitou. Amsterdam, Elsevier: 195-204.

- Greives, T. J., L. J. Kriegsfeld, G. E. Bentley, K. Tsutsui et G. E. Demas (2008). Recent advances in reproductive neuroendocrinology: a role for RFamide peptides in seasonal reproduction? *Proc Biol Sci* 275(1646): 1943-1951.
- Guerin, M. V., J. R. Deed et C. D. Matthews (2000). The coincidence of light and melatonin with a specific phase of the circadian pacemaker is important for the timing of seasonal breeding in the ewe. *J Biol Rhythms* 15(6): 514-523.
- Gwinner, E. (1981a). Annual rhythms: perspective dans *Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms*. Eds J. Aschoff. New-York, NY: Plenum Press. 4: 381-389.
- Gwinner, E. (1981b). Circannual systems dans *Handbook of behavioral neurobiology: biological rhythms*. Eds J. Aschoff. New-York, NY: Plenum Press. 4: 391-410.
- Gwinner, E. (1986). Circannual rhythms : endogenous annual clocks in the organization of seasonal processes. Berlin and New-York, Springer-Verlag.
- Hafez, E. S. E. (1952). Studies on the breeding season and reproduction of the ewe Part I. The breeding season in different environments Part II. The breeding season in one locality. *The Journal of Agricultural Science* 42: 189-231.
- Halasz, B. et L. Pupp (1965). Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotrophic area. *Endocrinology* 77(3): 553-562.
- Hamouda, H. O., P. Chen, A. Levoe, N. Sozer-Topcular, A. M. Daulat, J. L. Guillaume, R. Ravid, E. Savaskan, G. Ferry, J. A. Boutin, P. Delagrangé, R. Jockers et P. Maurice (2007). Detection of the human GPR50 orphan seven transmembrane protein by polyclonal antibodies mapping different epitopes. *J Pineal Res* 43(1): 10-15.
- Hanocq, E., L. Bodin, J. Thimonier, J. Teyssier, B. Malpoux et P. Chemineau (1999). Genetic parameters of spontaneous spring ovulatory activity in Mérinos d'Arles sheep. *Genetics Selection Evolution (Paris)* 31: 77-90.
- Hanon, E. A., G. A. Lincoln, J. M. Fustin, H. Dardente, M. Masson-Pevet, P. J. Morgan et D. G. Hazlerigg (2008). Ancestral TSH mechanism signals summer in a photoperiodic mammal. *Curr Biol* 18(15): 1147-1152.
- Hanon, E. A., K. Routledge, H. Dardente, M. Masson-Pevet, P. J. Morgan et D. G. Hazlerigg (2009). Effect of photoperiod on the thyroid-stimulating hormone neuroendocrine system in the European hamster (*Cricetus cricetus*). *J Neuroendocrinol* 22(1): 51-55.
- Hanrahan, J. P. et J. F. Quirke (1975). Repeatability of the duration of oestrus and breed differences in the relationship between duration of oestrus and ovulation rate of sheep. *J Reprod Fertil* 45(1): 29-36.
- Hara, R., K. Wan, H. Wakamatsu, R. Aida, T. Moriya, M. Akiyama et S. Shibata (2001). Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 6: 269-278.
- Haresign, W. (1992a). The effect of implantation of lowland ewes with melatonin on the time of mating and reproductive performance. *Animal Science* 54(01): 31-39.
- Haresign, W. (1992b). Manipulation of reproduction in sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 45: 127-139.
- Haresign, W., A. R. Peters et L. D. Staples (1990). The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. *Animal Science* 50(01): 111-121.
- Hastings, M., J. S. O'Neill et E. S. Maywood (2007). Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J Endocrinol* 195(2): 187-198.
- Hastings, M. H., G. E. Duffield, F. J. Ebling, A. Kidd, E. S. Maywood et I. Schurov (1997). Non-photoc signalling in the suprachiasmatic nucleus. *Biol Cell* 89(8): 495-503.

- Hatter, S., H. W. Liao, M. Takao, D. M. Berson et K. W. Yau (2002). Melanopsin containing ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science* 295: 1065-1070.
- Havern, R. L., C. S. Whisnant et R. L. Goodman (1991). Hypothalamic sites of catecholamine inhibition of luteinizing hormone in the anestrous ewe. *Biol Reprod* 44(3): 476-482.
- Hazlerigg, D. et A. Loudon (2008). New insights into ancient seasonal life timers. *Curr Biol* 18(17): R795-R804.
- Hazlerigg, D. G. et G. A. Lincoln (2011). Hypothesis: cyclical histogenesis is the basis of circannual timing. *J Biol Rhythms* 26(6): 471-485.
- Hazlerigg, D. G. et G. C. Wagner (2006). Seasonal photoperiodism in vertebrates: from coincidence to amplitude. *Trends Endocrinol Metab* 17(3): 83-91.
- Hegstrom, C. D. et S. M. Breedlove (1999). Social cues attenuate photoresponsiveness of the male reproductive system in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Journal of Biological Rhythms* 14: 54-61.
- Heideman, P. D., C. K. Bierl et C. J. Sylvester (2001). Photoresponsive Fischer 344 Rats are reproductively inhibited by melatonin and differ in 2-[125I] iodomelatonin binding from nonphotoresponsive Sprague-Dawley rats. *J Neuroendocrinol* 13(3): 223-232.
- Heideman, P. D. et F. H. Bronson (1992). A pseudoseasonal reproductive strategy in a tropical rodent, *Peromyscus nudipes*. *J Reprod Fertil* 95: 57-67.
- Herbison, A. E. (1997). Estrogen regulation of GABA transmission in rat preoptic area. *Brain Res Bull* 44(4): 321-326.
- Herbison, A. E. (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* 19(3): 302-330.
- Herbison, A. E. (2006). Physiology of the Gonadotropin-Releasing Hormone neuronal network dans *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third edition*. Eds Jimmy D. Neill, Elsevier: 1415-1482.
- Herbison, A. E., J. E. Robinson et D. C. Skinner (1993). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the preoptic area of the ewe: co-localization with glutamic acid decarboxylase but not luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 57: 751-759.
- Herwig, A., A. W. Ross, K. N. Nilaweera, P. J. Morgan et P. Barrett (2008). Hypothalamic thyroid hormone in energy balance regulation. *Obes Facts* 1(2): 71-79.
- Herwig, A., D. Wilson, T. J. Logie, A. Boelen, P. J. Morgan, J. G. Mercer et P. Barrett (2009). Photoperiod and acute energy deficits interact on components of the thyroid hormone system in hypothalamic tanycytes of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(5): R1307-1315.
- Hileman, S. M., D. E. Kuehl et G. L. Jackson (1994). Effect of anterior hypothalamic area lesions on photoperiod-induced shifts in reproductive activity of the ewe. *Endocrinology* 135: 1816-1823.
- Hill, R. W. (1992). The altricial/precocial contrast in thermal relations and energetics of small mammals dans *Mammalian energetics*. Eds Tomasi T. E. et T. H. Horton. Ithaca, NY, Cornell University Press: 122-159.
- Hoch, T., C. Begon, I. Cassar-Malek, B. Picard et I. Savary- Auzeloux (2003). Mécanismes et conséquences de la croissance compensatrice chez les ruminants. *INRA Productions Animales* 16: 49-59.
- Hoffmann, K. (1973). The influence of photoperiod and melatonin on testis size, body weight and pelage colour in the Djungurian hamster (*Phodopus sungorus*). *J Comp Physiol* 95: 267.
- Hoffmann, K. (1979). Photoperiod, pineal, melatonin and reproduction in hamsters. *Progress in Brain Research* 52: 397-415.

- Hoffmann, K. (1982). The critical photoperiod in the Djungarian hamster *Phodopus sungorus* dans *Vertebrate circadian systems*. Eds J. Aschoff, S. Daan et G. A. Groos. Berlin, Springer: 297–304.
- Hofman, M. A. et D. F. Swaab (2002). A brain for all seasons: cellular and molecular mechanisms of photoperiodic plasticity. *Prog Brain Res* 138: 255-280.
- Horvath, T. L. (2006). Synaptic plasticity in energy balance regulation. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5: 228S-233S.
- Horvath, T. L. et S. Diano (2004). The floating blueprint of hypothalamic feeding circuits. *Nat Rev Neurosci* 5(8): 662-667.
- Hotchkiss, J. et E. Knobil (1994). The menstrual cycle and its neuroendocrine control dans *The Physiology of Reproduction*. Eds E. Knobil et J. D. Neill. New York, Raven Press.
- Hotzel, M. J., S. W. Walkden-Brown, J. S. Fisher et G. B. Martin (2003). Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: responses to a nutritional stimulus in the breeding and non-breeding seasons. *Reprod Fertil Dev* 15(1-2): 1-9.
- Hulet, C. V., W. L. Shupe, T. Ross et W. Richards (1986). Effects of nutritional environment and ram effect on breeding season in range sheep. *Theriogenology* 25(2): 317-323.
- Hut, R. A. (2011). Photoperiodism: Shall EYA Compare Thee to a Summer's Day? *Current Biology* 21(1): R22-R25.
- Illnerova, H. (1991). The suprachiasmatic nucleus and rhythmic pineal melatonin production dans *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. Eds D. C. Klein, R. Y. Moore et S. M. Reppert. New-York, Oxford University Press: 197-216.
- Inagaki, N., S. Honma, D. Ono, Y. Tanahashi et K. Honma (2007). Separate oscillating cell groups in mouse suprachiasmatic nucleus couple photoperiodically to the onset and end of daily activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(18): 7664-7669.
- INRA (2010). Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des animaux – Valeurs des aliments, Quae.
- Iqbal, J., S. Pompolo, T. Sakurai et I. J. Clarke (2001). Evidence that orexin-containing neurones provide direct input to gonadotropin-releasing hormone neurones in the ovine hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 13(12): 1033-1041.
- Ivanova, E. A., D. A. Bechtold, S. M. Dupre, J. Brennand, P. Barrett, S. M. Luckman et A. S. Loudon (2008). Altered metabolism in the melatonin-related receptor (GPR50) knockout mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294(1): E176-182.
- Jackson, G. L., H. T. Jansen, D. E. Kuehl et R. D. Shanks (1989). Time of the sidereal year affects responsiveness to the phase-resetting effects of photoperiod in the ewe. *J Reprod Fertil* 85: 221-227.
- Jacobs, J. D. et J. C. Wingfield (2000). Endocrine control of life-cycle stages: a constraint on response to the environment? *The Condor* 102(1): 35-51.
- Jagota, A., H. O. de la Iglesia et W. J. Schwartz (2000). Morning and evening circadian oscillations in the suprachiasmatic nucleus in vitro. *Nat Neurosci* 3(4): 372-376.
- Jansen, H. T., C. Cutter, S. Hardy, M. N. Lehman et R. L. Goodman (2003). Seasonal plasticity within the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in identified GnRH inputs and glial association. *Endocrinology* 144(8): 3663-3676.
- Jansen, H. T., S. M. Hileman, L. S. Lubbers, D. E. Kuehl, G. L. Jackson et M. N. Lehman (1997). Identification and distribution of neuroendocrine gonadotropin-releasing hormone neurons in the ewe. *Biology of Reproduction* 56: 655-662.
- Johnson, E. (1972). Moulting cycles. *Mammal Review* 1(7-8): 198-208.
- Johnston, J. D. (2005). Measuring seasonal time within the circadian system: regulation of the suprachiasmatic nuclei by photoperiod. *J Neuroendocrinol* 17(7): 459-465.

- Johnston, J. D., B. B. Tournier, H. Andersson, M. Masson-Pevet, G. A. Lincoln et D. G. Hazlerigg (2006). Multiple effects of melatonin on rhythmic clock gene expression in the mammalian pars tuberalis. *Endocrinology* 147(2): 959-965.
- Kadokawa, H., M. Shibata, Y. Tanaka, T. Kojima, K. Matsumoto, K. Oshima et N. Yamamoto (2009). Bovine C-terminal octapeptide of RFamide-related peptide-3 suppresses luteinizing hormone (LH) secretion from the pituitary as well as pulsatile LH secretion in bovines. *Domest Anim Endocrinol* 36(4): 219-224.
- Kah, O., C. Lethimonier, G. Somoza, L. G. Guilgur, C. Vaillant et J. J. Lareyre (2007). GnRH and GnRH receptors in metazoa: a historical, comparative, and evolutive perspective. *General and Comparative Endocrinology* 153: 346-364.
- Kahn, B. B., T. Alquier, D. Carling et D. G. Hardie (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1(1): 15-25.
- Kalsbeek, A., M. Rikkers, B. Vivien-Roels et P. Pevet (1993). Vasopressin and vasoactive intestinal peptide infused in the paraventricular nucleus of the hypothalamus elevate plasma melatonin levels. *J Pineal Res* 15(1): 46-52.
- Karonen, S. L., H. A. Koistinen, P. Nikkinen et V. A. Koivisto (1998). Is brain uptake of leptin in vivo saturable and reduced by fasting? *Eur J Nucl Med* 25(6): 607-612.
- Karsch, F. J. (1987). Central actions of ovarian steroids in the feedback regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. *Annu Rev Physiol* 49: 365-382.
- Karsch, F. J., E. L. Bittman, D. L. Foster, R. L. Goodman, S. J. Legan et J. E. Robinson (1984). Neuroendocrine basis of seasonal reproduction. *Recent Prog Horm Res* 40: 185-232.
- Karsch, F. J., J. T. Cummins, G. B. Thomas et I. J. Clarke (1987). Steroid feedback inhibition of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the ewe. *Biol Reprod* 36(5): 1207-1218.
- Karsch, F. J., G. E. Dahl, N. P. Evans, J. M. Manning, K. P. Mayfield, S. M. Moenter et D. L. Foster (1993). Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod* 49(6): 1377-1383.
- Karsch, F. J., G. E. Dahl, T. M. Hachigian et L. A. Thrun (1995). Involvement of thyroid hormones in seasonal reproduction. *J Reprod Fertil Suppl* 49: 409-422.
- Karsch, F. J. et N. P. Evans (1996). Feedback actions of estradiol on GnRH secretion during the follicular phase of the estrous cycle. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 56(3): 715-725.
- Karsch, F. J., R. L. Goodman et S. J. Legan (1980). Feedback basis of seasonal breeding: test of an hypothesis. *J Reprod Fertil* 58(2): 521-535.
- Karsch, F. J., J. E. Robinson, C. J. Woodfill et M. B. Brown (1989). Circannual cycles of luteinizing hormone and prolactin secretion in ewes during prolonged exposure to a fixed photoperiod: evidence for an endogenous reproductive rhythm. *Biol Reprod* 41(6): 1034-1046.
- Kasa-Vubu, J. Z., G. E. Dahl, N. P. Evans, L. A. Thrun, S. M. Moenter, V. Padmanabhan et F. J. Karsch (1992). Progesterone blocks the estradiol-induced gonadotropin discharge in the ewe by inhibiting the surge of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 131(1): 208-212.
- Kassem, N. A., R. Deane, M. B. Segal, R. L. Chen et J. E. Preston (2007). Thyroxine (T4) transfer from CSF to choroid plexus and ventricular brain regions in rabbit: Contributory role of P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptides. *Brain Research* 1181: 44-50.
- Kastin, A. J. et V. Akerstrom (2000). Fasting, but not adrenalectomy, reduces transport of leptin into the brain. *Peptides* 21(5): 679-682.

- Kay, R. N. B. (1979). Seasonal changes of appetite in deer and sheep. *ARC Res Rev* 5: 13-15.
- Khaldi, G. (1984). Variations saisonnières de l'activité ovarienne, du comportement d'oestrus et de la durée de l'anoestrus post-partum des femelles ovines de race Barbarine: influence du niveau alimentaire et de la présence du mâle Thèse de Doctorat, Université de Montpellier.
- Kile, J. P., B. M. Alexander, G. E. Moss, D. M. Hallford et T. M. Nett (1991). Gonadotropin-releasing hormone overrides the negative effect of reduced dietary energy on gonadotropin synthesis and secretion in ewes. *Endocrinology* 128(2): 843-849.
- Kinoshita, M., H. Tsukamura, S. Adachi, H. Matsui, Y. Uenoyama, K. Iwata, S. Yamada, K. Inoue, T. Ohtaki, H. Matsumoto et K. Maeda (2005). Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146(10): 4431-4436.
- Kiss, J. et B. Halasz (1985). Demonstration of serotonergic axons terminating on luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography. *Neuroscience* 14(1): 69-78.
- Klaus, S. (2004). Adipose tissue as a regulator of energy balance. *Curr Drug Targets* 5(3): 241-250.
- Klein, D. C., R. Y. Moore et S. M. Reppert (1991). *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. Eds. New York, Oxford Univ. Press.
- Klosen, P., C. Biennu, O. Demarteau, H. Dardente, H. Guerrero, P. Pevet et M. Masson-Pevet (2002). The mt1 melatonin receptor and ROR β receptor are co-localized in specific TSH-immunoreactive cells in the pars tuberalis of the rat pituitary. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 50: 1647-1657.
- Knight, T. W., D. H. R. Hall et L. D. Wilson (1983). Effects of teasing and nutrition on the duration of the breeding season in Romney ewes. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 43: 17-19.
- Knobil, E. et J. D. Neill (1994). *The physiology of reproduction*. New York, Raven Press.
- Kohsaka, A., A. D. Laposky, K. M. Ramsey, C. Estrada, C. Joshu, Y. Kobayashi, F. W. Turek et J. Bass (2007). High-fat diet disrupts behavioral and molecular circadian rhythms in mice. *Cell Metab* 6(5): 414-421.
- Kokoeva, M. V., H. Yin et J. S. Flier (2005). Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310(5748): 679-683.
- Kortner, G. et F. Geiser (2000). The temporal organization of daily torpor and hibernation: circadian and circannual rhythms. *Chronobiol Int* 17(2): 103-128.
- Kotani, M., M. Detheux, A. Vandenberghe, D. Communi, J. M. Vanderwinden, E. Le Poul, S. Brezillon, R. Tyldesley, N. Suarez-Huerta, F. Vandeput, C. Blanpain, S. N. Schiffmann, G. Vassart et M. Parmentier (2001). The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 276(37): 34631-34636.
- Kovac, J., J. Husse et H. Oster (2009). A Time to Fast, a Time to Feast: The Crosstalk between Metabolism and the Circadian Clock. *Molecules and Cells* 28: 75-80.
- Krege, J. H., J. B. Hodgkin, J. F. Couse, E. Enmark, M. Warner, J. F. Mahler, M. Sar, K. S. Korach, J. A. Gustafsson et O. Smithies (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15677-15682.
- Kriegsfeld, L. J. (2006). Driving reproduction: RFamide peptides behind the wheel. *Horm Behav* 50(5): 655-666.

- Kriegsfeld, L. J., N. J. Ranalli, M. A. Bober et R. J. Nelson (2000). Photoperiod and temperature interact to affect the GnRH neuronal system of male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Journal of Biological Rhythms* 15: 306-316.
- Kuehl-Kovarik, M. C., W. A. Pouliot, G. L. Halterman, R. J. Handa, F. E. Dudek et K. M. Partin (2002). Episodic bursting activity and response to excitatory amino acids in acutely dissociated gonadotropin-releasing hormone neurons genetically targeted with green fluorescent protein. *J Neurosci* 22(6): 2313-2322.
- Kuhlman, S. J. et D. G. McMahon (2006). Encoding the ins and outs of circadian pacemaking. *Journal of Biological Rhythms* 21: 470-481.
- la Fleur, S. E., A. Kalsbeek, J. Wortel, J. van der Vliet et R. M. Buijs (2001). Role for the pineal and melatonin in glucose homeostasis: pinealectomy increases night-time glucose concentrations. *J Neuroendocrinol* 13(12): 1025-1032.
- Lagaraine, C., J. Skipor, A. Szczepkowska, L. Dufourny et J. C. Thiery (2011). Tight junction proteins vary in the choroid plexus of ewes according to photoperiod. *Brain Res* 1393: 44-51.
- Lassoued, N. et G. Khaldi (1990). Influence du niveau alimentaire avant et après la mise bas sur la brebis de race Barbarine à l'effet mâle. *Ann INRAT Tunisie* 63: 1-16.
- Lechan, R. M. et C. Fekete (2005). Role of thyroid hormone deiodination in the hypothalamus. *Thyroid* 15: 883-897.
- Legan, S. J. et F. J. Karsch (1980). Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. *Biol Reprod* 23(5): 1061-1068.
- Legan, S. J. et F. J. Karsch (1983). Importance of retinal photoreceptors to the photoperiodic control of seasonal breeding in the ewe. *Biology of Reproduction* 29: 316-325.
- Legan, S. J., F. J. Karsch et D. L. Foster (1977). The endocrin control of seasonal reproductive function in the ewe: a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 101(3): 818-824.
- Legan, S. J. et S. S. Winans (1981). The photoneuroendocrine control of seasonal breeding in the ewe. *Genetic and Comparative Endocrinology* 45: 317-328.
- Legros, C., S. Bernard, D. Chesneau et B. Malpoux (2006). The cerebrospinal fluid contributes to the presence of melatonin in the sheep brain. 6th International Congress of Neuroendocrinology. Pittsburgh (USA), *Frontiers in Neuroendocrinology*. 27: 130.
- Lehman, M. N., L. M. Coolen et R. L. Goodman (2010a). Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 151(8): 3479-3489.
- Lehman, M. N., L. M. Coolen, R. L. Goodman, C. Viguie, H. J. Billings et F. J. Karsch (2002). Seasonal plasticity in the brain: the use of large animal models for neuroanatomical research. *Reprod Suppl* 59: 149-165.
- Lehman, M. N., D. M. Durham, H. T. Jansen, B. Adrian et R. L. Goodman (1996). Dopaminergic A14/A15 neurons are activated during estradiol negative feedback in anestrus, but not breeding season, ewes. *Endocrinology* 137(10): 4443-4450.
- Lehman, M. N., F. J. Ebling, S. M. Moenter et F. J. Karsch (1993). Distribution of estrogen receptor-immunoreactive cells in the sheep brain. *Endocrinology* 133(2): 876-886.
- Lehman, M. N., R. L. Goodman, F. J. Karsch, G. L. Jackson, S. J. Berriman et H. T. Jansen (1997). The GnRH system of seasonal breeders: anatomy and plasticity. *Brain Res Bull* 44(4): 445-457.
- Lehman, M. N. et F. J. Karsch (1993). Do gonadotropin-releasing hormone, tyrosine hydroxylase-, and beta-endorphin-immunoreactive neurons contain estrogen

- receptors? A double-label immunocytochemical study in the Suffolk ewe. *Endocrinology* 133(2): 887-895.
- Lehman, M. N., Z. Ladha, L. M. Coolen, S. M. Hileman, J. M. Connors et R. L. Goodman (2010b). Neuronal plasticity and seasonal reproduction in sheep. *European Journal of Neuroscience* 32: 2152-2164.
- Lehman, M. N., C. M. Merkley, L. M. Coolen et R. L. Goodman (2010c). Anatomy of the kisspeptin neural network in mammals. *Brain Res* 1364: 90-102.
- Lehman, M. N., J. E. Robinson, F. J. Karsch et A. J. Silverman (1986). Immunocytochemical localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) pathways in the sheep brain during anestrus and the mid-luteal phase of the estrous cycle. *Journal of Comparative Neurology* 244: 19-35.
- Lehman, M. N., A. S. Tseng, B. Whited, C. C. Nestor, R. P. Millar, S. M. Hileman, C. L. M. et R. L. Goodman (2010d). Evidence that dopamine acts via kisspeptin to hold GNRH pulse frequency in check in anestrus ewes. Annual Meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, California.
- Letelier, C., A. Gonzalez-Bulnes, M. Herve, J. Correa et R. Pulido (2008). Enhancement of ovulatory follicle development in maiden sheep by short-term supplementation with steam-flaked corn. *Reprod Domest Anim* 43(2): 222-227.
- Levins, R. (1968). Evolution in changing environments. Some theoretical explorations. Princeton, Princeton University Press.
- Levoe, A., J. Dam, M. A. Ayoub, J. L. Guillaume, C. Couturier, P. Delagrangé et R. Jockers (2006). The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. *EMBO J* 25(13): 3012-3023.
- Lincoln, G., S. Messenger, H. Andersson et D. Hazlerigg (2002). Temporal expression of seven clock genes in the suprachiasmatic nucleus and the pars tuberalis of the sheep: evidence for an internal coincidence timer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13890-13895.
- Lincoln, G. A. (1979). Photoperiodic control of seasonal breeding in the ram: participation of the cranial sympathetic nervous system. *Journal of Endocrinology* 82: 135-147.
- Lincoln, G. A. (1989). Significance of seasonal cycles in prolactin secretion in male mammals dans *Perspectives in Andrology*. Eds M. Serio. New-York, Raven Press: 299-306.
- Lincoln, G. A. (1999). Melatonin modulation of prolactin and gonadotrophin secretion. Systems ancient and modern dans *Melatonin After Four Decades*. Eds J. Olcese. New York, Kluwer Academic/Plenum Publications: 137-153.
- Lincoln, G. A. (2006). Decoding the nightly melatonin signal through circadian clockwork. *Mol Cell Endocrinol* 252(1-2): 69-73.
- Lincoln, G. A., H. Andersson et D. Hazlerigg (2003a). Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/circannual timer in the pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 15(4): 390-397.
- Lincoln, G. A., H. Andersson et A. Loudon (2003b). Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals--a unifying hypothesis. *J Endocrinol* 179(1): 1-13.
- Lincoln, G. A. et I. J. Clarke (1994). Photoperiodically-induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: Evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *Journal of Neuroendocrinology* 6: 251-260.
- Lincoln, G. A., I. J. Clarke, R. A. Hut et D. G. Hazlerigg (2006). Characterizing a mammalian circannual pacemaker. *Science* 314(5807): 1941-1944.
- Lincoln, G. A. et W. Davidson (1977). The relationship between sexual and aggressive behaviour, and pituitary and testicular activity during the seasonal sexual cycle of rams, and the influence of photoperiod. *J Reprod Fertil* 49: 267-276.

- Lincoln, G. A., F. J. Ebling et O. F. Almeida (1985). Generation of melatonin rhythms. *Ciba Found Symp* 117: 129-148.
- Lincoln, G. A. et D. G. Hazlerigg (2010). Mammalian circannual pacemakers. Eighth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants of the Society of Reproduction and Fertility, Alaska (Anchorage), Nottingham University Press.
- Lincoln, G. A. et K. I. Maeda (1992). Reproductive effects of placing micro-implants of melatonin in the mediobasal hypothalamus and preoptic area in rams. *J Endocrinol* 132(2): 201-215.
- Lincoln, G. A. et R. V. Short (1980). Seasonal breeding: nature's contraceptive. *Recent Progress in Hormone Research* 36: 1-52.
- Lindsay, D. R., G. B. Martin et I. H. Williams (1993). Nutrition and reproduction dans *Reproduction in Domesticated Animals*. Eds G. J. King. World Animal Science Series, Elsevier Science Publishers: 459-491.
- Lopes, F. L., J. A. Desmarais et B. D. Murphy (2004). Embryonic diapause and its regulation. *Reproduction* 128(6): 669-678.
- Lubbers, L. S. et G. L. Jackson (1993). Neuroendocrine mechanisms that control seasonal changes of luteinizing hormone secretion in sheep are sexually differentiated. *Biology of Reproduction* 49: 1369-1376.
- Lynch, H. J., J. P. Eng et R. J. Wurtman (1973). Control of pineal indole biosynthesis by changes in sympathetic tone caused by factors other than environmental lighting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(6): 1704-1707.
- Maeda, K., S. Ohkura, Y. Uenoyama, Y. Wakabayashi, Y. Oka, H. Tsukamura et H. Okamura (2010). Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res* 1364: 103-115.
- Maeda, K. I. et G. A. Lincoln (1990). Phase shifts in the circadian rhythm in plasma concentrations of melatonin in rams induced by a 1-hour light pulse. *J Biol Rhythms* 5(2): 97-106.
- Mahieu, M., Y. Jégo, M. A. Driancourt et P. Chemineau (1989). Reproductive performances of Creole and Black-Belly ewes in the West Indies. A new major gene controlling ovulation rate? *Animal reproduction science* 19: 235-243.
- Malpoux, B. (2006). Seasonal regulation of reproduction in mammals dans *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Eds J. D. Neill. Birmingham, USA, Elsevier: 2231-2281.
- Malpoux, B., A. Daveau, F. Maurice-Mandon, G. Duarte et P. Chemineau (1998). Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139(4): 1508-1516.
- Malpoux, B., A. Daveau, F. Maurice, V. Gayrard et J. C. Thiery (1993). Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol Reprod* 48(4): 752-760.
- Malpoux, B., A. Daveau, F. Maurice, A. Locatelli et J. C. Thiery (1994). Evidence that melatonin binding sites in the pars tuberalis do not mediate the photoperiodic actions of melatonin on LH and prolactin secretion in ewes. *J Reprod Fertil* 101(3): 625-632.
- Malpoux, B. et F. J. Karsch (1990). A role for short days in sustaining seasonal reproductive activity in the ewe. *J Reprod Fertil* 90(2): 555-562.
- Malpoux, B., F. Maurice-Mandon, A. Daveau et P. Chemineau (1995). Use of light and melatonin to control reproduction in sheep and goats. *Rencontres Recherches Ruminants*. Paris, France. 2: 379-386.
- Malpoux, B., M. Migaud, H. Tricoire et P. Chemineau (2001). Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. *J Biol Rhythms* 16(4): 336-347.

- Malpaux, B., J. E. Robinson, M. B. Brown et F. J. Karsch (1988a). Importance of changing photoperiod and melatonin secretory pattern in determining the length of the breeding season in the Suffolk ewe. *J Reprod Fertil* 83(1): 461-470.
- Malpaux, B., J. E. Robinson, N. L. Wayne et F. J. Karsch (1989). Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. *J Endocrinol* 122(1): 269-278.
- Malpaux, B., C. Viguie, D. C. Skinner, J. C. Thiery et P. Chemineau (1997). Control of the circannual rhythm of reproduction by melatonin in the ewe. *Brain Res Bull* 44(4): 431-438.
- Malpaux, B., C. Viguie, D. C. Skinner, J. C. Thiery, J. Pelletier et P. Chemineau (1996). Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. *Animal reproduction science* 42: 109-117.
- Malpaux, B., N. L. Wayne et F. J. Karsch (1988b). Termination of the breeding season in the Suffolk ewe: involvement of an endogenous rhythm of reproduction. *Biol Reprod* 39(2): 254-263.
- Marshall, F. M. A. (1937). On the change over the oestrus cycle in animals after transference across the Equator, with further observations on the incidence of the breeding seasons and the factors controlling sexual periodicity. *Proceedings of the Royal Society of London* 122: 413-428.
- Marshall, S. (2006). Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci STKE* 2006(346): re7.
- Martin, G. B., D. Blache, D. W. Miller et P. E. Vercoe (2010). Interactions between nutrition and reproduction in the management of the mature male ruminant. *Animal* 4(7): 1214-1226.
- Martin, G. B., J. S. Fisher, M. A. Blackberry, R. Boukhliq, M. J. Hötzel, K. Shepherd et S. W. Walkden-Brown (1994). Nutritional and photoperiodic control of testicular size in Suffolk and Merino rams. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production*
- Martin, G. B., M. J. Hotzel, D. Blache, S. W. Walkden-Brown, M. A. Blackberry, R. C. Boukhliq, J. S. Fisher et D. W. Miller (2002). Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food supply. *Reprod Fertil Dev* 14(3-4): 165-175.
- Martin, G. B. et H. Kadokawa (2006). "Clean, green and ethical" animal production. Case study: reproductive efficiency in small ruminants. *J Reprod Dev* 52(1): 145-152.
- Martin, G. B., J. Rodger et D. Blache (2004). Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 16(4): 491-501.
- Martin, G. B., S. Tjondronegoro, R. Boukhliq, M. A. Blackberry, J. R. Briegel, D. Blache, J. A. Fisher et N. R. Adams (1999). Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male merino and Suffolk sheep: modification of endogenous rhythms by photoperiod. *Reprod Fertil Dev* 11(6): 355-366.
- Martin, G. B. et S. W. Walkden-Brown (1995). Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goats. *J Reprod Fertil Suppl* 49: 437-449.
- Masumoto, K., M. Ukai-Tadenuma, T. Kasukawa, M. Nagano, K. D. Uno, K. Tsujino, K. Horikawa, Y. Shigeyoshi et H. R. Ueda (2010). Acute induction of *Eya3* by late-night light stimulation triggers TSH β expression in photoperiodism. *Current Biology* 20: 2199-2206.
- Matthews, C. D., M. V. Guerin et J. R. Deed (1993). Melatonin and photoperiodic time measurement: Seasonal breeding in the sheep. *Journal of Pineal Research* 14: 105-116.

- Matthews, C. D., R. F. Seamark et M. V. Guerin (1992). Plasma melatonin profiles of Romney Marsh sheep in natural photoperiod and in acutely extended darkness. *J Reprod Fertil* 95(3): 869-875.
- Mauléon, P. et J. Rougeot (1962). Régulation des saisons sexuelles chez des brebis de races différentes au moyen de divers rythmes lumineux. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 2: 209-222.
- Maywood, E. S. et M. H. Hastings (1995). Lesions of the iodomelatonin-binding sites of the mediobasal hypothalamus spare the lactotropic, but block the gonadotropic response of male Syrian hamsters to short photoperiod and to melatonin. *Endocrinology* 136: 144-153.
- McNay, D. E., N. Briancon, M. V. Kokoeva, E. Maratos-Flier et J. S. Flier (2012). Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest* 122(1): 142-152.
- McNay, D. E., S. Robins, M. Kokoeva, N. Briancon, E. Maratos-Flier, M. Placzek et J. S. Flier (2009). The location and characterisation of hypothalamic neural stem cells. 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Chicago.
- McShane, T. M., T. May, J. L. Miner et D. H. Keisler (1992). Central actions of neuropeptide-Y may provide a neuromodulatory link between nutrition and reproduction. *Biol Reprod* 46(6): 1151-1157.
- Meijer, J. H., S. Michel, H. T. VanderLeest et J. H. T. Rohling (2010). Daily and seasonal adaptation of the circadian clock requires plasticity of the SCN neuronal network. *European Journal of Neuroscience* 32: 2143-2151.
- Meijer, J. H. et W. J. Schwartz (2003). In search of the pathways for light-induced pacemaker resetting in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms* 18: 235-249.
- Menassol, J. B., A. Collet, D. Chesneau, B. Malpoux et R. J. Scaramuzzi (2012). The interaction between photoperiod and nutrition and its effects on seasonal rhythms of reproduction in the ewe. *Biol Reprod* 86(2): 52.
- Menassol, J. B., C. Tautou, A. Collet, D. Chesneau, D. Lomet, J. Dupont, B. Malpoux et R. J. Scaramuzzi (2011). The effect of an intracerebroventricular injection of metformin or AICAR on the plasma concentrations of melatonin in the ewe: potential involvement of AMPK? *BMC Neurosci* 12(1): 76.
- Mendizabal, J. A., R. Delfa, A. Arana, P. Eguinoa, C. González, T. Treacher et A. Purroy (2003). Estimating fat reserves in Rasa Aragonesa ewes: A comparison of different methods. *Canadian Journal of Animal Science* 83(4): 695-701.
- Mendoza, J. (2007). Circadian clocks: setting time by food. *J Neuroendocrinol* 19(2): 127-137.
- Mendoza, J., C. Graff, H. Dardente, P. Pevet et E. Challet (2005). Feeding cues alter clock gene oscillations and photic responses in the suprachiasmatic nuclei of mice exposed to a light/dark cycle. *J Neurosci* 25(6): 1514-1522.
- Mendoza, J., P. Pevet, M. P. Felder-Schmittbuhl, Y. Bailly et E. Challet (2010). The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. *J Neurosci* 30(5): 1894-1904.
- Messenger, S., E. E. Chatzidaki, D. Ma, A. G. Hendrick, D. Zahn, J. Dixon, R. R. Thresher, I. Malinge, D. Lomet, M. B. Carlton, W. H. Colledge, A. Caraty et S. A. Aparicio (2005). Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(5): 1761-1766.
- Messenger, S., D. G. Hazlerigg, J. G. Mercer et P. J. Morgan (2000). Photoperiod differentially regulates the expression of *Per1* and *ICER* in the pars tuberalis and the suprachiasmatic nucleus of the Siberian hamster. *European Journal of Neuroscience* 12: 2865-2870.

- Messenger, S., A. W. Ross, P. Barrett et P. J. Morgan (1999). Decoding photoperiodic time through Per1 and ICER gene amplitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 9938-9943.
- Migaud, M., A. Daveau et B. Malpoux (2005). MTNR1A melatonin receptors in the ovine preammillary hypothalamus: day-night variation in the expression of the transcripts. *Biol Reprod* 72(2): 393-398.
- Miller, D. W., E. J. Bennett, J. L. Harrison, P. A. Findlay et C. L. Adam (2011). Adiposity and plane of nutrition influence reproductive neuroendocrine and appetite responses to intracerebroventricular insulin and neuropeptide-Y in sheep. *Reprod Fertil Dev* 23(2): 329-338.
- Miller, D. W., D. Blache et G. B. Martin (1995). The role of intracerebral insulin in the effect of nutrition on gonadotrophin secretion in mature male sheep. *J Endocrinol* 147(2): 321-329.
- Miller, D. W., J. L. Harrison, E. J. Bennett, P. A. Findlay et C. L. Adam (2007). Nutritional influences on reproductive neuroendocrine output: insulin, leptin, and orexigenic neuropeptide signaling in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 148(11): 5313-5322.
- Miller, W. L. (1988). Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Reviews* 9: 295-318.
- Moenter, S. M., A. R. DeFazio, G. R. Pitts et C. S. Nunemaker (2003). Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Front Neuroendocrinol* 24(2): 79-93.
- Moenter, S. M., C. J. Woodfill et F. J. Karsch (1991). Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: thyroidectomy blocks seasonal suppression of reproductive neuroendocrine activity in ewes. *Endocrinology* 128: 1337-1344.
- Molénat, G., P. Lapeyronie, M. Vincent et J. Gouy (1993). Variations de l'état corporel en système d'élevage méditerranéen transhumant dans *Pratiques D'élevage Extensif. Identifier, Modéliser, Évaluer*. Eds INRA. 27: 123-136.
- Monget, P. et G. B. Martin (1997). Nutrition et reproduction des animaux d'élevage. *Cah. Nutr. Diét.* 32(3): 166-171.
- Monniaux, D., A. Caraty, F. Clément, R. Dalbiès-Tran, J. Dupont, S. Fabre, N. Gérard, P. Mermillod, P. Monget et S. Uzbekova (2009). Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *INRA Prod. Anim.* 22(2): 59-76.
- Montgomery, G. W., I. C. Scott et N. Hudson (1985). An interaction between season of calving and nutrition on the resumption of ovarian cycles in post-partum beef cattle. *J Reprod Fertil* 73(1): 45-50.
- Morgan, P. J., P. Barrett, H. E. Howell et R. Helliwell (1994). Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochemistry International* 24: 101-146.
- Morgan, P. J., G. Davidson, W. Lawson et P. Barrett (1990). Both pertussis toxin-sensitive and insensitive G-proteins link melatonin receptor to inhibition of adenylate cyclase in the ovine pars tuberalis. *Journal of Neuroendocrinology* 2: 773-776.
- Morgan, P. J. et D. Hazlerigg (2008). Photoperiodic Signalling Through the Melatonin Receptor Turns Full Circle. *Journal of Neuroendocrinology* 20: 820-826.
- Morgan, P. J., W. Lawson, G. Davidson et H. E. Howell (1989). Melatonin inhibits cyclic AMP in cultured ovine pars tuberalis cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 5: R3-R8.
- Mrugala, M., P. Zlomanczuk, A. Jagota et W. J. Schwartz (2000). Rhythmic multiunit neural activity in slices of hamster suprachiasmatic nucleus reflect prior photoperiod.

- American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology 278: 987-994.
- Mysterud, A., G. Steinheim, N. G. Yoccoz, O. Holand et N. C. Stenseth (2002). Early onset of reproductive senescence in domestic sheep, *Ovis aries*. *Oikos* 97(2): 177-183.
- Nakao, N., H. Ono, T. Yamamura, T. Anraku, T. Takagi, K. Higashi, S. Yasuo, Y. Katou, S. Kageyama, Y. Uno, T. Kasukawa, M. Iigo, P. J. Sharp, A. Iwasawa, Y. Suzuki, S. Sugano, T. Niimi, M. Mizutani, T. Namikawa, S. Ebihara, H. R. Ueda et T. Yoshimura (2008a). Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* 452(7185): 317-322.
- Nakao, N., H. Ono et T. Yoshimura (2008b). Thyroid hormones and seasonal reproductive neuroendocrine interactions. *Reproduction* 136: 1-8.
- Navarro, V. M., M. L. Gottsch, C. Chavkin, H. Okamura, D. K. Clifton et R. A. Steiner (2009). Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29(38): 11859-11866.
- Negus, N. C. et P. J. Berger (1972). Environmental factors and reproductive process in mammalian populations dans *Biology of Reproduction: Basic and Clinical Studies*. Eds J. T. Velardo et B. A. Kasprow. New Orleans, Third Pan American Congress on Anatomy: 89-98.
- Nelson, R. J., J. Dark et I. Zucker (1983). Influence of photoperiod, nutrition and water availability on reproduction of male California voles (*Microtus californicus*). *J Reprod Fertil* 69: 473-477.
- Nicholls, T. J., N. K. Follett, A. R. Goldsmith et H. Pearson (1988). Possible homologies between photorefractoriness in sheep and birds: the effect of thyroidectomy on the length of the ewe's breeding season. *Reproduction Nutrition Development* 28: 375-385.
- Notter, D. R. et P. Chemineau (2001). Nocturnal melatonin and prolactin plasma concentrations in sheep selected for fertility in autumn lambing'. *J Anim Sci* 79(11): 2895-2901.
- Nottle, M. B., D. O. Kleemann, T. I. Grosser et R. F. Seamark (1997). Evaluation of a nutritional strategy to increase ovulation rate in Merino ewes mated in late spring-early summer. *Animal reproduction science* 47(4): 255-261.
- Nottle, M. B., R. F. Seamark et B. P. Setchell (1990). Feeding lupin grain for six days prior to a cloprostenol-induced luteolysis can increase ovulation rate in sheep irrespective of when in the oestrous cycle supplementation commences. *Reprod Fertil Dev* 2(2): 189-192.
- O'Callaghan, D., F. J. Karsch, M. P. Boland et J. F. Roche (1991). What photoperiodic signal is provided by a continuous-release melatonin implant? *Biol Reprod* 45(6): 927-933.
- OCDE/FAO (2012). Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2012-2021.
- Ohkura, S., K. Takase, S. Matsuyama, K. Mogi, T. Ichimaru, Y. Wakabayashi, Y. Uenoyama, Y. Mori, R. A. Steiner, H. Tsukamura, K. I. Maeda et H. Okamura (2009a). Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol* 21(10): 813-821.
- Ohkura, S., Y. Uenoyama, S. Yamada, T. Homma, K. Takase, N. Inoue, K. Maeda et H. Tsukamura (2009b). Physiological role of metastin/kisspeptin in regulating gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in female rats. *Peptides* 30(1): 49-56.
- Ohtaki, T., Y. Shintani, S. Honda, H. Matsumoto, A. Hori, K. Kanehashi, Y. Terao, S. Kumano, Y. Takatsu, Y. Masuda, Y. Ishibashi, T. Watanabe, M. Asada, T. Yamada, M. Suenaga, C. Kitada, S. Usuki, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura et M. Fujino

- (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 411(6837): 613-617.
- Okamura, H., K. Murata, K. Sakamoto, Y. Wakabayashi, S. Ohkura, Y. Takeuchi et Y. Mori (2010). Male effect pheromone tickles the gonadotrophin-releasing hormone pulse generator. *J Neuroendocrinol* 22(7): 825-832.
- Oltjen, J. W. et J. L. Beckett (1996). Role of ruminant livestock in sustainable agricultural systems. *Journal of Animal Science* 74(6): 1406-1409.
- Ono, H., N. Nakao et T. Yoshimura (2009). Identification of the photoperiodic signaling pathway regulating seasonal reproduction using the functional genomics approach. *Gen Comp Endocrinol* 163(1-2): 2-6.
- Ooka, H., P. E. Segall et P. S. Timiras (1978). Neural and endocrine development after chronic tryptophan deficiency in rats: II. Pituitary-thyroid axis. *Mech Ageing Dev* 7(1): 19-24.
- Ortavant, R., J. Pelletier, J. P. Ravault, J. Thimonier et P. Volland-Nail (1985). Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxf Rev Reprod Biol* 7: 305-345.
- Padmanabhan, V., D. Battaglia, M. B. Brown, F. J. Karsch, S. J. Lee, W. Pan, D. J. Phillips et J. VanCleeff (2002). Neuroendocrine control of follicle-stimulating hormone secretion. II. Is follistatin-induced suppression of follicle-stimulating hormone secretion mediated via changes in activin availability and does it involve changes in GnRH secretion? *Biology of Reproduction* 66: 1395-1402.
- Padmanabhan, V. et A. S. McNeilly (2001). Is there an FSH-releasing factor? *Reproduction* 121: 21-30.
- Padmanabhan, V. et T. P. Sharma (2001). Neuroendocrine vs. paracrine control of follicle-stimulating hormone. *Arch Med Res* 32(6): 533-543.
- Panaretto, B. (1964). Body composition *in vivo*. VI. The composition of ewes during prolonged undernutrition. *Australian Journal of Agricultural Research* 15(5): 771-787.
- Panda, S., S. K. Nayak, B. Compo, J. R. Walker, J. B. Hogenesch et T. Jegla (2005). Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 307: 600-604.
- Pardini, L. et B. Kaeffer (2006). Feeding and circadian clocks. *Reprod Nutr Dev* 5: 463-480.
- Parkinson, T. J. et B. K. Follett (1994). Effect of thyroidectomy upon seasonality in rams. *Journal of Reproduction and Fertility* 101: 51-58.
- Paul, M. J., J. Galang, W. J. Schwartz et B. J. Prendergast (2009). Intermediate-duration day lengths unmask reproductive responses to nonphotic environmental cues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(5): R1613-1619.
- Paul, M. J., I. Zucker et W. J. Schwartz (2008). Tracking the seasons: the internal calendars of vertebrates. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363(1490): 341-361.
- Pelletier, J. et G. Almeida (1987). Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* (34): 215-226.
- Pelletier, J., L. Bodin, E. Hanocq, B. Malpaux, J. Teyssier, J. Thimonier et P. Chemineau (2000). Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel(1a) receptor in the ewe. *Biol Reprod* 62(4): 1096-1101.
- Pellicer-Rubio, M.-T., J.-L. Touzé, G. Baril et B. Malpaux (2012). The luteal outcome of anoestrus ewes induced to ovulate by the male effect is not related to the population of ovarian antral follicles before male exposure. *Animal reproduction science*.
- Pellicer-Rubio, M. T., S. Ferchaud, S. Fréret, H. Tournadre, A. Fatet, S. Boulot, J. Pavie, B. leboeuf et F. Bocquier (2009). Les méthodes de maîtrise de la reproduction disponibles chez les mammifères d'élevage et leur intérêt en agriculture biologique. *INRA Prod. Anim.* 22(3): 255-270.

- Pengelley, E. T. et S. J. Asmundson (1974). Circannual rhythmicity in hibernating mammals dans *Circannual clocks*. Eds E. T. Pengelley. New-York, NY: Academic Press, Inc.: 95-160.
- Pereira, A., J. Rawson, A. Jakubowska et I. J. Clarke (2010). Estradiol-17beta-responsive A1 and A2 noradrenergic cells of the brain stem project to the bed nucleus of the stria terminalis in the ewe brain: a possible route for regulation of gonadotropin releasing hormone cells. *Neuroscience* 165(3): 758-773.
- Perreau-Lenz, S., A. Kalsbeek, M. L. Garidou, J. Wortel, J. van der Vliet, C. van Heijningen, V. Simonneaux, P. Pevet et R. M. Buijs (2003). Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci* 17(2): 221-228.
- Perreau-Lenz, S., A. Kalsbeek, P. Pevet et R. M. Buijs (2004). Glutamatergic clock output stimulates melatonin synthesis at night. *Eur J Neurosci* 19(2): 318-324.
- Peschke, E., T. Frese, E. Chankiewitz, D. Peschke, U. Preiss, U. Shreyer, R. Spessert et E. Mülbauer (2006). Diabetic Goto Kakizaki rats as well as type 2 diabetic patients show a decreased diurnal serum melatonin level and an increased pancreatic melatonin-receptor status. *Journal of Pineal Research* 40(135-143).
- Pevet, P. (1983). Anatomy of the pineal gland of mammals dans *Current Endocrinology: The Pineal Gland*. Eds R. Relkin. Amsterdam, Elsevier Biomedical: 1-75.
- Pévet, P., B. Vivien-Roels et M. Masson-Pévet (1991). Annual changes in the daily pattern of melatonin synthesis and release dans *Role of Melatonin and Pineal Peptides in Neuroimmunomodulation*. Eds F. Fraschini et R. J. Reiter. New York, Plenum: 147-158.
- Picazo, R. A. et G. A. Lincoln (1995). Light control of the duration of the daily melatonin signal under long and short days in the Soay ram. Role of inhibition and entrainment. *J Biol Rhythms* 10(1): 55-63.
- Pielecka-Fortuna, J., Z. Chu et S. M. Moenter (2008). Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology* 149(4): 1979-1986.
- Pielecka-Fortuna, J. et S. M. Moenter (2010). Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner. *Endocrinology* 151(1): 291-300.
- Pierce, A. A. et A. W. Xu (2010). De novo neurogenesis in adult hypothalamus as a compensatory mechanism to regulate energy balance. *J Neurosci* 30(2): 723-730.
- Pineda, R., D. Garcia-Galiano, A. Roseweir, M. Romero, M. A. Sanchez-Garrido, F. Ruiz-Pino, K. Morgan, L. Pinilla, R. P. Millar et M. Tena-Sempere (2010a). Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 151(2): 722-730.
- Pineda, R., D. Garcia-Galiano, M. A. Sanchez-Garrido, M. Romero, F. Ruiz-Pino, E. Aguilar, F. A. Dijcks, M. Blomenrohr, L. Pinilla, P. I. van Noort et M. Tena-Sempere (2010b). Characterization of the inhibitory roles of RFRP3, the mammalian ortholog of GnIH, in the control of gonadotropin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299(1): E39-46.
- Pitrosky, B., R. Kirsch, B. Vivien-Roels, I. Georg-Bentz, B. Canguilhem et P. Pevet (1995). The photoperiodic response in Syrian hamster depends upon a melatonin-driven circadian rhythm of sensitivity to melatonin. *J Neuroendocrinol* 7(11): 889-895.
- Pittendrigh, C. S. (1972). Circadian surfaces and the diversity of possible roles of circadian organization in photoperiodic induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 69: 2734-2737.

- Pittendrigh, C. S. et D. H. Minis (1964). The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *American Naturalist* 98: 261-294.
- Polkowska, J. (1981). Immunocytochemistry of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and gonadotropic hormones in the sheep after anterior deafferentations of the hypothalamus. *Cell & Tissue Research* 220: 637-649.
- Polkowska, J. et A. Gladysz (2001). Effect of food manipulation on the neuropeptide Y neuronal system in the diencephalon of ewes. *J Chem Neuroanat* 21(2): 149-159.
- Pompolo, S., O. Ischenko, A. Pereira, J. Iqbal et I. J. Clarke (2005). Evidence that projections from the bed nucleus of the stria terminalis and from the lateral and medial regions of the preoptic area provide input to gonadotropin releasing hormone (GNRH) neurons in the female sheep brain. *Neuroscience* 132(2): 421-436.
- Pompolo, S., A. Pereira, T. Kaneko et I. J. Clarke (2003a). Seasonal changes in the inputs to gonadotropin-releasing hormone neurones in the ewe brain: an assessment by conventional fluorescence and confocal microscopy. *J Neuroendocrinol* 15(5): 538-545.
- Pompolo, S., A. Pereira, C. J. Scott, F. Fujiyama et I. J. Clarke (2003b). Evidence for estrogenic regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by glutamatergic neurons in the ewe brain: An immunohistochemical study using an antibody against vesicular glutamate transporter-2. *J Comp Neurol* 465(1): 136-144.
- Prendergast, B. J., M. R. Gorman et I. Zucker (2000). Establishment and persistence of photoperiodic memory in hamsters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 5586-5591.
- Prendergast, B. J., L. J. Kriegsfeld et R. J. Nelson (2001). Photoperiodic polyphenisms in rodents: neuroendocrine mechanisms, costs and functions *Quarterly Review of Biology* 76: 293-321.
- Przekop, F. (1978). Effect of anterior deafferentation of the hypothalamus on the release of luteinizing hormone (LH) and reproductive function in sheep. *Acta Physiol Pol* 29(5): 393-407.
- Qi, Y., B. J. Oldfield et I. J. Clarke (2009). Projections of RFamide-related peptide-3 neurones in the ovine hypothalamus, with special reference to regions regulating energy balance and reproduction. *J Neuroendocrinol* 21(8): 690-697.
- Qiu, X., T. Kumbalasiri, S. M. Carlson, K. Y. Wong, V. Krishna, I. Provencio et D. M. Berson (2005). Induction of photosensitivity by heterologous expression of melanopsin. *Nature* 433: 745-749.
- Quennell, J. H., A. C. Mulligan, A. Tups, X. Liu, S. J. Phipps, C. J. Kemp, A. E. Herbison, D. R. Grattan et G. M. Anderson (2009). Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology* 150(6): 2805-2812.
- Quirke, J. F., J. P. Hanrahan, W. Loughnane et R. Triggs (1986). Components of the breeding and non-breeding seasons in sheep: breed effects and repeatability. *Irish Journal of Agricultural and Food Research* 25(2): 167-172.
- Rance, N. E. et T. R. Bruce (1994). Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology* 60(4): 337-345.
- Ravault, J. P., J. Arendt, I. Tobler, D. Chesneau et O. Maulins (1989). Entrainment of melatonin rhythms in rams by symmetrical light-dark cycles of different period lengths. *Chronobiology International* 6(4): 329-339.
- Ravault, J. P. et D. Chesneau (1999). The onset of increased melatonin secretion after the onset of darkness in sheep depends on the photoperiod. *J Pineal Res* 27(1): 1-8.
- Rawson, J. A., C. J. Scott, A. Pereira, A. Jakubowska et I. J. Clarke (2001). Noradrenergic projections from the A1 field to the preoptic area in the brain of the ewe and Fos responses to oestrogen in the A1 cells. *J Neuroendocrinol* 13(2): 129-138.

- Reavill, C. (2000). "Ovis aries" (On-line). Retrieved May 18th 2011, from http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Ovis_aries.html.
- Reiter, R. J. (1981). The mammalian pineal gland: structure and function. *American Journal of Anatomy* 162: 287-313.
- Reiter, R. J. (1991a). Melatonin: The chemical expression of darkness. *Molecular and Cellular Endocrinology* 79: C153-C159.
- Reiter, R. J. (1991b). Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews* 12: 151-180.
- Reiter, R. J. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 49(8): 654-664.
- Reiter, R. J. et B. K. Follett (1980). Seasonal reproduction in higher vertebrates. *Progress in Reproductive Biology*, vol. 5 Basel, S. Karger.
- Renquist, B. J., T. E. Adams, B. M. Adams et C. C. Calvert (2008a). Dietary restriction reduces the rate of estradiol clearance in sheep (*Ovis aries*). *J Anim Sci* 86(5): 1124-1131.
- Renquist, B. J., C. C. Calvert, B. M. Adams et T. E. Adams (2008b). Circulating estradiol suppresses luteinizing hormone pulse frequency during dietary restriction. *Domest Anim Endocrinol* 34(3): 301-310.
- Reppert, S. M. et D. R. Weaver (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418(6901): 935-941.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver, T. Ebisawa, C. D. Mahle et L. F. Kolakowski, Jr. (1996a). Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary. *FEBS Lett* 386(2-3): 219-224.
- Reppert, S. M., D. R. Weaver et C. Godson (1996b). Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends in Pharmacological Sciences* 17: 100-102.
- Reuss, S. et H. Schroder (1987). Neuropeptide Y effects on pineal melatonin synthesis in the rat. *Neurosci Lett* 74(2): 158-162.
- Rhind, S. M., S. McMillen et W. A. C. McKelvey (1991). Effects of levels of food intake and body condition on the sensitivity of the hypothalamus and pituitary to ovarian steroid feedback in ovariectomized ewes. *Anim. Prod.* 52: 115-125.
- Ribelayga, C., P. Pevet et V. Simonneaux (2000). HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278(5): R1339-1345.
- Richards, J. S. (1980). Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones. *Physiological Reviews* 60: 51-89.
- Ricordeau, G., F. Tchamitchian, J. Eycheenne et J. Razungles (1976). Performances de reproduction des brebis Berrichones du Cher, Romanov et croisées. I. - Activité sexuelle en début de saison et à contre saison *Ann. Génét. Sél. anim.* 8(1): 9-24.
- Rizwan, M. Z., R. Porteous, A. E. Herbison et G. M. Anderson (2009). Cells expressing RFamide-related peptide-1/3, the mammalian gonadotropin-inhibitory hormone orthologs, are not hypophysiotropic neuroendocrine neurons in the rat. *Endocrinology* 150(3): 1413-1420.
- Roa, J., E. Aguilar, C. Dieguez, L. Pinilla et M. Tena-Sempere (2008). New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 29(1): 48-69.
- Roa, J., V. M. Navarro et M. Tena-Sempere (2011). Kisspeptins in Reproductive Biology: Consensus Knowledge and Recent Developments. *Biol Reprod.*

- Robel, P. (2001). La stéroïdogénèse : les enzymes et la régulation de leur expression génomique dans *La reproduction chez les mammifères et l'homme*. Eds C. Thibault et M.C. Levasseur, INRA Ed., Ellipses Ed.: 144-154.
- Robertson, H. A. (1969). The endogenous control of estrus and ovulation in sheep, cattle, and swine. *Vitamins and Hormones* 27: 91-130.
- Robinson, J. E. (1987). Photoperiodic and steroidal regulation of the luteinizing hormone pulse generator in ewes dans *The Episodic Secretion of Hormones*. Eds W. F. Crowley Jr. et J. G. Hofler. New-York, John Wiley: 159-167.
- Robinson, J. E. et F. J. Karsch (1987). Photoperiodic history and a changing melatonin pattern can determine the neuroendocrine response of the ewe to daylength. *J Reprod Fertil* 80: 159-165.
- Robinson, J. J., C. J. Ashworth, J. A. Rooke, L. M. Mitchell et T. G. McEvoy (2006). Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology* 126: 259-276.
- Robinson, J. J., S. Wigzell, R. P. Aitken, J. M. Wallace, S. Ireland et I. S. Robertson (1991). The modifying effects of melatonin, ram exposure and plane of nutrition on the onset of ovarian activity, ovulation rate and the endocrine status of ewes. *Animal reproduction science* 26(1): 73-91.
- Robinson, T. J. (1965). Use of Progestagen-Impregnated Sponges Inserted Intravaginally or Subcutaneously for the Control of the Oestrous Cycle in the Sheep. *Nature* 206: 39-41.
- Rocha, J., S. Chen et A. Beja-Pereira (2011). Molecular evidence for fat-tailed sheep domestication. *Tropical Animal Health and Production*: 1-7.
- Rodriguez, E. M., J. L. Blazquez, F. E. Pastor, B. Pelaez, P. Pena, B. Peruzzo et P. Amat (2005). Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. *International Review of Cytology* 247: 89-164.
- Rondon, Z., F. Forcada, L. Zarazaga, J. A. Abecia et J. M. Lozano (1996). Oestrous activity, ovulation rate and plasma melatonin concentrations in Rasa Aragonesa ewes maintained at two different and constant body condition score levels and implanted or reimplanted with melatonin. *Animal reproduction science* 41(3): 225-236.
- Rosa, H. J. D. et M. J. Bryant (2003). Seasonality of reproduction in sheep. *Small Ruminant Research* 48(3): 155-171.
- Roseweir, A. K., A. S. Kauffman, J. T. Smith, K. A. Guerriero, K. Morgan, J. Pielecka-Fortuna, R. Pineda, M. L. Gottsch, M. Tena-Sempere, S. M. Moenter, E. Terasawa, I. J. Clarke, R. A. Steiner et R. P. Millar (2009). Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci* 29(12): 3920-3929.
- Ross, A. W., G. Helfer, L. Russell, V. M. Darras et P. J. Morgan (2011). Thyroid Hormone Signalling Genes Are Regulated by Photoperiod in the Hypothalamus of F344 Rats. *PLoS One* 6(6): e21351.
- Russel, A. J. F., J. M. Doney et R. G. Gunn (1969). Subjective assessment of body fat in live sheep. *The Journal of Agricultural Science* 72(3): 451-454.
- Rutter, J., M. Reick, L. C. Wu et S. L. McKnight (2001). Regulation of clock and NPAS2 DNA binding by the redox state of NAD cofactors. *Science* 293(5529): 510-514.
- Ryder, M. L. (1984). Sheep dans *Evolution of domesticated animals*. Eds Longman. London: 63-84.
- Salazar-Ortiz, J., S. Camous, C. Briant, L. Lardic, D. Chesneau et D. Guillaume (2011). Effects of nutritional cues on the duration of the winter anovulatory phase and on associated hormone levels in adult female Welsh pony horses (*Equus caballus*). *Reprod Biol Endocrinol* 9: 130.

- Santiago-Moreno, J., A. Lopez-Sebastian, A. Gonzalez-Bulnes, A. Gomez-Brunet et P. Chemineau (2000). Seasonal changes in ovulatory activity, plasma prolactin, and melatonin concentrations, in Mouflon (*Ovis gmelini musimon*) and Manchega (*Ovis aries*) ewes. *Reproduction Nutrition Development* 40: 421-430.
- Saper, C. B., J. Lu, T. C. Chou et J. Gooley (2005). The hypothalamic integrator for circadian rhythms. *Trends Neurosci* 28(3): 152-157.
- Sari, I. P., A. Rao, J. T. Smith, A. J. Tilbrook et I. J. Clarke (2009). Effect of RF-amide-related peptide-3 on luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone synthesis and secretion in ovine pituitary gonadotropes. *Endocrinology* 150(12): 5549-5556.
- Saunders, D. S. (1977). *An Introduction to Biological Rhythms*. Glasgow, Blackie.
- Saunders, D. S. (2005). Erwin Bünning and Tony Lees, two giants of chronobiology, and the problem of time measurement in insect photoperiodism. *Journal of Insect Physiology* 51: 599-608.
- Scaramuzzi, R. J., N. R. Adams, D. T. Baird, B. K. Campbell, J. A. Downing, J. K. Findlay, H. M. Henderson, G. B. Martin, K. P. McNatty, A. S. McNeilly et C. G. Tsonis (1993). A Model for Follicle Selection and the Determination of Ovulation Rate in the Ewe. *Reproduction Fertility and Development* 5: 459-478.
- Scaramuzzi, R. J., B. K. Campbell, J. A. Downing, N. R. Kendall, M. Khalid, M. Munoz-Gutierrez et A. Somchit (2006). A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* 46(4): 339-354.
- Scaramuzzi, R. J. et G. B. Martin (2008). The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2: 129-136.
- Schally, A. V., A. Arimura, A. J. Kastin, H. Matsuo, Y. Baba, T. W. Redding, R. M. Nair, L. Debeljuk et W. F. White (1971). Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science* 173: 1036-1038.
- Schanbacher, B. D. et D. D. Lunstra (1976). Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and testosterone in Finnish Landrace and Suffolk rams. *Journal of Animal Science* 43(3): 644-650.
- Schillo, K. K. (1992). Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *Journal of Animal Science* 70: 1271-1282.
- Schneider, J. E. (2004). Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 81(2): 289-317.
- Schwartz, M. W., E. Peskind, M. Raskind, E. J. Boyko et D. Porte, Jr. (1996). Cerebrospinal fluid leptin levels: relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nat Med* 2(5): 589-593.
- Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, Jr., R. J. Seeley et D. G. Baskin (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778): 661-671.
- Schwartz, W. J., H. O. de la Iglesia, P. Zlomanczuk et H. Illnerova (2001). Encoding Le Quattro Stagioni within the mammalian brain: photoperiodic orchestration through the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Biological Rhythms* 16: 302-311.
- Scott, C. J., A. J. Tilbrook, D. M. Simmons, J. A. Rawson, S. Chu, P. J. Fuller, N. H. Ing et I. J. Clarke (2000). The distribution of cells containing estrogen receptor-alpha (ERalpha) and ERbeta messenger ribonucleic acid in the preoptic area and hypothalamus of the sheep: comparison of males and females. *Endocrinology* 141(8): 2951-2962.

- Sergeeva, A. et H. T. Jansen (2009). Neuroanatomical plasticity in the gonadotropin-releasing hormone system of the ewe: seasonal variation in glutamatergic and gamma-aminobutyric acidergic afferents. *J Comp Neurol* 515(6): 615-628.
- Simonneaux, V. et C. Ancel (2012). RFRP neurons are critical gatekeepers for the photoperiodic control of reproduction. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3: 168.
- Simonneaux, V., A. Ouichou, C. Craft et P. Pevet (1994). Presynaptic and postsynaptic effects of neuropeptide Y in the rat pineal gland. *J Neurochem* 62(6): 2464-2471.
- Simonneaux, V. et C. Ribelayga (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* 55(2): 325-395.
- Singh, S. R., S. M. Hileman, J. M. Connors, C. J. McManus, L. M. Coolen, M. N. Lehman et R. L. Goodman (2009). Estradiol negative feedback regulation by glutamatergic afferents to A15 dopaminergic neurons: variation with season. *Endocrinology* 150(10): 4663-4671.
- Skinner, D. C., A. Caraty et R. Allingham (2001). Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology* 142: 573-579.
- Skinner, D. C. et L. Dufourny (2005). Oestrogen receptor beta-immunoreactive neurones in the ovine hypothalamus: distribution and colocalisation with gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Neuroendocrinology* 17: 29-39.
- Skinner, D. C., T. G. Harris et N. P. Evans (2000). Duration and amplitude of the luteal phase progesterone increment times the estradiol-induced luteinizing hormone surge in ewes. *Biol Reprod* 63(4): 1135-1142.
- Skinner, D. C. et B. Malpoux (1999). High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology* 140(10): 4399-4405.
- Skipor, J. et J. C. Thiery (2008). The choroid plexus--cerebrospinal fluid system: undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 68(3): 414-428.
- Sliwowska, J. H., H. J. Billings, R. L. Goodman, L. M. Coolen et M. N. Lehman (2004). The premammillary hypothalamic area of the ewe: anatomical characterization of a melatonin target area mediating seasonal reproduction. *Biol Reprod* 70(6): 1768-1775.
- Smith, I. D. (1965). The influence of level of nutrition during winter and spring upon oestrous activity in the ewe. *World Rev Anim Prod* 4: 95-101.
- Smith, J. T. (2008). Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res Rev* 57(2): 288-298.
- Smith, J. T. (2009). Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: comparative aspects. *Peptides* 30(1): 94-102.
- Smith, J. T. (2011). The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. *Domest Anim Endocrinol*.
- Smith, J. T., B. V. Acohido, D. K. Clifton et R. A. Steiner (2006a). KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinol* 18(4): 298-303.
- Smith, J. T. et I. J. Clarke (2010). Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. *Trends Endocrinol Metab* 21(4): 255-260.
- Smith, J. T., C. M. Clay, A. Caraty et I. J. Clarke (2007). KiSS-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. *Endocrinology* 148(3): 1150-1157.
- Smith, J. T., D. K. Clifton et R. A. Steiner (2006b). Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 131(4): 623-630.

- Smith, J. T., L. M. Coolen, L. J. Kriegsfeld, I. P. Sari, M. R. Jaafarzadehshirazi, M. Maltby, K. Bateman, R. L. Goodman, A. J. Tilbrook, T. Ubuka, G. E. Bentley, I. J. Clarke et M. N. Lehman (2008). Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 149(11): 5770-5782.
- Smith, J. T., H. M. Dungan, E. A. Stoll, M. L. Gottsch, R. E. Braun, S. M. Eacker, D. K. Clifton et R. A. Steiner (2005). Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 146(7): 2976-2984.
- Smith, J. T., Q. Li, A. Pereira et I. J. Clarke (2009). Kisspeptin neurons in the ovine arcuate nucleus and preoptic area are involved in the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 150(12): 5530-5538.
- Smith, J. T., M. Shahab, A. Pereira, K. Y. Pau et I. J. Clarke (2010). Hypothalamic expression of KISS1 and gonadotropin inhibitory hormone genes during the menstrual cycle of a non-human primate. *Biol Reprod* 83(4): 568-577.
- Somchit, A., B. K. Campbell, M. Khalid, N. R. Kendall et R. J. Scaramuzzi (2007). The effect of short-term nutritional supplementation of ewes with lupin grain (*Lupinus luteus*), during the luteal phase of the estrous cycle on the number of ovarian follicles and the concentrations of hormones and glucose in plasma and follicular fluid. *Theriogenology* 68(7): 1037-1046.
- St Germain, D. L., V. A. Galton et A. Hernandez (2009). Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology* 150(3): 1097-1107.
- Staples, L. D., S. Mc Phee, J. Reeve et A. H. Williams (1991). Practical applications for controlled release melatonin implants in sheep dans *Advances in pineal research*. Eds A. Foldes et R. J. Reiter. London, John Libbey Publishers. 6A: 199-208.
- Stefanovic, I., B. Adrian, H. T. Jansen, M. N. Lehman et R. L. Goodman (2000). The ability of estradiol to induce Fos expression in a subset of estrogen receptor-alpha-containing neurons in the preoptic area of the ewe depends on reproductive status. *Endocrinology* 141(1): 190-196.
- Steger, R. W., K. Matt et A. Bartke (1985). Neuroendocrine regulation of seasonal reproductive activity in the male golden hamster. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 9: 191-201.
- Stehle, J. H., C. von Gall, C. Schomerus et H. W. Korf (2001). Of rodents and ungulates and melatonin: creating a uniform code for darkness by different signalling mechanisms. *Journal of Biological Rhythms* 16: 312-325.
- Stirland, J. A., J. D. Johnston, F. R. Cagampang, P. J. Morgan, M. G. Castro, M. R. White, J. R. Davis et A. S. Loudon (2001). Photoperiodic regulation of prolactin gene expression in the Syrian hamster by the *pars tuberalis*-derived factor. *Journal of Neuroendocrinology* 13: 147-157.
- Sumova, A., Z. Travnickova, R. Peters, W. J. Schwartz et H. Illnerova (1995). The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 92: 7754-7758.
- Swanson, L. V. (1989). Interactions of nutrition and reproduction. *J Dairy Sci* 72(3): 805-814.
- Tannenbaum, M. G., R. J. Reiter, M. K. Vaughan, M. E. Troiani et A. Gonzalez-Brito (1987). Adrenalectomy prevents changes in rat pineal melatonin content and N-acetyltransferase activity induced by acute insulin stress. *J Pineal Res* 4(4): 395-402.
- Tatman, W. R., M. B. Judkins, T. G. Dunn et G. E. Moss (1990). Luteinizing hormone in nutrient-restricted ovariectomized ewes. *J Anim Sci* 68(4): 1097-1102.

- Tena-Sempere, M. (2006). KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinology* 83(5-6): 275-281.
- Teubner, B. J., C. D. Smith et D. A. Freeman (2008). Multiple melatonin target tissues mediate termination of photorefractoriness by long day lengths in Siberian hamsters. *J Biol Rhythms* 23(6): 502-510.
- Thiery, J. C., P. Chemineau, X. Hernandez, M. Migaud et B. Malpaux (2002). Neuroendocrine interactions and seasonality. *Domest Anim Endocrinol* 23(1-2): 87-100.
- Thiery, J. C., V. Gayrard, S. Le Corre, C. Viguie, G. B. Martin, P. Chemineau et B. Malpaux (1995). Dopaminergic control of LH secretion by the A15 nucleus in anoestrous ewes. *J Reprod Fertil Suppl* 49: 285-296.
- Thiery, J. C. et B. Malpaux (2003). Seasonal regulation of reproductive activity in sheep: modulation of access of sex steroids to the brain. *Ann N Y Acad Sci* 1007: 169-175.
- Thiery, J. C. et J. Pelletier (1981). Multiunit activity in the anterior median eminence and adjacent areas of the hypothalamus of the ewe in relation to LH secretion. *Neuroendocrinology* 32(4): 217-224.
- Thimonier, J. (1989). Contrôle photopériodique de l'activité ovulatoire chez la brebis. Existence de rythmes endogènes. Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Tours, Université François-Rabelais de Tours.
- Thimonier, J., Y. Cognié, N. Lassoued et G. Khaldi (2000). L'effet mâle chez les ovins : une technique actuelle de maîtrise de la reproduction. *INRA Prod. Anim.* 13: 223-231.
- Thimonier, J. et P. Mauléon (1969). Variations saisonnières du comportement d'oestrus et des activités ovarienne et hypophysaire chez les ovins. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.* 9(2): 233-250.
- Thimonier, J., J. P. Ravault et R. Ortavant (1978). Plasma prolactin variations and cyclic ovarian activity in ewes submitted to different light regimens. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18: 1229-1235.
- Thrun, L. A., G. E. Dahl, N. P. Evans et F. J. Karsch (1997a). A critical period for thyroid hormone action on seasonal changes in reproductive neuroendocrine function in the ewe. *Endocrinology* 138(8): 3402-3409.
- Thrun, L. A., G. E. Dahl, N. P. Evans et F. J. Karsch (1997b). Effect of thyroidectomy on maintenance of seasonal reproductive suppression in the ewe. *Biol Reprod* 56(4): 1035-1040.
- Thwaites, C. J. (1965). Photoperiodic control of breeding activity in the Southdown ewe with particular reference to the effects of an equatorial light regime. *J. Agric. Sci. Cambr.* 65: 57-65.
- Tillet, Y., J. P. Ravault, C. Selve, G. Evin, B. Castro et M. P. Dubois (1986). [Conditions for the use of specific antibodies for immunohistochemical visualization of serotonin and melatonin in the pineal gland of sheep]. *C R Acad Sci III* 303(3): 77-82.
- Tournadre, H., M. Pellicer-Rubio et F. Bocquier (2009). Maîtriser la reproduction en élevage ovin biologique: influence de facteurs d'élevage sur l'efficacité de l'effet bélier. *Innovations Agronomiques* 4: 85-90.
- Tricoire, H., A. Locatelli, P. Chemineau et B. Malpaux (2002). Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 143(1): 84-90.
- Tsutsui, K., G. E. Bentley, G. Bedecarrats, T. Osugi, T. Ubuka et L. J. Kriegsfeld (2010). Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* 31(3): 284-295.
- Turek, F. W. et C. S. Campbell (1979). Photoperiodic regulation of neuroendocrine-gonadal activity. *Biology of Reproduction* 20: 32-50.

- Um, J. H., S. Yang, S. Yamazaki, H. Kang, B. Viollet, M. Foretz et J. H. Chung (2007). Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase Iepsilon (CKIepsilon)-dependent degradation of clock protein mPer2. *J Biol Chem* 282(29): 20794-20798.
- Ungerfeld, R., M. Forsberg et E. Rubianes (2004). Overview of the response of anoestrous ewes to the ram effect. *Reprod Fertil Dev* 16(4): 479-490.
- Urrutia-Morales, J., C. A. Meza-Herrera, F. J. Escobar-Medina, H. G. Gamez-Vazquez, B. M. Ramirez-Andrade, M. O. Diaz-Gomez et A. Gonzalez-Bulnes (2009). Relative roles of photoperiodic and nutritional cues in modulating ovarian activity in goats. *Reprod Biol* 9(3): 283-294.
- VanderLeest, H. T., T. Houben, S. Michel, T. Deboer, H. Albus, M. J. Vansteensel, G. D. Block et J. H. Meijer (2007). Seasonal encoding by the circadian pacemaker of the SCN. *Curr Biol* 17(5): 468-473.
- Vanecek, J. (1988). Melatonin binding sites. *Journal of Neurochemistry* 51: 1436-1440.
- Vanecek, J. (1998). Cellular Mechanisms of Melatonin Action. *Physiological Reviews* 78(3): 687-721.
- Vasudevan, N., S. Ogawa et D. Pfaff (2002). Estrogen and Thyroid Hormone Receptor Interactions: Physiological Flexibility by Molecular Specificity. *Physiological Reviews* 82: 923-944.
- Vazquez, M. I., J. A. Abecia, F. Forcada et A. Casao (2010a). Effects of exogenous melatonin on in vivo embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. *Theriogenology* 74(4): 618-626.
- Vazquez, M. I., F. Forcada, A. Casao, J. A. Abecia, C. Sosa et I. Palacin (2010b). Undernutrition and exogenous melatonin can affect the in vitro developmental competence of ovine oocytes on a seasonal basis. *Reprod Domest Anim* 45(4): 677-684.
- Veliz, F. G., P. Poindron, B. Malpaux et J. A. Delgadillo (2006). Positive correlation between the body weight of anestrus goats and their response to the male effect with sexually active bucks. *Reprod Nutr Dev* 46(6): 657-661.
- Viguié, C., D. F. Battaglia, H. B. Krasa, L. A. Thrun et F. J. Karsch (1999). Thyroid hormones act primarily within the brain to promote the seasonal inhibition of luteinizing hormone secretion in the ewe. *Endocrinology* 140(3): 1111-1117.
- Viguié, C., A. Caraty, A. Locatelli et B. Malpaux (1995). Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by melatonin in the ewe. I. Simultaneous delayed increase in LHRH and luteinizing hormone pulsatile secretion. *Biol Reprod* 52(5): 1114-1120.
- Viguié, C., H. T. Jansen, J. D. Glass, M. Watanabe, H. J. Billings, L. Coolen, M. N. Lehman et F. J. Karsch (2001). Potential for polysialylated form of neural cell adhesion molecule-mediated neuroplasticity within the gonadotropin-releasing hormone neurosecretory system of the ewe. *Endocrinology* 142(3): 1317-1324.
- Viguié, C., S. Picard, J. C. Thiery et B. Malpaux (1998). Blockade of tyrosine hydroxylase activity in the median eminence partially reverses the long day-induced inhibition of pulsatile LH secretion in the ewe. *J Neuroendocrinol* 10(7): 551-558.
- Vinoles, C., M. Forsberg, G. B. Martin, C. Cajarville, J. Repetto et A. Meikle (2005). Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* 129(3): 299-309.
- Vinoles, C., A. Meikle et G. B. Martin (2009). Short-term nutritional treatments grazing legumes or feeding concentrates increase prolificacy in Corriedale ewes. *Anim Reprod Sci* 113(1-4): 82-92.

- Vivien-Roels, B. (1999). Seasonal variations in the amplitude of the daily pattern of melatonin secretion in mammalian and non-mammalian vertebrates: Possible physiological consequences dans *Comparative Endocrinology and Reproduction*. Eds K. P. Joy, A. Krishna et C. Haldar. New-Dehli, Narosa Publishing House: 529-542.
- Vivien-Roels, B. et J. Arendt (1983). How does the indoleamine production of the pineal gland respond to variations of the environment in a non-mammalian vertebrate, *Testudo hermanni* Gmelin? *Psychoneuroendocrinology* 8(3): 327-332.
- Vivien-Roels, B., P. Pevet, M. Masson-Pevet et B. Canguilhem (1992). Seasonal variations in the daily rhythm of pineal gland and/or circulating melatonin and 5-methoxytryptophol concentrations in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 86(2): 239-247.
- Vivien-Roels, B., B. Pitrosky, M. Zitouni, A. Malan, B. Canguilhem, D. Bonn et P. Pevet (1997). Environmental control of the seasonal variations in the daily pattern of melatonin synthesis in the European hamster, *Cricetus cricetus*. *Gen Comp Endocrinol* 106(1): 85-94.
- von Gall, C., D. R. Weaver, J. Moek, A. Jilg, J. H. Stehle et H. W. Korf (2005). Melatonin plays a crucial role in the regulation of rhythmic clock gene expression in the mouse *pars tuberalis*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040: 508-511.
- Waddington Lamont, E., V. L. Harbour, J. Barry-Shaw, L. Renteria Diaz, B. Robinson, J. Stewart et S. Amir (2007). Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of *Period2* protein in the limbic forebrain. *Neuroscience* 144(2): 402-411.
- Wagner, G. C., J. D. Johnston, I. J. Clarke, G. A. Lincoln et D. G. Hazlerigg (2008). Redefining the limits of day length responsiveness in a seasonal mammal. *Endocrinology* 149(1): 32-39.
- Wakabayashi, Y., T. Nakada, K. Murata, S. Ohkura, K. Mogi, V. M. Navarro, D. K. Clifton, Y. Mori, H. Tsukamura, K. Maeda, R. A. Steiner et H. Okamura (2010). Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci* 30(8): 3124-3132.
- Walkden-Brown, S. W., B. J. Restall, B. W. Norton, R. J. Scaramuzzi et G. B. Martin (1994). Effect of nutrition on seasonal patterns of LH, FSH and testosterone concentration, testicular mass, sebaceous gland volume and odour in Australian Cashmere goats. *J Reprod Fertil* 102(2): 351-360.
- Walker, R. F. et C. L. Bethea (1977). Gonadal function in underfed rats: I. Effect of pineal gland and constant light on maturation and fecundity. *Biol Reprod* 17(5): 623-629.
- Watanabe, M., S. Yasuo, T. Watanabe, T. Yamamura, N. Nakao, S. Ebihara et T. Yoshimura (2004). Photoperiodic regulation of type 2 deiodinase gene in Djungarian hamster: Possible homologies between avian and mammalian photoperiodic regulation of reproduction. *Endocrinology* 145: 1546-1549.
- Wayne, N. L., B. Malpoux et F. J. Karsch (1990). Photoperiodic requirements for timing onset and duration of the breeding season of the ewe: synchronization of an endogenous rhythm of reproduction. *J Comp Physiol A* 166(6): 835-842.
- Weaver, D. R., C. Liu et S. M. Reppert (1996). Nature's knockout: the *Mel1b* receptor is not necessary for reproductive and circadian responses to melatonin in Siberian hamsters. *Mol Endocrinol* 10(11): 1478-1487.
- Webb, R., P. C. Garnsworthy, J. G. Gong et D. G. Armstrong (2004). Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J Anim Sci* 82 E-Suppl: E63-74.
- Webster, J. R., S. M. Moenter, G. K. Barrell, M. N. Lehman et F. J. Karsch (1991a). Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. III. Thyroidectomy blocks seasonal

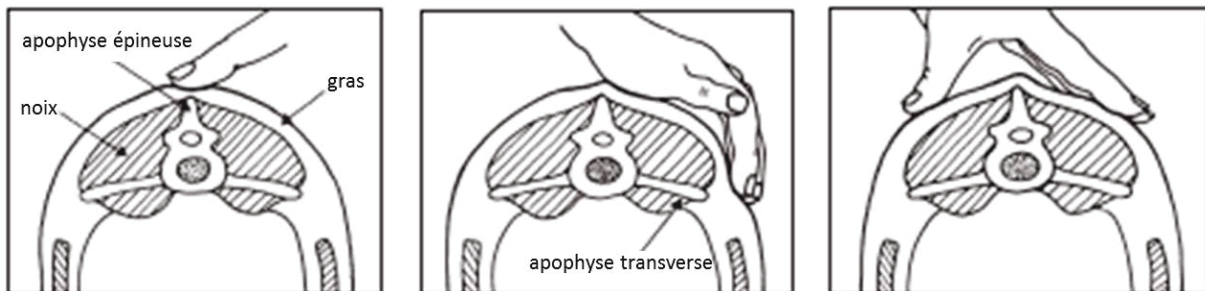
- suppression of gonadotropin-releasing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 129(3): 1635-1643.
- Webster, J. R., S. M. Moenter, C. J. Woodfill et F. J. Karsch (1991b). Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. II. Thyroxine allows a season-specific suppression of gonadotropin secretion in sheep. *Endocrinology* 129(1): 176-183.
- Welker, H. A. et L. Vollrath (1984). The effects of a number of short-term exogenous stimuli on pineal serotonin-N-acetyltransferase activity in rats. *J Neural Transm* 59(1): 69-80.
- Welsh, D. K., J. S. Takahashi et S. A. Kay (2010). Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annual Review of Physiology* 72: 551-577.
- Welsh, D. K., S. H. Yoo, A. C. Liu, J. S. Takahashi et S. A. Kay (2004). Bioluminescence imaging of individual fibroblasts reveals persistent, independently phased circadian rhythms of clock gene expression. *Current Biology* 14(22): 2289-2295.
- Whisnant, C. S. et R. L. Goodman (1994). Effect of anterior hypothalamic deafferentation on the negative feedback of gonadal steroids on luteinizing hormone pulse frequency in the ewe. *Domest Anim Endocrinol* 11(2): 151-159.
- Williams, L. M., P. J. Morgan, G. Pelletier, G. I. Riddoch, W. Lawson et G. R. Davidson (1989). Neuropeptide Y (NPY) innervation of the ovine pineal gland. *J Pineal Res* 7(4): 345-353.
- Wingfield, J. C. (1984). The influences of weather on reproduction. *J. Exp. Zool.* 232: 589-594.
- Wingfield, J. C. (2008). Organization of vertebrate annual cycles: implications for control mechanisms. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363(1490): 425-441.
- Wingfield, J. C., D. L. Maney, C. W. Breuner, J. D. Jacobs, S. Lynn, M. Ramenofsky et R. D. Richardson (1998). Ecological Bases of Hormone-Behavior Interactions: The "Emergency Life History Stage". *American Zoologist* 38(1): 191-206.
- Wintermantel, T. M., R. E. Campbell, R. Porteous, D. Bock, H. J. Grone, M. G. Todman, K. S. Korach, E. Greiner, C. A. Perez, G. Schutz et A. E. Herbison (2006). Definition of estrogen receptor pathway critical for estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone neurons and fertility. *Neuron* 52(2): 271-280.
- Witt-Enderby, P. A., J. Bennett, M. J. Jarzynka, S. Firestine et M. A. Melan (2003). Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci* 72(20): 2183-2198.
- Wittkowski, W., J. Bockmann, M. R. Kreutz et T. M. Bockers (1999). Cell and molecular biology of the pars tuberalis of the pituitary. *Int Rev Cytol* 185: 157-194.
- Woodfill, C. J., N. L. Wayne, S. M. Moenter et F. J. Karsch (1994). Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. *Biol Reprod* 50(4): 965-976.
- Wray, S. (2002). Development of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology* 23: 292-316.
- Xiong, J. J., F. J. Karsch et M. N. Lehman (1997). Evidence for seasonal plasticity in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system of the ewe: changes in synaptic inputs onto GnRH neurons. *Endocrinology* 138(3): 1240-1250.
- Xu, Y., N. Tamamaki, T. Noda, K. Kimura, Y. Itokazu, N. Matsumoto, M. Dezawa et C. Ide (2005). Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. *Exp Neurol* 192(2): 251-264.
- Yahalom, D., A. Chen, N. Ben-Aroya, S. Rahimipour, E. Kaganovsky, E. Okon, M. Fridkin et Y. Koch (1999). The gonadotropin-releasing hormone family of neuropeptides in the brain of human, bovine and rat: identification of a third isoform. *FEBS Letters* 463: 289-294.

- Yamamura, T., S. Yasuo, K. Hirunagi, S. Ebihara et T. Yoshimura (2006). T(3) implantation mimics photoperiodically reduced encasement of nerve terminals by glial processes in the median eminence of Japanese quail. *Cell Tissue Res* 324(1): 175-179.
- Yasuo, S., N. Nakao, S. Ohkura, M. Iigo, S. Hagiwara, A. Goto, H. Ando, T. Yamamura, M. Watanabe, T. Watanabe, S. Oda, K. Maeda, G. A. Lincoln, H. Okamura, S. Ebihara et T. Yoshimura (2006a). Long-day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a short-day breeder: implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis. *Endocrinology* 147(1): 432-440.
- Yasuo, S., M. Watanabe, M. Iigo, T. Yamamura, N. Nakao, T. Takagi, S. Ebihara et T. Yoshimura (2006b). Molecular mechanism of photoperiodic time measurement in the brain of Japanese quail. *Chronobiol Int* 23(1-2): 307-315.
- Yasuo, S., M. Watanabe, N. Nakao, T. Takagi, B. K. Follett, S. Ebihara et T. Yoshimura (2005). The reciprocal switching of two thyroid hormone-activating and -inactivating enzyme genes is involved in the photoperiodic gonadal response of Japanese quail. *Endocrinology* 146: 2551-2554.
- Yasuo, S. et T. Yoshimura (2009). Comparative analysis of the molecular basis of photoperiodic signal transduction in vertebrates. *Integrative and Comparative Biology* 49(5): 507-518.
- Yasuo, S., T. Yoshimura, S. Ebihara et H. W. Korf (2007). Temporal dynamics of type 2 deiodinase expression after melatonin injections in Syrian hamsters. *Endocrinology* 148: 4385-4392.
- Yasuo, S., T. Yoshimura, S. Ebihara et H. W. Korf (2009). Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. *J Neurosci* 29(9): 2885-2889.
- Yasuo, S., T. Yoshimura, S. Ebihara et H. W. Korf (2010). Photoperiodic control of TSH-beta expression in the mammalian pars tuberalis has different impacts on the induction and suppression of the hypothalamo-hypophysial gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 22(1): 43-50.
- Yenikoye, A. (1984). Annual variations in estrual behavior, rate and possibilities for ovulation in Peulh ewes from Niger. *Reproduction Nutrition Development* 24: 11-19.
- Ying, S. Y. (1988). Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Reviews* 9: 267-293.
- Yoshimura, T., S. Yasuo, M. Watanabe, M. Iigo, T. Yamamura, K. Hirunagi et S. Ebihara (2003). Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature* 426(6963): 178-181.
- Zarazaga, L., I. Celi, J. L. Guzmán et B. Malpaux (2011). The response of luteinizing hormone secretion to photoperiod is modified by the level of nutrition in female Mediterranean goats. *Animal reproduction science* 126(1-2): 83-90.
- Zarazaga, L. A., J. L. Guzman, C. Dominguez, M. C. Perez et R. Prieto (2005). Effect of plane of nutrition on seasonality of reproduction in Spanish Payoya goats. *Anim Reprod Sci* 87(3-4): 253-267.
- Zarazaga, L. A., B. Malpaux, L. Bodin et P. Chemineau (1998a). The large variability in melatonin blood levels in ewes is under strong genetic influence. *Am J Physiol* 274(4 Pt 1): E607-610.
- Zarazaga, L. A., B. Malpaux et P. Chemineau (2003). Amplitude of the plasma melatonin nycthemeral rhythms is not associated with the dates of onset and offset of the seasonal ovulatory activity in the Ile-de-France ewe. *Reprod Nutr Dev* 43(2): 167-177.
- Zarazaga, L. A., B. Malpaux, D. Guillaume, L. Bodin et P. Chemineau (1998b). Genetic variability in melatonin concentrations in ewes originates in its synthesis, not in its catabolism. *Am J Physiol* 274(6 Pt 1): E1086-1090.

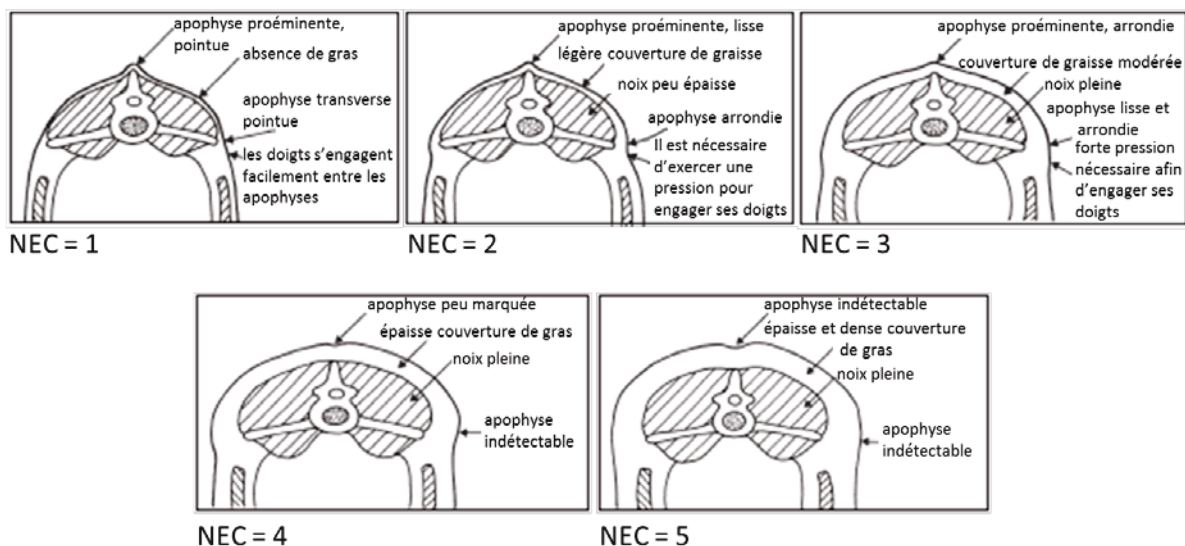
- Zarazaga, L. A., L. Todini, P. Chemineau, P. G. Marnet, A. Locatelli et B. Malpoux (2010). Nocturnal melatonin concentrations vary dramatically between the two jugular veins in most individual sheep maintained under mimicked or natural photoperiod. *Res Vet Sci* 88(2): 233-238.
- Zhang, S., D. Blache, M. A. Blackberry et G. B. Martin (2005). Body reserves affect the reproductive endocrine responses to an acute change in nutrition in mature male sheep. *Anim Reprod Sci* 88(3-4): 257-269.
- Zieba, D. A., K. Kirsz, E. Molik, K. Romanowicz et A. K. Wojtowicz (2011). Effects of orexigenic peptides and leptin on melatonin secretion during different photoperiods in seasonal breeding ewes: an in vitro study. *Domest Anim Endocrinol* 40(3): 139-146.
- Zieba, D. A., B. Klocek, G. L. Williams, K. Romanowicz, L. Boligłowa et M. Wozniak (2007). In vitro evidence that leptin suppresses melatonin secretion during long days and stimulates its secretion during short days in seasonal breeding ewes. *Domest Anim Endocrinol* 33(3): 358-365.
- Zieba, D. A., M. Szczesna, B. Klocek-Gorka, E. Molik, T. Misztal, G. L. Williams, K. Romanowicz, E. Stepień, D. H. Keisler et M. Murawski (2008a). Seasonal effects of central leptin infusion on secretion of melatonin and prolactin and on SOCS-3 gene expression in ewes. *J Endocrinol* 198(1): 147-155.
- Zieba, D. A., M. Szczesna, B. Klocek-Gorka et G. L. Williams (2008b). Leptin as a nutritional signal regulating appetite and reproductive processes in seasonally-breeding ruminants. *J Physiol Pharmacol* 59 Suppl 9: 7-18.
- Ziylan, Y. Z., A. K. Baltacı et R. Mogulkoc (2009). Leptin transport in the central nervous system. *Cell Biochem Funct* 27(2): 63-70.
- Zucker, I. (2001). Circannual rhythms: mammals dans *Handbook of Behavioral Neurobiology: Circadian clocks*. Eds J. Takahashi, F. W. Turek et R. Y. Moore. New-York, Plenum-Kluwer: 511-530.
- Zucker, I., P. G. Johnston et F. Frost (1980). Comparative physiological and biochronometric analyses of rodent seasonal reproductive cycles. *Prog. Reprod. Biol.* 5: 102-133.
- Zucker, I., T. M. Lee et J. Dark (1991). The suprachiasmatic nucleus and annual rhythms of mammals dans *The Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. Eds D. C. Klein, R. Y. Moore et S. M. Reppert. New-York, Oxford University Press: 246-259.

Annexes

1. La méthode d'attribution d'une Note d'Etat Corporel (NEC) chez les ovins



Ces coupes transversales de la colonne vertébrale d'une brebis au niveau des reins détaillent le procédé de palpations en vue d'attribuer la NEC. Sont ainsi appréciés la proéminence des apophyses épineuses et transverses des vertèbres, le développement des muscles sous-lombaires et de la noix. Chaque note d'état, attribuée sur une grille de 1 à 5, se réfère à des conditions particulières pour chacun de ces critères :



D'après Russel *et al.* (1969) et Thompson et Meyer (1994)

2. Tableau d'aide à la décision concernant la sortie d'un animal du protocole alimentaire expérimental : critères et définition des valeurs de chaque critère (end points).

CRITERES	<i>VAL. ACCEPTABLE</i> «NORME»	<i>VALEUR MOYENNE</i> «PERTURBATION»	<i>VALEUR CRITIQUE</i> «ALTERATION»
COMPORTEMENT alimentaire, social et individuel	Rien de particulier à signaler L'animal interagit avec ses congénères et réagit à la présence de l'expérimentateur	L'animal ne présente pas de réponse à la distribution de la nourriture <u>ou</u> Éprouve des difficultés à consommer sa ration <u>ou</u> Ne rumine pas L'animal arrache la laine du dos de ses congénères <u>et</u> Consomme sa litière	Association du facteur «éprouve des difficultés à consommer sa ration» avec un des autres facteurs de la valeur «PERTURBATION» L'animal ne parvient pas à se maintenir debout <u>ou</u> Grince des dents <u>ou</u> Ne réagit pas à différents stimuli
NOTE d'ETAT CORPOREL	NEC comprise entre 1,5 et 4,5 <u>et</u> Chute entre deux notations inférieure à 0,5 point	NEC comprise entre 1,5 et 4,5 <u>et</u> Chute entre deux notations comprise entre 0,5 et 1 point	NEC sortant de la fourchette [1,5 4,5] <u>ou</u> Chute entre deux notations supérieure à 1 point
POIDS VIF	Poids vif compris entre 45 et 80 kg <u>et</u> Perte de poids par rapport au poids initial inférieure à 30%	Poids vif compris entre 40 et 80 kg <u>et</u> Perte de poids par rapport au poids initial supérieure à 30%	Poids vif inférieur à 40 kg <u>et</u> Perte de poids par rapport au poids initial supérieure à 30%

L'utilisation de ces critères a accompagné chaque mise en place et maintien d'un groupe de brebis à un faible état d'engraissement.

L'atteinte d'une valeur définie comme représentant une grave altération (colonne rouge) pour un des trois critères, entraînait la sortie de l'individu du protocole alimentaire (end point). L'end point était également atteint dès lors qu'une valeur moyenne (colonne jaune) du critère COMPORTEMENT était associée à valeur moyenne pour au moins un des deux autres critères

Pituitary and ovarian responses to the “ram effect” in anestrus ewes are influenced by body condition but not short-term nutritional supplementation

Scaramuzzi, R. J.^{1,2}, Oujagir, L.¹, Menassol, J-B.¹, Fréret, S.¹, Piezel, A.¹, Brown, H. M.¹, Cognié, J.¹ and Fabre-Nys, C.¹

¹. INRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

². CNRS, UMR6175 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

³. Université François Rabelais de Tours, F-37041 Tours, France

⁴. IFCE, F-37380 Nouzilly, France

⁵. Department of Veterinary Basic Sciences, Royal Veterinary College, Herts, UK

Abstract

Nutrition and socio-sexual interactions are two important factors that can affect reproduction in sheep. The “ram effect” is a socio-sexual technique used to induce out-of-season fertility while nutrition is used to increase prolificacy. However the effects of nutrition and specifically long- and short-term variations in energy supply on the “ram effect” are poorly understood. The objective of this experiment was to determine if the level of fatness (long-term nutrition) and/or the short-term provision of extra nutrition interact to stimulate folliculogenesis in anestrus ewes and so modify their response to the “ram effect” and also to determine those pituitary and ovarian responses to the “ram effect” that are responsive to short- and long-term nutritional flux.

The experiment using Île-de-France ewes was carried out in late anestrus. Three months prior to the experiment, 48 ewes were fed diets designed to produce two groups of ewes; one with a body condition score (BCS) of >3.0 (high BCS; n = 23) and the other with a BCS <2.0 (low BCS; n = 15). Within each group half of the animals were supplemented daily with 500g of lupins from day -5 to day 0 (ram introduction). The resulting four groups were: Low BCS,

supplemented (n = 7) and non-supplemented (n = 8) and high BCS, supplemented (n = 12) and non-supplemented (n = 11). Fasting concentrations of glucose and insulin were determined during supplementation and on day -1 the LH response to 75 ng GnRH was determined. From day 0 to the end of the experiment, rams were left in contact with the ewes. During this period the short-term pituitary responses (LH pulsatility, LH surge) and long-term ovarian responses (ovulation rate, ovarian cyclicity, and estrus) to the “ram effect” were analyzed.

Ewes in the low BCS groups had lower concentrations of glucose and insulin (both $p < 0.001$) and supplementation increased both (both $p \leq 0.001$). The increase in LH induced by GnRH was reduced in ewes with low BCS ($p = 0.015$) but it was not affected by supplementation. Similarly the parameters of the short-term LH response to the “ram effect” were all reduced in ewes with low BCS (all $p < 0.05$) and supplementation altered this response only in high BCS ewes. There was no effect of nutrition on the timing of the LH surge. The ovarian response to the “ram effect” was not affected by either BCS or supplementation; there was a trend towards delayed ovarian responses in ewes in the low BCS groups ($p = 0.099$) and the start of the follow-up cycle was significantly delayed in these groups ($p = 0.034$) furthermore their maximum concentration of progesterone was lower ($p = 0.029$). There was no effect of nutrition on ovulation rate or estrus.

These results show that the BCS of ewes is a significant factor influencing the response to the “ram effect” and that supplementation has little direct influence, and no interaction with BCS, on this response.

Introduction

In recent years there has been an increasing emphasis on the use of non-hormonal methods to control reproduction in farm animals (Martin et al., 2004; Martin & Kadokawa, 2006). This concept is based on the knowledge that the physiological systems that control reproduction respond to environmental factors that tailor reproduction to the prevailing environmental conditions. Environmental factors that affect reproductive success of sheep include photoperiod, nutrition, stress and socio-sexual interactions and through the manipulation of some or all of these factors reproduction of sheep can be controlled without the need to use exogenous hormones (Scaramuzzi & Martin, 2008). While, there is little doubt that these

methods are feasible doubts do remain concerning their practical efficacy and economic viability.

The effect of nutrition on reproduction is complex and three types of nutritional effects have been identified, the so-called static, dynamic and short-term effects (Lindsay et al., 1993). It is not clear if these effects are controlled by a single mechanism or separate mechanisms (Scaramuzzi et al., 2006). The static effect is associated with the absolute level of body weight and is closely related to adiposity and as adiposity increases so does ovulation rate (Morley et al., 1978; McNeilly et al., 1987; Viñoles et al., 2002). On the other hand the short-term effect is associated with a short-term boost in nutrient intake that stimulates folliculogenesis by increasing the number of small and medium sized follicles (Muñoz-Gutiérrez et al., 2002; Somchit et al., 2007) leading directly to an increase in ovulation rate (Teleni et al., 1989; Downing et al., 1995) without a corresponding change in body weight and is probably associated with increased insulin-stimulated uptake of glucose by the ovary (Scaramuzzi et al., 2010).

Socio-sexual effects on reproductive activity are well illustrated by the “ram effect”, a sequence of endocrine and physiological events in anoestrus ewes in response to the presence of a sexually active ram that culminates in ovulation and the formation of a corpus luteum (Ungerfeld et al., 2004; Delgadillo et al., 2009; Hawken & Martin 2012). The sequence commences with the sensory detection (primarily olfactory) of the presence of a ram causing increased pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) leading to increased pulsatile secretion of luteinizing hormone (LH), a short-term pituitary response that leads to gonadotropin-stimulated secretion of follicular estradiol that causes positive feedback, a LH surge, ovulation and the formation of a corpus luteum (long-term ovarian responses).

In conventional systems of lamb production the short-term effect of nutrition can be used to provide the ewes with positive nutrient flux for a short period prior to mating and this technique reliably increases litter size for ewes mated in the breeding season (Lindsay et al., 1993; Scaramuzzi et al., 2006; 2011). The “male effect” can be to induce fertile mating outside of the normal breeding season in sheep and goats (Ungerfeld et al., 2004; Delgadillo et al., 2009). Normally, these techniques are generally used individually even though it has already been established that they can be used synergistically to further improve the performances of does in response to a “buck effect” (Fitz-Rodríguez et al. 2009). Moreover both the “ram effect” (Henniawati & Fletcher, 1986; Véliz et al., 2006) and short-term

nutritional effects: (Viñoles et al. 2005) are likely to be influenced by body condition (level of fatness).

This experiment was designed to determine if these two techniques could be used together to improve the reproductive performance in sheep mated during late anestrus and in addition, to unravel how these reproductive responses are affected by body condition (low vs. high) and/or short-term supplementation. In this study, particular attention was paid to the shortcomings of these techniques (Chanvallon, 2009; Chanvallon et al., 2011) that limit their efficacy for the management of reproduction in commercial enterprises. For example, only a small proportion typically 20 to 40 per cent, of ewes respond to short-term nutritional stimulation (Scaramuzzi et al., 2006) and responses to the “ram effect” vary between 0 and 90% (Chanvallon, 2009; Chanvallon et al., 2011). In addition, studies have shown that failure of the “ram effect” to induce ovulation was mainly caused by a failure to induce a LH surge (Chanvallon et al., 2011). A further aim in this study was to determine the effect of nutrition (body condition and short-term nutritional supplementation) on some of the intervening physiological responses of the pituitary gland and ovary to the “ram effect”.

Material and methods

The experiment used 48 mature Île-de-France ewes and was carried out at the INRA research facility at Nouzilly in July during the late non-breeding season for this breed in this location. The ewes were housed in an open sided barn, in several pens each holding a group of 8-10 ewes on straw bedding. The ewes were isolated from all contact with rams until the rams were introduced to induce the “ram effect”. The experiment was carried out in accordance with French and European regulations on the care and welfare of animals in research.

Before the experiment the ewes were first confirmed as anoestrus. Blood samples were collected once a week for three weeks before the start of the experiment. The plasma samples were then assayed for progesterone and anoestrous ewes were identified by a pattern of persistently low (<1ng/mL for two consecutive weeks) concentrations of progesterone, over this period, indicating the absence of corpora lutea (Chanvallon 2009). On this basis, 38 anoestrus ewes were available for inclusion in the experiment.

Diets and nutritional management

All diets were designed using the INRA recommendations for the growth and maintenance requirements of adult, non-pregnant ewes (INRA, 2010). The diet consisted of a mix of straw (50%), fescue hay (40%) and barley grain (10%) and at all times during the pre-experimental and experimental periods the ewes had ad-libitum access to water, low quality roughage that satisfied appetite but had a very low net nutritional value and mineral licks.

Starting in March, about three months before the experiment commenced, the ewes were group fed diets designed to achieve body condition scores of <2.0 (low BCS) or >3.0 (high BCS). During this period the ewes of the low BCS group were fed at 40 % of their maintenance needs for energy which corresponded to an average daily intake of 0.43 Mcal of net energy and 27.70 g of metabolizable protein and the ewes in the high BCS group were fed at 125 % of their maintenance needs for energy which corresponded to an average daily intake of 1.50 Mcal of net energy and 86.39 g of metabolizable protein. Once the desired BCS was achieved the ewes were then fed a diet designed to maintain a constant body weight and BCS, reflecting a stable metabolic state. Hence both nutritional groups were fed at 85-100 % of their maintenance needs for energy which corresponded to an average daily intake of 0.84 or 1.33 Mcal of net energy and 49.86 or 75.51 g of metabolizable protein for the ewes in the low and high BCS groups respectively.

The supplemented groups were fed their basal diet supplemented individually with 500g of whole lupin grain (*Lupinus alba* var. Wodjii) per ewe per day with a net nutritional value of 1.21 Mcal of net energy and 93.17 g of metabolizable protein per kilogram of dry matter (DM) that raised their energy intake to an average of twice maintenance. The supplement was fed in equal portions at 1000h and 1600h over a five day periods commencing five days before the introduction of rams and again from days 14 to 19 after the “ram effect”.

Experimental plan

In early June, thirty eight mature multiparous, anestrus Île-de-France ewes were allocated at random to four groups in a two by two factorial design. The first factor was BCS (Russel et al., 1969) at two levels; low BCS (2.0) and high BCS (3.0); the median BCS of these two groups at the start of the experiment were 1.75 and 3.25. The second factor was diet tested at

two levels (supplemented with lupin grain and non-supplemented from day -6 to the day of the “ram effect”). The four groups were:

- Low BCS, non-supplemented (n = 8)
- Low BCS, supplemented (n = 7)
- High BCS, non-supplemented (n = 11)
- High BCS, supplemented (n = 12);

On day 14 after the “ram effect” the ewes in the two high BCS groups were split so that half of each group was fed the control diet and the other half were supplemented until day 19. In the two low BCS groups there was no supplementation after the “ram effect”. The plan for the conduct of the experiment is shown in Figure 1.

The “ram effect”

The ewes were kept completely isolated from all contact with rams until the time the rams were introduced. Groups of 4 to 5 ewes were placed in 15m² pens with a single sexually active ram. The time the rams were introduced to the ewes was designated “time 0”. The rams were left in contact with the ewes for the next 15 days they were then replaced with fresh rams fitted with mating harnesses and crayons, and left with the ewes until the end of the experiment on day 32. To ensure an even stimulus and to avoid variability associated with individual rams during the “ram effect”, the rams were rotated amongst the pens, every hour for the first 6 hours, then every 3 days until day 15 and finally once a day until day 28.

Blood sampling and plasma preparation

Samples of jugular venous blood (3mL) were taken by venepuncture at the following times relative to the day rams were introduced to the ewes (day 0). From days -6 to -1 blood samples were taken twice daily at 0900h (one hour before feeding) and again at 1300h (three hours after feeding). The plasma from these samples was assayed for glucose and insulin. From time -2h samples were taken every 15 minutes until time +4 h and then every four hours until time +72 hours. The plasma from these samples was assayed for LH. Finally samples were taken once a day from day 0 to day 27. The plasma from these samples was assayed for

progesterone. Within an hour of collection, the blood samples were centrifuged at 2500g for 10 min. The plasma was then decanted and stored at -200C.

GnRH test

The LH response to a single intravenous injection of GnRH was carried out the day before the introduction of rams. The ewes were given a jugular venous injection (2 mL) of 75 ng of GnRH (Sigma Aldrich Inc., Saint-Quentin Fallavier, France) and 3 mL samples of jugular venous blood collected at -60, -30, 0, 5, 15, 45 and 60 min relative to the injection of GnRH. The dose of GnRH was chosen to induce a LH pulse with average amplitude of 1 to 2 ng/mL (Chanvallon et al., 2011). These samples were processed as described above and the plasma analyzed for LH.

The Detection of Oestrus

From day 15 rams fitted with harness and crayons were used to detect oestrus. The ewes were examined once a day, from day 16 to day 28. The presence of a crayon mark on the rump of a ewe was regarded as evidence of estrus. Estrus was confirmed individually by direct observation of the ewe-ram interaction between the ewe and a sexually active ram (Fabre-Nys & Venier 1987).

Endoscopy

The ewes were examined by endoscopy on day 5 after the introduction of rams. The number, size and colour of corpora lutea (CLs) and the number and size of visible surface follicles were recorded. The endoscopies were carried out under anaesthesia by the site veterinary surgeon (JC).

Endocrine end points

The characteristics of pulsatile LH secretion (LH pulse frequency, LH pulse amplitude and the baseline concentrations of LH) were determined using the Pulsar algorithm (Merriam & Watcher, 1982) as we have described previously (Menassol et al., 2012). These parameters over the four hours immediately following the introduction of rams determined the short-term LH response to the “ram effect”. The LH surge was defined as a concentration of LH

>8.0ng/mL (the upper detection limit of the assay), in two consecutive samples between 4 and 72h after the introduction of rams (Caraty et al., 2002).

Classification of ovarian responses

The type of cycle induced by the “ram effect” was determined from the pattern of progesterone in jugular venous blood. An ovarian response to the “ram effect” was defined as a rise in the jugular venous concentration of progesterone up to 0.5 ng/mL or greater, within 7 days of the introduction of rams. The length of the luteal phase was defined as the number of days that the plasma concentration of progesterone was continuously above 0.5 ng/mL and the length of the estrous cycle was defined as the number of days between the first and second time following the introduction of rams, that the plasma concentration of progesterone rose above 0.5 ng/mL.

A normal luteal phase was defined as a one in which the concentration of progesterone was above 0.5 ng/mL for more than 10 days but less than 16 days and a short luteal phase was defined as one in which the concentration of progesterone rose above the mean baseline concentration before the “ram effect” for at least one day in the first seven days after the introduction of rams.

Hormone and metabolite analyses

The analysis of glucose used plasma from blood samples collected into fluoride EDTA vacuum tubes. Samples collected into Heparin-lithium vacuum tubes were analyzed for insulin, progesterone and LH. All assays were carried out in duplicate.

ELISAs for LH and progesterone

Plasma samples were analyzed by ELISA to determine the concentrations of LH (Faure et al., 2005) and progesterone (Canépa et al., 2008). The limit of detection of LH was 0.01 ng/mL, the upper limit of detection was 8.0 ng/mL and the inter-assay coefficient of variation was 13.6%. The limit of detection of progesterone was 0.25ng/mL and the inter-assay coefficient of variation was 14.3%.

Radioimmunoassay for insulin

Insulin was measured using a heterologous radioimmunoassay (Menassol et al., 2011). The antiserum was rabbit anti-porcine insulin (Sigma Aldrich Inc., Saint-Quentin Fallavier, France); the standards were ovine insulin (Sigma Aldrich Inc., Saint-Quentin Fallavier, France). The second antibody a goat anti-rabbit IGG (Sigma Aldrich Inc., Saint-Quentin Fallavier, France), was used at a dilution of 1 in 20 and left overnight at 40C before centrifugation and decanting. The sensitivity of the assay was 0.05 ng/mL and the inter-assay and intra-assay coefficients of variation were 10% and 15% respectively. The cross reactivity of the antiserum with ovine insulin was 100% relative to the homologous standard.

Glucose

The concentration of glucose in plasma was determined by colorimetry using the glucose oxidase method. The reagents were supplied as a kit (Glucose Assay Kit; Sigma Aldrich Inc., Saint-Quentin Fallavier, France) and the assay method followed the instructions provided by the manufacturer. Plasma samples were diluted to obtain concentrations that fell within the range of the standard curve (20 to 80 mg/dL). The sensitivity of the assay was 20 mg/dL.

Statistical Analyses

Statistical analyses were carried out using the statistical software program, SPSS® version 17.0 (SPSS Inc., IBM Company Headquarters, Chicago, Illinois, USA). Data reported as proportions were first analyzed with a binary logistic regression testing the effects of BCS, supplementation and interaction BCS x supplementation, using the statistical software program, SAS® (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). When the interaction was non-significant, the Fisher's exact test was used to analyze main effects of BCS and supplementation. Differences in live weight were tested using the unpaired t-test and differences in BCS were tested using the Wilcoxon rank sum test. The data on glucose and insulin concentrations were analyzed using a repeated measures analysis of variance (ANOVA) with time as the repeated measure, and where appropriate, post-hoc comparisons between treatments within time were carried out using the LSD test. Other quantitative data were analyzed using a two-way factorial ANOVA (testing the effects of BCS, supplementation and interaction BCS x supplementation).

Data are reported as mean \pm SEM except the data for body condition score which are reported as medians and ranges.

Results

General observations and exclusions

Two ewes had ovulated spontaneously before the rams were introduced to the ewes; data from these two ewes were excluded from the experiment. The excluded ewes were both from non-supplemented groups; one from the low BCS group and the other from the high BCS group.

At the time of the “ram effect”, the ewes had a mean (\pm SEM) body weight of 53.3 ± 1.09 kg and a median BCS of 1.75 (range 1.25 to 2.25) in the low BCS groups and a mean (\pm SEM) body weight of 64.0 ± 1.27 kg and a median BCS of 3.375 (range 2.75 to 3.75) in the high BCS groups. The differences in both BCS and live weight were significant (both $P < 0.001$).

The second period of supplementation (days 14 to 19) had no statistically significant effects on any reproductive parameter and so the data for the groups supplemented after the “ram effect” were pooled and re-analysed.

Effect of supplementation and BCS on glucose and insulin

The fasting (pre-morning feeding) concentrations of glucose and insulin in jugular venous blood over the 5 day period of nutritional supplementation are shown in Figure 2.

There was a significant overall effect of BCS on the blood concentrations of glucose and insulin, the low BCS group had significantly lower concentrations of both (both $P < 0.001$). There were also significant overall effect of supplementation on the blood concentrations of glucose ($P = 0.001$) and insulin ($P < 0.001$). Although the effect of time was not significant ($P = 0.363$) there were significant interactions of time with supplementation for both glucose ($P = 0.047$) and insulin ($P = 0.050$) which show that over time, the glucose and insulin concentrations increased in the supplemented groups but not in the non-supplemented groups (Figure 2). There was also interactions between BCS and supplementation for both glucose ($P = 0.023$) and insulin ($P < 0.001$) which shows that supplementation was more effective at increasing glucose and insulin in the high BCS groups (Figure 2).

At time “0” the concentration of both glucose ($P < 0.001$) and insulin ($P = 0.014$) were significantly lower in the low BCS group compared to the high BCS group but there were no significant differences between the supplemented and non-supplemented groups for either glucose ($P = 0.538$) or insulin ($P = 0.504$) at time “0”.

During the 5 day period of supplementation, the concentrations of both glucose and insulin increased. For glucose, its concentration was significantly higher in supplemented ewes on day 4 ($P = 0.022$) and remained high on day 5 ($P = 0.039$). For insulin, its concentration tended to be higher in supplemented ewes by day 2 ($P = 0.054$) and remained high on days 3 ($P = 0.059$) and 4 ($P = 0.017$) but by day 5 the increase was no longer significant ($P = 0.129$). There was a significant overall effect of BCS on the blood concentrations of glucose and insulin, the low BCS group had significantly lower concentrations of both (both $P < 0.001$).

The effect of supplementation and BCS in anoestrous ewes on the LH response to GnRH

The results of the GnRH test are given in Table 1. Data were available for 33 ewes, two ewes were eliminated because they had ovulated by the time the experiment had started and three ewes were eliminated because an endogenous pulse of LH was present at the time of the GnRH injection. Of the 33 ewes remaining, GnRH induced a pulse of LH in 29, 4 ewes did not respond and there were no significant effects of either BCS or supplementation and no significant interaction, on the proportion of non-responders. Ewes in low BCS tended to have a higher proportion of ewes that did not respond to GnRH (3/11 vs. 1/22; $P = 0.059$) but there was no effect of supplementation (2/16 vs. 2/17; $P = 0.948$) on the proportion of non-responders.

The concentration of LH before GnRH was significantly ($P = 0.019$) lower 360 in the ewes in the low BCS groups but it was not affected by nutritional supplementation ($P = 0.549$). Four end points were used to describe the LH response to GnRH. These were; the mean concentration of LH ($p = 0.025$) the maximum concentration of LH ($p = 0.005$), the mean amplitude of LH pulse induced by GnRH ($p = 0.015$) and the difference in the mean concentration of LH before and after GnRH ($p = 0.013$); all were significantly lower in the low BCS group (Table 1) while nutritional supplementation had no effect on any of them (Table 1).

The effect of supplementation and BCS on pituitary responses to the “ram effect”

LH pulsatility before the “ram effect”

Before the “ram effect”, the frequency of LH pulses in anoestrus ewes was very low and there were no significant effects of either BCS or nutritional supplementation on this end point (Table 2). However there was an effect of BCS on the mean concentration of LH in anoestrous ewes and it was significantly lower ($P < 0.001$) in the low BCS group but there was no effect of nutritional supplementation (Table 2).

The short-term LH response to the “ram effect”

A short-term LH response to the “ram effect” was detected in 33/36 ewes; 3 ewes had no short-term response and all 3 were in the low BCS groups. The proportion with a short term response was significantly lower in the low BCS group (10/13 vs. 23/23; $P = 0.016$) but was not affected by nutritional supplementation (15/18 vs. 18/18; $P = 0.070$) and the interaction between the two was not significant.

The short-term LH responses to the “ram effect” are shown in Table 3. In response to the “ram effect” the ewes in the low body condition groups had fewer LH pulses ($P = 0.002$), reduced mean concentrations of LH ($P = 0.033$) a lower maximum concentration of LH ($P = 0.005$), a longer interval from the introduction of rams to the first LH pulse ($P = 0.001$) and a trend towards a lower amplitude of LH pulses ($P = 0.085$) compared to ewes in the high BCS groups (Table 3). There were significant interactions between supplementation and BCS for the mean concentration of LH ($p = 0.051$), the maximum concentration of LH ($p = 0.005$) and the amplitude of LH pulses ($p = 0.015$). In all three cases the interaction due to reduced response in supplemented ewes from the high BCS groups but not from the low BCS groups (Table 3).

The LH surge in response to the “ram effect”

The LH surge induced by the “ram effect” was detected in 21/23 ewes in the high BCS group and in 10/13 ewes in the low BCS group, the difference was not significant ($P = 0.231$)

similarly, nutritional supplementation had no effect (15/18 vs. 16/18; $P=0.630$) and the interaction was also not significant.

The time interval between the introduction of rams and the start of the LH surge is shown in Figure 3. The time of the LH surge was not influenced by either BCS ($P=0.163$) or nutritional supplementation ($P=0.141$). Of the 31 ewes with LH surges in four (13%) of them the LH surge had started early that is, within four hours of the introduction of the rams.

The effect of supplementation and BCS on ovarian responses to the “ram effect”

Ovarian cyclicity in response to the “ram effect”

The overall response to the “ram effect” was high reflecting the time of the year (late anoestrus) when the experiment was conducted (Chanvallon et al., 2011) and of the 36 included in the data set 30 ewes had an LH surge and an increase in progesterone indicating an ovarian response to the “ram effect”. Of the 6 ewes without both a LH surge and a rise in progesterone two had atypical responses (no LH surge and highly variable concentrations of progesterone – Figure 4) that could not be classified using our definitions and four had no rise in progesterone even if they had a LH surge. The ovarian response to the “ram effect” was not affected by nutritional supplementation (15/18 vs. 15/18) but BCS did show a trend. Six ewes did not respond to the “ram effect” and four of these were in the low BCS group (4/13 vs. 2/23; $P=0.088$); the interaction 418 was not significant.

The various types of cycle in response to the “ram effect” are illustrated in Figure 4 and the distributions of cycle types are shown in Table 4. The proportion of ewes having normal cycles following the “ram effect” did not differ significantly between treatments and their interaction was not significant. Similarly the proportion of ewes having short cycles following the “ram effect” did not differ significantly between treatments and their interaction was not significant. Of the 30 ewes that responded to the “ram effect” and for whom, data is available, the majority of them (27; 90%) went on to have a normal follow-up cycle, and the proportion of normal follow-up cycles did not differ significantly between treatments and their interaction was not significant (Table 4).

Ewes in the low body condition groups had trend ($P=0.099$) towards a longer interval between the introduction of rams and the day when progesterone rose above 0.5 ng/mL (Figure 5). However the duration of the luteal phase, either normal or short, was not affected by BCS (Figure 5). Similarly, the follow-up cycle was started later in ewes in the low BCS groups and here the difference was significant ($P=0.034$) and again the duration of the follow-up cycle was not affected by BCS. Nutritional supplementation had no effect on any of these variables associated with the ovarian response to the “ram effect” (Figure 5).

Both the average concentration of progesterone over the luteal phase in those ewes with a normal cycle in response to the “ram effect” ($P=0.018$) and the maximum concentration of progesterone ($P=0.029$) were significantly lower in ewes in the low BCS groups (Figure 5). By contrast in those ewes with short cycles neither the average ($P=0.359$) nor the maximum concentration of progesterone ($P=0.809$) were affected by BCS. Nutritional supplementation had no effect on either the average or the maximum concentration of progesterone in ewes with either normal or short cycles in response to the “ram effect” (Figure 5).

Ovulation rate on day 5 in response to the “ram effect”

Both ovulation rate ($P < 0.001$) and the number of follicles greater than 3mm in size ($P=0.005$) were significantly lower in ewes in the low BCS groups (Table 5). Nutritional supplementation had no effect on either ovulation rate ($P=0.449$) or the number of follicles ($P=0.783$; Figure 5).

The effect of supplementation and BCS on oestrus in response to the “ram effect”

Twenty five ewes responding to the “ram effect” had definitive evidence of a follow-up cycle by the time the experiment ended on day 28 and of these a high proportion (18; 72%) displayed oestrus at the start of the follow-up cycle (Table 4). The proportion of ewes in oestrus was not affected by either BCS or nutritional supplementation and their interaction was not significant (Table 4).

Discussion

The results of this study confirm our preliminary finding that the body condition of ewes, i.e. adiposity, affected the short-term adeno-hypophyseal response to the “ram effect” in late anoestrus for Île-de-France breed of sheep (Johnson et al., 2011). Despite the fact that some parameters of the long-term ovarian response were affected by low BCS (ovulation rate, and progesterone concentrations during normal cycle) the main reproductive outcomes following the “ram effect” (the pattern of oestrous cycles and the expression of oestrus) were not different between groups of high and low BCS. Similarly, short-term nutritional supplementation before the “ram effect”, despite altering the metabolic status of the animals as expected (Somchit et al., 2007; Zabuli et al., 2010), stimulating glucose and insulin and interacting with BCS (the increases were greater in high BCS groups) did not affect any of the reproductive events triggered by the “ram effect”. Therefore we conclude that although low BCS was a potent signal that altered most of the pituitary responses to the “ram effect” it had little effect on the final reproductive outcome and similarly short-term nutritional supplementation had no effect on this response.

Despite the effects of low BCS on the short-term endocrine response to the “ram effect”, the reproductive stimulus induced by the “ram effect” was in general, correctly interpreted and the increase in LH pulsatility was sufficient to trigger an LH surge and the following ovarian response. However, the ovarian responses were reduced in ewes with a low BCS perhaps the effects were less obvious because the experiment was carried out late in the anoestrus so that the percentage of ewes responding to the “ram effect” was close to 100. The negative effects of low BCS on ovarian response to the “ram effect” at this time were seen as a tendency to delay the ovarian response and also as a reduced maximum and mean concentration of progesterone during the luteal phase.

Immediately before the “ram effect”, anoestrous ewes in low body condition had lower concentrations of basal LH but, the LH pulse frequency was not affected. An interaction between the seasonality of oestrous cyclicity and nutrition has been reported for the same breed of ewe by our laboratory (Menassol et al., 2012) and the present findings concerning the concentration of LH in anoestrous ewes agree with these data. It would be very beneficial to be able to predict those anoestrous ewes capable of responding to the “ram effect” and with this possibility in mind our findings suggest further tests to determine if the basal

concentration of LH or the LH response to a GnRH test could predict the likely response to the “ram effect”.

The response to the “ram effect” was close to 100% reflecting the fact that the experiment was done in late anoestrus (June) when very good responses are normally expected (Chanvallon et al., 2011). The advantage of doing the experiment in June was that a high response meant a high number of cycles to evaluate but with the disadvantage that it became more difficult to detect effects of nutrition. During the breeding season neither BCS nor nutritional supplementation had any effect on cyclicity although effects of BCS on the length of the breeding season have been reported (Menassol et al., 2012). The number of cycles observed in ewes on a low plane of nutrition was fewer than in ewes on a high plane of nutrition in some breeds (Allison & Kelly 1979, Hugo et al, 1981, Hulet et al, 1986) but not others (Allison & Kelly 1979, Hugo et al, 1981, Hulet et al, 1986). The incidence and duration of oestrus was not affected by BSC (Hulet et al, 1962, Allison & Davis 1976) but ram-seeking activity was higher in heavier ewes (Allison & Davis 1976). However, we have found in anoestrus, that BCS but not nutritional supplementation, affected the response to the “ram effect”. However, neither of the treatments affected the proportion of ewes with short cycles and it seems likely that the unknown mechanisms that underpin the defective luteal function that accompany the “ram effect” do not have a nutritional component. The proportion of short to normal cycles was 14:16 allowed scope to detect in either direction the effect of nutrition on short cycles. Since no effects were detected we conclude that short cycles occur independently of nutrition.

In this experiment there were 6 ewes that posed particular problems of interpretation. Two ewes were classed as abnormal because they could not be accommodated by our definitions. The progesterone profile for one of these is shown in Figure 4. Both these ewes had no LH surge and would normally be classed as non-responding. However the concentrations of progesterone and the results of the endoscopic examination suggest that there was some stimulation of ovarian activity. They may well have been animals on the verge of spontaneous ovarian activity. The same is may also be true for 4 other ewes that were classed as non-responding. Three of these ewes had elevated progesterone but later than the 7 day limit of our definition of a response. Some authors (Ungerfeld et al., 2002, Chanvallon et al., 2011) have classified such ewes as delayed responders and the high degree of synchronisation of these so-called delayed responses (progesterone rose between days 9 and 14) support this interpretation. The alternative interpretation is that these ewes experienced spontaneous

ovulation unrelated to the “ram effect”. It is also possible that some of these ewes had a short cycle-normal cycle sequence. These could not be classified as such because they did not satisfy our definitions but inspection of their progesterone profiles strongly suggest that the “ram effect” induced some ovarian activity which conditioned the animals to ovulate around days 7-10 later and to show oestrus around days 21-26. Six ewes were classed as abnormal or non-responding, and in 5 of them progesterone increased between days 9 and 15 and 4 of them were in oestrus between days 21 and 26. These responses are typical of those seen in a short cycle-normal cycle sequence. The commonly used definition of a short cycle is in fact quite arbitrary and these data suggest that the current definition is too rigorous and it requires a more precise physiological definition to replace the existing arbitrary definitions.

It is well known that both high body condition and short-term nutritional supplementation can increase the number of medium and large follicles and ovulation rate in ewes during the breeding season (Scaramuzzi et al., 2006; 2011). In this experiment our findings were similar with respect to body condition but, we were surprised by the failure of short-term nutritional supplementation to affect follicle count or ovulation rate. Perhaps there is a difference in the regulation of folliculogenesis between the breeding season and anoestrus and although there is little if any published information on this point, it is probably worth following up. Another possible explanation for the absence of an effect could be the greater difficulty in synchronising the period of short-term nutritional supplementation with the time of ovulation. In the breeding season it is relatively simple to feed a supplement for a very precise time prior to ovulation. Optimum responses occur when the supplement is fed for 3-5 days before the induction of oestrus (Oldham and Lindsay, 1984; Nottle et al., 1986; Stewart and Oldham, 1986). Such precise timing is more difficult to achieve in conjunction with the “ram effect” because of the inherent variability of ovarian responses (Chanvallon 2009; Chanvallon et al., 2011). Contrary to our finding with short-term nutritional supplementation, there was an effect of BCS on ovulation rate and as reported for ewes in the breeding season (Morley et al., 1978; McNeilly et al., 1987; Viñoles et al., 2002), ewes in low body condition had lower ovulation rates compared to ewes in high body condition.

There were timing issues with the detection of oestrus. Rams with mating harnesses were introduced on day 15 after the “ram effect” and unfortunately this was a few days too late because based on our progesterone data, it is apparent that many ewes would have been in oestrus before day 15 but, were not detected as such. The greater majority of these were ewes with a normal cycle in response to the “ram effect”. None-the-less those ewes with a short

cycle-normal cycle sequence were in oestrus from day 20 onwards and in these ewes there was no evidence that either BCS or short-term nutritional supplementation affected the expression of oestrus. In this respect the ewe appears to differ from the doe where an effect of nutrition on oestrus has been reported (De Santiago-Miramontes et al., 2007; Fitz-Rodríguez et al., 2009). The reason for this difference is not apparent but it may be related to the different role of progesterone as a priming agent for oestrus in these species (Robinson 1954; Sutherland & Lindsay 1991, Billings & Katz 1997).

Conclusion

The findings from this study show that the body condition of ewes is a significant factor influencing the response to the “ram effect”. Ewes in the low BCS groups had reduced adeno-hypophyseal responses to the “ram effect”. The experiment also showed that anoestrous ewes with low basal concentrations of LH and reduced responses to a GnRH challenge also had poorer responses to the “ram effect. At an ovarian level, ewes in the low BCS groups had fewer follicles and in response to the “ram effect”, lower ovulation rates. The results also showed that that short-term dietary supplementation had little influence on the response to the “ram effect” at either the adeno-hypophyseal or the ovarian level.

Acknowledgments

The research was supported by a grant from the European Union Framework 6 funding program (MEXC-CT-2006-042499). RJS was the recipient of an EU Marie Curie Chair of Excellence (MEXC-CT-2006-042499). We wish to thank Armelle Collet, Alice Fatet, Nesrine Zouaïdi and the staff from the INRA experimental station at Nouzilly for their help during the experiments as well as Anne-Lyse Laine of the hormone assay laboratory of the UMR PRC for the assays of progesterone, and LH.

Tables

Table 1: The LH response to a challenge with a 75ng bolus injection of GnRH in anoestrus ewes in low (2.0) or high (3.0) body condition score (BCS) that were either not supplemented or supplemented with 500g of lupin grain per ewe per day for five days immediately before the introduction of rams. The observations were made on the day before the introduction of rams. Within columns values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

BCS	Diet	Mean LH before GnRH (ng/mL)	Mean LH after GnRH (ng/mL)	Max LH after GnRH (ng/mL)	LH amplitude after GnRH (ng/mL)	Diff: mean LH after minus mean LH before (ng/mL)
Low	Non-Supplemented (n=6)	0.31 ± 0.100 ^a	0.77 ± 0.15 ^a	0.91 ± 0.24 ^a	0.54 ± 0.21 ^a	0.42 ± 0.779 ^a
	Supplemented (n=5)	0.29 ± 0.038 ^a	0.66 ± 0.035 ^a	0.85 ± 0.14 ^a	0.39 ± 0.15 ^a	0.32 ± 0.063 ^a
High	Non-Supplemented (n=11)	0.54 ± 0.057 ^b	1.60 ± 0.24 ^b	2.11 ± 0.28 ^b	1.32 ± 0.27 ^b	1.09 ± 0.23 ^b
	Supplemented (n=11)	0.45 ± 0.069 ^b	1.20 ± 0.23 ^b	1.65 ± 0.33 ^b	1.00 ± 0.34 ^b	0.84 ± 0.23 ^b

Table 2: The frequency of LH pulses and the mean concentration of LH in anoestrus ewes in low (2.0) or high (3.0) body condition score (BCS) that were either not supplemented or supplemented with 500g of lupin grain per ewe per day for five days immediately before the introduction of rams. The observations were made during a two-hour sampling window immediately before the introduction of rams. Within columns and within experiments values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

BCS	Diet	Frequency of LH pulses (pulses/h)	Mean LH (ng/mL)
Low	Non-Supplemented (n=7)	0.07 ± 0.071^a	0.20 ± 0.060^a
	Supplemented (n=6)	No pulses detected	0.23 ± 0.021^a
High	Non-Supplemented (n=11)	0.05 ± 0.045^a	0.52 ± 0.139^b
	Supplemented (n=12)	0.21 ± 0.074^a	0.66 ± 0.082^b

Table 3: The short-term LH responses to the “ram effect” in anoestrus ewes in low (2.0) or high (3.0) body condition score (BCS) that were either not supplemented or supplemented with 500g of lupin grain per ewe per day for five days immediately before the introduction of rams. In the four hours immediately following the introduction of rams several end points were determined in blood samples collected every 15 minutes. These were LH pulse frequency, mean and maximum LH and LH pulse amplitude in addition the time from the introduction of rams and the first LH pulse and the within ewe difference in LH pulse frequency between two sampling periods, one of two-hours immediately before and the other of four hours immediately after the introduction of rams were also determined. Within columns and between body condition groups, values with different superscripts (a, b are significantly different (P<0.05) and in the low BCS group values with different superscripts (x, y) are significantly different (P<0.05). There were no significant effects of supplementation in the high BCS groups.

BCS	Diet	LH pulses (N)	LH pulse freq (N per hour)	Mean LH* (ng/mL)	Max LH** (ng/mL)	LH amplitude (ng/mL)***	Diff in pulse freq (No after minus no before)	Time to first LH pulse (min)
Low	Non-Supplemented (n=7)	2.43 ± 0.42 ^a	0.61 ± 0.10 ^a	1.85 ± 0.59 ^{a,x}	2.84 ± 0.37 ^{a,x}	1.56 ± 0.18 ^{a,x}	2.29 ± 0.61 ^a	90.0 ± 25.8 ^a
	Supplemented (n=6)	2.67 ± 0.46 ^a	0.67 ± 0.11 ^a	0.79 ± 0.13 ^{a,y}	1.65 ± 0.24 ^{a,y}	0.88 ± 0.10 ^{a,y}	2.67 ± 0.56 ^a	55.8 ± 32.1 ^a
High	Non-Supplemented (n=11)	4.55 ± 0.56 ^b	1.14 ± 0.14 ^b	1.92 ± 0.19 ^b	3.01 ± 0.20 ^b	1.41 ± 0.10 ^a	4.45 ± 0.49 ^b	12.3 ± 4.88 ^b
	Supplemented (n=12)	3.92 ± 0.42 ^b	0.98 ± 0.14 ^b	2.38 ± 0.37 ^b	3.87 ± 0.42 ^b	1.66 ± 0.18 ^a	3.50 ± 0.48 ^b	21.2 ± 5.68 ^b

* p = 0.051 for the interaction between supplementation and BCS; ** p = 0.005 for the interaction between supplementation and BCS; *** p = 0.085 for the main effect of BCS and p = 0.015 or the interaction between supplementation and BCS

Table 4: The number and percentage of ovarian cycles, follow-up ovarian cycles and estrus in response to the “ram effect” in anoestrus ewes in low (2.0) or high (3.0) body condition score (BCS) that were either not supplemented or supplemented with 500g of lupin grain per ewe per day for five days immediately before the “ram effect”. There are no significant differences among the treatments for any of the parameters.

BCS	Diet	First cycle outcome			Follow-up cycle outcome			Oestrus at start of the follow-up cycle
		None**	Normal luteal phase	Short luteal phase	Return to anoestrus	Normal luteal phase	Short luteal phase	
Low	Non-Supplemented (n=7)	3 (43%)	2 (28.5%)	2 (28.5%)	0	4 (100%)	0	2 (50%)
	Supplemented (n=6)	0	3 (50%)††	3 (50%)	0 (20%)	5 (100%)	0	3 (60%)
High	Non-Supplemented (n=11)	0	5 (45%)	6 (55%)	1 (9%)	10 (91%)	0	9 (90%)
	Supplemented (n=12)*	1 (8%)	4 (33%)†	6 (50%)	1 (11%)	8 (91%)	0	6 (75%)
Total	36	4	14	17	2	27	0	20

* One ewe had an abnormal cycle that was not classified (See ewe 9 in Figure 4); ** Four ewes were classified as not responding because progesterone did not rise above 0.5 ng/mL within 7 days of the “ram effect”. However in all 4, progesterone rose between days 9-14 and all had normal cycles and 3 with estrus between days 21-26. † One ewe in the high-supplemented group was not classified because her daily blood sampling ended on day 15. †† One ewe became pregnant to the “ram effect” and so there is no data on her follow-up cycle

Table 5: The ovulation rate and the mean number of follicles >3.0 mm in diameter on day 5 after the “ram effect” in anoestrus ewes in low (2.0) or high (3.0) body condition score (BCS) that were either not supplemented or supplemented with 500g of lupin grain per ewe per day for five days immediately before the introduction of rams. Within columns and between body condition groups values with different superscripts are significantly different (P<0.05). There were no significant effects of supplementation.

BCS	Diet	Ovulation rate	No Follicles (>3mm)
Low	Non-Supplemented (n=7)	1.67 ± 0.21 ^a	0.86 ± 0.26 ^a
	Supplemented (n=6)	1.20 ± 0.20 ^a	1.17 ± 0.48 ^a
High	Non-Supplemented(n=11)	2.50 ± 0.17 ^b	2.45 ± 0.43 ^b
	Supplemented (n=12)	2.56 ± 0.34 ^b	2.42 ± 0.50 ^b

Figures

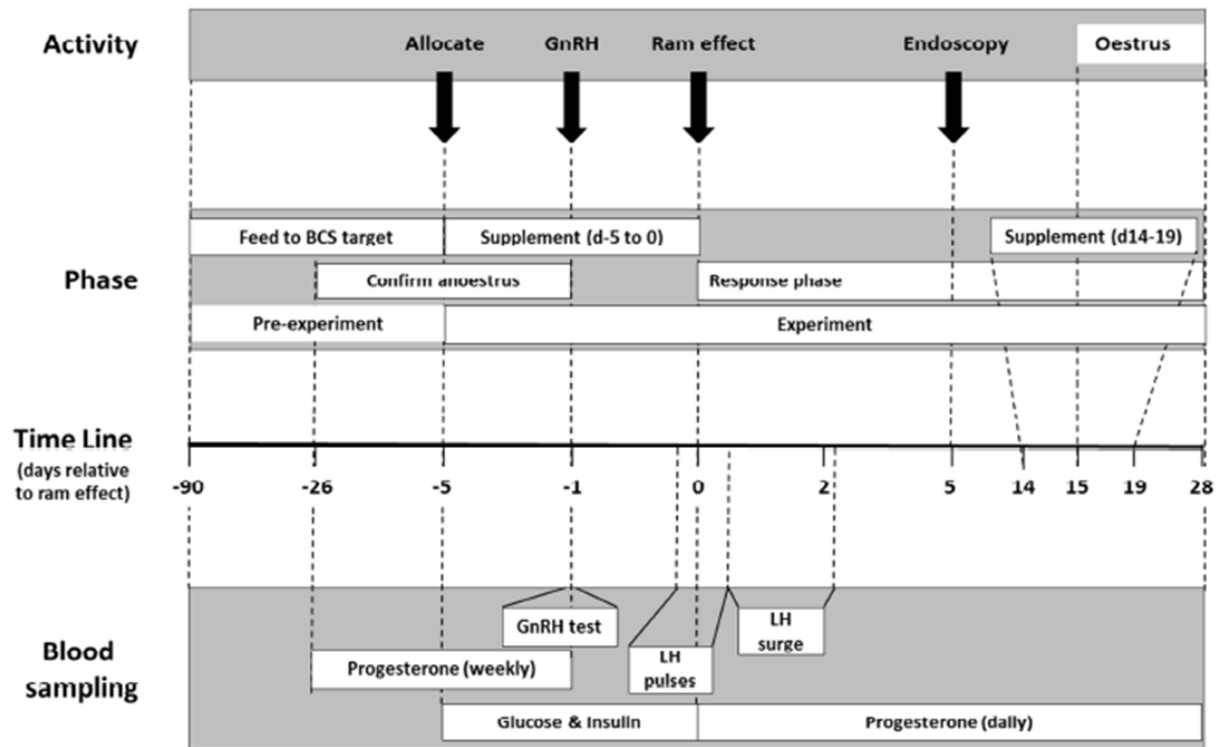


Figure 1: A schematic plan of the experiment showing the time line (not to scale) of the experiment and its principal features. Ninety days before the experiment a group of 48 ewes were managed to achieve two predetermined groups with median BCSs of 2 and 3 and when these ewes were confirmed as being in anoestrus (weekly plasma samples assayed for progesterone), 38 of the original 48 remained available for allocation to 4 experimental groups. From day 5 before the ram effect (day 0) half of the ewes in each BCS group were fed a nutritional supplement for 5 days. During the period of supplementation, the ewes were bled twice daily and the plasma assayed for glucose and insulin. On Day -1 the ewes were injected with 75ng of GnRH and blood was collected at 15 minute intervals from 60 min before to 60 min after GnRH; the plasma was assayed for LH. From two h before until 4 h after the “ram effect” blood was taken every 15 min (LH pulses) then from 4–72h every 4h (LH surge). These plasmas were assayed for LH. From the day of the “ram effect” blood was taken daily and the plasma assayed for progesterone. Endoscopy was carried on day 5 to determine ovulation rate and estrus checks were made daily from d15-28. There was second period of supplementation between days 14 and 19 during which nutritional supplementation was reversed in the high BCS groups.

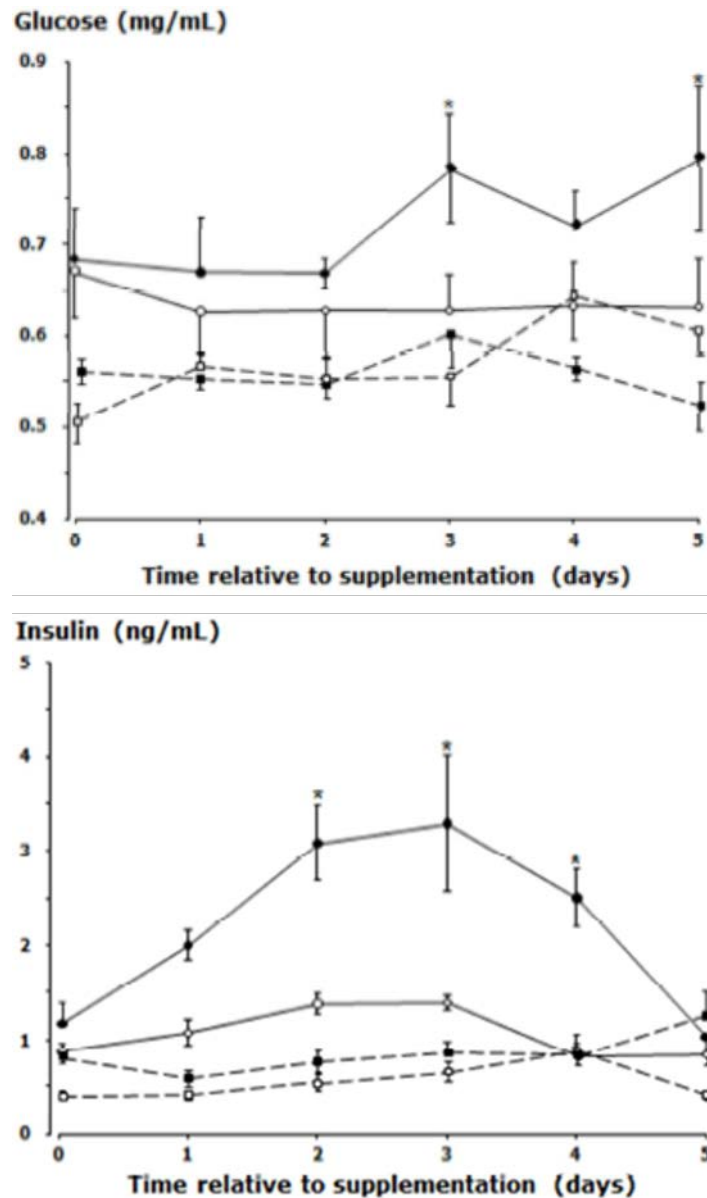


Figure 2: The mean \pm SEM, concentrations of glucose and insulin in jugular venous blood from anoestrus ewes in low (2.0; dashed lines, square symbols) or high (3.0; solid lines, round symbols) body condition score (BCS) that were either supplemented (black symbols) or not supplemented (open symbols) with 500g of lupin grain per ewe per day for five days immediately before the introduction of rams. Significant differences are described in the text.

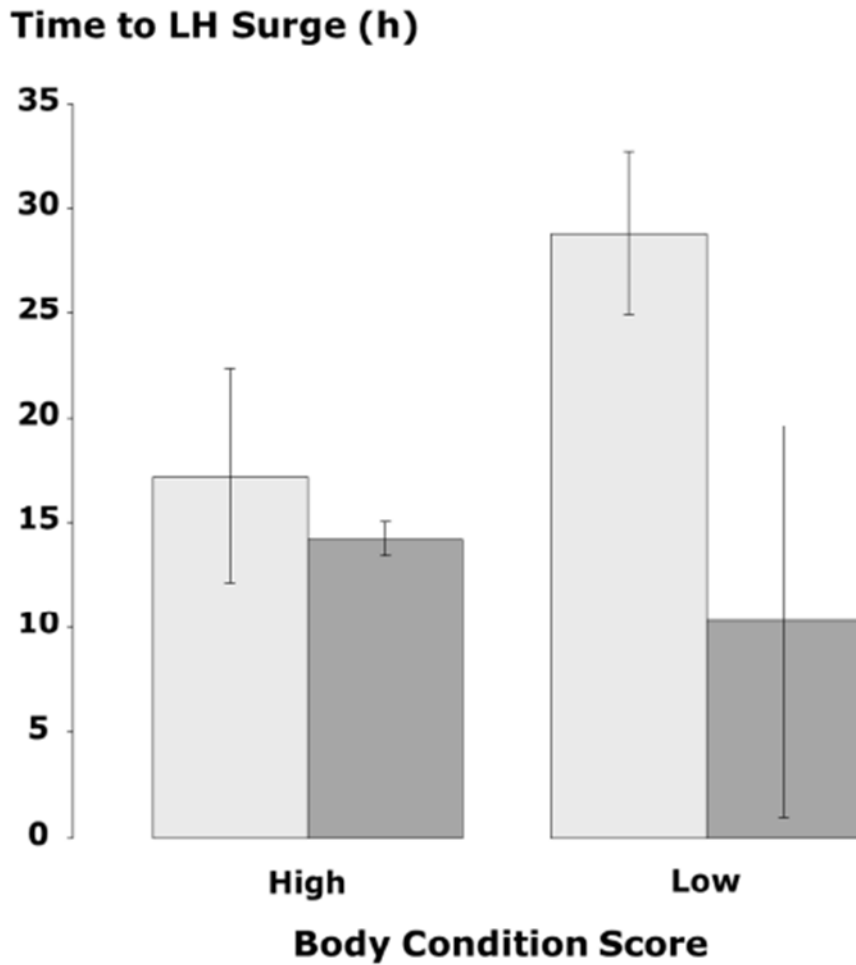


Figure 3: The mean \pm SEM, time in hours from the introduction of rams to the LH surge in anoestrus ewes in low (2.0) or high (3.0) body condition score (BCS) that were either supplemented (dark grey bars) or not supplemented (light grey bars) with 500g of lupin grain per ewe per day for five days immediately before the introduction of rams. There were no significant differences.

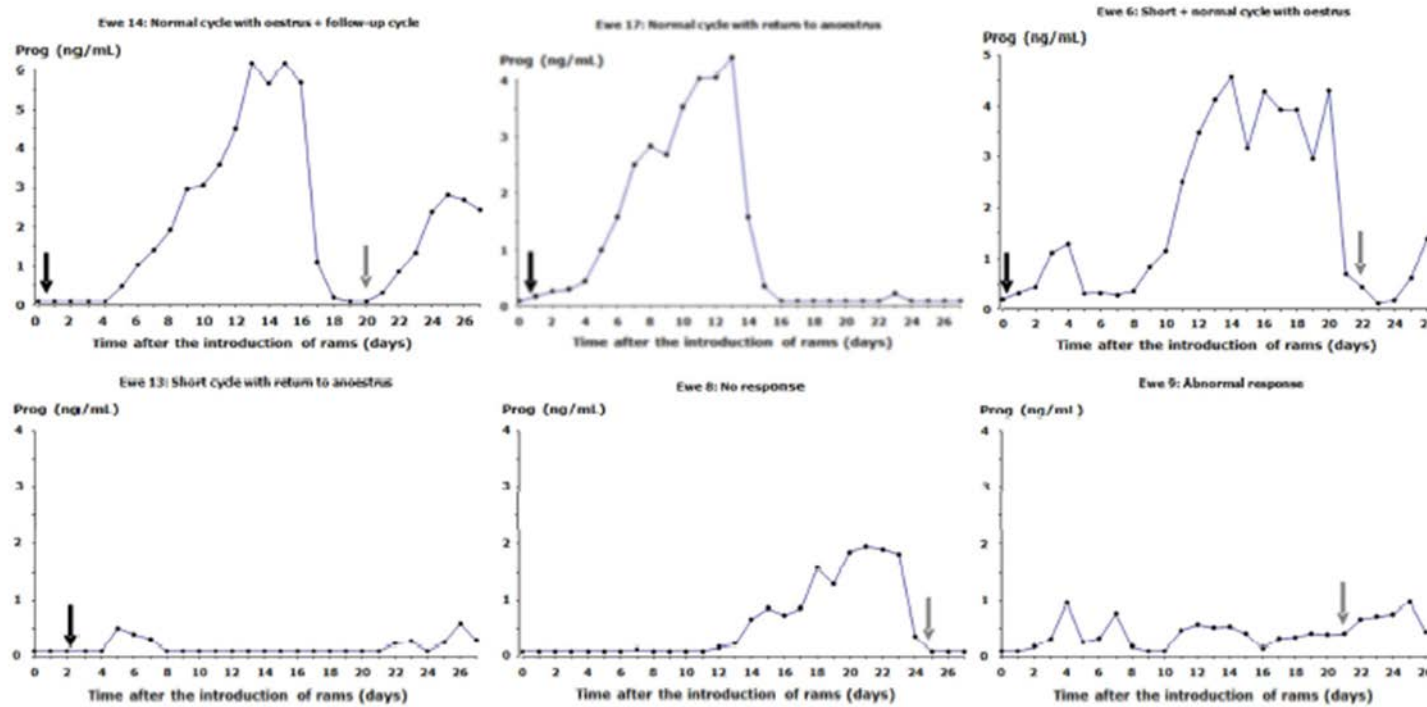


Figure 4: Progesterone profiles indicative of ovarian responses, in six individual ewes, illustrating the variety of responses observed to the “ram effect”. A black arrow indicates the presence and time of the LH surge and a grey arrow indicates the day of estrus.

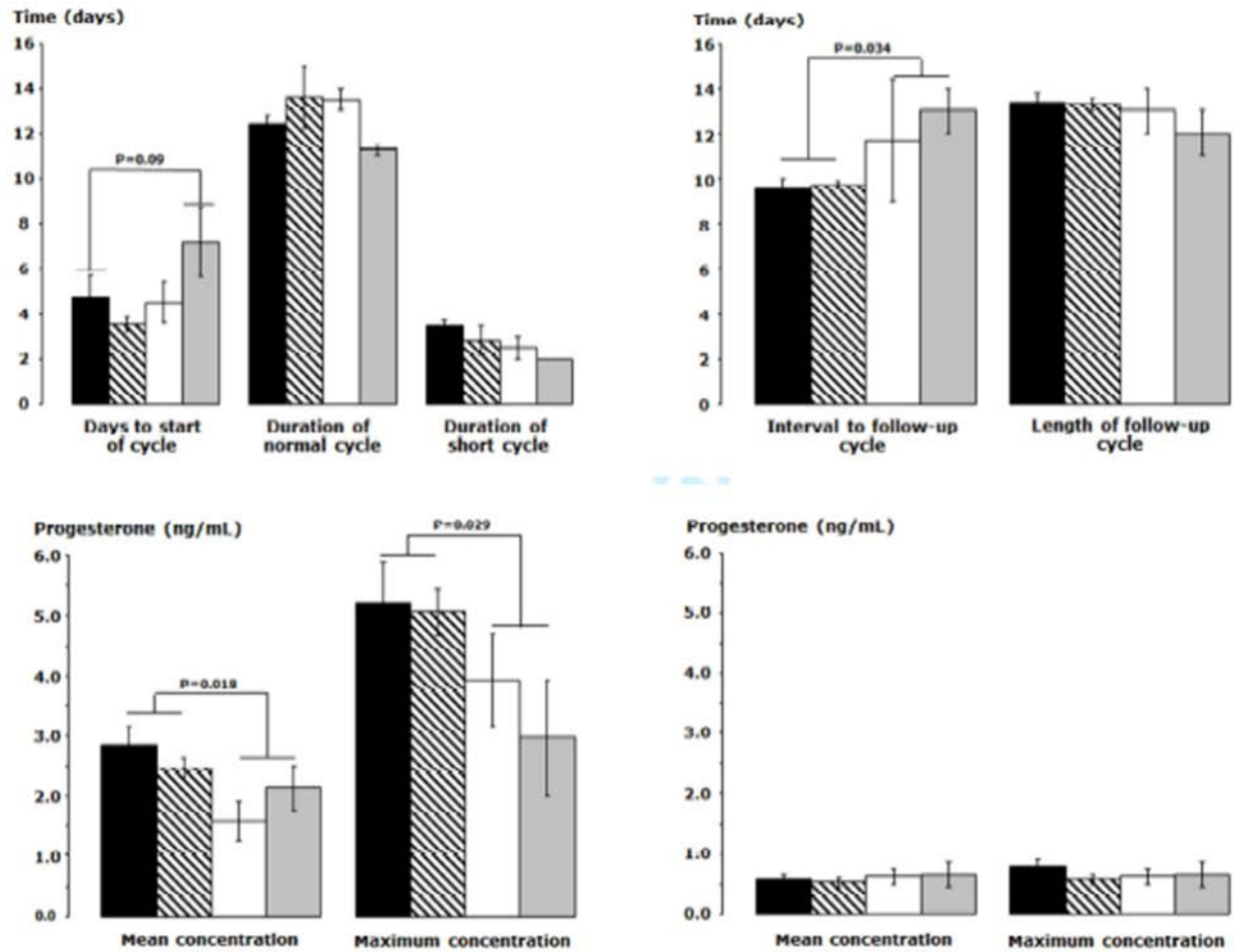


Figure 5: Ovarian cycles and progesterone concentrations in anoestrus ewes in low (2.0) or high (3.0) body condition score (BCS) that were either supplemented or not supplemented with 500g of lupin grain per ewe per day for five days immediately before the introduction of rams. Black bar – high BCS and supplemented; hatched bar – high BCS and not supplemented; white bar – low BCS and supplemented; grey bar – low

BCS and not supplemented. The four panels show: Top left - the time interval from the introduction of rams to a concentration of progesterone above 0.5 ng/mL (days to start of cycle), the period of time the concentration of progesterone was continuously above 0.5 ng/mL in ewes with a normal luteal phase (duration of normal cycle) or a short luteal phase (duration of short cycle). Top right - the period from the end of a normal cycle to the start of the follow-up cycle (interval to follow-up cycle) and its length (duration of follow-up cycle). Bottom left - the mean and maximum concentration of progesterone in ewes with a normal cycle and bottom right - the mean and maximum concentration of progesterone in ewes with a short cycle.

References

- Allison AJ, & Davis GH (1976) Studies of mating behaviour and fertility of Merino ewes II Effects of age of ewe, live weight, and paddock size on duration of oestrus and ram-seeking activity. *N.Z. Journal of Experimental Agriculture* **4**: 269-274.
- Allison AJ & Kelly RW (1979) Effects of differential nutrition on the incidence of oestrus and ovulation rate in Booroola X Romney and Romney ewes. *Proc NZ Soc Anim Prod* **39**: 43-49.
- Billings HJ & Katz LS (1997) Progesterone facilitation and inhibition of estradiol-induced sexual behavior in the female goat. *Horm Behav* **31**:47-53.
- Canépa S, Laine A-L, Bluteau A, Fagu C, Flon C & Monniaux D (2008) Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cahier des Techniques de l'INRA* **64**: 19-30
- Caraty A, Delaleu B, Chesneau D & Fabre-Nys C (2002) Sequential role of E2 and GnRH for the expression of estrous behavior in ewes. *Endocrinology* **143**: 139-145.
- Chanvallon, A (2009) Origine de la variabilité de réponse à l'effet mâle. *Thèse; Université François Rabelais de Tours*
- Chanvallon A, Sagot L, Pottier E, Debus N, François D, Fassier T, Scaramuzzi, RJ & Fabre-Nys C (2011) New insights into the influence of breed and time of the year on the response of ewes to the "ram effect". *Animal* **5**: 1594–1604.
- Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PA & Martin GB (2009) The 'male effect' in sheep and goats--revisiting the dogmas. *Behav Brain Res* **200**: 304-314.
- De Santiago-Miramontes MA, Rivas-Muñoz R, Muñoz-Gutiérrez M, Malpaux B, Scaramuzzi RJ & Delgadillo JA (2007) Ovulation rate in female anoestrous goats exposed to the male effect is increased by nutritional supplementation under grazing conditions. *Animal Reproduction Science* **105**: 409–416.
- Downing JA, Joss J, Connell P & Scaramuzzi RJ (1995) Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Reprod Fertil* **103**: 137–145
- Fabre Nys C & Venier (1987) Development and use of a method for quantifying female sexual behaviour in ewes. *Applied Animal Behaviour Science* **17**: 289-304
- Faure MO, Nicol L, Fabre S, Fontaine J, Mohoric N, McNeilly AS & Taragnat C (2005) BMP-4 inhibits follicle-stimulating hormone secretion in ewe pituitary. *J Endocrinol* **186**: 109-121.

- Fitz-Rodríguez G, De Santiago-Miramontes MA, Scaramuzzi RJ, Malpaux B & Delgadillo JA (2009) Nutritional supplementation improves ovulation and pregnancy rates in female goats managed under natural grazing conditions and exposed to the male effect. *Animal Reproduction Science* **116**: 85–94.
- INRA Alimentation des Bovines, Ovins et Caprins: Besoins des Animaux – Valeurs des Aliments. Tables INRA 2007, mise à jour 2010 (2010) éditions Quae, Antony (Paris), France
- Hawken PA & Martin GB (2012) Socio-sexual stimuli and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone secretion in sheep and goats. *Domestic Animal Endocrinology* **43**: 85-94.
- Henniawati & Fletcher IC (1986) Reproduction in Indonesian sheep and goats at two levels of nutrition. *Anim. Reprod Sci* **12**: 77-84.
- Hugo WJ, Els DL & Roelofse CSMB (1981) Studies on sexual activity of Merino ewes. 2 Sexual activity in relation to diet, wool production and increasing age. *Agroanimalia* **13**: 35-40.
- Hulet CV, Blackwell SK, Ercanbrack SK, Price DA & Wilson LO (1962) Mating behaviour of the ewe. *J Anim. Sci.* **21**: 870-874.
- Hulet CV, Shupe WL, Ross T & Richards W (1986) Effects of nutritional environment and ram effect on breeding season in range sheep. *Theriogenology* **25**: 317-323.
- Johnson L, Fabre-Nys C, Chanvallon A, François D, Fassier T, Menassol J-B, Brown HM, Lardic L & Scaramuzzi RJ (2011) The effect of short-term nutritional supplementation and body condition score on the ovarian responses of anoestrus ewes to the “ram effect”. *Journal of Veterinary Science and Technology* **S2**:001.
- Lindsay DR, Martin GB & Williams IH (1993) Nutrition and reproduction. In: *Reproduction in Domesticated Animals* pp. 459–491 Ed. GJ King, Elsevier, Amsterdam
- Martin GB & Kadokawa H (2006) “Clean, green and ethical” animal production. Case study: reproductive efficiency in small ruminants *J Reprod Dev* **52**:145-152.
- Martin GB, Milton JT, Davidson RH, Banchemo Hunzicker GE, Lindsay DR & Blache D, (2004) Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Animal Reproduction Science* **82-83**: 231-245.
- McNeilly AS, Jonassen JA & Rhind SM (1987) Reduced ovarian follicular development as a consequence of low body condition in ewes. *Acta Endocrinol (Copenh)* **115**:75-83.

- Menassol J-B, Collet A, Chesneau D, Malpaux B & Scaramuzzi RJ (2012) The interaction between photoperiod and nutrition and its effects on seasonal rhythms of reproduction in the ewe. *Biology of Reproduction* **86**, 52, 1 - 12.
- Menassol J-B, Tautou C, Collet A, Chesneau D, Lomet D, Dupont J, Malpaux B & Scaramuzzi RJ (2011) Effect of a metformin and AICAR intracerebroventricular injection on plasma melatonin levels in ewe: potential involvement of AMPK. *BMC Neuroscience* **12**: 76.
- Merriam GR & Watcher KW (1982) Algorithms for the study of episodic hormone secretion. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **243**: 310-318.
- Morley FHW, White DH, Kenny PA & Davis IF (1978) Predicting ovulation rate from liveweight in ewes. *Agricultural Systems*, **3**: 27-45.
- Muñoz-Gutiérrez M, Blache D, Martin GB & Scaramuzzi RJ (2002) Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding *Reproduction* **124**: 721-731.
- Nottle, MB, Setchell, BP. & Seamark, RF. (1986) Supplementation with lupin grain for 6 days can increase induced ovulation rate in ewes. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia* **11**: 139 (abstract).
- Oldham CM & Lindsay, DR (1984) The minimum period of intake of lupin grain required by ewes to increase their ovulation rate when grazing dry summer pasture. In: 'Reproduction in Sheep', pp. 274-275. (Eds D.R. Lindsay and D.T. Pearce.) Australian Academy of Science, Canberra.
- Robinson TJ (1954) The necessity for progesterone with estrogen for the induction of recurrent estrus in the ovariectomized ewe. *Endocrinology* **55**: 403-408.
- Russel AJF, Doney JM & Gunn RG (1969) Subjective assessment of body fat in live sheep. *J agric Sci (Camb)* **72**: 451-454.
- Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget P, Monniaux D, Viñoles C & Webb R (2011) Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev* **23**:444-467.
- Scaramuzzi, R.J., Brown, H.M. & Dupont, J. (2010) Nutritional and metabolic mechanisms in the ovary and their role in mediating the effects of diet on folliculogenesis: A perspective. *Reproduction in Domestic Animals* **45**: (Suppl 3) 32–41.

- Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Muñoz-Gutiérrez M & Somchit A (2006) A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev* **46**: 339-354.
- Scaramuzzi RJ & Martin GB (2008) The importance of interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in the development of hormone free methods for controlling fertility *Reprod Dom Anim* **43**: Suppl 2, 129-136.
- Somchit A, Khalid M, Campbell BK & Scaramuzzi RJ (2007) The effects of short-term nutritional supplementation with lupins (*Lupinus luteus*) on the number of ovarian follicles and the concentrations of follicular hormones and glucose in ewes during the luteal phase of the oestrous cycle. *Theriogenology* **68**: 1037-1046.
- Stewart R & Oldham CM (1986) Feeding lupins to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate. *Animal Production in Australia* **16**: 367-369.
- Sutherland SR & Lindsay DR (1991) Ovariectomized does do not require progesterone priming for oestrous behaviour. *Reprod Fertil Dev* **3**:679-84.
- Teleni E, Rowe JB, Croker KP, Murray PJ & King WR (1989) Lupins and energy-yielding nutrients in ewes II Responses in ovulation rate in ewes to increased availability of glucose, acetate and amino acids. *Reprod Fertil Dev* **1**: 117-125.
- Ungerfeld R, Pinczak A, Forsberg M & Rubianes E (2002) Ovarian responses of anoestrous ewes to the “ram effect”. *Canadian Journal of Animal Science* **82**: 599-602.
- Ungerfeld R, Forsberg M & Rubianes E (2004) Overview of the response of anoestrous ewes to the ram effect. *Reproduction Fertility and Development* **16**: 479-490.
- Véliz FG, Poindron P, Malpaux B & Delgadillo JA (2006) Positive correlation between the body weight of anestrus goats and their response to the male effect with sexually active bucks. *Reproduction Nutrition and Development* **46**: 657-661.
- Viñoles C, Forsberg M, Banchero G & Rubianes E. (2002) Ovarian follicular dynamics and endocrine profiles in Polwarth ewes with high and low body condition. *Animal Science* **74**: 539-545.
- Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Martin GB, Cajarville C, Repetto J & Meikle A (2005) Short-term nutritional supplementation of ewes in low body condition affects follicle development due to an increase in glucose and metabolic hormones. *Reproduction* **129**: 299-309.

Zabuli J, Tanaka T, Lu W & Kamomae (2010) Intermittent nutritional stimulus by short-term treatment of high-energy diet promotes ovarian performance together with increases in blood levels of glucose and insulin in cycling goats. *Anim Reprod Sci* **122**: 288-293.



Jean-Baptiste MENASSOL
**Interactions entre facteurs
photopériodique et
nutritionnel sur les profils
saisonniers de reproduction
des ovins**



Résumé

L'étude des effets de la nutrition sur les profils saisonniers de reproduction ainsi que sur les techniques naturelles visant à maîtriser ce caractère, présente un intérêt tout particulier pour le développement de systèmes d'élevage ovins durables. Nos travaux démontrent que l'état d'engraissement est un facteur capable d'interagir avec la photopériode pour moduler le moment des transitions saisonnières reproductives. Cet effet n'affecte pas la synchronisation annuelle du rythme reproductif des brebis et s'effectue indépendamment de leur degré de saisonnalité. Les effets de l'état d'engraissement se transmettent, en partie via la voie AMPK, sur l'amplitude du rythme journalier et endogène de sécrétion de mélatonine chez la brebis Île-de-France, sans qu'une implication fonctionnelle de ce phénomène puisse être déterminée. Enfin, l'état d'engraissement contribue de façon significative à la variabilité de la réponse des brebis à un traitement d'implants de mélatonine ainsi qu'à la réalisation d'un effet mâle, tous deux réalisés en fin de saison d'anoestrus chez la brebis Île-de-France.

Abstract

To determine the effect of nutrition on the seasonal patterns of reproduction and on the natural techniques used to control these patterns, is a feature of particular interest in the development of sustainable sheep breeding systems. This work establishes that body condition is a potent factor that interacts with photoperiod to modulate the timing of seasonal reproductive transitions in sheep. This effect does not result in an alteration in the synchronization of the annual reproductive rhythm and is independent of the degree of seasonality of the breed of sheep considered. The effect of body condition involves the AMPK system to alter the amplitude of the daily and endogenous rhythm of secretion of melatonin in the Ile-de-France breed of sheep; a functional implication for this phenomenon remains to be determined. Finally, body condition contributed significantly to the variability of the response of sheep to a treatment with melatonin implants and to the male effect, both performed at the end of the anestrus season for the Ile-de-France breed.