

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

Neuroendocrinologie des Interactions et des Comportements Sexuels

THÈSE

 présentée par :

Manon CHASLES

soutenue le : 18 décembre 2017

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

Discipline/ Spécialité : Science de la Vie

Induction d'une maturation sexuelle précoce chez la chevrette par une exposition prépubertaire au mâle

THÈSE dirigée par :

M. KELLER Matthieu

Directeur de Recherches, HDR, INRA Val de Loire, Tours

RAPPORTEURS :

M. ABECIA José-Alfonso

Professeur, Faculté Vétérinaire de Saragosse

M. CHARLIER Thierry

Professeur, HDR, Université de Rennes1

JURY :

M. ABECIA José-Alfonso

Professeur, Faculté Vétérinaire de Saragosse

M. CHARLIER Thierry

Professeur, HDR, Université de Rennes1

Mme. CORNIL Charlotte

Maître de Recherches, HDR, Université de Liège

M. DARDENTE Hugues

Chargé de Recherches, HDR, INRA Val de Loire, Tours

M. KELLER Matthieu

Directeur de Recherches, HDR, INRA Val de Loire, Tours

M. VAUDIN Pascal

Maître de Conférences, HDR, Université François-Rabelais de Tours

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail, je remercie José-Alfonso ABECIA et Thierry CHARLIER d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et Charlotte CORNIL, Hugues DARDENTE et Pascal VAUDIN d'avoir accepté de participer à mon jury.

Je remercie Florian GUILLOU et Thierry MAGALLON pour m'avoir accueilli au sein de l'UMR Physiologie de la Reproduction et des Comportements pendant ces trois années de thèse.

Je remercie sincèrement Matthieu KELLER qui m'a permis de réaliser cette thèse au sein de son équipe. Vous avez su me pousser à donner le meilleur de moi-même au cours de ces trois années tout en me laissant une part idéale d'autonomie. Merci d'avoir été disponible à chaque instant. Merci de m'avoir inculqué le sens de la rigueur, vous avez su être sévère mais juste tout au long de cette aventure. Un grand merci de m'avoir également permis de participer aux autres projets menés au sein de l'équipe, j'aurai énormément appris de ces trois années à vos côtés. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes.

Ce travail n'aurait pas pu être accompli sans l'aide de nombreuses personnes, en particulier Didier CHESNEAU et Chantal PORTE qui ont toujours été disponibles pour m'aider au cours de cette thèse. Merci de m'avoir montré comment attraper mes chèvres et mes boucs, parce qu'au début c'était pas gagné...Je me rappellerai longtemps de mon rodéo sur bélier. Merci d'avoir passé avec moi des heures et des heures enfermés avec les chevrettes pour les prélèvements de LH. Merci à Didier de m'avoir initié aux dosages RIA et à l'orchidométrie (« couillométrie » pour les intimes). Merci pour ses conseils toujours avisés (ou presque : «Mais non elle est pas en chaleur ta chèvre, elle joue »). Merci à Chantal pour m'avoir initié à l'étude du comportement et de m'avoir expliqué comment aider une brebis/chèvre à mettre bas, grâce à cela j'ai pu éviter la catastrophe. Merci également à vous deux d'avoir accepté de relire mon manuscrit.

Je tiens également à remercier Philippe CHEMINEAU pour sa gentillesse et sa disponibilité, merci d'avoir accepté de relire l'introduction de cette thèse. Votre expertise sur l'espèce caprine aura été un atout sans mesure tout au long de cette thèse. Merci pour tous vos conseils.

Je remercie l'ensemble des personnes faisant ou ayant fait partie de l'équipe NICS, pour les discussions toujours pertinentes et leurs conseils avisés au cours de ma thèse. Merci à Pablo CHAMERO, Daniel GUILLAUME, Arsène ELLA, Anne-Charlotte TROUILLET, David BARRIERE et bien sûr Kévin POISSENOT.

Kévin ou plutôt Kévinou, tu as toujours été disponible pour m'aider, me conseiller au cours de cette thèse. Malheureusement avec le kisspeptine on est tombé sur un sacré os... Merci pour ces magnifiques neurones et utérus et surtout merci de m'avoir supporté à l'INRA comme à l'extérieur.

Merci au CIRCA de l'Université de Torrón et en particulier au « jefe » José DELGADILLO pour m'avoir accueilli pendant presque un mois au sein de son équipe. Merci pour vos nombreux conseils tout au long de cette thèse. Un grand merci à Marie BEDOS qui m'a accueilli dans sa maison

et dans sa famille durant ce séjour, merci de m'avoir fait découvrir de la cuisine mexicaine adapté à mon petit estomac de française et merci de m'avoir fait découvrir un peu du Mexique.

Un grand merci à Massimo BELTRAMO pour sa grande disponibilité et ses nombreux conseils tout au long de ma thèse. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse. Et merci d'avoir pensé à moi pour les petites chevrettes, elles ont visiblement apprécié la présence des boucs.

Merci également à Laurence DUFOURNY pour ses conseils et ses remarques avisées sur mon introduction. Bisous à Murphy.

Merci à Martine MIGAUD et Martine BATAILLER pour m'avoir initié au maniement du cryomicrotome, m'avoir permis d'utiliser leur grand couteau et pour m'avoir prêter des anticorps même si le kisspeptine a définitivement décidé de ne pas fonctionner..

Merci à Danielle MONNIAUX et à Caroline DECOURT pour ces discussions toujours intéressantes et vos conseils.

Un grand merci à toute l'équipe de l'UEPAO en particulier Olivier LASSERRE, Didier DUBREUIL et Damien CAPO pour avoir pris soins de mes animaux, d'avoir participé aux différents protocoles que nous avons mis en place. Merci d'avoir toujours été disponibles.

Merci à toute l'équipe du laboratoire de dosages hormonaux de la PRC, Anne-Lyse LAINE, Dominique GENNETAY et Corinne LACLIE pour avoir réalisé les dosages de progestérone, avec parfois quelques surprises (« elles sont gestantes tes chèvres ? »)

Merci à la plateforme CIRE et en particulier à Jean-Philippe DUBOIS pour son savoir-faire qui nous a permis de réaliser nos perfusions dans un cadre optimal et de récupérer de beaux organes.

Merci à la plateforme PIC pour la mise à disposition du matériel d'imagerie. Merci en particulier à Maryse MEURISSE et Marie-Claire BLACHE qui ont été d'une grande aide pour la mise au point des immuno et l'utilisation des logiciels de traitement d'image.

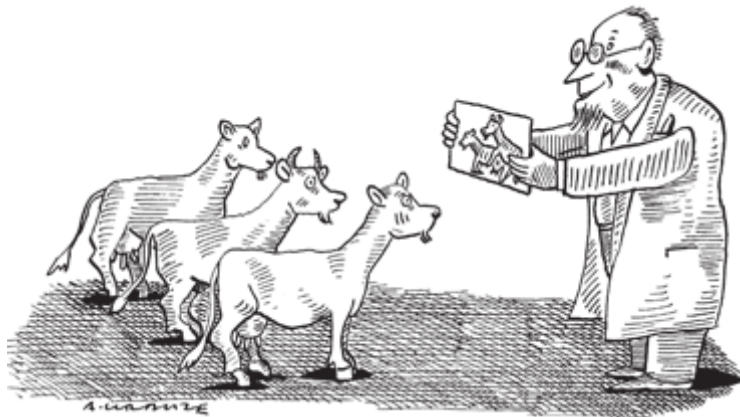
Merci à l'ensemble des personnes que j'ai croisé au cours de ces années à la PRC. Merci à Sophie MARY alias la maman de l'INRA, merci à Gaël RAME toujours disponible en cas de soucis. Merci à Didier LOMET et Fabien CORNILLEAU pour l'ambiance musicale au labo et au bureau, deux salles deux ambiances ..

Et enfin, merci à tous les thésards, post docs, CDD et stagiaires de la PRC qui ont contribué à faire de cette thèse une belle aventure, merci pour votre soutien durant ces trois années et pour avoir accepté de manger avec moi quand j'empestais le bouc en rut (ambiance Soignon): Sabrina, Elske, Rebeca, Marion G et Marion F (grâce à toi je roule en caddie maintenant), Emilie, Lucille, Caroline, Flore, Narjis, les Julie(s), Miléna, Alice, Namya et Ophélie. Merci également à Daphné BRISARD, petit padawan est devenu jedi !

Pour finir merci à ma mère et ma sœur qui ont cru en moi et m'ont soutenu durant cette thèse, qui ont accepté de garder mon fauve durant mes nombreux déplacements.

Merci à mon Caddie qui a été patient quand je finissais tard, qui m'a supporté quand je parlais de ma thèse jusque dans mon sommeil, qui m'a soutenu jusqu'au bout.

Et un petit mot pour Karl dont les ronrons (et oui il ne fait pas que mordre) m'ont aidé à rester zen jusqu'au bout de cette thèse.



Peste, Crevette et Choléra en pleine manip.

Résumé

La transition pubertaire est une période critique dans la vie d'un individu puisqu'elle marque le début de la vie reproductive. Durant cette phase, l'individu acquiert la capacité physiologique à se reproduire (production de gamètes matures) mais il commence également à exprimer des comportements sexuels. Chez les mammifères, de nombreux facteurs internes comme externes à l'individu peuvent moduler l'entrée en puberté. Parmi les signaux externes, deux facteurs ont été plus particulièrement étudiés : la photopériode pour les espèces à reproduction saisonnée et l'environnement social.

La régulation de la maturation sexuelle par l'environnement social du jeune a été particulièrement bien étudiée chez les rongeurs. En effet, on sait que l'exposition prépubertaire à un mâle adulte permet d'induire, chez la jeune femelle, une ouverture vaginale précoce ainsi qu'une avance de l'âge au premier œstrus. Ce phénomène est connu sous le nom d'effet Vandenberg. Néanmoins, il n'y a encore actuellement que très peu de données sur les modifications endocrines liées à cette accélération pubertaire. L'objectif de ma thèse a donc été de caractériser plus finement les conséquences d'une exposition précoce au mâle sur la fonction de reproduction de la femelle immature. Nous avons ainsi décidé de réaliser cette étude sur le modèle caprin car il présente de multiples avantages. On peut en effet réaliser des prélèvements sanguins de manière répétée sans affecter la physiologie de l'animal ce qui permet un suivi précis des sécrétions endocrines afin, par exemple, d'étudier la pulsativité de la LH ou encore de suivre les niveaux de progestérone, un indicateur de l'état ovulatoire des femelles. Par ailleurs, chez les caprins, on sait que l'axe reproducteur femelle est extrêmement sensible aux signaux émis par le bouc, ceci ayant été bien étudié dans le cadre de l'effet mâle.

Dans un premier temps, nous avons exposé de jeunes femelles, nées au printemps, à des mâles entiers ou castrés, un groupe de femelles est resté isolé de tout mâle. Nous avons ainsi montré que seule la présence de mâles entiers permettait d'induire une avance de puberté chez la jeune chevrette. Les femelles exposées aux mâles entiers présentent en effet une augmentation précoce de la sécrétion pulsatile de LH et leur première ovulation a lieu 1 mois et demi plus tôt que chez les femelles isolées ou en contact avec des mâles castrés. L'exposition précoce aux mâles entiers a également induit une accélération de la maturation du tractus génital se caractérisant par une forte hausse du poids de l'utérus (+40%). Ces résultats montrent que la présence de boucs entiers permet de réactiver l'axe gonadotrope des jeunes femelles. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet de la présence de mâles sur le nombre de contacts synaptiques par neurone à GnRH.

Dans un second temps, nous avons étudié les conséquences d'une exposition précoce à un mâle sexuellement actif sur l'âge à la puberté de femelles nées à l'automne. On sait en effet que les chevrettes nées à contre-saison (à l'automne au lieu du printemps) présentent un retard de puberté, elles ovulent en moyenne à 1 an au lieu de 7 mois. La présence de mâles actifs a permis de contrecarrer ce retard de puberté et d'induire une puberté très précoce chez ces femelles. En effet, ces femelles ont ovulé en moyenne à 3 mois et demi soit bien plus tôt que ce à quoi nous nous attendions.

Enfin, nous avons testé les possibles conséquences d'une puberté précoce sur la réponse à un effet mâle. Des travaux réalisés chez le mouton suggèrent une meilleure réponse à l'effet mâle chez les femelles ayant eu une puberté induite. Nous n'avons pas détecté de différence dans la réponse ovulatoire des femelles ayant eu une première ovulation précoce ou non. La présence de boucs sexuellement actifs ayant induit l'ovulation chez plus de 80% des femelles de chaque groupe.

L'ensemble de ces expériences nous a permis de démontrer de manière claire que la présence de boucs sexuellement actifs permet d'induire une accélération de la maturation sexuelle chez la jeune chevrete. Ces mâles permettent d'induire une première ovulation précoce dès l'âge de 3 mois et demi, par ailleurs ils induisent également une forte synchronisation de la première ovulation puisque dans chacune de nos expériences ces femelles ont toutes ovulé sur un intervalle maximal de 3 semaines. De plus, toutes les femelles ont continué à cycler après cette première ovulation induite. Nos résultats montrent également l'importance du niveau d'activité sexuelle du bouc pour induire une puberté précoce puisque la présence d'un mâle castré n'a pas eu de conséquences sur la transition pubertaire et que dans l'ensemble des expérimentations, les chevrettes ont ovulé dans le mois suivant l'entrée en saison sexuelle des boucs.

En conclusion, cette thèse a mis en évidence l'importance de l'environnement social et en particulier de la présence de mâles actifs sur la régulation de la transition pubertaire dans l'espèce caprine.

Mots clés : Puberté, Environnement social, Ovulation, Hypothalamus, LH, Comportement sexuel, Caprins

Résumé en anglais

The pubertal transition is a critical period in the life of an individual as it marks the beginning of the reproductive life. During this phase, the individual acquire the physiological capacity of reproduction (production of mature gametes) but he also starts to exhibit sexual behaviors. In mammals, several factors, internal as external, can modulate the age at puberty. Among those external factors, two have been particularly studied: the photoperiod for seasonal breeders and the social environment.

Regulation of the sexual maturation by the social environment has been particularly well studied in rodents. Indeed, it is well known that a prepubertal exposure to an adult male can induce a precocious vaginal opening in young female and an advance of their first estrous. This phenomenon is called Vandenberg effect. Nevertheless, there is still few data on the endocrine modifications related to this puberty acceleration. The aim of my thesis was therefore to characterize more finely the consequences of a precocious exposure to male on the reproductive function of immature females. This study was carried on goats as it present multiple advantages. We can perform repeated blood sampling without affecting the physiology of the young female, enabling a fine monitoring of endocrine secretions to study LH pulsatility for example or to study the progesterone levels, a good indicator of the ovulatory state. Moreover, in goats, it is known that the female reproductive axis is highly sensitive to signals provided by the bucks, this has been well studied in the case of the male effect.

First, we exposed Spring-born young females to intact bucks or to castrated bucks, one group of females remained isolated from males. We demonstrated that only intact bucks were efficient to induce a precocious puberty in females. Indeed, females exposed to intact bucks had a precocious increase of the LH pulses frequency and their first ovulation occurred 1.5 months earlier than isolated females or females exposed to castrated bucks. Exposure to intact bucks also induced an acceleration of the genital tract maturation characterized by an important increase of the uterus weight (+40%). Those results show that the presence of intact bucks can reactivate the gonadotrope axis of young females. However, we failed to detect any difference in the number of synaptic contact per GnRH neuron between the three groups of females.

Secondly, we studied the consequences of a precocious exposure to sexually active bucks on the age at puberty of Autumn-born goats. Indeed, we know that young female goats born out-of-season (in Autumn instead of Spring) exhibit a puberty delay, they ovulate at the age of 1 year instead of 7 months. Exposure to active bucks was highly efficient to avoid this

puberty delay and inducing a precocious puberty. Indeed, females exposed to active bucks had their first ovulation at a mean age of 3.5 months, earlier than what we expected.

Finally, we tested the possible consequences of a precocious puberty on the future response to a male effect. A study carried in sheep suggests a better response to a male effect for females that had an induced precocious ovulation. We did not detect any differences in the ovulatory response of females with or without a precocious puberty. Indeed, in each group, exposure to sexually active bucks induced ovulation in more than 80% of females.

Our results clearly demonstrated that the presence of sexually active bucks can induce a precocious sexual maturation in young goats. Those males induced a precocious puberty as early as 3.5 months and they also induced a great synchronization of the first ovulation. Indeed, in all of our experiments, all females ovulated for the first time in a maximal range of 3 weeks. Moreover, all females had normal and regular cycles after their first induced ovulation. Our results also highlights the importance of the level of sexual activity of the male to induce a precocious puberty in young goats since exposure to castrated bucks had no effect on the age at puberty. Moreover, in all experiments, young goats reached puberty within a month after the bucks started to exhibit sexual behaviors.

To conclude, this thesis highlighted the importance of the social environment, and more precisely the importance of exposure to sexually active bucks, on the regulation of the pubertal transition in goats.

Keywords: Puberty, Social environment, Ovulation, Hypothalamus, LH, Sexual behavior, Goats

Avant propos

Publications scientifiques :

Chasles M., Chesneau D., Moussu C., Delgadillo J A., Chemineau P., and Keller M. Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes. *Animal Reproduction Science* 2016, 168: 86-91.

Ramirez S., Bedos M., **Chasles M.**, Hernandez H., Flores J A., Vielma J., Duarte G., Retana-Marquez M S., Keller M., Chemineau P. and Delgadillo J A. Fifteen minutes of daily contact with sexually active male induces ovulation, but delays its timing in seasonally anestrus goats. *Theriogenology* 2016, 87: 148-153.

Jennings K., **Chasles M.**, Cho H., Mikkelsen J., Bentley G., Keller M. and Kriegsfeld L. The preoptic area and the RFamide-related peptide neuronal system gate seasonal changes in chemosensory processing. *Integrative and Comparative Biology* 2017

Communications orales :

Chasles M., Chesneau D., Moussu C., Delgadillo J A., Chemineau P., and Keller M. Effects of an early exposure to sexually active bucks on the age at puberty and sexual behavior of goats. *18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*, Tours (France) 27-30 Juin 2016.

Chasles M., Chesneau D., Moussu C., Delgadillo J A., Chemineau P., and Keller M. La présence de boucs entiers dès le sevrage permet d'accélérer la puberté chez la chèvre alpine (*Capra hircus*). *47e colloque de la Société Française pour l'Étude du Comportement Animal (SFECA)*, Gif-sur-Yvette (France) 15-17 Mai 2017.

Chasles M., Chesneau D., Moussu C., Delgadillo J A., Chemineau P., and Keller M. Advancement of puberty in autumn-born goat kids by exposure to sexually active bucks. *21st Annual European Society for Domestic Animal Reproduction Conference (ESDAR)*, Berne (Suisse) 24-26 Août 2017.

Présentations affichées :

Chasles M., Chesneau D., Moussu C., Delgadillo J A., Chemineau P., and Keller M. Effects of an early exposure to sexually active bucks on the age at puberty and sexual behavior of goats. *18th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*, Tours (France) 27-30 Juin 2016.

Chasles M., Chesneau D., Moussu C., Delgadillo J A., Chemineau P., and Keller M. Early exposure to bucks can advance the puberty of young does of 1.5 months without affecting their cyclicity and their sexual behaviour. *Reprosciences 2017*, Tours (France) 10-12 Avril 2017.

Chasles M., Chesneau D., Moussu C., Delgadillo J A., Chemineau P., and Keller M. Socio-sexual interactions with males are highly efficient to induce precocious puberty in female goats. *50th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR)*, Washington DC (Etats-Unis) 13-16 Juillet 2017.

Table des matières

Remerciements	1
Résumé	4
Résumé en anglais	6
Avant propos	8
Table des matières	10
Liste des abréviations	13
Liste des tableaux	14
Liste des figures	15
Chapitre I : La transition pubertaire chez la femelle, régulation par des facteurs internes et externes, revue bibliographique	17
I. L'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien	18
A. L'hypothalamus.....	18
B. L'hypophyse.....	20
C. L'ovaire	21
1) Le cycle ovarien	21
2) Les hormones impliquées dans la régulation du cycle ovarien	23
(1) L'hormone gonadotrope (GnRH).....	25
(2) Les gonadotropines : l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH)	26
(3) Les stéroïdes sexuels : la progestérone (P4) et l'œstradiol (E ₂).....	28
(4) Les prostaglandines	32
II. La transition pubertaire	33
A. Les signes de la transition pubertaire	33
B. La réactivation de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien (HHO) : évènement déclencheur de la transition pubertaire.....	38
1) Phases d'activité fœtale et néonatale de l'axe HHO	38
2) Réactivation de l'axe HHO à la puberté.....	39
(1) La théorie du gonadostat	40
(2) La théorie de la maturation centrale	40
C. Contrôle hypothalamique de la transition pubertaire	42
1) Au cœur de la transition pubertaire : les neurones à GnRH.....	42

2)	Importance du système à kisspeptine et des neurones KNDy.....	45
(1)	Les neurones à kisspeptine (Kp)	46
(2)	Les neurones à neurokinine B (NKB)	49
(3)	Les neurones à Dynorphine (Dyn)	51
3)	Le RFRP-3 : un modulateur de la sécrétion de GnRH.....	54
III.	Facteurs régulateurs de la puberté chez la femelle.....	56
A.	Des facteurs internes	56
1)	Une composante génétique.....	56
2)	L'état métabolique.....	57
(1)	La leptine : un garant de la transition pubertaire.....	57
(2)	Action de la leptine au niveau hypothalamique	58
B.	Des facteurs externes.....	60
1)	La photopériode.....	60
(1)	Influence de la photopériode sur le déclenchement de la puberté.....	61
(2)	La mélatonine, relai de l'information photopériodique	63
2)	L'environnement social.....	66
(1)	La présence d'autres femelles peut moduler l'entrée en puberté de la jeune femelle immature.....	66
(2)	La présence de mâle accélère la transition pubertaire chez la femelle.....	67
IV.	La chèvre (<i>Capra hircus</i>), un modèle pour l'étude de la régulation sociale de la fonction de reproduction	76
A.	La chèvre, une espèce à reproduction saisonnée.....	76
1)	En saison sexuelle	77
2)	Au cours de l'anestrus saisonnier.....	80
B.	Désaisonnement des caprins, une technique de maîtrise de la reproduction	81
1)	Les traitements hormonaux	81
2)	L'effet mâle	83
C.	La puberté chez la chèvre.....	87
	Chapitre II : Hypothèses de travail et objectifs de la thèse.....	89
	Chapitre III : Travaux de Recherche.....	93
	Article 1: Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes.	94
	Article 2: Exposure to sexually active bucks stimulate early puberty onset in does	102

Article 3: Precocious activation of reproductive function in autumn-born goats (<i>Capra hircus</i>) by exposure to sexually active bucks ¹	131
Article 4: No impact of a previous experience with bucks and induced precocious puberty in nulliparous goats on the response to a male-effect.	147
Chapitre IV : Discussion	163
Chapitre V : Conclusion	176
Autres articles publiés au cours de la thèse	179
Chapitre VI : Bibliographie	197
Résumé	228
Résumé en anglais	228

Liste des abréviations

APO : Aire Pré-Optique
ARC : Noyau Arqué de l'hypothalamus
Dyn : Dynorphine
E₂ : Œstradiol
EM : Eminence Médiane
ER : Récepteur à l'œstradiol
FSH : Hormone folliculo-stimulante (Follicle Stimulating hormone)
FSHR : Récepteur à la FSH
GnIH : Gonadotropin Inhibitory Hormone
GnRH : Gonadolibérine (Gonadotropin Releasing Hormone)
GnRHR : Récepteur à la GnRH
GPR147 : Récepteur au RFRP-3
GPR54 : Récepteur à la Kisspeptine
HHO : Hypotalamo-Hypophyso-Ovarien
HMB : Hypothalamus Médio-Basal
KNDy : Neurones à Kisspeptine, Neurokinine B et Dynorphine
KOR : Récepteur aux opiacés de type Kappa
Kp : Kisspeptine
LH : Hormone Lutéinisante (Luteinizing Hormone)
LHCGR : Récepteur à la LH (Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor)
LHRH : ancien nom de la GnRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone)
MT : Récepteur à la mélatonine
NK3R : Récepteur à la Neurokinine B
NKB : Neurokinine B
NPY : Neuropeptide Y
NSC : Noyaux Supra-Chiasmatiques
Ob-R : Récepteur à la leptine
OVLT : Organe Vasculaire de la Lamme Terminale
P₄ : Progestérone
PGF₂ α : Prostaglandine F₂ α
PGRMC1 : Récepteur à la Progestérone (Progesterone Receptor Membrane Component 1)
PMSG : Sérum de jument gravide (Pregnant Mare Serum Gonadotropin)
POMC : Pro-opiomélanocortine
RFRP-3 : RFamide-Related Peptide-3
TSH : Hormone Thyroïdostimulante

Liste des tableaux

Tableau 1. Durée moyenne du cycle ovarien chez différentes espèces de mammifères.....	22
Tableau 2. L'âge moyen à la puberté varie énormément entre différentes espèces de mammifères.....	56
Tableau 3. La présence du mâle peut avancer la puberté chez de nombreux mammifères.	70

Liste des figures

Figure 1. Coupe sagittale d'un cerveau humain, localisation de l'hypothalamus et de l'hypophyse.	18
Figure 2. Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien.....	19
Figure 3. L'hypophyse est divisée en 2 lobes, l'adénohypophyse et la neurohypophyse.....	21
Figure 4. Représentation schématique de l'évolution des concentrations des hormones hypophysaires (en bleu) et des stéroïdes sexuels (en jaune), ainsi que de leur régulation au niveau de l'axe HPO au cours du cycle oestrien de la brebis.	24
Figure 5. Réponse hormonale, LH et FSH, de singes présentant des lésions hypothalamiques après l'administration continue ou pulsatile de GnRH	26
Figure 6. Profils simultanés de la sécrétion pulsatile de LH et de GnRH (LHRH) chez la brebis ovariectomisée.....	27
Figure 7. Rétro-contrôle de la sécrétion de GnRH par les oestrogènes au niveau de l'hypothalamus, implication des neurones à kisspeptine de l'aire pré-optique (APO) et du noyau arqué (ARC).	30
Figure 8. Les caractères sexuels secondaires, un moyen de détermination du niveau de maturité sexuelle d'un individu.	34
Figure 9. Echelle de Tanner pour le suivi de la transition pubertaire chez la jeune fille et le jeune garçon.	34
Figure 10. L'ouverture vaginale, un moyen non invasif pour déterminer l'âge à la puberté des rongeurs.....	35
Figure 11. Concentration en LH (•) et en FSH (○) chez une brebis pendant la période prépubertaire et au moment de la transition pubertaire.....	37
Figure 12. Profils de sécrétion pulsatile de LH et de FSH, de la petite enfance à la puberté, chez la jeune fille et le jeune garçon.....	38
Figure 13. Les deux théories de la transition pubertaire : gonadostat et maturation centrale..	41
Figure 14. Les principaux noyaux hypothalamiques.	42
Figure 15.1. Représentation schématique de la distribution des neurones à GnRH dans le cerveau de souris adulte.	43
Figure 15.2. Représentations schématiques de la distribution des neurones à GnRH dans l'hypothalamus caprin.	44

Figure 16. Représentation schématique de l'hypothèse actuelle de modulation du déclenchement pubertaire via les neurones KNDy coexprimant la kisspeptine (rouge) la neurokinine B (vert) et la dynorphine (violet).	53
Figure 17. Schéma de la modulation de la transition pubertaire par l'action de la leptine.	59
Figure 18. Disparité des périodes de reproduction (gris) selon les espèces pour permettre une mise-bas pendant la saison favorable (noir).	61
Figure 19. Transmission de l'information photopériodique jusqu'à la glande pinéale, chez le mouton.	64
Figure 20. Les phéromones permettent de moduler la fonction de reproduction via la stimulation du système olfactif accessoire chez les rongeurs.	73
Figure 21. Variation saisonnière de l'activité sexuelle de la chèvre alpine sous une latitude tempérée.	77
Figure 22. Comportement sexuel du bouc (en gras) et de la chèvre (en italique).	78
Figure 23. Comportement de flehmen (à gauche) et d'auto-marquage urinaire (à droite) chez le bouc.	79
Figure 24. Le traitement hormonal classique de synchronisation de l'œstrus en caprin.	82
Figure 25. Ovulations et comportement d'œstrus chez la chèvre créole en réponse à l'introduction d'un mâle.	83
Figure 26. Le traitement photopériodique de jours longs permet d'induire la reprise de l'activité sexuelle chez le bouc.	86

**Chapitre I : La transition pubertaire
chez la femelle, régulation par des
facteurs internes et externes, revue
bibliographique**

La transition pubertaire est un phénomène complexe permettant le passage d'un état juvénile sexuellement immature vers un état d'adulte reproducteur. Elle peut être caractérisée par un pic de croissance, l'apparition des caractères sexuels secondaires (développement mammaire et pilosité chez la femme, développement des bois du cerf par exemple), l'acquisition de la capacité physiologique à se reproduire (1^{ère} ovulation) mais également par l'expression d'un comportement sexuel adéquat (Dietrich, 2014). Dans le cadre de ma thèse, j'ai étudié l'influence de l'environnement social sur la fonction de reproduction, et plus précisément les conséquences de la présence de boucs sur la maturation sexuelle de la jeune chevrette. Ainsi dans l'introduction de ce manuscrit, je décrirai essentiellement les mécanismes impliqués dans la régulation de la fonction de reproduction chez la femelle. Chez cette dernière, la transition pubertaire est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien (HHO).

I. L'axe hypothalamo-hypophysio-ovarien

A. L'hypothalamus

L'hypothalamus est une petite région cérébrale située à la base du 3^{ème} ventricule, délimitée en avant par le chiasma optique et en arrière par les corps mamillaires (Figure 1). Elle est constituée de différents noyaux de neurones et participe à la régulation de nombreuses fonctions parmi lesquelles la prise alimentaire et hydrique, la thermorégulation, le sommeil, la physiologie des émotions et la reproduction.

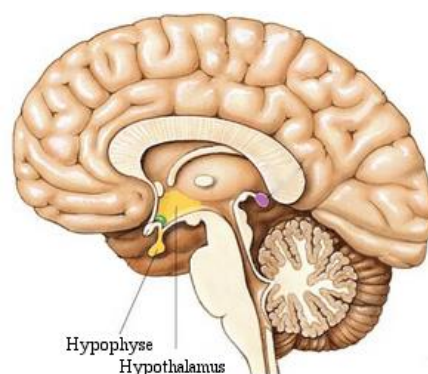


Figure 1. Coupe sagittale d'un cerveau humain, localisation de l'hypothalamus et de l'hypophyse.

Au niveau hypothalamique, la régulation de la fonction de reproduction est modulée par la sécrétion d'un décapeptide par des neurones de l'hypothalamus médio-basal et de l'aire pré-optique: la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone). Cette hormone, initialement nommée LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) a été mise en évidence indépendamment par deux équipes en 1971 dans le cerveau de porc (Schally et al., 1971) et de mouton (Amoss et al., 1971), ce qui vaudra à Andrew Schally et Roger Guillemin le prix Nobel de médecine en 1977.

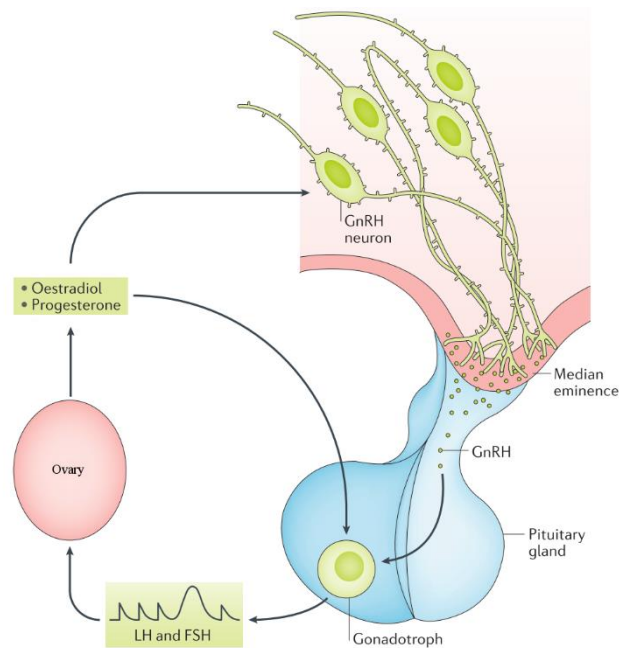


Figure 2. Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien.

Adapté de (Herbison, 2016)

Les neurones à GnRH sont très dispersés et assez peu nombreux, autour de 800 chez la souris (Hoffman and Finch, 1986) et autour de 3000 chez le mouton (Caldani et al., 1988). Les neurones à GnRH prennent leur origine dans les placodes olfactives (Schwanzel-Fukuda and Pfaff, 1989; Wray et al., 1989) puis au cours du développement embryonnaire vont migrer vers la région hypothalamique. Ce lien entre système olfactif et contrôle central de la fonction reproductrice a été pressenti lors de la description du cas pathologique d'un homme présentant une anosmie, absence du sens de l'odorat, et un hypogonadisme hypogonadotrope, c'est-à-dire, des organes sexuels sous-développés et une sécrétion des hormones gonadotropes et des stéroïdes sexuels très faible voire inexistante. Le médecin l'ayant mis en évidence, Franz Kallmann, donnera son nom à ce syndrome (Dodé and Hardelin, 2009).

A l'âge adulte, les neurones à GnRH sont localisés au niveau de l'aire pré-optique (APO) et de l'hypothalamus médio-basal (HMB). La proportion de ces neurones dans l'une ou l'autre des structures varient selon les espèces, avec une proportion plus importante de neurones à GnRH au niveau de l'APO chez les rongeurs et les ruminants (Bennett-Clarke and Joseph, 1982; Caldani et al., 1988; Zuccolilli et al., 1994), et au contraire une distribution préférentielle dans l'HMB chez les primates par exemple (Goldsmith et al., 1990; Silverman et al., 1977).

Les neurones à GnRH sécrètent de manière pulsatile la neurohormone qui est libérée au niveau du système porte hypothalamo-hypophysaire (Figure 2). L'hypothalamus est en effet relié à une glande, l'hypophyse, par la tige pituitaire qui est composée d'axones et de capillaires sanguins permettant les échanges de molécules entre ces deux structures. La GnRH a un rôle prépondérant dans la régulation de la sécrétion des hormones hypophysaires notamment la LH (Luteinizing Hormone) et la FSH (Follicle Stimulating Hormone). La GnRH en se fixant à ses récepteurs à 7 domaines transmembranaires situés au niveau du lobe antérieur de l'hypophyse va entraîner la libération des gonadotropines citées précédemment.

B. L'hypophyse

L'hypophyse (ou glande pituitaire) se situe à la base du cerveau, juste en dessous de l'hypothalamus et communique avec ce dernier par un réseau à la fois nerveux et vasculaire. Cette structure est divisée en deux lobes, l'adénohypophyse (ou anté-hypophyse) et la neurohypophyse (ou post-hypophyse). Ces deux parties ont à la fois une origine embryonnaire et une fonction distincte (Figure 3). La neurohypophyse est composée essentiellement de terminaisons nerveuses dont les corps cellulaires sont situés au niveau de l'hypothalamus, ces neurones sont responsables de la synthèse de l'ocytocine et de la vasopressine. La neurohypophyse est décrite comme le lieu de stockage mais également de sécrétion de ces deux neurohormones (Melmed, 2010).

L'adénohypophyse renferme quant à elle de nombreuses cellules endocrines, cette structure est composée de 3 subdivisions que sont la *pars tuberalis*, la *pars intermedia* et la *pars distalis* (Figure 3). Au niveau de la *pars distalis*, on observe la présence de plusieurs populations cellulaires responsables de la sécrétion de 6 hormones différentes : l'hormone de croissance, la prolactine, l'hormone thyroïdienne, l'hormone corticotrope, la LH et la FSH (Melmed, 2010).

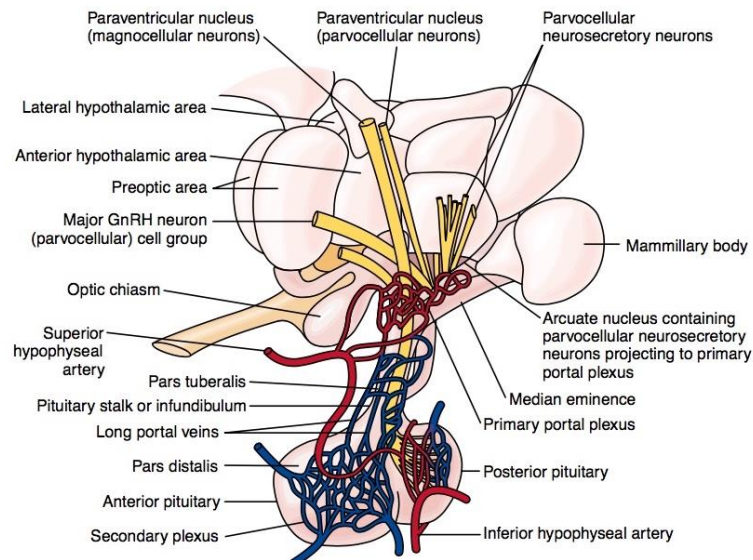


Figure 3. L'hypophyse est divisée en 2 lobes, l'adénohypophyse et la neurohypophyse.
(Clifton and Steiner, 2014)

Les cellules gonadotropes sont les cellules sécrétant les gonadotropines sous le contrôle de la GnRH. Elles représentent autour de 10% des cellules hypophysaires totales et sont en majorité bihormonales, elles produisent à la fois la LH et la FSH, néanmoins certaines de ces cellules sont monohormonales et ne vont pouvoir sécréter qu'une seule des deux gonadotropines. La LH et la FSH sont responsables chez la femelle à la fois du phénomène de folliculogenèse, du maintien du corps jaune mais aussi de la synthèse des hormones ovariennes. Les récepteurs de ces hormones sont en effet présents chez la femelle de mammifère sur différents types cellulaires composant le follicule ovarien mais également au niveau du corps jaune et de l'utérus (Melmed, 2010).

C. L'ovaire

1) Le cycle ovarien

L'ovaire est le lieu de production des ovocytes mais également de synthèse des stéroïdes sexuels que sont les progestagènes et les œstrogènes. Cette synthèse est différenciellement régulée au cours du cycle œstrien qui se compose de deux phases : la phase folliculaire et la

phase lutéale. La durée totale du cycle tout comme la durée de chaque phase est très variable entre différentes espèces mais très constante au sein d'une espèce (Table 1). La cyclicité démarre à la puberté et s'achève chez la femme au moment de la ménopause.

Tableau 1. Durée moyenne du cycle ovarien chez différentes espèces de mammifères
(d'après Plant et al., 2015)

	Durée totale du cycle (jours)	Phase lutéale (jours)	Phase folliculaire (jours)
Souris	4-5	1-2	2-3
Mouton	16-17	13-14	2-3
Femme	24-32	14-16	12-15

Le stock de follicules ovariens se forme au cours du développement foetal jusqu'au tout début de la vie néonatale chez tous les mammifères. La maturation de ces follicules primordiaux afin d'obtenir un ovocyte apte à être fécondé ne débutera qu'au moment de la puberté (Monniaux et al., 2009).

Dès lors, à chaque cycle on observera un recrutement de follicules primordiaux qui vont entrer en maturation lors de la phase folliculaire. Au début de cette phase folliculaire, la pulsativité de la GnRH est encore faible, par conséquent celle de la LH également. Cette sécrétion de GnRH va néanmoins stimuler la production de FSH stimulant à son tour la croissance folliculaire. Ces petits follicules ne sécrètent qu'une quantité limitée d'œstradiol (E2) qui va effectuer un rétro-contrôle négatif à la fois au niveau de l'hypophyse mais aussi de l'hypothalamus (Figure 4). Au cours de cette phase, le follicule primordial va devenir un follicule primaire puis secondaire, la taille de l'ovocyte va augmenter tout comme le nombre de cellules entourant cet ovocyte, les cellules de la granulosa. Après cette phase de croissance, l'ovocyte va entrer dans une phase de différenciation au cours de laquelle une cavité se forme au sein du follicule, c'est l'*antrum*. On observera alors une différenciation des cellules de la granulosa au contact direct de l'ovocyte en cellules du cumulus, formant ainsi le complexe ovocyte-cumulus. Les cellules folliculaires plus éloignées de l'ovocyte et donc moins exposées aux facteurs ovocytaires resteront à l'état de cellules de la granulosa. A la fin de cette phase de différenciation, des récepteurs à la LH (LHCGR) apparaissent sur les cellules de la granulosa, rendant ainsi le follicule tertiaire pré-ovulatoire sensible à la LH. En fin de phase folliculaire, la hausse de la fréquence des pulses de

LH va ainsi entraîner une hausse de la sécrétion d'œstradiol, par les follicules en croissances, jusqu'à atteindre son maximum. La forte concentration d'œstradiol va alors déclencher un rétrocontrôle positif au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse. Ceci va induire une augmentation très importante de la sécrétion pulsatile de GnRH, provoquant le pic pré-ovulatoire de LH et de FSH précédant de quelques heures l'ovulation (Figure 4). Cette forte sécrétion d'œstradiol engendrera chez la femelle le comportement d'œstrus, se caractérisant en outre par l'acceptation de l'accouplement avec le mâle. Chez certaines espèces comme les ovins, une imprégnation progestative préalable est nécessaire pour que la femelle exprime un comportement d'œstrus (Robinson, 1954). Au moment de l'ovulation, l'ovocyte est alors expulsé du follicule et les cellules somatiques du follicule ovulatoire vont alors former le corps jaune marquant l'entrée en phase lutéale. Au cours de celle-ci, le corps jaune sécrète de la progestérone qui agit au niveau de l'hypothalamus afin d'inhiber la sécrétion de GnRH. On observe alors un retour à une pulsatilité faible du couple GnRH/LH. En absence de gestation, à la fin de la phase lutéale, le corps jaune va régresser (lutéolyse) et en absence de gestation les taux plasmatiques de progestérone baissent de manière drastique, levant ainsi le rétro-contrôle négatif et une nouvelle phase folliculaire démarre alors (Figure 4).

2) Les hormones impliquées dans la régulation du cycle ovarien

Le cycle ovarien est sous le contrôle d'hormones d'origine hypothalamique, hypophysaire et ovarienne. La régulation conjointe de ces hormones permet une bonne coordination des différents événements que sont l'ovulation, l'expression du comportement sexuel ou encore la préparation de la matrice utérine. C'est cette synchronisation qui assurera le succès reproducteur et ainsi la pérennité de l'espèce. En effet cela permet de favoriser les copulations en période péri-ovulatoire, ce qui accroît les chances de rencontre des gamètes et donc de fécondation. Cela assure également qu'en cas de fécondation, le zygote puisse s'implanter au moment où la matrice utérine sera la plus propice à l'implantation, favorisant ainsi les chances de survie de l'embryon.

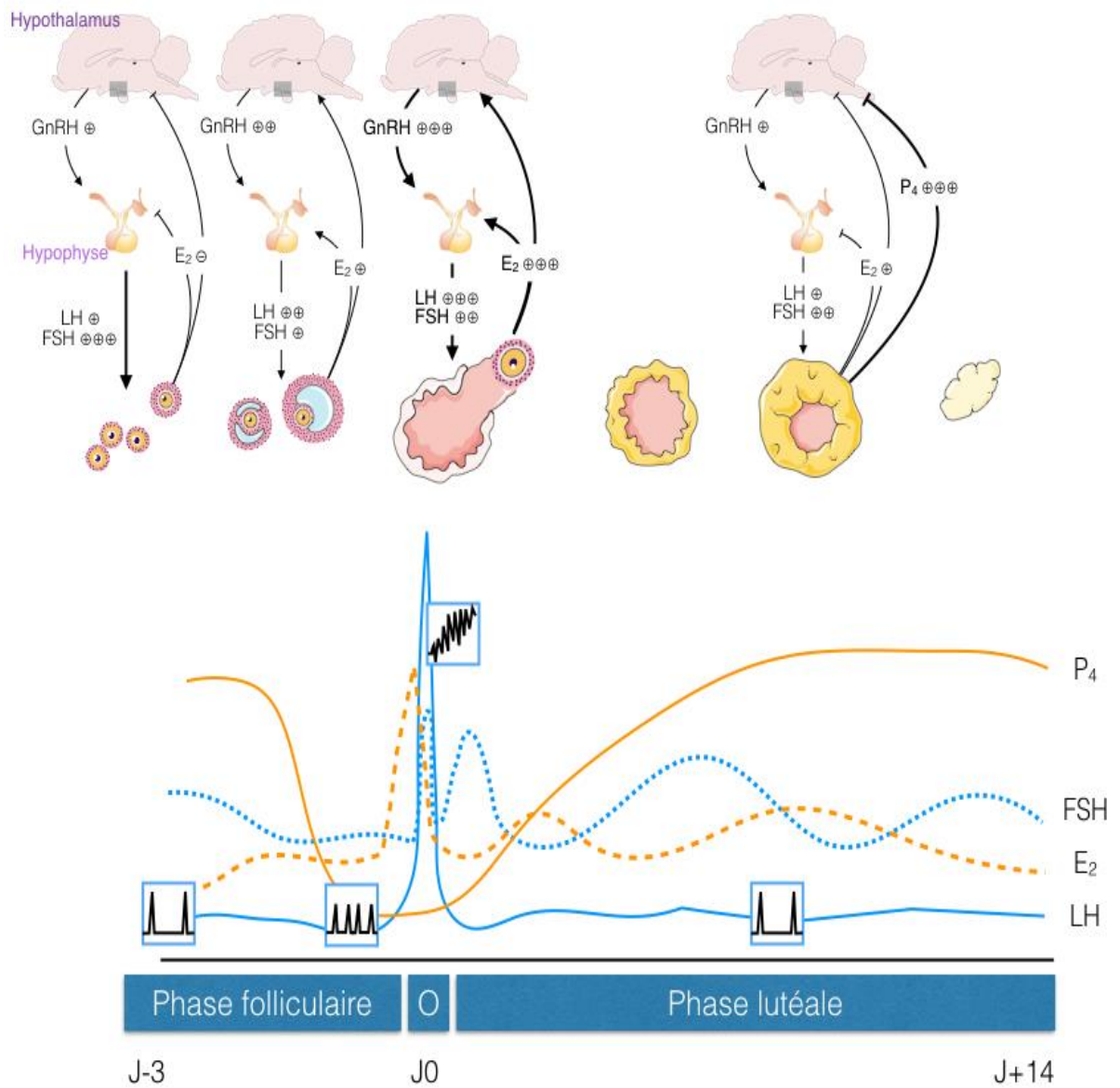


Figure 4. Représentation schématique de l'évolution des concentrations des hormones hypophysaires (en bleu) et des stéroïdes sexuels (en jaune), ainsi que de leur régulation au niveau de l'axe HPO au cours du cycle oestrien de la brebis.

(d'après Driancourt and Levasseur, 2001; Monniaux et al., 2009)

(1) L'hormone gonadotrope (GnRH)

L'hormone gonadotrope, initialement nommée LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) est une hormone hypothalamique considérée comme l'hormone-clé dans la régulation de la fonction de reproduction. Son récepteur (GnRHR) est présent au niveau des cellules gonadotropes de l'hypophyse, la GnRH sécrétée par l'hypothalamus va donc pouvoir agir au niveau de cette autre structure afin de stimuler la sécrétion des gonadotropines. De par son site de libération, le système porte hypothalamo-hypophysaire, et du fait e sa courte demi-vie, autour de 5 min (Clayton and Catt, 1981), la GnRH est une hormone dont le dosage est difficile et nécessite une approche chirurgicale.

Deux modes distincts de sécrétion ont été décrits pour la GnRH, une sécrétion pulsatile (pulse mode) et une sécrétion de pics pré-ovulatoires (surge mode). Le mode pulsatile est le mode de sécrétion le plus fréquent au cours du cycle, on le retrouve à la fois en phase lutéale et en phase folliculaire. La fréquence des pulses varie selon les phases du cycle avec une fréquence plus faible en phase lutéale qu'en phase folliculaire (Figure 4), chez les ovins cette pulsatilité est multipliée par 2 en phase folliculaire. On observe en effet 1,26 pulses par heure en phase folliculaire contre 0,66 pulses par heure en phase lutéale, on remarque également que cela ne s'accompagne pas d'une plus importante sécrétion de GnRH, car la hausse de la fréquence des pulses s'accompagne d'une diminution de leur amplitude, cela montre que le message porté par la GnRH est transmis par une modulation de la fréquence des pulses (Clarke et al., 1987). Ainsi, l'élément clé dans l'action de la GnRH sur les cellules hypophysaires est sa sécrétion pulsatile. Ceci est une propriété intrinsèque du neurone à GnRH, en effet lors d'expérience de culture in vitro d'explants d'hypothalamus, ces neurones continuent à sécréter la GnRH de manière pulsatile (Bourguignon and Franchimont, 1984). Les pulses ont une durée de quelques minutes et la période entre deux pulses peut varier selon l'espèce et le stade physiologique d'une vingtaine de minutes à plusieurs heures. Cette pulsatilité est cruciale, en effet dans le cas de singes présentant des lésions hypothalamiques abolissant donc la sécrétion des gonadotropines, l'administration pulsatile de GnRH (1µg/min pendant 6min toutes les heures) permet de restaurer la sécrétion de la LH comme de la FSH. Au contraire l'administration continue (1µg/min) de GnRH chez ces mêmes animaux n'a pas permis de restaurer cette sécrétion (Figure 5, Belchetz et al., 1978). Des résultats similaires ont été obtenus chez des brebis ovariectomisées présentant une déconnexion hypothalamo-hypophysaire (Clarke et al., 1986).

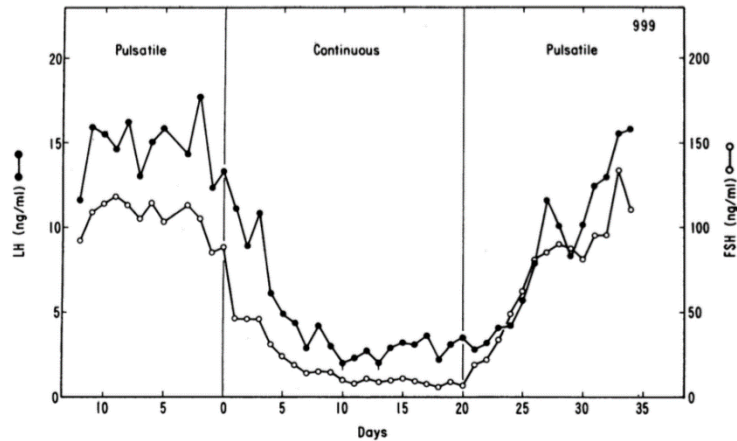


Figure 5. Réponse hormonale, LH et FSH, de singes présentant des lésions hypothalamiques après l'administration continue ou pulsatile de GnRH

(Belchetz et al., 1978)

Les pics de GnRH ne sont observables que dans les heures précédant l'ovulation, à ce moment les niveaux de GnRH vont augmenter très fortement et très rapidement, atteignant des valeurs très supérieures aux valeurs observées durant les autres phases du cycle, jusqu'à 10 à 20 fois supérieures. Contrairement au cas des pulses qui sont répétés mais de faible durée, le pic pré-ovulatoire de GnRH est unique mais sera maintenu pendant plusieurs heures.

(2) Les gonadotropines : l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH)

La LH et la FSH sont des hormones glycoprotéiques, elles sont sécrétées par les cellules gonadotropes de la partie antérieure de l'hypophyse, ces deux hormones forment la famille des gonadotropines. Elles sont toutes deux constituées de 2 sous-unités α et β . La sous-unité α est commune à l'ensemble des hormones glycoprotéiques d'une espèce donnée alors que la sous-unité β est caractéristique et spécifique de chaque hormone. C'est la sous-unité β qui permettra ainsi la liaison spécifique de chacune des gonadotropines sur leurs récepteurs respectifs. Ces deux hormones sont sous le contrôle de la GnRH mais le degré de dépendance des 2 hormones diffère. La sécrétion de LH semble en effet beaucoup plus dépendante de la GnRH que la FSH. Une étude a pu mettre en évidence que si l'injection sous-cutanée d'un antagoniste de la GnRH n'avait que peu d'effet sur la sécrétion de FSH, cela bloquait totalement la sécrétion de LH (Hallf et al., 1988).

Au cours du cycle œstrien, LH et FSH sont régulées différemment, La phase folliculaire est davantage sous le contrôle de la FSH alors que la LH jouera un rôle crucial dans la période péri-ovulatoire. Cela s'explique par la différence du niveau de dépendance à la GnRH mais aussi par la réponse différente des cellules gonadotropes à la fréquence des pulses de LH. Une pulsativité élevée de la GnRH favorise la sécrétion de LH alors qu'au contraire, une fréquence plus faible favorise la sécrétion de FSH (Jayes et al., 1997; L. Wildt et al., 1981). Ainsi en début de phase folliculaire, la sécrétion de GnRH est faible mais suffisante pour stimuler la libération de FSH par l'hypophyse. Le récepteur à la FSH (FSHR) est spécifiquement localisé au niveau des cellules de la granulosa des follicules en croissance. La sécrétion de FSH au cours de la folliculogénèse va ainsi favoriser la croissance du follicule en stimulant la prolifération des cellules de la granulosa.

Comme dit précédemment, contrairement à la FSH, la sécrétion de LH est très dépendante des niveaux en GnRH, de nombreuses études (Caraty et al., 1989; Clarke and Cummins, 1982; Levine et al., 1982) ont ainsi pu montrer que la sécrétion pulsatile de la LH est le reflet quasi-parfait de la sécrétion pulsatile du GnRH (Figure 6).

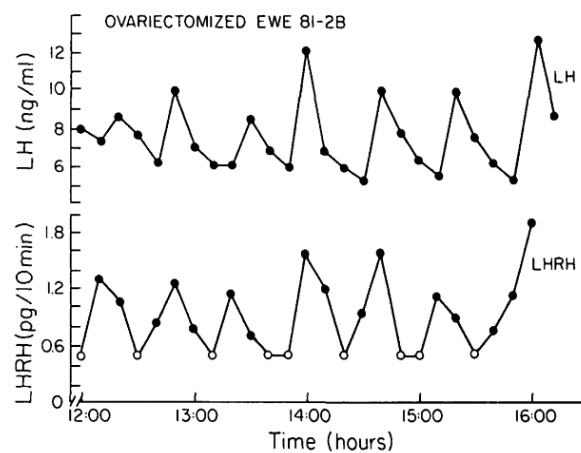


Figure 6. Profils simultanés de la sécrétion pulsatile de LH et de GnRH (LHRH) chez la brebis ovariectomisée. La GnRH a été dosée dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire après canulation des brebis, la LH a quant à elle été dosée dans le sang prélevé au niveau de la veine jugulaire. (Levine et al., 1982)

La sécrétion pulsatile de LH au cours du cycle œstrien est donc extrêmement similaire à ce que nous venons de décrire pour la GnRH. On observe une faible fréquence de pulses pendant la phase lutéale puis une hausse de cette pulsativité lors de la phase folliculaire. Comme pour la GnRH, en période péri-ovulatoire, le mode de sécrétion de la LH est modifié avec une sécrétion forte et maintenue pendant plusieurs heures marquant le pic pré-ovulatoire de LH (Figure 4). Les récepteurs à la LH (LHCGR) sont présents sur les cellules de granulosa des follicules tertiaires. Seuls les follicules présentant un nombre important de récepteur à la LH seront aptes à ovuler en réponse au pic pré-ovulatoire de LH, c'est le phénomène de dominance. On observe alors une reprise de la méiose dans les follicules dominants, ainsi qu'une expansion des cellules du cumulus, le follicule finira par rompre libérant ainsi l'ovocyte dans l'oviducte.

Le pic pré-ovulatoire de GnRH et donc de LH est la conséquence de la hausse de la sécrétion d'œstradiol (E_2) par les cellules de la granulosa. Les récepteurs à la LH étant présents sur ces cellules, la hausse de la sécrétion pulsatile de LH au cours du cycle œstrien induit une hausse de la sécrétion d' E_2 . Une fois les niveaux en E_2 assez élevés, ils déclenchent un rétro-contrôle positif au niveau des cellules gonadotropes de l'hypophyse stimulant fortement la sécrétion de lh et de FSH, induisant alors l'ovulation en quelques heures (Figure 4).

Lors de la phase lutéale, la sécrétion de LH est fortement inhibée par le rétro-contrôle négatif de la progestérone (P_4) sécrétée par le corps jaune. La sécrétion de FSH est, quant à elle, augmentée afin de stimuler la croissance de nouveaux follicules primordiaux impliqués dans le cycle œstrien suivant.

(3) Les stéroïdes sexuels : la progestérone (P_4) et l'œstradiol (E_2)

Les stéroïdes sexuels, la progestérone (P_4) et l'œstradiol (E_2), sont produits par les cellules ovariennes. L'œstradiol est sécrété par les cellules de la granulosa des follicules en croissance et la progestérone par les cellules lutéales du corps jaune. Ces hormones jouent un rôle crucial dans la régulation de l'axe HHO au cours du cycle œstrien. En effet une ovariectomie aura pour conséquence une hausse des niveaux circulants de LH et de FSH tout en abolissant le pic pré-ovulatoire de ces gonadotropines (Wise and Ratner, 1980; Yen and Tsai, 1971), montrant l'existence d'un rétro-contrôle négatif et positif des sécrétions ovariennes sur les gonadotropines. Cela est dû en partie à l'action des stéroïdes sexuels sur l'hypothalamus, en effet l'ovariectomie d'une femelle mature mène également à une hausse de la sécrétion de GnRH (Chongthammakun et al., 1993).

Le rôle des œstrogènes au cours du cycle est complexe, en effet l'œstradiol va exercer un rétro-contrôle positif ou négatif selon la phase du cycle (Figure 4). Cette hormone est sécrétée par les cellules de la granulosa, sa sécrétion va donc augmenter au cours de la croissance folliculaire. Ainsi en début de phase folliculaire, les faibles concentrations d'œstradiol ont un effet inhibiteur sur l'axe hypothalamo-hypophysaire. Puis en fin de phase folliculaire, les concentrations croissantes d'œstradiol induisent une bascule vers un rétro-contrôle positif stimulant la sécrétion pulsatile de GnRH et de LH. On observe une forte élévation de la concentration en œstradiol dans les heures précédant le pic de GnRH et de LH. L'œstradiol est indispensable à la genèse du pic pré-ovulatoire, en effet en son absence on n'observe aucun pic de GnRH (Caraty et al., 1989; Moenter et al., 1990) alors qu'un traitement à l'œstradiol permet l'induction d'un pic pré-ovulatoire de LH chez la femelle ovariectomisée (Manabe et al., 1993; Scaramuzzi et al., 1971). On remarque néanmoins que les concentrations en œstradiol diminuent alors que le pic de LH lui persiste encore plusieurs heures (Figure 4), l'œstradiol est donc indispensable à l'induction du pulse de GnRH et de LH mais pas à son maintien. Puis au cours de la phase lutéale, les concentrations en œstradiol diminuent, retournant à leur niveau de base et induisant un retour du rétro-contrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse. Le rétro-contrôle par les œstrogènes est exercé par leur liaison aux récepteurs ER α et ER β , on sait que l'ER α est impliqué dans le rétro-contrôle positif puisque l'inactivation chez la souris du gène codant pour l'ER α induit un défaut de réponse à l'œstradiol avec une absence de pic pré-ovulatoire de LH et donc un défaut d'activation des neurones à GnRH. L'inactivation pour le gène codant pour le récepteur ER β n'est pas accompagnée de ces défauts d'activation, les souris Er β -/- présentent un profil classique de réponse à l'œstradiol (Wintermantel et al., 2006). Le récepteur ER α est donc crucial dans le rétro-contrôle par les œstrogènes, et si les cellules gonadotropes de l'hypophyse possèdent les récepteurs ER α , ce n'est pas le cas des neurones à GnRH (Herbison et al., 1993; Lehman and Karsch, 1993; Sullivan et al., 1995). Ainsi, si le rétro-contrôle peut être direct au niveau hypophysaire, il est nécessaire qu'une population neuronale intermédiaire soit impliquée dans le cadre du rétro-contrôle hypothalamique. Il semblerait que parmi ces interneurones certains puissent être des neurones à kisspeptine (plus de détail sur la kisspeptine en page 43). En effet au contraire des neurones à GnRH, ceux-ci expriment les récepteurs à l'œstradiol (Franceschini et al., 2006; Smith et al., 2006b) et le récepteur à la kisspeptine, le GPR54, est présent sur les neurones à GnRH (Irwig et al., 2004, Figure 7). Par ailleurs on observe une régulation différentielle de la sécrétion de kisspeptine par l'œstradiol selon la localisation des neurones à kisspeptine. Chez

les rongeurs, un traitement à l'œstradiol stimule la sécrétion de kisspeptine par les neurones situés au niveau de l'aire pré-optique (APO) alors qu'elle en inhibe la sécrétion par les neurones à kisspeptine de l'hypothalamus située au niveau du noyau arqué (ARC) et de l'éminence médiane (Smith et al., 2005, Figure 7). Au niveau hypophysaire, on sait que l'œstradiol permet de sensibiliser les cellules gonadotropes au signal GnRH via une augmentation du nombre de récepteurs à la GnRH (Gregg and Nett, 1989).

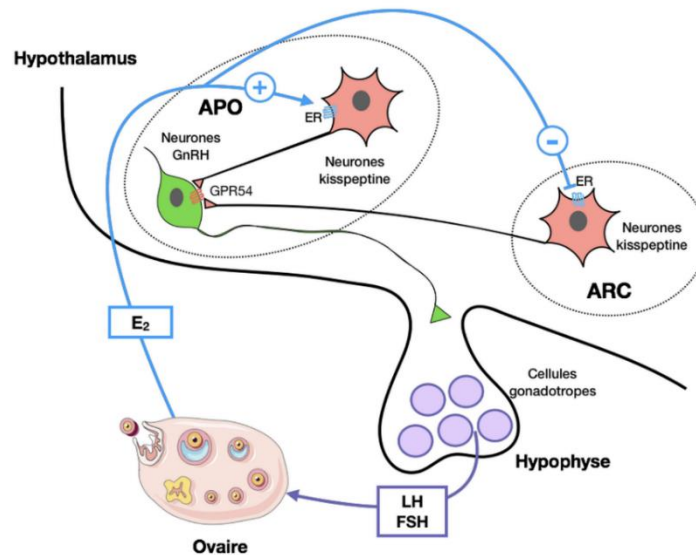


Figure 7. Rétro-contrôle de la sécrétion de GnRH par les oestrogènes au niveau de l'hypothalamus, implication des neurones à kisspeptine de l'aire pré-optique (APO) et du noyau arqué (ARC).

(D'après Beltramo and Dufourny, 2015)

Si le rôle des œstrogènes peut être à la fois stimulateur et inhibiteur au cours du cycle, le rôle de la progestérone (P4) est lui moins ambigu puisque son rôle est purement inhibiteur. La P4 est sécrétée par le corps jaune, elle est donc présente en quantités très faibles voire indétectables lors de la phase folliculaire. Mais après l'ovulation les cellules folliculaires forment le corps jaune, les cellules devenues des cellules lutéales sécrètent alors de la P4 en grande quantité. Cette progestérone agit via les récepteurs PGRMC1 présents sur les neurones à GnRH (Bashour and Wray, 2012; Peluso, 2013) afin de bloquer le rétro-contrôle positif de l'œstradiol sur la sécrétion de GnRH et des gonadotropines (Karsch et al., 1979). Les niveaux de progestérone resteront hauts durant toute la phase lutéale avant de diminuer brutalement au début de la phase folliculaire suivante, libérant ainsi la pulsativité du GnRH et le cycle recommence.

- Rôle des stéroïdes sexuels dans la fonction utérine

Les stéroïdes sexuels sont importants pour la réceptivité utérine, l'implantation du zygote mais également pour le maintien de la gestation. On observe des modifications cycliques de l'utérus que ce soit au niveau morphologique ou fonctionnel. Ainsi une ovariectomie bilatérale a pour conséquence d'induire une atrophie de l'utérus, ce phénomène pouvant être renversé par l'administration d'œstrogènes et/ou de progestérone (Accorsi-Mendonça et al., 2002). La phase folliculaire du cycle œstrien correspond à la phase proliférative du cycle utérin, en effet l'endomètre utérin va s'épaissir par prolifération cellulaire sous l'action des œstrogènes. Au cours de cette phase, les œstrogènes vont induire une hausse de l'activité contractile de l'utérus mais aussi la synthèse des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone. L'utérus est ainsi sensibilisé à l'action de la progestérone, au cours de la phase lutéale du cycle œstrien la sécrétion de progestérone par le corps jaune induit alors une différenciation de l'utérus stimulant l'activité sécrétoire de l'endomètre. Au cours de cette phase la progestérone induit également un accroissement des cellules du myomètre tout en diminuant son activité contractile, rendant l'utérus plus réceptif à la possible implantation d'un embryon. En cas de gestation, selon l'espèce concernée, le placenta prendra le relai ou non, après en temps donné, de la sécrétion de progestérone permettant ainsi le maintien de la gestation.

- Rôle des stéroïdes dans le comportement sexuel femelle

Le comportement sexuel femelle se divise en 3 composantes : l'attractivité, la proceptivité et la réceptivité (Beach, 1976). La phase d'attractivité permet la mise en contact des partenaires sexuels, elle se caractérise par l'expression de caractéristiques physiologiques mais aussi morphologiques qui sont propres à la femelle. Cela peut se traduire par des signaux sensoriels divers. L'olfaction est souvent impliquée dans cette phase d'attractivité, en effet la femelle va émettre des odeurs caractéristiques afin d'attirer le mâle et de stimuler son comportement sexuel. Ces composés olfactifs sont notamment des phéromones, c'est-à-dire des substances sécrétées par un individu qui lorsqu'elles seront perçues par un autre individu de la même espèce pourront induire une réponse physiologique et comportementale spécifique (Karlson et al., 1959). Chez les ovins, on sait ainsi qu'une molécule présente dans l'urine de brebis en œstrus induit une hausse de l'intérêt porté par le bélier (Stevens et al., 1982). Mais d'autres modalités sensorielles peuvent être impliquées dans cette phase d'attractivité comme l'ouïe ou encore la vue. Chez certaines espèces d'oiseaux, on observe en effet que la femelle

possède un chant particulier permettant d'attirer les mâles en vue de se reproduire (Langmore et al., 1996). Enfin des modifications morphologiques peuvent également être des facteurs d'attractivité du mâle, ainsi on observe chez certaines races de singes un gonflement associé à une coloration de la zone ano-génitale communiquant au partenaire sexuel l'état de réceptivité de la femelle (Waite et al., 2006).

La seconde phase ou phase de proceptivité est caractérisée par une recherche active du mâle par la femelle, la femelle montre souvent une hausse de son activité locomotrice, des postures et/ou des séquences comportementales stéréotypées. La femelle cherche alors la proximité du mâle allant parfois jusqu'à lui asséner des coups de tête comme observé chez les ovins (Beach, 1976). Dans certaines espèces comme les caprins par exemple, la femelle exprimera également des comportements de cour typiques du mâle comme la monte, que ce soit envers le mâle lui-même ou envers d'autres femelles. Ces comportements permettent d'intensifier l'excitation sexuelle du mâle et ainsi de stimuler son comportement de monte.

La dernière phase du comportement sexuel femelle est la phase de réceptivité, elle correspond à l'acceptation de la monte de la femelle par le mâle et l'adoption de postures favorisant la copulation. Cela se traduit par une immobilisation de la femelle chez les ruminants et les porcins par exemple. Chez les rongeurs la femelle adopte une posture particulière appelée lordose se traduisant par une courbure du dos, une déviation de la queue et une extension des pattes arrières, ce qui facilite l'intromission par le mâle.

Ce comportement sexuel est synchronisé avec le cycle œstrien afin que la copulation puisse avoir lieu durant la période péri-ovulatoire, là où les chances de fécondation sont les plus élevées. Le comportement d'œstrus est ainsi régulé par les hormones stéroïdes, en particulier par le pic d'œstradiol précédant le pic pré-ovulatoire de LH. Chez certaines espèces comme le mouton, l'expression du comportement sexuel nécessite néanmoins une imprégnation préalable à la progestérone. En effet chez la brebis ovariectomisée, le traitement conjoint à l'œstradiol et à la progestérone permet d'induire entre 80% et 100% d'œstrus alors que l'œstradiol seul ne permet d'induire qu'entre 17% et 45% d'œstrus (Robinson, 1954).

(4) Les prostaglandines

S'il n'y a pas eu de conception au cours du cycle ovarien, en fin de phase lutéale l'endomètre utérin sécrète de la prostaglandine F2 α (PGF2 α), qui induit rapidement la lutéolyse (régression du corps jaune) associée à une diminution brutale des niveaux de progestérone. On observe alors le démarrage d'un nouveau cycle œstrien.

II. La transition pubertaire

La transition pubertaire est une période critique dans le développement d'un individu puisque c'est le moment où il acquiert la capacité physiologique à se reproduire (production de gamètes matures) mais c'est également le moment où il commence à exprimer un comportement sexuel adapté (comportement de cour, monte pour le mâle ou encore lordose pour la femelle rongeur). Cela est la conséquence d'une réactivation de l'axe gonadotrope resté quiescent depuis l'enfance.

A. Les signes de la transition pubertaire

Le terme puberté vient du latin *pubes, puberis* signifiant « à qui le poil commence à venir » ; si le développement de la pilosité est une caractéristique de la transition pubertaire ne concernant que l'espèce humaine, le terme de puberté est utilisé pour toutes les autres espèces animales. Derrière le terme de puberté, on considère l'ensemble des événements menant à l'acquisition de la capacité de reproduction d'un individu ainsi que les modifications physiologiques, morphologiques et comportementales associées. On caractérise donc la puberté à la fois par la production de gamètes matures, le développement des caractères sexuels secondaires et l'expression d'un comportement sexuel adéquat. Ces divers phénomènes inclus dans le terme de puberté mènent à une multiplicité des possibilités de mesure et de caractérisation de la transition pubertaire.

Un des moyens les plus simples de caractériser le niveau de maturité sexuelle d'un individu est d'observer l'apparition des caractères sexuels secondaires. Selon les espèces, ces modifications corporelles sont plus ou moins marquées, menant souvent à un dimorphisme sexuel évident entre mâles et femelles. Ces caractères sexuels secondaires sont dans la majorité des cas l'apanage des mâles et sont plus ou moins développés selon les espèces (Figure 8). Parmi les cas les plus remarquables, le développement de la crinière du lion mâle, la coloration de l'abdomen chez le mâle araignée-paon, le développement des bois chez le cerf ou encore la crête turgescence et les barbillons rouges vifs du coq (Figure 8).



Figure 8. Les caractères sexuels secondaires, un moyen de détermination du niveau de maturité sexuelle d'un individu.

Chez l'Homme, l'évaluation du développement de ces caractères sexuels secondaires est la méthode la plus utilisée pour suivre la transition pubertaire des individus, en effet c'est une méthode non-invasive et facile à mettre en place. Le suivi de la puberté se fait ainsi, pour l'homme et la femme, selon les chronologies établies en 1969 et 1970 par Tanner et Marshall (Marshall and Tanner, 1969). Chez la femme, on suit ainsi l'âge à la thélarche (développement des seins) et à la pubarche (apparition de la pilosité pubienne) mais le critère le plus précis pour déterminer l'âge à la puberté d'une jeune fille reste l'âge à la ménarche, c'est-à-dire l'âge des premières menstruations. Chez l'homme, on suit essentiellement les volumes testiculaires qui sont multipliés par 5 au cours de la transition pubertaire.

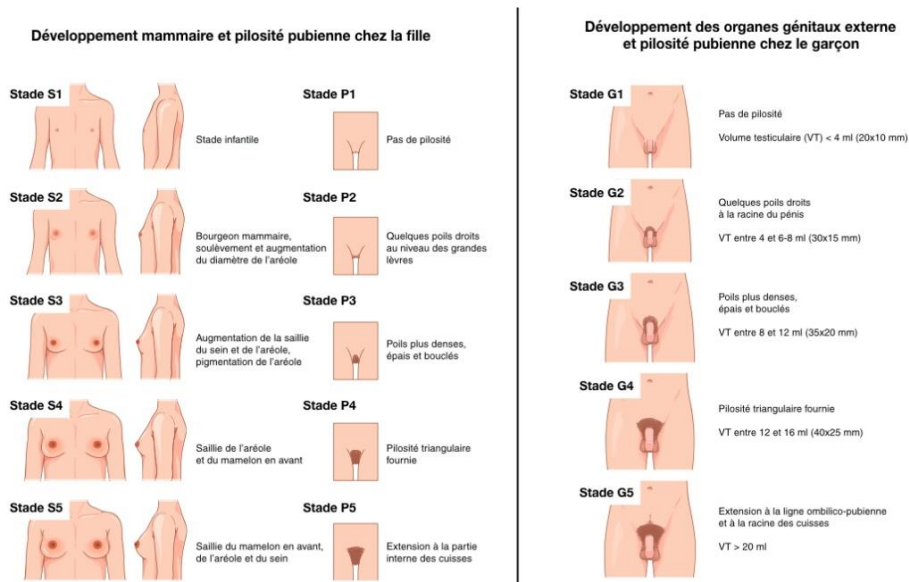


Figure 9. Echelle de Tanner pour le suivi de la transition pubertaire chez la jeune fille et le jeune garçon.

(d'après Bouvattier and Pienkowski, 2014)

Le suivi de l'acquisition de ces caractères sexuels secondaires permet un bon suivi de la transition pubertaire car ils sont le reflet de la hausse de la sécrétion des hormones stéroïdes. Ainsi la hausse des niveaux en œstrogènes initie le développement mammaire mais est aussi responsable du pic de croissance observé au moment de la transition pubertaire. Mais si ces caractéristiques sont très faciles à évaluer, elles ne sont valables que pour l'espèce humaine. Pour les autres espèces animales il existe cependant de nombreuses autres façons de déterminer l'âge à la puberté des femelles. Ainsi chez les rongeurs le critère le plus communément utilisé est l'âge à l'ouverture vaginale, puisque la membrane recouvrant le vagin va être la cible d'un phénomène d'apoptose dépendant des œstrogènes (Rodriguez et al., 1997). C'est un moyen facile, rapide et non-invasif permettant le suivi de la transition pubertaire chez les rongeurs (Figure 10). Néanmoins, tous ces critères sont des indicateurs indirects de la transition pubertaire, l'apparition des caractères sexuels secondaires comme l'ouverture vaginale sont des processus plus ou moins longs pas toujours étroitement corrélés à d'autres marqueurs de la puberté comme la première ovulation.



Figure 10. L'ouverture vaginale, un moyen non invasif pour déterminer l'âge à la puberté des rongeurs.

(Nah et al., 2011)

Ainsi chez la femme, on sait que les premières menstruations ont lieu dans les 2 à 3 années suivant l'apparition des premiers caractères sexuels secondaires. Pour ce qui est de l'ouverture vaginale, on observe le même manque de corrélation avec l'âge à la première ovulation chez la souris puisque l'euthanasie de femelles le jour même de leur ouverture vaginale ne permet pas de mettre en évidence l'ovulation chez ces souris (Safranski et al., 1993).

L'évaluation de l'état de maturité sexuelle des animaux peut également se faire par la détection du 1^{er} œstrus. Chez les rongeurs cela se fait le plus souvent par la réalisation de frottis vaginaux réguliers afin de récupérer des cellules de l'épithélium utérin, selon la phase du cycle les populations cellulaires ne seront pas les mêmes et permettront ainsi à l'utilisateur de

déterminer dans quelle phase se trouve chaque animal et ainsi de dater le 1^{er} œstrus. Des critères peuvent également être appliqués dans la détection de la transition pubertaire comme l'expression du comportement d'œstrus ou de manière plus restrictive la date à la première acceptation de la monte par un mâle. Néanmoins, comme pour le suivi morphologique, le suivi comportemental est une méthode indirecte et n'est pas toujours étroitement corrélé avec la première ovulation. On sait en effet, que chez de nombreuses espèces les premières ovulations peuvent être silencieuses c'est-à-dire qu'elles ne sont pas accompagnées d'un comportement d'œstrus. On observe cette configuration aussi bien chez les ruminants (bovins : Swanson et al., 1972 ; ovins : Chu and Edey, 1978 ; Foote et al., 1970 ; caprins : Zarazaga et al., 2009), que chez les petit carnivores (chien : D. E. Wildt et al., 1981) ou encore les porcins (Eliasson, 1989). Par ailleurs, l'étude du comportement d'œstrus ou d'acceptation de la monte nécessite la présence d'un mâle au sein du groupe de femelles, ce qui est incompatible avec les expérimentations où une partie ou la totalité des femelles étudiées doivent être isolées de tout stimuli du mâle qu'il soit visuels, olfactifs ou auditifs.

Le suivi des modifications morphologiques et/ou comportementales ayant lieu au moment de la puberté permet donc un suivi facile et non-invasif de la transition pubertaire mais ne permet pas de dater cette puberté avec précision. Le moyen le plus précis de dater l'entrée en puberté d'un individu et de suivre sa production de gamètes, première éjaculation contenant des spermatozoïdes pour le mâle et première ovulation pour la femelle. La détection de la première ovulation peut se faire de plusieurs manières, par échographie ou via des dosages hormonaux, par exemple le dosage de la progestérone. L'échographie permet de suivre la croissance du follicule jusqu'à l'ovulation mais aussi le développement du corps jaune, l'avantage de cette méthode est qu'elle permet de savoir lequel des deux ovaires a ovulé mais aussi de connaître le taux d'ovulation ce qui est intéressant à connaître pour les espèces poly-ovulantes. Mais le suivi échographique nécessite un matériel précis et adapté à l'espèce d'intérêt mais également la présence d'un manipulateur habitué à la lecture des images échographiques.

Enfin, le suivi du statut reproducteur d'un individu peut également se faire via un suivi de ses niveaux hormonaux. En effet on sait qu'au moment de la transition pubertaire il y a, chez la femelle, réactivation de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien. Le suivi des hormones impliquées dans la régulation de cet axe nous permet donc de savoir si un individu est sexuellement mature ou non. Le couple GnRH/LH et la progestérone sont les hormones les plus souvent utilisées dans le suivi de la transition pubertaire. En effet on sait qu'à la puberté il y a

une hausse de la sécrétion pulsatile de GnRH et par conséquent de LH, comme expliqué précédemment. Le suivi de la GnRH est rendu difficile par son site de sécrétion et sa demi-vie très courte, mais la sécrétion de LH est le reflet quasi-parfait de la sécrétion de GnRH. Le suivi seul de la LH est donc suffisant à caractériser l'entrée en puberté. Chez la brebis par exemple, on observe une forte augmentation de la sécrétion pulsatile de LH la semaine de la première ovulation (Figure 11, FP) de l'individu et la semaine précédant cette ovulation (Figure 11, 1), on observe également sur ces graphiques que la sécrétion de FSH est quant à elle diminuée mais la modification du profil de sécrétion est plus facilement détectable pour la LH (Huffman et al., 1987).

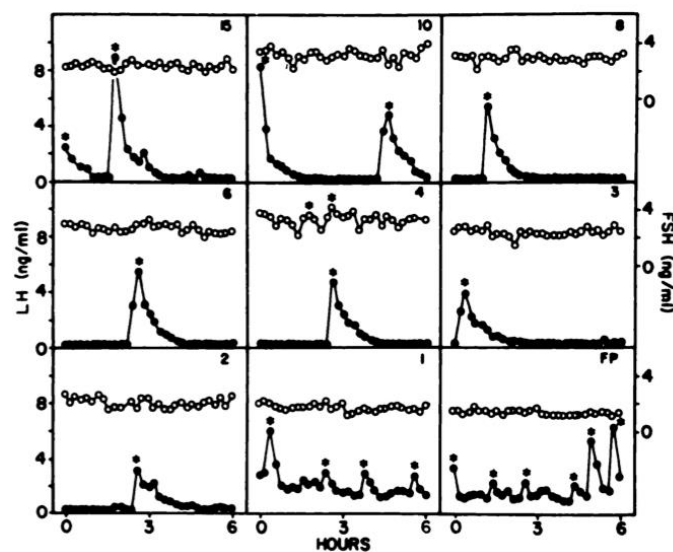


Figure 11. Concentration en LH (•) et en FSH (○) chez une brebis pendant la période prépubertaire et au moment de la transition pubertaire. FP désigne la semaine de l'ovulation et les semaines précédant la puberté sont indiquées par les numéros en haut de chaque graphe. Les astérisques indiquent des pulses de LH. (Huffman et al., 1987)

De par sa sécrétion pulsatile, la détection de la transition pubertaire par la LH nécessite la réalisation de prises de sangs sériées de manière régulière. L'autre hormone couramment utilisée pour caractériser l'état physiologique d'un individu est la progestérone. En effet, étant sécrétée par le corps jaune, une hausse des taux circulants de progestérone est le signe qu'il y a eu ovulation. Chez l'individu impubère, la progestérone reste ainsi basse et à des taux relativement constants jusqu'au moment de la transition pubertaire où on observera alors une forte hausse des niveaux de progestérone correspondant à la première ovulation (Andersson et al., 1983; Fitzgerald and Butler, 1982). Ces paramètres font de la progestérone un excellent marqueur de la transition pubertaire.

B. La réactivation de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien (HHO) : évènement déclencheur de la transition pubertaire

La transition pubertaire est la conséquence d'une réactivation de l'axe HHO, néanmoins on observe que cet axe va connaître deux périodes d'activité bien avant la période péri-pubertaire : durant la vie fœtale et la vie néonatale.

1) Phases d'activité fœtale et néonatale de l'axe HHO

Chez la femelle comme chez le mâle, on observe à partir du 2^e tiers de la gestation une activation de l'axe gonadotrope stimulant le développement des organes génitaux et participant à la différenciation sexuelle. Ainsi chez le rat on observe chez le fœtus femelle une hausse importante des taux plasmatiques de LH entre J19 et J21 de gestation, passant de 2ng/mL à plus de 25ng/mL (Slob et al., 1980). Chez l'homme comme chez le mouton, on observe également chez le fœtus femelle une hausse des taux circulants de LH et de FSH à mi-gestation (Siler-Khodr and Khodr, 1980; Sklar et al., 1981). Ces taux vont ensuite diminuer jusqu'à la naissance de par la maturation de l'axe HHO aboutissant à la mise en place de son rétro-contrôle négatif.

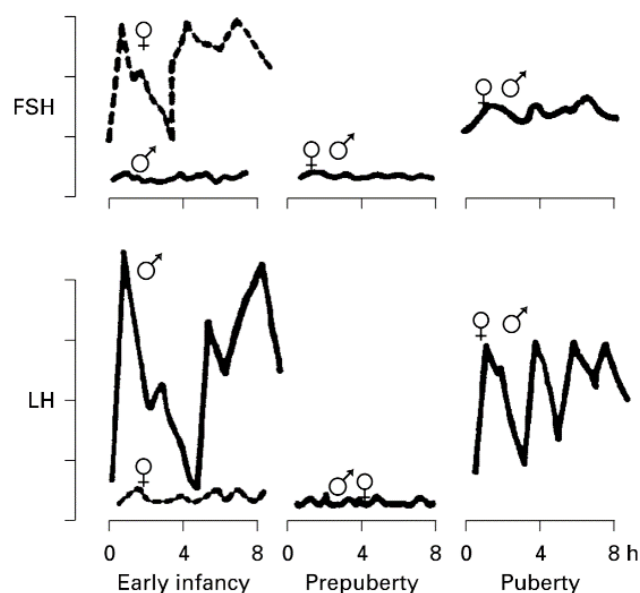


Figure 12. Profils de sécrétion pulsatile de LH et de FSH, de la petite enfance à la puberté, chez la jeune fille et le jeune garçon.

(Grumbach, 2002)

Peu après la naissance on observe une réactivation de l'axe gonadotrope, à ce moment les concentrations en hormones gonadotropes du jeune sont comparables à celles de l'adulte (Figure 12). Ce phénomène est qualifié de mini-puberté, et si à l'heure actuelle les mécanismes régulant cette mini-puberté ne sont pas encore élucidés, le phénomène a été caractérisé chez de nombreuses espèces animales. L'une des hypothèses de cette mini-puberté est une levée de l'inhibition des œstrogènes sur la sécrétion de gonadotropines. En effet, au moment de la naissance, la concentration plasmatique en œstradiol du nouveau-né diminue de manière drastique puisque ce dernier ne reçoit plus, via le cordon ombilical, l'œstradiol maternel. Cette chute est à l'origine d'une réactivation transitoire de l'axe HHO chez la jeune (Kuiri-Hänninen et al., 2014). On observe ainsi que les concentrations en LH et FSH sont plus élevées chez la souris au stade juvénile qu'à un stade pré-pubertaire tardif (Dullaart et al., 1975). Des résultats similaires sont observables chez la petite fille (Winter et al., 1975) et l'agnelle (Foster et al., 1975) avec une sécrétion augmentée des gonadotropines autour de l'âge de 2/3 mois. Si le rôle de cette mini-puberté dans la mise en place de la fonction de reproduction est encore méconnu, on sait qu'elle participe à la maturation des cellules germinales. Au cours de cette période, on peut remarquer une croissance des organes génitaux, et chez la petite fille une augmentation de la taille de l'utérus et un début de développement mammaire (Kuiri-Hänninen et al., 2014). Après cette phase de réactivation néonatale, l'axe HHO va rester quiescent jusqu'au moment de la transition pubertaire (Figure 12).

2) Réactivation de l'axe HHO à la puberté

Si la puberté est un évènement important dans la vie d'un individu, malgré des décennies de recherche, le mécanisme précis de la transition pubertaire reste méconnu. Comment le déclenchement de la puberté est-il régulé ? Quelles hormones sont impliquées dans la réactivation de l'axe HHO quiescent depuis la petite enfance ? Néanmoins la découverte en 2003 du rôle crucial de la kisspeptine pour la mise en place de la puberté (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003) a considérablement amélioré notre compréhension de ce phénomène.

Historiquement, deux théories ont été évoquées afin de comprendre la transition pubertaire, l'une reposant sur un rôle prépondérant des œstrogènes en tant qu'inhibiteur de l'axe HHO, c'est l'hypothèse du « gonadostat ». L'autre théorie propose un contrôle central avec comme mécanisme clé l'activation des neurones à GnRH.

(1) La théorie du gonadostat

Cette hypothèse propose que chez les individus juvéniles, la sécrétion de LH est réprimée via un rétro-contrôle négatif des œstrogènes en faible quantité et qu'au moment de la transition pubertaire, il y a une baisse au niveau hypothalamique de la sensibilité à cette inhibition induisant ainsi une hausse de la sécrétion de GnRH et donc de LH (Figure 13).

Cette théorie a été évoquée pour la première fois en 1963 par Ramirez et McCann. Ces derniers ont montré que les doses d'œstradiol provoquant une baisse de la sécrétion de LH chez de jeunes rates ovariectomisées étaient 2 à 3 fois inférieures aux doses nécessaires à une réaction semblables chez des femelles adultes ovariectomisées (Ramirez and McCann, 1963). Il semble donc que les rates impubères soient plus sensibles au rétro-contrôle négatif par l'œstradiol que les adultes. Cette théorie a été confortée par des études réalisées chez d'autres espèces comme le mouton qui ont également démontré une baisse de la sensibilité aux œstrogènes au moment de la transition pubertaire (Foster and Ryan, 1979).

Cette hypothèse suppose donc que la gonadectomie d'un individu sexuellement immature supprimerait le rétro-contrôle des œstrogènes et induirait donc une hausse de la sécrétion de GnRH et de LH. Or des travaux menés sur des singes rhésus ont mis en évidence qu'une ovariectomie n'induisait de hausse des niveaux de LH que chez les individus ayant déjà démarré leur transition pubertaire. Aucune modification des taux de LH circulants n'a été observée chez les femelles prépubères ovariectomisées (Chongthammakun et al., 1993). La théorie du gonadostat ne permet donc pas à elle seule d'expliquer le mécanisme déclencheur de la puberté, une composante indépendante des stéroïdes sexuels semble être également impliquée dans la régulation de ce moment clé.

(2) La théorie de la maturation centrale

Dans ce modèle, la transition pubertaire est initiée par une réorganisation au niveau hypothalamique d'un « centre régulateur de la puberté » lié au circuit de neurones à GnRH. En effet, si les neurones à GnRH sont présents dans l'hypothalamus avant même la naissance (Paulin et al., 1977), ils ne sécrètent chez les individus immatures que de faibles quantités de GnRH (Watanabe and Terasawa, 1989). Des études ont par ailleurs montré que l'injection de GnRH permettait d'induire la puberté chez des individus immatures (Loose and Terasawa, 1985; Wildt et al., 1980). D'autres équipes ont mis en évidence que la stimulation électrique des neurones à GnRH ou via l'injection d'un neurotransmetteur excitateur pouvait également

induire une puberté précoce (Moll et al., 1976; Urbanski and Ojeda, 1987). Dans ce modèle, c'est donc la levée d'un signal inhibiteur et/ou une augmentation d'un signal stimulateur sur la population de neurones à GnRH qui est à l'origine de l'initiation de la puberté (Figure 13). Si les mécanismes précis impliqués dans cette réorganisation du « centre régulateur de la puberté » restent méconnus, on sait que leur action est indépendante des gonades. Et en effet, on observe que chez le singe rhésus, même en l'absence de stéroïdes sexuels suite à une ovariectomie précoce, on détecte une hausse de la sécrétion pulsatile de la GnRH, signe d'une initiation de la transition pubertaire (Chongthammakun et al., 1993).

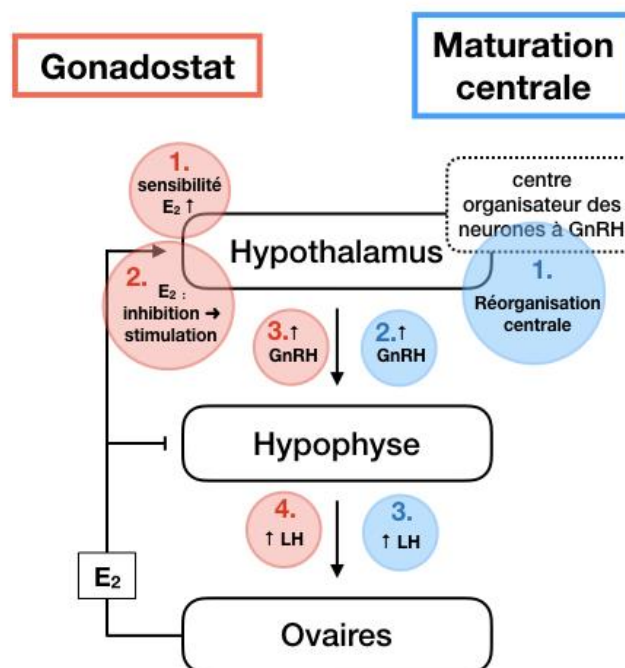


Figure 13. Les deux théories de la transition pubertaire : gonadostat et maturation centrale.

Néanmoins, ces deux théories ne s'excluent pas mutuellement et pourraient coexister chez un certain nombre d'espèces animales. L'importance relative de chacun de ces deux mécanismes variant selon les espèces (Goodman, 2015).

C. Contrôle hypothalamique de la transition pubertaire

Si la puberté est un événement crucial dans le développement d'un individu, le mécanisme déclencheur de cette transition pubertaire reste méconnu. Néanmoins tous s'accordent à désigner l'hypothalamus comme le centre initiateur et régulateur de la transition pubertaire. L'hypothalamus est une structure complexe composée de nombreux noyaux (Figure 14) et de populations neuronales très diverses.

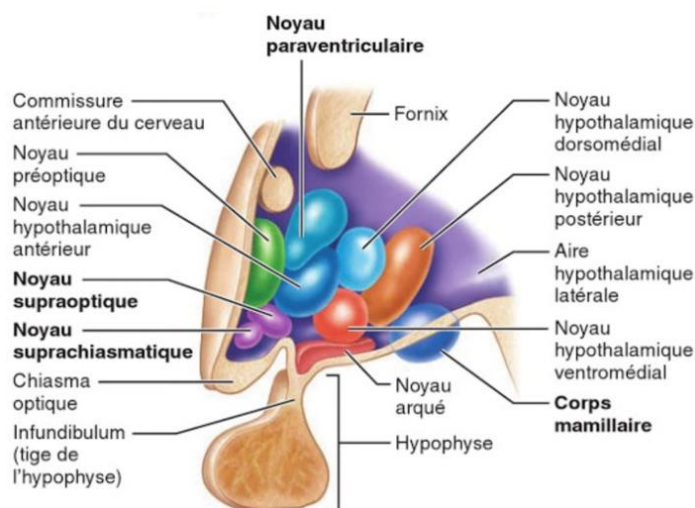


Figure 14. Les principaux noyaux hypothalamiques.

(Marieb, 1999)

1) Au cœur de la transition pubertaire : les neurones à GnRH

Les neurones à GnRH jouent un rôle central dans la transition pubertaire, comme expliqué précédemment. On sait que l'injection de GnRH chez des individus immatures permet d'induire la puberté (Loose and Terasawa, 1985; Wildt et al., 1980). Par ailleurs, les études de cas pathologiques d'individus présentant un défaut de la transition pubertaire a pu apporter de nouvelles connaissances sur les modalités de régulation de la GnRH sur la fonction de reproduction. Ainsi il a été observé qu'une anomalie du système à GnRH, que ce soit un défaut de sécrétion, une anomalie de la migration des neurones depuis la placode olfactive (Syndrome de Kallmann), ou encore une mutation perte de fonction des GnRHR, est associée à un hypogonadisme hypogonadotrope. Ces individus présentent en effet des gonades sous-développées, de très faibles taux circulants de gonadotropines et un défaut de transition pubertaire (Dodé and Hardelin, 2009; Mason et al., 1986). Néanmoins ce phénotype est réversible, un traitement à la GnRH permet en effet de provoquer un retour à des taux normaux

de LH, FSH et œstradiol après quelques jours de traitement seulement, aboutissant à une ovulation en moins de 20 jours (Abel et al., 2013).

- Localisation des neurones à GnRH

Chez l'adulte, les neurones à GnRH se retrouvent principalement au niveau de l'aire pré-optique (APO) et de l'hypothalamus médio-basal (HMB), la distribution relative entre ces deux régions variant selon l'espèce. Chez les rongeurs, ces neurones sont dispersés mais se retrouvent principalement dans l'APO avec une forte densité de cellules observées autour de l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT), quelques neurones sont observés plus antérieurement au niveau de la bande diagonale de Broca mais aussi plus postérieurement au niveau de l'aire hypothalamique antérieure (Figure 15.1 ; Iremonger and Herbison, 2014). Chez les caprins comme les ovins, on retrouve de grandes similarités quant à la distribution hypothalamique des neurones à GnRH, avec un nombre important de corps cellulaires à GnRH observés autour de l'OVLT (Figure 15.2; Zuccolilli et al., 1994; Caldani et al., 1988). Les neurones émettent de nombreuses projections vers l'émence médiane (EM) où la GnRH sera libérée dans le sang porte hypophysaire.

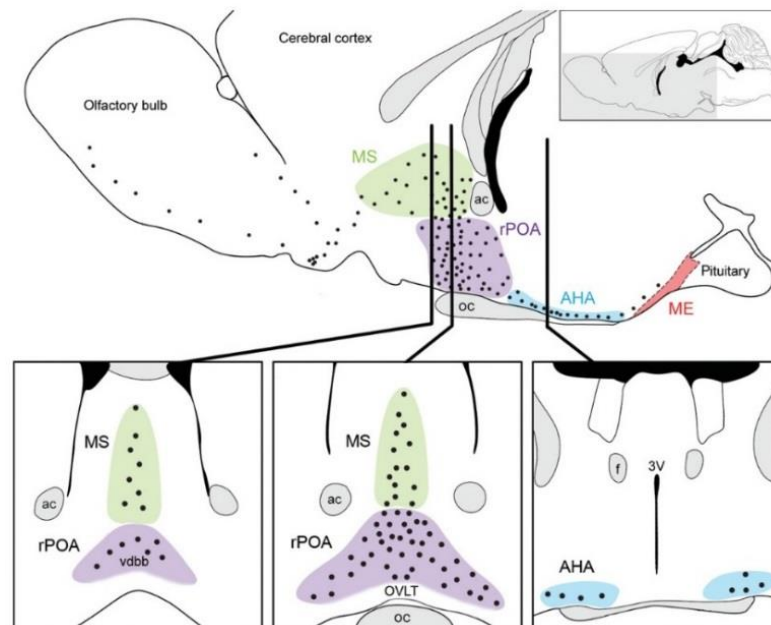


Figure 15.1. Représentation schématique de la distribution des neurones à GnRH dans le cerveau de souris adulte. ac : commissure antérieure ; AHA : aire hypothalamique antérieure ; f : fornix ; ME : éminence médiane ; MS : septum médian ; oc : chiasma optique, OVLT : organe vasculaire de la lame terminale ; rPOA : aire pré-optique rostrale ; vdbb : aspect ventral de la bande diagonale de Broca ; 3V : 3^e ventricule . (Iremonger and Herbison, 2014)

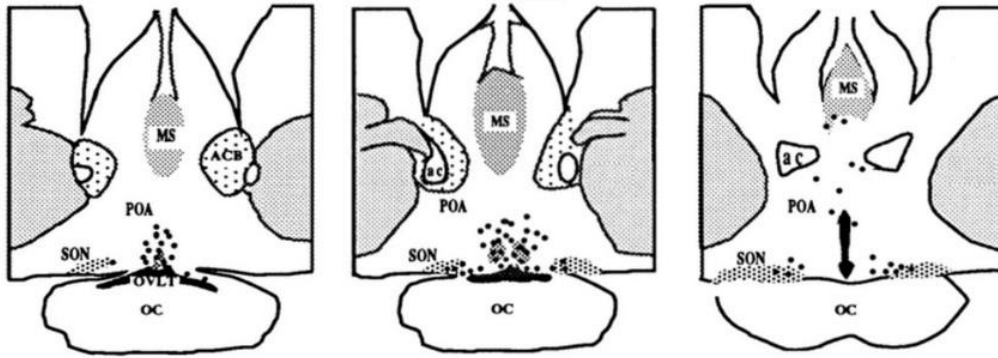


Figure 15.2. Représentations schématiques de la distribution des neurones à GnRH dans l'hypothalamus caprin. ac : commissure antérieure ; ACB : noyau accumbens ; MS : septum médian ; OC : chiasma optique, OVLT : organe vasculaire de la lame terminale ; POA : aire pré-optique ; SON : noyau supra-optique. (Zuccolilli et al., 1994)

- Maturation du système à GnRH au cours de la transition pubertaire

Les neurones à GnRH sont donc présents dans l'hypothalamus bien avant le début de la puberté ; néanmoins, au moment de la transition pubertaire on observe un remodelage morphologique des neurones à GnRH. Chez le jeune prépubère, un nombre important de neurones à GnRH présentent une morphologie complexe avec de multiples dendrites. Au cours de la maturation sexuelle, ces neurones vont peu à peu acquérir leur forme mature, c'est-à-dire des neurones unipolaires et bipolaires. Ces neurones matures vont également présenter un nombre accru d'épines dendritiques (Cottrell et al., 2006; Wray and Hoffman, 1986). Ces dernières sont le lieu de contacts synaptiques avec d'autres neurones ; l'augmentation de leur nombre pourrait suggérer une plus grande excitabilité des neurones à GnRH au moment du déclenchement pubertaire. Néanmoins, on ne sait toujours pas comment se fait la réactivation des neurones à GnRH au moment de la puberté, si cela est dû à une baisse d'un facteur inhibiteur ou à l'augmentation d'un facteur excitateur. En effet, les neurones à GnRH reçoivent des afférences de multiples populations neuronales, on estime que chaque neurone à GnRH est connecté à environ 5 millions d'autres neurones parmi lesquels les neurones GABAergiques et les neurones glutamatergiques. Des études ont montré chez le singe Rhésus que le blocage des récepteurs GABA de type A mais non de type B induisait une hausse de la sécrétion de LH aboutissant à une puberté précoce (Keen et al., 1999; Mitsushima et al., 1994). Les neurones GABAergiques ont donc un rôle inhibiteur sur la sécrétion de GnRH et inhibent la transition pubertaire chez le jeune immature. En parallèle, une action stimulatrice du glutamate sur la

sécrétion de GnRH a été observée et un traitement au glutamate est efficace pour induire une puberté précoce chez le rat femelle (Smyth and Wilkinson, 1994; van den Pol and Trombley, 1993).

Récemment, des chercheurs ont également décelé des modifications morphologiques de l'environnement des neurones à GnRH au cours de la maturation sexuelle. Ainsi ils ont pu montrer qu'au moment du pic pré-ovulatoire de GnRH, une population de cellules gliales spécialisées bordant le 3^e ventricule (les tanycytes) présente des modifications de leur conformation. Ces modifications vont permettre, à cette période précise, un contact direct des terminaisons des neurones à GnRH avec le système porte-hypophysaire, ce qui pourrait faciliter la libération de la GnRH à ce moment critique de la transition pubertaire (Ojeda et al., 2003).

Ainsi, les neurones à GnRH sont au centre du processus de transition pubertaire et leur réactivation en est l'élément déclencheur. Ces neurones recevant de très nombreuses afférences, de nombreux facteurs peuvent potentiellement réguler leur activité. En réalité, peu de mutations associées à ces modulateurs de la puberté entraînent un phénotype d'hypogonadisme hypogonadotrope montrant que leur implication dans la maturation sexuelle n'est pas critique. Cependant, récemment, le rôle crucial dans la puberté d'une autre population neuronale, les neurones à kisspeptine, a été mis en évidence amenant des réponses mais aussi de nouvelles questions quant aux mécanismes déclencheurs de la puberté.

2) Importance du système à kisspeptine et des neurones KNDy

Depuis les années 2000, notre compréhension de la transition pubertaire et de sa régulation progresse et cela est dû en grande partie à la découverte au niveau de l'hypothalamus de certaines espèces, des neurones KNDy ou neurones à kisspeptine/neurokinine B/dynorphine. Ces récentes études ont pu mettre en évidence leur rôle clé dans la fonction de reproduction, que ce soit dans la modulation de la sécrétion pulsatile de LH au cours du cycle œstrien chez l'individu mature ou encore dans la régulation de la transition pubertaire.

(1) Les neurones à kisspeptine (Kp)

Le gène codant pour la kisspeptine *KISS1*, a été découvert dès 1996 par une équipe américaine pour son rôle de suppresseur de tumeur (Lee et al., 1996). Néanmoins son rôle dans la régulation de la fonction de reproduction n'a été mis en évidence qu'en 2003 par deux équipes, l'une française et l'autre américaine. Les deux équipes ont découvert simultanément l'implication du système à kisspeptine dans certains cas d'hypogonadisme hypogonadotrope. Ils ont ainsi mis en évidence qu'une mutation naturelle ou induite causant une perte de fonction du récepteur à la kisspeptine, le GPR54 provoque, chez l'Homme comme chez le rongeur, une altération de la maturation sexuelle (de Roux et al., 2003; Seminara et al., 2003). Depuis de nombreux travaux ont été menés sur le système à kisspeptine et son rôle dans la fonction de reproduction. Ils ont ainsi montré que l'injection intracérébroventriculaire de kisspeptine permet d'induire une libération de LH comme de GnRH chez le mouton (Messenger et al., 2005). La kisspeptine est à ce jour le plus puissant sécrétagogue connu de la GnRH. L'injection de kisspeptine peut également provoquer une puberté précoce chez le rat (Navarro et al., 2004) alors que des souris invalidées pour le gène *Kiss1* présentent un phénotype d'hypogonadisme hypogonadotrope (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007). Par ailleurs, si l'injection de kisspeptine permet d'induire une forte sécrétion de LH chez les souris *Kiss1* KO, ce n'est pas le cas pour les souris *GPR54* KO (d'Anglemont de Tassigny et al., 2007; Lapatto et al., 2007). Le kisspeptine semble donc être modulateur majeur des neurones à GnRH.

- Localisation des neurones à kisspeptine et de son récepteur GPR54

Comme pour les neurones à GnRH, les neurones à kisspeptine sont localisés dans l'hypothalamus. Deux populations distinctes de neurones à kisspeptine différant à la fois sur leur localisation mais aussi sur leur rôle dans la régulation de la fonction de reproduction ont été mises en évidence. Ainsi chez un grand nombre de mammifères, la majorité des cellules à kisspeptine se distribuent entre le noyau arqué de l'hypothalamus (ARC) et une région plus antérieure, l'AVPV pour les rongeurs, l'APO pour les petits ruminants et les primates (Clarkson et al., 2009b; Decourt et al., 2008; Franceschini et al., 2006; Ramaswamy et al., 2008; Smith et al., 2008; Wakabayashi et al., 2010). Les fibres à kisspeptine sont observées dans de nombreuses régions cérébrales dont les régions contenant des corps cellulaires à kisspeptine mais aussi au niveau de l'éminence médiane (Smith et al., 2011). Cette juxtaposition des

neurones à kisspeptine et des neurones à GnRH, pourrait permettre une action régulatrice directe de la kisspeptine sur ces derniers. On sait d'ailleurs que la ségrégation entre ces deux populations de neurones à kisspeptine n'est pas seulement spatiale mais aussi fonctionnelle, les deux modes de sécrétion de la GnRH (surge mode et pulse mode) seraient ainsi contrôlés différemment par ces deux populations neuronales. Ainsi, les neurones à kisspeptine de l'APO seraient à l'origine du déclenchement du pic pré-ovulatoire de GnRH (surge mode) alors que ceux de l'ARC réguleraient sa sécrétion pulsatile au cours du cycle (pulse mode). On sait en effet que l'administration d'un antagoniste de la kisspeptine au niveau de l'ARC induit une baisse de la sécrétion pulsatile de LH chez le rat (Li et al., 2009). On sait aussi que chez les rongeurs, les neurones à kisspeptine de l'APO sont impliqués dans le rétro-contrôle positif par l'œstradiol et jouent donc un rôle dans la stimulation du pic pré-ovulatoire de GnRH (Kinoshita et al., 2005; Smith et al., 2005).

Le récepteur de la kisspeptine est le GPR54, un récepteur couplé aux protéines G ; il est exprimé majoritairement au niveau cérébral. En périphérie, il est aussi exprimé par quelques organes parmi lesquels l'ovaire (Castellano et al., 2006). Au vu de l'effet de la kisspeptine sur la sécrétion de GnRH, la présence du récepteur GRP54 sur les neurones à GnRH a été examinée. Les résultats obtenus chez les rongeurs et chez les ovins montrent que la majorité des neurones à GnRH, entre 70 et 90%, expriment le GPR54, signe de l'importance du signal kisspeptine dans la régulation de la sécrétion de GnRH (Irwig et al., 2004; Li et al., 2011; Smith et al., 2009).

Il est important de remarquer qu'il existe, chez les rongeurs, un dimorphisme sexuel des populations de neurones à kisspeptine, qui ne concerne toutefois que la population la plus antérieure. Ainsi, chez les rongeurs, au niveau de l'AVPV, les femelles présentent un nombre plus élevé de neurones à kisspeptine que les mâles (Clarkson and Herbison, 2006). Ce dimorphisme sexuel semble se mettre en place très tôt dans la vie d'un individu, au cours de la période périnatale sous l'influence des effets organisationnels de stéroïdes sexuels. En effet le traitement néonatal aux androgènes de jeunes rates induit une masculinisation de la population de neurones à kisspeptine de l'AVPV se traduisant par une forte diminution du nombre de cellules immunoréactives à l'âge adulte (Kauffman et al., 2007). De manière symétrique, la castration précoce chez un rat mâle provoque une hausse importante du nombre de cellules à kisspeptine dans l'AVPV, la testostérone sécrétée en période péri-natale permet donc une déféminisation du système à kisspeptine de l'AVPV (Homma et al., 2009).

- Maturation du système à kisspeptine au cours de la transition pubertaire

De nombreux travaux ont mis en évidence l'importance du système kisspeptine/GPR54 dans la régulation centrale de la fonction de reproduction, en particulier au moment de la transition pubertaire. A cette période, on observe chez la souris comme chez la brebis, une augmentation du nombre de neurones à kisspeptine dans l'hypothalamus rostral, davantage de neurones à GnRH exprimant le GPR54 mais aussi une hausse du nombre d'appositions de neurones à kisspeptine sur les neurones à GnRH (Clarkson and Herbison, 2006; Nestor et al., 2012). Il y a donc une maturation du système kisspeptine/GPR54/GnRH dans la période péri-pubertaire sensibilisant les neurones à GnRH à l'action de la kisspeptine.

Comme expliqué précédemment, les neurones à GnRH ne sont pas la cible directe du rétro-contrôle par les œstrogènes car ils expriment très rarement les récepteurs ER α . En revanche, environ 50% des neurones à GnRH expriment ER β . Par contre, les neurones à kisspeptine de l'ARC comme de l'AVPV sont nombreux à exprimer ces récepteurs. Ainsi, chez les rongeurs entre 50% et 90% des neurones à kisspeptine expriment ER α et entre 10% et 30% expriment ER β (Adachi et al., 2007; Smith et al., 2005). Chez la brebis, plus de 90% des neurones à kisspeptine de l'ARC contiennent des ER α contre 50% pour ceux de l'APO (Franceschini et al., 2006). La maturation du système à kisspeptine est donc potentiellement régulée par les œstrogènes. Cette hypothèse est confirmée par l'inactivation conditionnelle de l'ER α dans les neurones à kisspeptine qui engendre chez la souris une forte hausse de la sécrétion de LH mais également une puberté avancée de 20 jours (Mayer et al., 2010). Il semble donc que chez le jeune, l'œstradiol ait un rôle inhibiteur sur les neurones à kisspeptine. Il se pourrait qu'au moment de la transition pubertaire on observe une modification de la sensibilité des neurones à kisspeptine au signal inhibiteur de l'œstradiol. Cela serait responsable d'une augmentation de la sécrétion de kisspeptine entraînant à son tour une hausse de la sécrétion de GnRH déclenchant ainsi la cascade de réactivation de l'axe gonadotrope observé au moment de la puberté.

Cette maturation des neurones à kisspeptine est-elle similaire entre les deux populations ou l'une est-elle réactivée avant l'autre ? Chez la souris, on sait qu'au moment de la transition pubertaire on observe une forte hausse du nombre de cellules à kisspeptine au niveau de l'AVPV, le nombre de neurones à kisspeptine étant multiplié par 10 entre J15 et J30. Il a été montré que cette augmentation du nombre de cellules exprimant la kisspeptine était dépendante

des œstrogènes ; en effet, chez des individus précocement ovariectomisés, le nombre de cellules à kisspeptine ne varie pas entre J15 et J30. Les femelles ovariectomisées traitées à l'œstradiol présentant un nombre de neurones à kisspeptine similaires aux femelles contrôles (Clarkson et al., 2009a), il semblerait que la maturation péri-pubertaire des neurones à kisspeptine de l'AVPV soit sous la dépendance des œstrogènes. Ainsi, si la maturation des neurones à kisspeptine de l'AVPV dépend des niveaux d'œstradiol, c'est qu'elle est la conséquence chez la femelle d'une réactivation préalable de l'axe HHO. Les neurones à kisspeptine de l'ARC seraient donc les premiers à être réactivés, induisant une hausse de la sécrétion de GnRH et donc d'œstradiol. Cette augmentation des niveaux en œstradiol va alors induire la maturation finale du système à kisspeptine de l'AVPV, ce système étant le générateur des pics pré-ovulatoires de GnRH cela conduira à l'induction de la première ovulation.

Les deux populations de neurones à kisspeptine diffèrent donc par leur localisation au sein de l'hypothalamus, leur maturation au cours de la transition pubertaire, leur action sur le système à GnRH mais aussi par leur contenu. En effet, chez certaines espèces, la majorité des neurones à kisspeptine de l'ARC co-expriment deux autres neuropeptides : la neurokinine B et la dynorphine. Ces neurones sont les neurones KNDy et ne sont pas présents dans la population plus rostrale des neurones à kisspeptine (APO/AVPV).

(2) Les neurones à neurokinine B (NKB)

La neurokinine B est un neuropeptide de la famille des tachykinines, elle est synthétisée à partir du gène *Tac3* chez les ruminants et les primates et à partir du gène *Tac2* chez les rongeurs. Son implication dans le rétro-contrôle par les œstrogènes est connue depuis les années 1990, mais l'intérêt des neuroendocrinologues pour la neurokinine B a fortement augmenté en 2009, lorsque son rôle dans la transition pubertaire a été mis en évidence. Des chercheurs ont alors découvert qu'une mutation associée à une perte de fonction du gène codant pour la neurokinine B ou son récepteur, le NK3R, conduit à un hypogonadisme hypogonadotrope chez l'Homme (Topaloglu et al., 2009) mais pas chez la souris (Yang et al., 2012). Un traitement à la GnRH permet d'induire l'ovulation chez une femme de 23 ans atteinte d'une mutation du gène codant pour le NK3R et présentant une absence de puberté (pas de menstruation et peu de pilosité) (Young et al., 2010). Comme la kisspeptine, la neurokinine B est donc impliquée dans la régulation de la sécrétion de GnRH au cours de la transition pubertaire et du cycle oestrien, on considère que la NKB a une action stimulatrice de la sécrétion de GnRH.

- Localisation des neurones à neurokinine B et de son récepteur NK3R

Les neurones à NKB sont présents en majorité au niveau de l'ARC, cette population a été décrite chez de nombreuses espèces parmi lesquelles le rat (Marksteiner et al., 1992), le singe (Abel et al., 1999) et la chèvre (Wakabayashi et al., 2010). Mais des neurones à neurokinine B ont été détectés dans de nombreuses autres régions dont l'amygdale, l'aire pré-optique ou encore le noyau du lit de la strie terminale (Marksteiner et al., 1992). Chez le mouton, la plupart des neurones à kisspeptine de l'ARC co-expriment la neurokinine B mais ce n'est pas le cas des neurones à kisspeptine de l'APO (Goodman et al., 2007). Concernant les neurones à NKB de l'ARC, chez le rat la majorité des fibres projettent au niveau de l'éminence médiane et de l'AVPV (Krajewski et al., 2010; Marksteiner et al., 1992). Dans ces deux régions, on retrouve le récepteur à la neurokinine B, ce récepteur est exprimé au niveau des neurones KNDy (Goodman et al., 2007). Sa présence au niveau des neurones à GnRH reste plus discutée puisque le NK3R a pu être mis en évidence chez le rat au niveau de neurones à GnRH (Krajewski et al., 2005) mais pas chez le mouton (Amstalden et al., 2010). Il y aurait donc une action directe possible de la neurokinine B sur la sécrétion de GnRH, mais aussi une possibilité de régulation indirecte via la modulation de l'activité des neurones KNDy. On sait par ailleurs que l'injection de NKB induit une hausse de l'activité des neurones KNDy, caractérisée ici par une hausse du signal c-fos au sein de ces neurones (Sakamoto et al., 2012).

Comme pour la kisspeptine, on remarque un dimorphisme sexuel dans le nombre de cellules à NKB, ainsi au niveau du noyau arqué médian et caudal les cellules à NKB sont 5 fois plus nombreuses chez la brebis que chez le bélier (Cheng et al., 2010). Ce dimorphisme semble sous le contrôle des niveaux de testostérone au cours du développement fœtal puisque le traitement prénatal de brebis à la testostérone induit une forte diminution du nombre de cellules à NKB (Cheng et al., 2010).

Comme observé pour les neurones à kisspeptine, les neurones à NKB sont régulés par les stéroïdes et en particulier par les œstrogènes. L'action de la NKB sur la sécrétion pulsatile de GnRH/LH peut être modulée par les niveaux circulants en œstradiol. En effet chez la souris, il a été montré que des niveaux faibles voir nuls en œstradiol induisent une inhibition de la sécrétion de GnRH par la NKB, alors que des niveaux élevés en œstradiol ont pour conséquence d'induire une stimulation de la sécrétion de GnRH/LH par la NKB (Grachev et al., 2014). Cette régulation semble être transmise par les récepteurs ER α puisque chez une souris invalidée pour l'ER α , l'œstradiol ne permet pas l'inhibition de la NKB (Dellovade and Merchenthaler, 2004).

Cette modulation de l'action de la NKB par les œstrogènes est moins évidente chez les petits ruminants, en effet le traitement par un agoniste du NK3R, le senktide, a des conséquences différentes selon la phase du cycle œstrien, avec une stimulation de la sécrétion de LH en phase folliculaire mais aucun effet observé en phase lutéale. Par ailleurs, en période d'anœstrus, le senktide permet de stimuler la sécrétion de LH (Billings et al., 2010). L'effet stimulateur de la NKB ne semble donc pas, chez la brebis, sous la dépendance de fortes concentrations en œstradiol. On sait que la quasi-totalité des neurones KNDy co-expriment le récepteur à la progestérone (Cheng et al., 2010), on peut donc postuler d'un rôle de la progestérone dans la modulation de l'effet de la NKB sur le système à GnRH.

- Maturation du système à neurokinine B au cours de la transition pubertaire.

L'importance de la neurokinine B pour la transition pubertaire a été découverte dans le cadre du suivi d'une famille atteinte d'hypogonadisme hypogonadotrope mais cela a été confirmé plus tard chez le rat via l'utilisation d'un antagoniste du NK3R, le SB222200. En effet, cet antagoniste du système à NKB induit chez les rates un retard de puberté et une modification de la sécrétion de LH, les pulses observés sont moins fréquents et de moindre amplitude (Li et al., 2014). Contrairement à ce qui est observé pour la kisspeptine, aucune modification du nombre de corps cellulaires à NKB n'est observée entre la période prépubère et post-pubère, que ce soit chez la femelle ou chez le mâle (Nestor et al., 2012). Néanmoins l'ovariectomie précoce ou tardive induit chez la brebis une hausse du nombre de neurones à NKB (Nestor et al., 2012), il existe donc chez le jeune comme chez l'adulte un mécanisme inhibiteur du système NKB dépendant des stéroïdes sexuels.

(3) Les neurones à Dynorphine (Dyn)

La dynorphine est un peptide opiacé moins étudié que la kisspeptine et la NKB ; à l'heure actuelle aucune mutation humaine du système à dynorphine n'a été rapportée. La Dyn se lie spécifiquement à un récepteur opiacé, le KOR (kappa-opioid receptor). Bien que la Dyn ait été beaucoup moins étudiée que les deux autres neurotransmetteurs présents dans les neurones KNDy, on sait qu'elle a un rôle plutôt inhibiteur sur la sécrétion de GnRH. En effet l'injection de Dyn inhibe l'activité électrophysiologique au niveau hypothalamique (Wakabayashi et al., 2010) alors que l'injection d'un antagoniste du KOR induit une augmentation de la fréquence des pulses de LH chez la brebis en phase lutéale (Whisnant and Goodman, 1988).

- Localisation des neurones à dynorphine et de son récepteur KOR

Chez la brebis, les neurones à Dyn sont présents en majorité au niveau de l'ARC et de l'APO mais ils ont également été détectés entre autres au niveau des noyaux supra-optiques et des noyaux paraventriculaires (Weems et al., 2016). Chez le mouton comme chez la chèvre, plus de 90% des neurones à kisspeptine de l'ARC co-expriment la dynorphine; aucune colocalisation n'a pu être mise en évidence au niveau des neurones à kisspeptine de l'APO (Goodman et al., 2007; Wakabayashi et al., 2010). Chez la brebis et le rat, plus de 94% des neurones KNDy expriment également le récepteur KOR, concernant les neurones à GnRH, on retrouve le récepteur KOR dans 75% des neurones à GnRH de l'APO et dans 95% de ceux de l'HMB (Weems et al., 2016). Par ailleurs, plus de 90% des neurones à GnRH de l'HMB reçoivent des appositions de la part de neurones à Dyn (Goodman et al., 2004).

Comme pour la kisspeptine et la NKB, il existe un dimorphisme sexuel dans le nombre de cellules exprimant la Dyn. Comme pour la NKB, le nombre de cellules à Dyn est 5 fois plus élevé chez les brebis que chez les béliers (Cheng et al., 2010). Là encore, cette organisation spécifique selon le sexe est régulée par le taux de testostérone lors du développement foetal puisqu'un traitement prénatal à la testostérone induit une forte diminution du nombre de neurones à Dyn chez la femelle (Cheng et al., 2010).

Comme la NKB et la kisspeptine, la Dyn est sous le contrôle des stéroïdes sexuels, l'inhibition du système à Dyn par l'injection d'un antagoniste du KOR permet en effet d'induire une augmentation de la sécrétion de LH en phase lutéale alors que cela n'a aucun effet sur les niveaux de LH en phase folliculaire (Whisnant and Goodman, 1988). Par ailleurs, la quasi-totalité des cellules à Dyn co-expriment le récepteur à la progestérone (Foradori et al., 2002). L'hypothèse de la régulation de l'action de la Dyn par la progestérone est confirmée par l'observation que l'injection d'un antagoniste du KOR permet de stimuler la sécrétion pulsatile de LH chez une brebis ovariectomisée traitée à la progestérone qu'elle soit traitée à l'œstradiol ou non alors que cela n'aura aucun effet sur une brebis ovariectomisée uniquement traitée à l'œstradiol (Whisnant and Goodman, 1988).

- Maturation du système à dynorphine au cours de la transition pubertaire

On sait que la Dyn joue un rôle inhibiteur sur la transition pubertaire via une inhibition de la sécrétion pulsatile de LH, en effet, l'injection d'un inhibiteur du KOR chez la rate induit

une ouverture vaginale précoce et une hausse de la sécrétion pulsatile de LH (Nakahara et al., 2013). Bien que l'on connaisse l'influence du système à Dyn dans la transition pubertaire, très peu de données sont actuellement disponibles sur la maturation de ce système en relation avec la puberté. Chez la brebis prépubère, on n'observe que très peu de cellules exprimant la dynorphine (Lopez et al., 2016). Dans cet article les auteurs ont également montré que la population de neurones à Dyn n'augmentait pas après une ovariectomie précoce avec ou sans supplémentation en œstrogène. Par ailleurs, ils ont également démontré chez la femelle adulte en phase lutéale, que ces cellules sont abondantes au niveau de l'ARC (Lopez et al., 2016).

Ainsi les neurones KNDy semblent être un élément clé dans la régulation de la transition pubertaire : la kisspeptine et la neurokinine B ayant un rôle stimulateur de la sécrétion de GnRH, alors que la Dyn a un rôle inhibiteur sur cette population neuronale. Une caractéristique des neurones KNDy est leur nombre important de connexions réciproques donnant l'image d'un réseau extrêmement connecté. Cette communication au sein même de ces neurones KNDy semble critique pour la synchronisation de ces neurones considérés aujourd'hui comme une part importante du « centre générateur de pulses de GnRH » et donc comme une des populations neuronales les plus importantes dans le déclenchement pubertaire (Figure 16).

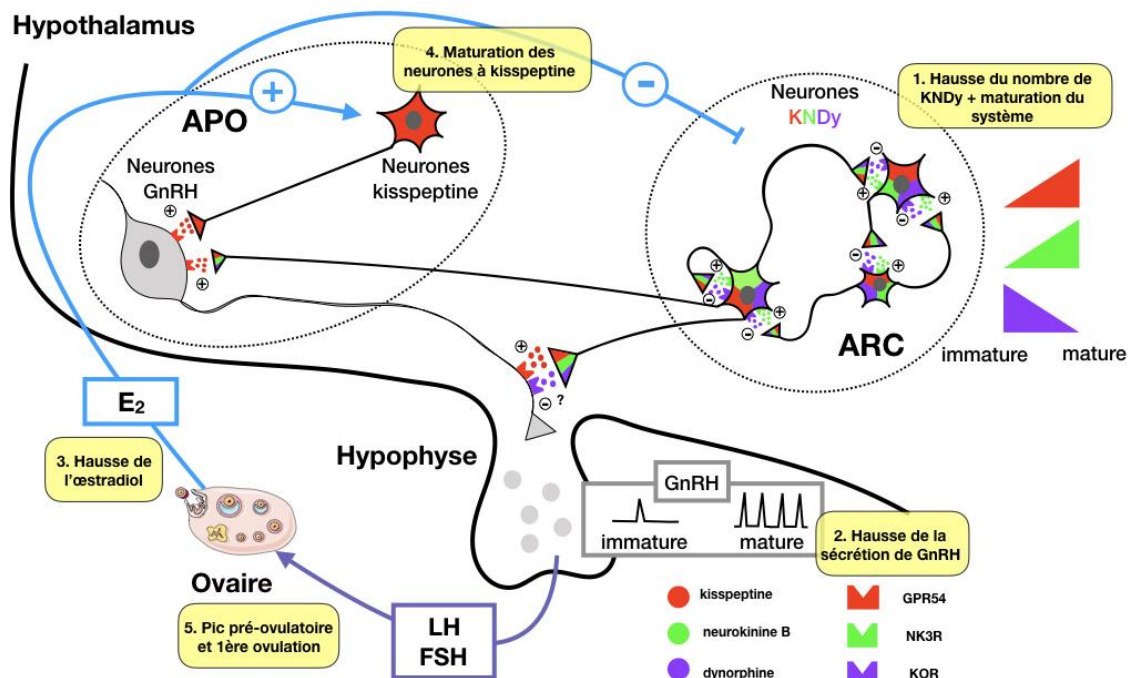


Figure 16. Représentation schématique de l'hypothèse actuelle de modulation du déclenchement pubertaire via les neurones KNDy coexprimant la kisspeptine (rouge) la neurokinine B (vert) et la dynorphine (violet).

(D'après Uenoyama et al., 2014; Wakabayashi et al., 2010 et Weems et al., 2016)

3) Le RFRP-3 : un modulateur de la sécrétion de GnRH

Un neuropeptide hypothalamique inhibiteur de la sécrétion de GnRH, le GnIH (Gonadotropin Inhibitory Hormone) a été mis en évidence en 2000 chez la caille japonaise (Tsutsui et al., 2000). Les orthologues mammaliens du GnIH sont le RFRP-1 et le RFRP-3, leur action sur la sécrétion de GnRH est similaire chez le hamster doré à ce qui a été observé chez les oiseaux (Kriegsfeld et al., 2006). Depuis, de nombreuses études ont été menées afin de caractériser son rôle dans la fonction de reproduction et dans la modulation de la transition pubertaire. Néanmoins, les effets du RFRP-3 sur la sécrétion de LH sont encore mal définis chez de nombreux mammifères. On sait que chez le rat, l'injection de RFRP-3 induit une inhibition de la sécrétion de LH (Pineda et al., 2010) mais aussi une inhibition de l'expression des comportements sexuels chez le mâle (Johnson et al., 2007). Aucun effet de l'administration de RFRP-3 n'a pu être observé sur l'expression du comportement sexuel chez la brebis (Clarke et al., 2012). Néanmoins, un article montre que dans l'espèce ovine, au niveau du sang porte-hypophysaire, les taux de RFRP-3 seraient multipliés par 3 lors de la saison de repos sexuel en comparaison de la saison de reproduction (Clarke et al., 2012). Chez différentes espèces de hamster, on observe au contraire une augmentation du nombre de neurones exprimant le RFRP lors de la saison de reproduction (Simonneaux and Ancel, 2012). On observe également, chez le hamster femelle, que l'injection chronique de RFRP-3 durant la période de repos sexuel induit une activation de l'axe gonadotrope caractérisée par une augmentation du poids du tractus génital (ovaires + utérus) ainsi qu'une hausse de la sécrétion de LH et d'œstradiol (Henningsen et al., 2017). Les neurones à RFRP-3 sont donc régulés par la photopériode, avec des neurones plus nombreux en jours longs qu'en jours courts mais leur action sur l'axe gonadotrope est très variable selon l'espèce étudiée, pouvant soit inhiber soit stimuler la fonction de reproduction, soit n'avoir aucun effet.

- Localisation des neurones à RFRP-3 et de son récepteur GPR147

Chez les rongeurs et les ongulés, les neurones à RFRP-3 sont localisés au niveau de l'hypothalamus dorso-médian (Kriegsfeld et al., 2006; Smith et al., 2008). Chez le mouton, on sait que ces neurones projettent vers de nombreuses populations neuronales, ainsi ils réalisent des connexions synaptiques avec de nombreux neurones impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique (neurones à neuropeptide Y (NPY), les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC) ou encore les neurones à orexine) (Qi et al., 2009). Mais on

retrouve également des appositions de neurones à RFRP-3 sur plus de la moitié des neurones à GnRH (Qi et al., 2009). On connaît deux récepteurs au RFRP-3, le GPR147 et le GPR74, néanmoins, on sait que le RFRP-3 a une affinité plus importante pour le GPR147. Le GPR147 semble être présent dans de nombreuses régions cérébrales dont l'hypothalamus (Gouardères et al., 2004) où on le retrouve au niveau des neurones à GnRH (Poling et al., 2012). Il y a donc une inhibition directe possible des neurones à GnRH par les neurones à RFRP-3. On sait également que des appositions à RFRP-3 sont observées dans une proportion plutôt modérée sur les neurones KNDy de l'ARC et qu'environ 20% de neurones à KNDy co-expriment le GPR147. Très peu de cellules à kisspeptine de l'AVPV, autour de 10%, co-expriment le GPR147 rendant peu plausible une action importante du RFRP-3 sur cette population neuronale (Poling et al., 2013).

Contrairement à ce que l'on a pu observer pour les neurones à kisspeptine, à neurokinine B ou encore à dynorphine, il ne semble pas exister, chez la souris, de dimorphisme sexuel dans le nombre et la localisation des neurones à RFRP-3 (Poling et al., 2012).

- Maturation du système à RFRP-3 au cours de la transition pubertaire

Le RFRP-3 par son action inhibitrice de la sécrétion de GnRH est un inhibiteur de la transition pubertaire chez les rongeurs. Ceci est confirmé par des travaux récents montrant que l'injection de RFRP-3 induit un retard dans la maturation sexuelle chez le rat-taupe nu (Peragine et al., 2017). Le nombre de cellules à RFRP-3 est plus important chez le jeune immature que chez l'adulte, en effet on observe une diminution progressive du nombre de neurones à RFRP-3 au cours du temps chez l'individu prépubère (Poling et al., 2012; Poling and Kauffman, 2015). Le RFRP-3 inhibant la sécrétion de GnRH, cette diminution du nombre de cellules pourrait se traduire par une baisse progressive du signal inhibiteur du RFRP-3 sur la transition pubertaire permettant ainsi leur réactivation par les autres populations neuronales (neurones KNDy par exemple).

III. Facteurs régulateurs de la puberté chez la femelle

Nous avons ainsi vu dans le chapitre précédent que les mécanismes neuroendocrines impliqués dans la régulation de la transition pubertaire sont complexes et à l'heure actuelle de nombreuses questions restent toujours en suspens. Si la découverte récente de la kisspeptine et des neurones KNDy permet une meilleure connaissance de la cascade d'évènements menant à la première ovulation, l'élément déclencheur à l'origine de cette transition pubertaire reste encore méconnu. L'âge à la puberté est une caractéristique très variable entre espèces mais plutôt stable au sein d'une espèce donnée (Tableau 2), différents facteurs internes comme externes influencent néanmoins le déclenchement de la puberté, induisant, selon les cas, une puberté précoce ou un retard de puberté.

Tableau 2. L'âge moyen à la puberté varie énormément entre différentes espèces de mammifères.

(D'après Klein, 2013)

	Age à la puberté
Souris	28-32 jours
Vache	8-12 mois
Cheval	12-18 mois
Chèvre	7-8 mois

A. Des facteurs internes

1) Une composante génétique

De nombreux travaux ont été menés chez l'Homme afin de mettre en évidence un éventuel déterminisme génétique de l'âge à la puberté. Ces travaux ont montré que 50% de la variabilité de l'âge aux premières menstruations (ménarche) est dépendante de facteurs génétiques (Towne et al., 2005). Cette importance du facteur génétique a été confortée par des études réalisées chez des jumelles monozygotes et dizygotes montrant un taux de corrélation pour l'âge à la ménarche de 0.97 pour les paires monozygotes contre 0.5 pour les paires dizygotes. L'écart moyen pour l'âge à la ménarche étant d'un mois pour les premières contre 6 mois pour les secondes (Sharma, 1983).

2) L'état métabolique

On sait que le métabolisme énergétique et en particulier la balance énergétique d'un individu a une influence sur le bon fonctionnement de l'axe HHG que ce soit à l'âge adulte ou au moment du déclenchement de la puberté (Clarke and Henry, 1999). Ceci est particulièrement vrai pour la femelle chez laquelle l'activité reproductive est énergivore ; en effet en cas de reproduction celle-ci devra assurer une gestation ainsi qu'une lactation qui sont des processus extrêmement coûteux d'un point de vue énergétique. On conçoit donc facilement qu'une femelle n'acquière la capacité à se reproduire que lorsqu'un certain seuil de réserves énergétiques est atteint. Cette théorie développée dans les années 1970 porte le nom de « critical fat mass hypothesis » (Frisch and Revelle, 1970). Ainsi chez l'Homme comme chez l'animal, une surnutrition et donc une masse grasseuse importante est associée à une puberté précoce alors qu'à l'inverse, une sous-nutrition et donc un déficit en masse grasseuse est associé à un retard voire une absence de puberté (Castellano et al., 2011; Martos-Moreno et al., 2010; Walkden-Brown and Bocquier, 2010). Par ailleurs chez les espèces polyovulantes comme la chèvre, on sait que chez l'adulte, une moins bonne condition corporelle est associée à un nombre réduit de follicules ovulatoires à chaque cycle, des cycles plus courts et une période de reproduction réduite (De Santiago-Miramontes et al., 2009). En parallèle, un apport énergétique important juste avant l'ovulation induit chez la truie une augmentation du nombre de follicules ovulatoires (Zimmerman et al., 1959). Concernant l'âge à la puberté chez les animaux de rente, il est communément accepté que la puberté se déclenche lorsque l'animal a atteint entre 40 et 60% de son poids adulte (Alkass et al., 1994; Perry, 2016; Walkden-Brown and Bocquier, 2010). L'état métabolique de l'individu est donc un important facteur régulateur de la reproduction.

(1) La leptine : un garant de la transition pubertaire

La découverte du rôle de la leptine dans le métabolisme énergétique a permis de mieux comprendre les interactions entre métabolisme et reproduction. La leptine aussi appelée « hormone de satiété » est sécrétée par les cellules du tissu adipeux, les adipocytes. Les concentrations plasmatiques de leptine sont anormalement basses dans le cadre d'une sous-nutrition et anormalement élevées dans le cadre d'une surnutrition (Martos-Moreno et al., 2010). Les taux de leptine sont pour l'hypothalamus le principal signal l'informant de l'état des réserves corporelles en graisse (Martos-Moreno et al., 2010). Son rôle dans la transition pubertaire a été confirmé chez l'Homme comme chez l'animal par l'étude de mutations du gène

de la leptine ou de son récepteur. Ainsi une déficience congénitale en leptine est associée chez l'Homme à une obésité morbide et un hypogonadisme hypogonadotrope chez les individus masculins comme féminins (Farooqi et al., 1999; Strobel et al., 1998). La mutation homozygote du gène codant pour la leptine, le gène *ob*, provoque également une stérilité chez la souris femelle, un phénotype réversible en cas de traitement à la leptine (Chehab et al., 1996). Chez l'Homme également, cette stérilité induite par une déficience en leptine semble être réversible. En effet, chez une fillette atteinte de cette anomalie et présentant un important surpoids associé à une immaturité du système reproducteur, un traitement à la leptine a permis le déclenchement de la transition pubertaire (Farooqi et al., 1999). Néanmoins, si un traitement à la leptine permet d'induire la transition pubertaire chez des souris femelles déficientes en leptine (Chehab et al., 1996), cela ne permet pas d'induire une puberté précoce chez des rates prépubères présentant naturellement des taux faibles de leptine (Cheung et al., 1997b). Par ailleurs, le suivi des taux circulants de leptine au cours de la maturation sexuelle de jeunes rats ne montre pas de variations significatives avant l'entrée en puberté (Cheung et al., 2001). Ainsi la leptine n'est pas un facteur déclencheur de la transition pubertaire mais semble plutôt jouer le rôle d'un facteur permissif crucial garant d'une réserve énergétique suffisante pour assurer une fonction de reproduction normale.

(2) Action de la leptine au niveau hypothalamique

La leptine agit via ses récepteurs Ob-R, chez la femelle ces derniers sont présents à chaque étage de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien. Au niveau ovarien, les Ob-R ont été détectés dans divers types cellulaires, mais les niveaux d'expressions les plus élevés sont retrouvés au niveau des cellules de la granulosa (Batista et al., 2013). *In vitro*, la leptine semble avoir un effet négatif sur la sécrétion d'œstradiol par les cellules de la granulosa (Ghizzoni et al., 2001). Les récepteurs à la leptine sont également présents au niveau de l'hypophyse ; ainsi chez le rat, 97% de ces récepteurs sont présents dans des cellules exprimant également l'hormone de croissance ; moins de 1% des Ob-R sont situés sur les cellules gonadotropes rendant peu plausible une action directe de la leptine sur la sécrétion de LH et de FSH (Sone et al., 2001). L'action de la leptine sur la sécrétion des gonadotropines semble donc indirecte. Ceci est confirmé par une étude récente où l'injection intracérébroventriculaire de leptine dans l'APO mais pas au niveau de l'ARC permet d'induire une hausse de la sécrétion de GnRH comme de LH (Watanobe, 2002). Par ailleurs, les récepteurs Ob-R sont également exprimés au niveau de l'hypothalamus mais ne semblent pas présents sur les neurones à GnRH

(Cunningham et al., 1999). L'action de la leptine sur la sécrétion de GnRH est donc très probablement transmise par un ou plusieurs interneurones. Parmi ces relais neuronaux, les neurones à kisspeptine sont des cibles probables : chez la souris comme chez le mouton des récepteurs à la leptine ont pu être mis en évidence dans ces cellules (Backholer et al., 2010; Smith et al., 2006a). De plus, la sécrétion de kisspeptine est diminuée dans une situation de stress énergétique induit par un jeûne chez le rat (Castellano et al., 2005). Mais d'autres neurones pourraient également jouer le rôle de relai hypothalamique de la leptine, parmi ceux-ci les neurones à neuropeptide Y (NPY) et les neurones à pro-opiomélanocortine (POMC). En effet, ces neurones expriment également le récepteur à la leptine (Cheung et al., 1997a; Mercer et al., 1996). Chez la brebis on sait que le NPY a un rôle orexigène, qu'il est négativement régulé par la leptine et, peut donc moduler la fonction de reproduction (Estrada et al., 2003). Contrairement au NPY, les neurones à POMC sécrètent un peptide ayant un rôle anorexigène, l' α -melanocyte-stimulating hormone, positivement régulée par la leptine (Martos-Moreno et al., 2010). Par ailleurs, chez la brebis, 40% des neurones à kisspeptine reçoivent des appositions de la part de neurones POMC ou NPY et les neurones à kisspeptine réalisent des appositions sur 7% des neurones NPY et 22% des neurones POMC (Backholer et al., 2010). Il semble donc que l'information métabolique soit intégrée par la leptine et relayée au niveau hypothalamique par ce réseau de neurones interconnectés qui transmettent l'information aux neurones à GnRH (Figure 17).

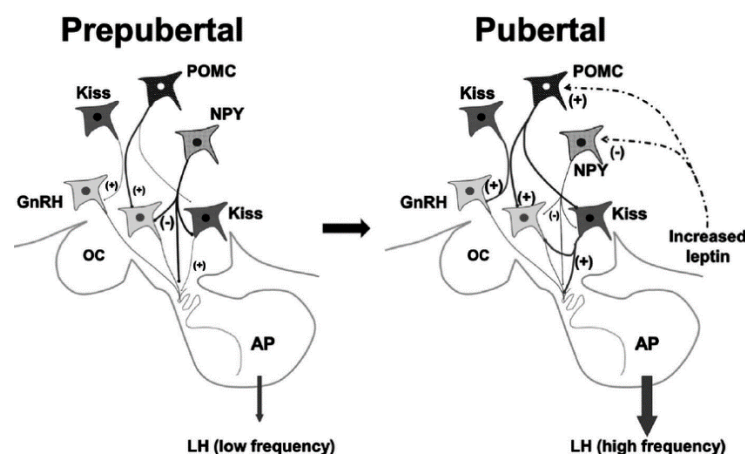


Figure 17. Schéma de la modulation de la transition pubertaire par l'action de la leptine. AP : hypophyse antérieure ; OC : chiasma optique (Amstalden et al., 2014)

B. Des facteurs externes

La transition pubertaire est une étape clé dans le développement d'un individu. Comme vu précédemment, elle peut être régulée par des facteurs internes assurant que l'individu au moment de sa transition pubertaire soit physiquement apte à maintenir une fonction de reproduction et une éventuelle gestation/lactation. Néanmoins, cet individu n'est pas un système isolé et il interagit avec un environnement complexe. L'environnement, qu'il soit physique (notamment les variations saisonnières) ou social (interaction avec les congénères), au même titre que les facteurs internes, peut accélérer ou retarder la transition pubertaire.

1) La photopériode

Chaque individu vivant sur Terre est soumis à des variations journalières et annuelles de son environnement et en particulier de la durée du jour (ou photopériode). Ces variations sont inhérentes à la vie puisqu'elles découlent d'une part de l'orbite de la Terre autour du soleil et d'autre part de la rotation de la Terre sur son propre axe. Ces phénomènes induisent une variation de l'intensité et de la durée de l'éclairement et de l'ensoleillement au cours de l'année ayant pour conséquence des modifications de la température et de la pluviométrie menant à des variations des disponibilités alimentaires. Ces variations, dont l'amplitude augmente avec la latitude, sont des défis adaptatifs. Ainsi, pour survivre, la majorité des espèces animales ont mis en place au cours de l'évolution différentes stratégies adaptatives afin de moduler leur physiologie selon ces variations. Parmi ces adaptations, on retrouve l'hibernation, la migration ou encore la mue, mais le processus le plus commun est la mise en place d'une reproduction saisonnée, c'est-à-dire une alternance au cours de l'année entre une saison d'activité sexuelle (saison d'œstrus) et une saison de repos sexuel (saison d'anœstrus) (Avgar et al., 2014; Bronson, 1985).

Ainsi l'un des facteurs les plus importants pouvant réguler l'axe HHG est la photopériode. En effet, la reproduction est une fonction extrêmement énergivore en particulier chez les mammifères, qui contrairement à d'autres espèces, prodiguent des soins parentaux et dont les jeunes se nourrissent dans les premiers temps du lait maternel. Limiter les naissances à la période la plus favorable de l'année, lorsque les températures ne sont pas extrêmes mais surtout lorsque la nourriture est la plus abondante, à la fois pour la mère durant la lactation mais aussi pour le jeune, permet de favoriser sa survie et donc d'améliorer la valeur sélective (« fitness ») des individus (Plant et al., 2015b). Chez ces reproducteurs saisonnés, afin d'assurer

que les naissances aient lieu à la saison favorable (au printemps), la période de reproduction est fixée par la durée de la gestation (Figure 18). On divise donc classiquement ces espèces animales en deux groupes, les reproducteurs de jours longs (chevaux, hamster) et les reproducteurs de jours courts (caprins, ovins). Les reproducteurs de jours longs se reproduisent lorsque les jours s'allongent, au printemps et à l'été, alors que les reproducteurs de jours courts se reproduisent lorsque la photopériode diminue, durant l'automne et l'hiver (Figure 18, Ortavant et al., 1985). Pour ces reproducteurs saisonnés, l'indice le plus fiable permettant de déterminer le début et la fin de la période de reproduction est la variation de la durée du jour, la photopériode. En effet, contrairement à la disponibilité en nourriture ou à la température, la photopériode est extrêmement stable d'une année à une autre et ne peut pas être impactée par des facteurs externes comme l'activité humaine par exemple.

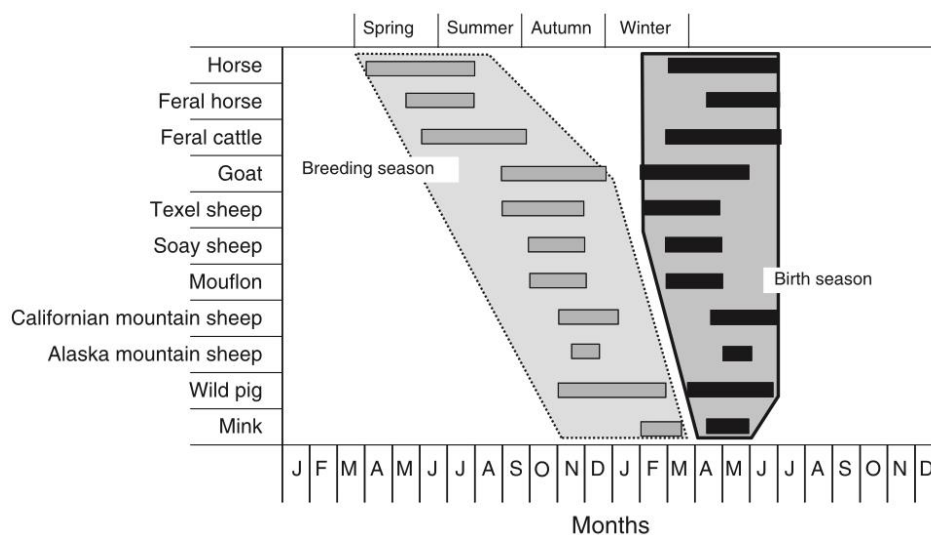


Figure 18. Disparité des périodes de reproduction (gris) selon les espèces pour permettre une mise-bas pendant la saison favorable (noir).

(Ortavant et al., 1985)

(1) Influence de la photopériode sur le déclenchement de la puberté

Ainsi chez l'adulte, la photopériode est un facteur crucial dans la régulation de la fonction de reproduction au cours de l'année, mais la photopériode est également un facteur crucial pour le déclenchement de la transition pubertaire. Chez les ovins, les animaux nés en contre-saison, c'est-à-dire à l'automne au lieu du printemps, présentent un retard de puberté

(Foster et al., 1985). De nombreuses études ont été réalisées chez les animaux de rente de par les conséquences possibles, au niveau agro-économique, d'un tel retard de puberté. Ainsi, les jeunes chevrettes nées au printemps atteignent la puberté autour de l'âge de 7 mois alors que celles nées à l'automne n'atteignent la puberté que vers l'âge de 11 mois (Delgadillo et al., 2007). Le suivi régulier du poids n'ayant pas mis en évidence de différence entre les groupes, ce retard de puberté ne peut être expliqué par un ce facteur. C'est donc l'ajustement obligatoire au cycle photopériodique qui est responsable de cette puberté retardée. Cette expérimentation a été réalisée au Mexique sur une race locale de chèvres, mais des résultats similaires ont été obtenus à Chypre, sous une latitude différente, avec des chèvres Damascus et des moutons de Chios (Papachristoforou et al., 2000). Par ailleurs, on observe que l'âge à la puberté peut être modulé par l'utilisation de traitements photopériodiques, c'est-à-dire en modifiant simplement la durée du jour à laquelle seront exposés les animaux. Ainsi un traitement de jours longs (15h de lumière par jour) induit chez les jeunes brebis un retard de puberté conséquent de l'ordre de 30 semaines par rapport au groupe contrôle, les deux groupes étant nées au même moment au printemps (Yellon and Foster, 1985). De manière similaire, on sait qu'il est possible de contrer le retard de puberté des jeunes agnelles nées à l'automne en les soumettant dès leur naissance à un traitement photopériodique mimant les variations de luminosité ayant lieu au printemps. Ce traitement de lumière permet d'induire la puberté à l'âge de 33-37 semaines chez des femelles nées à l'automne contre 48-50 semaines pour des femelles témoins nées à l'automne mais non traitées. Cet âge à la puberté est comparable à ce qui est observé chez les femelles nées au printemps qui était dans cette étude de 26-35 semaines (Fraleley et al., 1988). Dans les espèces et races saisonnées, la photopériode est un facteur crucial de régulation de la fonction de reproduction femelle, que ce soit pour la saisonnalité de la reproduction chez l'adulte, mais aussi pour le moment de la transition pubertaire chez le jeune immature. Il est donc nécessaire que l'information concernant la durée du jour soit captée puis intégrée par l'individu afin que celle-ci puisse être traitée afin de moduler chez la femelle l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-ovarien. Au niveau central on sait que le relai de cette information photopériodique est réalisé par la glande pinéale (ou épiphyse) via la sécrétion d'une hormone : la mélatonine.

(2) La mélatonine, relai de l'information photopériodique

La mélatonine a été découverte en 1958 par une équipe de chercheurs américains à partir de glandes pinéales bovines (Lerner et al., 1958). Sa synthèse et sa sécrétion est réalisée par les pinéaloctes, des cellules spécialisées présentes au sein de la glande pinéale. La sécrétion de mélatonine respecte un rythme jour/nuit bien défini puisqu'elle n'a lieu que pendant la phase d'obscurité. Ainsi, le maintien de moutons en lumière continue induit des niveaux extrêmement bas de mélatonine (Rollag and Niswender, 1976). Lors du maintien des animaux en obscurité constante, on observe tout de même un rythme endogène de sécrétion mais moins bien synchronisé sur le rythme journalier de 24h que lors d'une alternance jour/nuit (Ebling et al., 1988; Rollag and Niswender, 1976).

Comme le mouton, le hamster a été une espèce modèle très largement utilisée pour l'étude des régulations photopériodiques de la fonction de reproduction et du rôle de la mélatonine. Dès les années 1960, le rôle de la pinéale dans la régulation de cette reproduction saisonnée a été mis en évidence chez cette espèce. En effet, le hamster syrien est une espèce de jours longs : lorsqu'un mâle est exposé à une photopériode courte, on observe une diminution de la taille des testicules. Cette inhibition de la fonction de reproduction n'est pas observée si la glande pinéale du hamster a été préalablement retirée (Hoffman and Reiter, 1965). Par ailleurs une infusion d'au moins 8 heures de mélatonine permet d'induire une régression testiculaire chez des hamsters pinéalectomisés, alors qu'une infusion plus courte n'a aucune incidence (Carter and Goldman, 1983). Ces travaux ont ainsi mis en évidence que la transmission de l'information photopériodique au système nerveux central est traduite par la sécrétion de mélatonine et en particulier par la durée de sa sécrétion.

- Transmission de l'information photopériodique par la mélatonine : de sa perception par l'œil à son traitement par l'hypothalamus

L'information lumière/obscurité est captée par l'œil au niveau de la rétine puis elle est transmise via le tractus rétino-hypothalamique aux noyaux supra-chiasmatiques (NSC) qui sont le siège de l'horloge circadienne endogène. Le message est ensuite transmis aux noyaux hypothalamiques paraventriculaires, puis passe par la moelle épinière, l'information est ensuite traitée par les ganglions cervicaux supérieurs qui vont finalement la transmettre à la glande pinéale qui sécrètera ou non de la mélatonine (Figure 19 ; Malpoux et al., 1996).

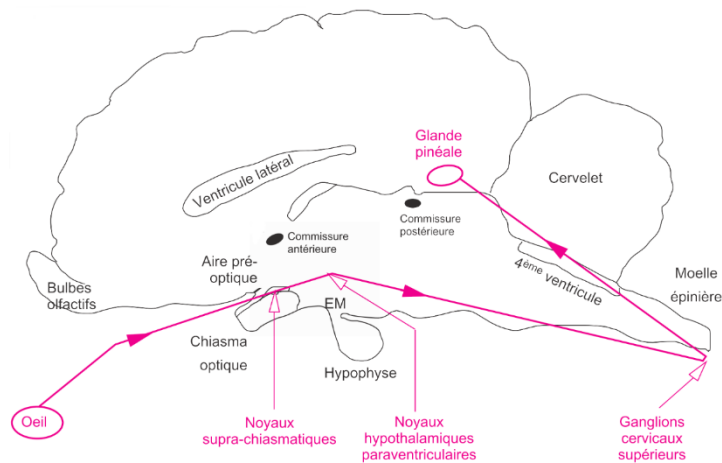


Figure 19. Transmission de l'information photopériodique jusqu'à la glande pinéale, chez le mouton.

(Malpaux et al., 1996)

Comme expliqué précédemment, la sécrétion de mélatonine n'est possible que lorsque l'individu se retrouve dans l'obscurité. Ceci est la conséquence de la voie de synthèse de la mélatonine, en effet au sein des pinéaloctes, la mélatonine est synthétisée à partir de tryptophane. Ce tryptophane est converti en sérotonine qui est elle-même convertie en mélatonine. Ces réactions nécessitent l'action successive de 2 enzymes, l'aralkylamine N-acyltransférase et l'hydroxyindole O-méthyltransférase. Si l'activité de la seconde est plutôt stable sur 24h, la première est soumise à d'importantes variations au cours de la journée, avec une forte augmentation durant la nuit (Klein et al., 1997). C'est donc l'aralkylamine N-acyltransférase qui est responsable de la rythmicité de la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale et donc qui est à la base de la régulation saisonnière de la fonction de reproduction. Ainsi au cours de la nuit, la glande pinéale riche en aralkylamine N-acyltransférase synthétise la mélatonine, celle-ci est aussitôt libérée dans le système sanguin périphérique mais aussi dans le liquide céphalo-rachidien où elle est retrouvée en plus forte concentration (Tricoire et al., 2002).

Chez les mammifères, il existe deux types de récepteurs à la mélatonine, MT1 et MT2. Ces récepteurs sont exprimés dans de nombreuses régions cérébrales et leur distribution est très variable entre les différentes espèces étudiées. Seule la présence de ces récepteurs au niveau de la *pars tuberalis*, au niveau de l'hypophyse antérieure, est commune à toutes ces espèces (Dardente et al., 2016). Au sein de cette structure, la mélatonine contrôle négativement la synthèse d'une autre hormone, l'hormone thyroïdienne (TSH); ainsi en jours courts lorsque

la sécrétion de mélatonine est élevée, les niveaux en TSH diminuent (Panda and Turner, 1968). Or cette hormone est elle-même responsable de la stimulation de la synthèse d'une déiodinase, la DIO2 qui permet la transformation de l'hormone thyroïdienne de sa forme inactive T4 vers sa forme active T3 (Dardente et al., 2016). L'action sur la fonction de reproduction de cette hormone thyroïde active, la T4, semble être traduite par une modulation de l'activité de deux populations neuronales, les neurones à kisspeptine et les neurones à RFRP-3 qui comme vu précédemment jouent un rôle clé dans la régulation de la fonction de reproduction chez le jeune comme chez l'adulte. En effet, une infusion centrale de TSH chez un hamster maintenu en jours courts conduit à des niveaux d'expression de kisspeptine et de RFRP-3 similaires à ceux observés en jours longs (Klosen et al., 2013).

Néanmoins, chez le mouton des travaux ont montré que des implants de mélatonine ne permettait d'induire une hausse de la sécrétion de LH que lorsqu'ils étaient posés au niveau de l'hypothalamus médio-basal (Malpaux et al., 1998, 1993). Par ailleurs, la pose d'implants au niveau même de la *pars tuberalis* ne permet pas d'induire une telle réponse au niveau de la sécrétion de LH (Malpaux et al., 1995). En dépit de la forte concentration de récepteurs à la mélatonine au niveau de la *pars tuberalis*, elle ne semble pas être la cible principale dans le cadre de la régulation de la reproduction.

Ainsi chez les espèces à reproduction saisonnée, la régulation de l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique au cours de l'année est permise par l'action de la mélatonine. L'inactivation de l'axe HHG lors de la saison de repos sexuel est à l'origine du retard de puberté observé pour les jeunes nés à l'automne au lieu du printemps. En effet, bien qu'ils soient en âge d'être sexuellement matures, le signal inhibiteur de la photopériode empêche toute réactivation spontanée possible de l'axe gonadotrope et cette réactivation n'aura alors lieu que lorsque ce signal inhibiteur sera levé c'est-à-dire au moment de la saison de reproduction suivante à l'automne.

2) L'environnement social

Les mammifères ne sont pas seulement soumis à des variations de leur environnement physique, mais également à des modifications de leur environnement social. En effet de par leur stratégie de reproduction, le jeune, de la naissance au sevrage est intégré au sein d'un environnement social complexe. Certaines espèces vivent de manière solitaire, mâles et femelles ne se rejoignant que pour la saison de reproduction, chez d'autres espèces, les individus vivent en groupes où mâles et femelles coexistent toute l'année. De nombreux facteurs sociaux peuvent ainsi moduler la puberté des jeunes femelles. Parmi ces facteurs, l'état physiologique des autres femelles du groupe ou encore la présence/absence d'un mâle pour les espèces chez lesquelles ce dernier n'a de contacts avec la femelle que lors de la saison de reproduction.

(1) La présence d'autres femelles peut moduler l'entrée en puberté de la jeune femelle immature

La grande majorité des expériences visant à étudier la régulation sociale de la transition pubertaire ont été réalisées chez la souris. Chez cette espèce la présence d'une ou plusieurs femelles a, selon le statut physiologique de la femelle stimulatrice, des conséquences variables sur la transition pubertaire. Le plus souvent on observe un effet inhibiteur de la présence d'autres femelles sur la transition pubertaire, on observe ainsi que des femelles élevées en groupe présentent un premier œstrus plus tardif que les femelles élevées en cage individuelle (Vandenbergh et al., 1972). Ce même retard de puberté est observé pour des femelles immatures exposées à de l'urine de femelles sexuellement matures élevées en groupe, mais aucun effet n'est constaté lorsque l'urine provient de femelles élevées seules (Drickamer, 1974a). Il est intéressant de remarquer que l'inhibition de cette transition pubertaire peut également être induite par une exposition à de l'urine de souris juvénile (Drickamer, 1977, 1974a). Il existe donc dans l'urine des souris femelles sexuellement matures et immatures une molécule induisant un retard de puberté chez les autres femelles du groupe. Cette molécule est une phéromone, un signal olfactif spécifique d'une espèce : produite par un individu émetteur cette phéromone induira une réponse comportementale et/ou physiologique chez l'individu récepteur. La présence de cette phéromone dans l'urine excrétée semble dépendante de la densité de population et pourrait jouer un rôle dans la régulation des populations en retardant la première reproduction des jeunes lorsque le nombre de femelles est trop important évitant ainsi la surpopulation. Cette molécule ne semble pas être régulée par les hormones stéroïdes sexuelles

puisque'une ovariectomie n'a aucune conséquence sur la présence dans l'urine de cette molécule permettant de provoquer un retard de puberté (Drickamer et al., 1978). Néanmoins le stimulus émis semble dépendant de l'état physiologique des femelles. Ainsi, on remarque qu'au contraire l'exposition à de l'urine de femelles gestantes ou en lactation permet d'avancer le premier œstrus de jeunes souris de 4 jours (Hoover and Drickamer, 1979). Ce phénomène a également été observé chez la souris sauvage (*Mus musculus*) et une autre espèce de rongeur sauvage, le campagnol sylvestre (Drickamer, 1979; Lepri and Vandenberg, 1986). Ainsi, il existe chez la femelle un moyen de réguler la croissance de la population via une inhibition de la transition pubertaire des jeunes femelles, néanmoins, si cet effet a été assez bien caractérisé chez la souris, à l'heure actuelle extrêmement peu de données sont disponibles chez d'autres espèces, ne permettant pas d'attester de la présence ou de l'absence d'un effet comparable chez des espèces animales autres que rongeurs.

(2) La présence de mâle accélère la transition pubertaire chez la femelle

Si l'effet de la présence de femelles sur la transition pubertaire de jeunes femelles a été bien caractérisé chez la souris, les conséquences possibles de la présence d'un mâle sur l'âge à la puberté de la femelle ont été bien plus étudiées encore, que ce soit chez les rongeurs mais aussi chez de nombreuses autres espèces animales (Tableau 3). C'est en 1967 que John Vandenberg a mis en évidence pour la première fois une étude a mis en évidence que l'exposition d'une jeune souris immature à un mâle adulte permettait d'induire une avance de puberté chez celle-ci (Vandenberg, 1967). Dans cette étude, les jeunes femelles exposées au mâle présentaient une ouverture vaginale avancée de 4 jours par rapport aux femelles non exposées au mâle, l'analyse de frottis vaginaux a par ailleurs montré que leur premier œstrus était avancé lui de 20 jours en comparaison des femelles isolées. On observe d'ailleurs une forte élévation des niveaux de LH chez la jeune femelle dans l'heure suivant sa première exposition à un mâle adulte ce qui pourrait être le signe d'une réactivation de l'axe HHO (Bronson and Desjardins, 1974). De nombreuses études ont suivi confirmant l'existence chez la souris de ce phénomène aujourd'hui connu sous le nom d' « Effet Vandenberg ». Si toutes ces études ont montré un effet stimulateur de la présence d'un mâle sur la transition pubertaire de la jeune femelle, l'importance de l'effet montre des différences notables selon les expériences. Ainsi la présence d'un mâle provoque une avance de l'ouverture vaginale de 2 à 4 jours et du premiers œstrus de 6 à 20 jours chez la souris (*Mus musculus*) élevée en laboratoire (Drickamer, 1974b; Eisen, 1975; Vandenberg, 1969, 1967). Néanmoins, des résultats du même ordre ont été

reproduits sur des souris (*Mus musculus*) sauvages issues de femelles piégées à l'extérieur, la présence du mâle a en effet permis d'avancer le premier œstrus de 15 jours chez ces jeunes femelles (Drickamer, 1979).

Ce phénomène d'accélération de la puberté chez la souris dépend du niveau d'activité sexuelle du mâle. En effet, dès 1969, John Vandenberg met en évidence que l'exposition de jeunes femelles à un mâle castré n'a aucun impact sur l'âge à la puberté de ces femelles (Vandenberg, 1969). Par ailleurs, l'effet d'avance de puberté est retrouvé lorsque les jeunes femelles sont stimulées par des mâles castrés traités avec soit de la testostérone, soit de l'œstradiol ; dans ces deux cas, le poids de l'utérus des femelles est significativement plus élevé lorsqu'elles sont exposées à ces mâles traités que lorsqu'elles sont exposées à des mâles castrés non traités (Lombardi et al., 1976; Thorpe and DeCatanzaro, 2012). Néanmoins, ces mâles restent moins efficaces que des mâles intacts : l'exposition à un mâle intact induit en effet une hausse de 130% du poids de l'utérus alors qu'un mâle castré traité à la testostérone n'induit qu'une hausse de 60% (Lombardi et al., 1976). Cette avance de puberté est également obtenue par la stimulation de jeunes femelles par des femelles adultes ovariectomisées et traitées à la testostérone (Drickamer, 1974b; Lombardi et al., 1976). Il est intéressant de remarquer que lorsque les mâles utilisés pour stimuler les femelles ont la possibilité d'interagir avec d'autres mâles et donc d'établir une hiérarchie, seuls les mâles dominants ont la capacité d'induire un effet Vandenberg, la présence de mâles subordonnés n'aura aucune incidence sur la transition pubertaire des jeunes femelles (Lombardi and Vandenberg, 1977). Il existe donc chez la souris mâle un effet qui permet d'accélérer la maturation sexuelle de la jeune femelle, en induisant une avance de l'ouverture vaginale, du premier œstrus mais aussi une augmentation de la masse utérine.

Cet effet Vandenberg a également été observé chez d'autres rongeurs avec cependant quelques différences notables (Tableau 3). Ainsi il semblerait que chez le rat, la présence d'un mâle n'ait aucune conséquence sur l'âge à l'ouverture vaginale mais permette d'avancer le premier œstrus de 5 jours (Vandenberg, 1976). Chez le hamster sibérien aucun effet n'est observé sur l'ouverture vaginale mais une avance de 18 jours est observée pour le premier œstrus (Levin and Johnston, 1986). Au contraire, chez le campagnol des prés, la présence d'un mâle induit une forte avance de l'ouverture vaginale (15 jours) sans aucun effet sur le premier œstrus ; la masse de l'utérus de ces femelles stimulées est quant à elle 4 fois plus grande que celle de l'utérus des femelles contrôles (Baddaloo and Clulow, 1981).

Contrairement à l'effet inhibiteur des femelles, l'effet stimulateur de la présence d'un mâle sur l'entrée en puberté de la jeune femelle a fait l'objet de plusieurs études chez des espèces de mammifères autres que les rongeurs. Si de nombreuses données ont été acquises chez les porcins, quelques travaux attestent d'un possible effet du type « Effet Vandenberg » chez les bovins, ovins, caprins mais aussi chez une espèce sauvage l'oryx d'Arabie (Tableau 3). Ceci s'explique en partie par l'intérêt potentiel de l'application d'un tel phénomène en agronomie, l'avancement de la puberté permettant d'augmenter la durée de vie reproductive des femelles en commençant plus tôt. L'induction d'une puberté précoce est une thématique d'intérêt puisque dès les années 1960-1970 des traitements hormonaux ont été testés afin de pouvoir déclencher la première ovulation chez les bovins et les porcins. L'efficacité de ces traitements s'est avérée mitigée puisque bien souvent ils permettent d'induire une première ovulation précoce mais il n'y a pas de persistance de la cyclicité à la suite de cette ovulation induite (Gordon, 2004).

Le phénomène d'accélération de la puberté dû à une exposition précoce à un mâle adulte a été bien mis en évidence chez les porcins. La simple présence d'un mâle permet d'avancer le premier œstrus de 10 jours (Brooks and Cole, 1970; Thompson and Savage, 1978), et s'il y a une rotation régulière du mâle stimulateur on observe que l'effet est beaucoup plus marqué car on obtient alors une avance de 37 jours sur l'apparition des premiers comportements d'œstrus (Brooks and Cole, 1970). On observe par ailleurs une meilleure synchronisation de l'entrée en puberté chez ces femelles en comparaison du groupe contrôle (Brooks and Cole, 1970). Chez la truie, l'âge à la première exposition au verrat semble moduler la réponse physiologique puisqu'un premier contact précoce (à 125-132 jours) induit une entrée en puberté plus tardive qu'un premier contact à l'âge de 139 et 146 jours (Kirkwood and Hughes, 1979). Les femelles stimulées le plus précocement expriment leurs premiers comportements d'œstrus à l'âge moyen de 176 jours, 48 jours après le premier contact avec le mâle, alors que les femelles stimulées plus tardivement ont un premier œstrus en moyenne à 167 jours soit 25 jours après la première exposition au mâle. En ce qui concerne l'aspect androgéno-dépendant de cette avance de puberté, les résultats sont moins explicites que ceux obtenus chez la souris. En effet, l'exposition à un mâle adulte castré induit une avance de puberté comparable à ce qui est observé lors d'une exposition à un mâle entier, néanmoins l'exposition à un jeune mâle de 6,5 mois n'induit aucune accélération de la maturation sexuelle de la jeune femelle (Cole et al., 1982; Kirkwood and Hughes, 1981).

Tableau 3. La présence du mâle peut avancer la puberté chez de nombreux mammifères.

Espèce	Avance de puberté (en jours)		Modalité de stimulation par le mâle		Références
			Exposition directe	Stimulation olfactive	
<u>Rongeurs :</u>	Ouverture vaginale	Premier œstrus			
Souris (<i>Mus musculus</i>)	4 2	15 9	X -	- X (litière souillée)	Vandenbergh (1969)
Rat (<i>Rattus norvegicus</i>)	NS	5	X	Non testé	Vandenbergh (1976)
Hamster russe (<i>Phodopus campbelli</i>)	NS	18	X	Non testé	Levin and Johnston (1986)
Campagnol des prés (<i>Microtus pennsylvanicus</i>)	15	Non testé	X	X (Urine)	Baddaloo and Clulow (1981)
Autres que rongeurs :					
Cochon (<i>Sus scrofa</i>)	37 (Premier œstrus)		X	Non testé	Brooks and Cole (1970)
Vache (<i>Bos taurus</i>)	NS (Premier œstrus et/ou corps jaune palpable)		X	Non testé	Berardinelli et al (1977)
	NC (Corps jaune palpable)		Non testé	X (Urine)	Izard and Vandenbergh (1982)
Oryx (<i>Oryx leucoryx</i>)	120 (Première ovulation / Progestérone)		X (au travers d'une barrière)	Non testé	Blanvillain et al (1997)
Mouton (<i>Ovis aries</i>)	NC (Corps jaune / Laparoscopie)		X	Non testé	Oldham and Gray (1984)
Chèvre (<i>Capra hircus</i>)	NC (Première acceptation de la monte)		X	Non testé	Amoah and Bryant (1984)

NS : non significatif NC : non communiqué (plus de femelles pubères à un temps donné)

De plus, lors d'une autre expérimentation, l'exposition à un mâle castré n'a pas permis d'induire de puberté précoce chez les jeunes truies (Kirkwood et al., 1983). Dans l'espèce porcine, on ne peut donc pas conclure avec certitude de la nature androgéno-dépendante du stimulus provenant du mâle et étant responsable de l'induction d'une puberté précoce chez la jeune femelle.

Quelques études ont également été réalisées chez les bovins afin de mettre en évidence un éventuel effet de la présence d'un taureau sur l'entrée en puberté des génisses mais les résultats obtenus n'ont pas permis de conclure quant à l'existence d'un tel effet chez cette espèce (Tableau 3). Ainsi deux études mettant en présence des génisses avec des taureaux entiers n'ont pas pu mettre en évidence de différence quant à l'âge à la puberté des femelles (Berardinelli et al., 1977; Roberson et al., 1987) alors qu'une étude réalisée avec des mâles castrés supplémentés en testostérone a mis en évidence un effet significatif, mais assez limité, de leur présence sur la transition pubertaire des femelles (Fiol et al., 2010). La présence de ces mâles androgénisés augmente, après 42 jours de stimulation, de 15% le nombre de femelles pubères par rapport au groupe de femelles isolées ; mais cet effet n'est observé que pour les femelles les plus lourdes, aucun effet n'est observé pour celles pesant moins de 237 Kg (Fiol et al., 2010). Une autre étude tend à montrer un possible effet Vandenberg chez les bovins : des génisses ont été stimulées par des sprays d'urine de taureau dans le nez et la bouche, après 7 semaines de traitement il y avait 35% de femelles pubères en plus dans le groupe recevant de l'urine que dans le groupe contrôle traité avec de l'eau (Izard and Vandenberg, 1982). Cette dernière expérimentation laisse à penser qu'il existe dans l'urine de taureau une molécule induisant une maturation sexuelle précoce chez la femelle. Il est possible que l'absence de résultat observé dans certaines des études mettant en contact direct le mâle et la femelle soit due à une dilution de l'effet stimulateur dû à un ratio femelle/mâle trop important. Dans les deux expériences où la présence du mâle n'a pas induit d'effet, dans un cas un mâle a été utilisé pour stimuler 26 femelles (Roberson et al., 1987) et dans l'autre cas pour stimuler 14 femelles (Berardinelli et al., 1977). Dans les deux situations de mise en contact direct taureau-vache, l'intensité de la stimulation semble moindre en comparaison d'une injection intranasale et intrabuccale d'urine pure de taureau.

D'autres expériences ont été réalisées chez les petits ruminants laissant présager un possible effet de la présence du mâle sur la transition pubertaire (Tableau 3). Ainsi chez le mouton, l'exposition de jeunes brebis à des mâles entiers permet d'augmenter de 60% le nombre de femelles pubères 17 jours après la première mise en contact (Kenyon et al., 2012).

Le même effet est observé lorsque l'on utilise un mâle castré traité à la testostérone pour stimuler ces femelles (Oldham and Gray, 1984). Une étude récente a également mis en évidence que dans le cas de jeunes agnelles nées à contre-saison et donc présentant naturellement un retard de puberté, une exposition à des mâles sexuellement actifs permettait d'induire une transition pubertaire plus précoce que dans le groupe contrôle exposé à des mâles inactifs, l'avance obtenue sur la première ovulation est de 42 jours (Abecia et al., 2016). Ainsi dans cette étude, l'exposition à un mâle entier mais sexuellement inactif n'a pas permis d'avancer la puberté des jeunes femelles. Les niveaux de testostérone d'un mâle entier inactif étant très faibles, le stimulus responsable du phénomène d'avance de puberté chez les ovins pourrait être androgéno-dépendant, comme ce qui est décrit chez les rongeurs. Une expérience a été réalisée chez les caprins mettant en présence de manière précoce de jeunes chevrettes avec des boucs adultes entiers : 2 mois après le début de la stimulation, 95% des femelles avec le mâle sont pubères alors qu'aucune n'a atteint la puberté dans le groupe contrôle (Amoah and Bryant, 1984). Leur critère de détermination de la puberté utilisé par ces auteurs est l'âge à la première acceptation de la monte par le mâle. Cependant, chez les petits ruminants il est très courant que les premières ovulations soient silencieuses c'est-à-dire qu'elles ne soient pas accompagnées d'un comportement d'œstrus. Il est donc possible qu'une partie de l'effet ait été masqué par ce phénomène. De plus on ne peut pas quantifier cette avance de puberté puisque les auteurs ont dû exposer le groupe contrôle à des mâles afin de déterminer l'âge à la première monte ; nous n'avons donc pas accès à l'âge auquel ces femelles contrôles auraient spontanément atteint la puberté.

- Induction d'une puberté précoce par la présence du mâle : modalités sensorielles impliquées

Lorsque ce phénomène d'induction d'une puberté précoce a été mis au jour pour la première fois chez les rongeurs, l'une des premières questions a été de déterminer la nature du « stimulateur » ainsi que la modalité sensorielle impliquée. Dès 1969, John Vandenberg a pu mettre en évidence l'importance de l'olfaction dans l'accélération pubertaire chez la souris. En effet, l'exposition à de l'urine de mâle ou à un mâle isolé par un grillage permet également d'induire une avance de puberté chez la jeune femelle, néanmoins, cette avance est moins importante que celle obtenue par contact direct avec le mâle (Tableau 3 ; Vandenberg, 1969). L'action de l'urine mais aussi de l'exposition à de la litière souillée a été confirmée par de

nombreuses études chez la souris (Colby and Vandenberg, 1974; Cowley and Wise, 1972; Drickamer and Murphy, 1978; Jouhannau et al., 2015, 2014). Récemment il a été décrit qu'en plus d'induire une avance de puberté, une exposition précoce à de l'odeur de mâle intact pouvait provoquer l'apparition précoce d'une préférence pour l'odeur de mâle versus de l'odeur de femelle ou de mâle castré (Jouhannau et al., 2014).

Il existe donc dans l'urine de souris mâle intacte une phéromone provoquant une accélération de la maturation sexuelle de la jeune femelle. Chez les mammifères, il existe deux systèmes olfactifs : le système principal et le système accessoire. Les phéromones sont, chez les rongeurs, essentiellement traitées par le système accessoire, qui se compose en partie d'un organe particulier l'organe voméronasal (ou organe de Jacobson). Ainsi la stimulation de jeunes femelles par de l'odeur de mâle induit chez ces dernières une augmentation de l'activité neuronale au sein du bulbe olfactif accessoire quel que soit l'âge de la femelle. Une hausse de l'activité cérébrale est également observée au niveau de l'amygdale, une structure connue pour relayer l'information olfactive jusqu'à l'hypothalamus chez les rongeurs (Figure 20; Szymanski and Keller, 2014). Par ailleurs, de jeunes souris présentant une lésion de l'organe voméronasal ne présentent plus d'accélération de la puberté lorsqu'elles sont exposées à un mâle (Lomas and Keverne, 1982) confirmant l'importance du système accessoire dans l'effet Vandenberg.

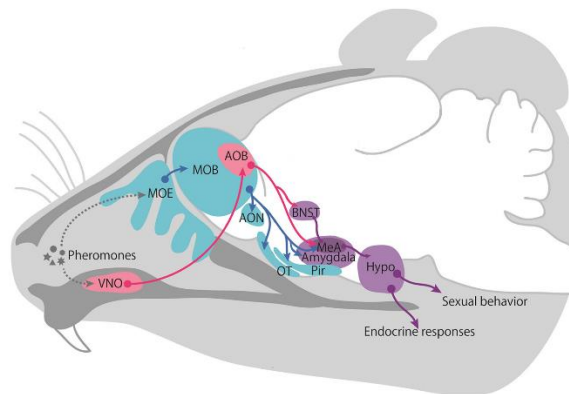


Figure 20. Les phéromones permettent de moduler la fonction de reproduction via la stimulation du système olfactif accessoire chez les rongeurs. AOB : bulbe olfactif accessoire ; AON : noyau olfactif antérieur ; BNST : noyau du lit de la strie terminale ; Hypo : hypothalamus ; MeA : amygdale médiane ; MOB : bulbe olfactif principal ; MOE : épithélium olfactif principal ; OT : tubercule olfactif ; Pir : cortex pyriforme ; VNO : organe voméro-nasal (Asaba et al., 2014)

L'olfaction semble également cruciale dans le phénomène de puberté précoce induite par la présence du mâle chez les porcins et les bovins. En effet comme indiqué précédemment, chez les bovins la stimulation par de l'urine de taureau uniquement induit une avance de puberté chez la génisse (Izard and Vandenberg, 1982). Chez les porcins, on sait que le seul fait de mettre une jeune femelle dans un enclos précédemment occupé par un mâle induit une puberté précoce, preuve que la présence du mâle n'est pas requise dans ce phénomène (Kirkwood and Hughes, 1980). L'importance de l'olfaction a été confirmée par la suite lors d'une expérience où de jeunes truies ont subi une ablation des bulbes olfactifs avant d'être exposées à un mâle. Ces femelles n'ont pas d'avance de puberté alors que les femelles non-opérées ont un premier œstrus avancé de 25 jours (Kirkwood et al., 1981). Le système olfactif est donc nécessaire dans l'induction de la puberté précoce chez la truie ; néanmoins, la limitation de la stimulation à un contact indirect induit une forte diminution de l'effet stimulateur de la puberté (Pearce and Paterson, 1992). En effet, on observe une diminution de 50% de l'efficacité de la présence du mâle à induire une puberté précoce lorsque le mâle est maintenu séparé des femelles par une barrière, le pourcentage de femelles pubères passant de 75% à 38% (Pearce and Paterson, 1992). On sait que chez les porcins, de nombreuses phéromones sont contenues dans la salive du verrat, l'absence de contact direct a donc pu limiter l'accès à ces molécules. Néanmoins, la simple utilisation de salive de verrat n'a pas permis de stimuler les femelles (Booth, 1984). Une hypothèse suggère l'implication d'un bouquet de molécules pouvant avoir des origines différentes (salive, urine, ..) plutôt que d'une molécule unique à l'origine de cette effet stimulateur sur la puberté chez les porcins.

Chez les petits ruminants, l'implication de l'olfaction dans cet « effet Vandenberg » n'a pas été testée, mais dans le cadre d'autres expérimentations, l'importance de l'olfaction dans la modulation de la reproduction par des interactions socio-sexuelles a pu être mise en évidence. Ainsi des travaux réalisés chez la chèvre ont démontré que l'exposition de femelles adultes à du poil de bouc ou de bélier induisait une hausse de l'activité cérébrale dans la région des neurones à GnRH, activation qui n'était pas observée lors d'une exposition à de la laine de brebis (Ichimaru et al., 2008). L'exposition à du poil de bouc induit également une augmentation de l'activité électrophysiologique dans le noyau arqué, à proximité des neurones KNDy (Murata et al., 2011). En 2014, une équipe japonaise a identifié une molécule présente dans le poil de bouc, le 4-ethylotanal. L'exposition à cette molécule seule permet d'induire une hausse de l'activité dans la zone générant les pulses de GnRH chez la chèvre (Murata et al.,

2014). Chez la brebis, l'exposition à de la toison de bélier induit également une réponse neuroendocrine avec une hausse de la sécrétion pulsatile de LH, mais contrairement à ce qui a été décrit chez les rongeurs, une lésion du système olfactif accessoire ne permet pas d'inhiber cette réponse (Cohen-Tannoudji et al., 1986). L'implication du système olfactif principal a alors été étudiée et contrairement aux résultats obtenus après une lésion du système accessoire, une lésion du système olfactif principal induit une baisse significative du nombre de femelles répondant au stimulus olfactif (Gelez and Fabre-Nys, 2004). Chez les petits ruminants, la modulation sociale de la fonction de reproduction semble donc impliquer le système olfactif principal et non l'organe voméronasal pourtant souvent considéré comme le centre de traitement des phéromones. La découverte chez la chèvre de récepteurs de type voméronasaux au sein de l'épithélium olfactif principal est un premier élément pouvant expliquer comment l'odeur du mâle est traitée par le système olfactif principal (Wakabayashi et al., 2007, 2002)

Ainsi la puberté est un évènement crucial dans le développement d'un individu car il marque l'entrée dans la vie reproductive. Si l'on ne connaît toujours pas à ce jour la nature de l'évènement déclencheur de cette transition pubertaire, on connaît de mieux en mieux les différents facteurs internes comme externes à pouvant moduler l'âge à la puberté. On sait en effet que la génétique tient une part prépondérante mais que la variation d'autres facteurs comme la photopériode, l'état métabolique de l'individu ou encore l'environnement social dans lequel il évolue pourront selon les cas inhiber la transition pubertaire et donc induire un retard de puberté ou au contraire accélérer la maturation sexuelle de cet individu.

IV. La chèvre (*Capra hircus*), un modèle pour l'étude de la régulation sociale de la fonction de reproduction

La chèvre est un mammifère dont la reproduction, sous les latitudes tempérées, est saisonnée mais qui présente également une très bonne réponse à l'effet mâle démontrant une forte sensibilité de l'axe reproducteur femelle à la présence de mâles. Ces critères en font un modèle de choix pour l'étude de la modulation de la transition pubertaire par des facteurs sociaux et environnementaux.

A. La chèvre, une espèce à reproduction saisonnée

Les caprins sont une espèce à reproduction saisonnée, néanmoins, on observe des différences qui peuvent être liées à la race mais aussi à la latitude à laquelle les animaux sont élevés. En effet, les caprins sont des animaux dit de « jours courts » exception faite de certaines races de chèvres des zones équatoriales et tropicales (chèvre créole par exemple) qui présentent des cycles toute l'année, néanmoins ces chèvres peuvent présenter un profil saisonné lorsqu'elles sont soumises à des variations plus importante de la photopériode (Chemineau et al., 2004).

En France, la race de chèvre la plus répandue est la chèvre Alpine. Utilisée pour sa production laitière elle présente des caractéristiques de reproduction très saisonnées. En effet, sous une latitude tempérée où la durée du jour varie entre 8h et 16h par jour, la période de reproduction de la chèvre Alpine débute en septembre-octobre et se termine en février-mars (Figure 21 ; Chemineau et al., 1992). Ainsi le cycle reproductif annuel de la chèvre est composé de deux parties, la période de reproduction et la période de repos sexuel ou saison d'ancestrus. La chèvre Alpine maintenue hors reproduction passe ainsi la majorité de l'année en période de repos sexuel (environ 250 jours par an).

Le bouc alpin présente également une variation de son activité de reproduction observable par la mesure des volumes testiculaires, par le comportement sexuel et/ou par la mesure des concentrations plasmatiques en testostérone (Delgadillo et al., 2002; Flores et al., 2000). En comparaison de la saison de reproduction des femelles, les boucs présentent un léger décalage puisque la période de reproduction des boucs démarre plus tôt. Ainsi on observe que les volumes testiculaires atteignent leur maximum en septembre puis diminuent jusqu'à atteindre leur minimum en mars (Delgadillo et al., 1991).

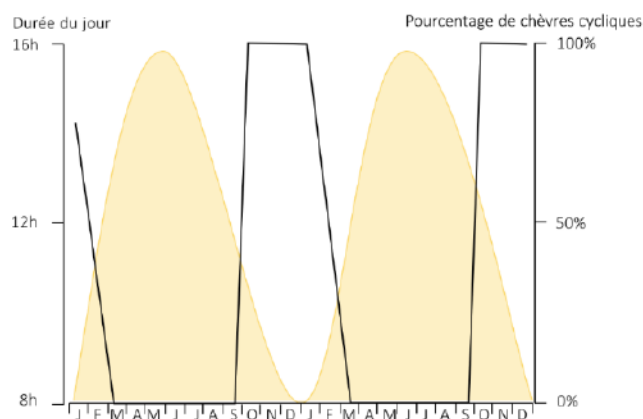


Figure 21. Variation saisonnière de l'activité sexuelle de la chèvre alpine sous une latitude tempérée.

(D'après Chemineau et al., 1992)

1) En saison sexuelle

Au cours de la saison sexuelle, les chèvres présentent une succession de cycles ovulatoires et œstriens. Comme décrit auparavant, le cycle œstrien de la chèvre se divise en deux phases : la phase folliculaire et la phase lutéale. En moyenne le cycle œstrien de la chèvre s'étend sur 21 jours, 77% des chèvres présentant un cycle entre 17 et 25 jours. La durée relative des deux phases du cycle est très inégale, la phase folliculaire est courte, d'une durée moyenne de 3 à 5 jours alors que la phase lutéale dure en moyenne entre 16 et 18 jours (Chemineau et al., 1982; Fatet et al., 2011). Comme pour les autres mammifères, la phase lutéale est caractérisée par une hausse de la sécrétion de progestérone, les niveaux de progestérone dépasseront alors les 0,5ng/mL peu après l'ovulation pour monter jusqu'à 10-12ng/mL au maximum du cycle (Chemineau et al., 1982). On observe une faible pulsativité de la LH au cours de la phase lutéale (autour de 0,3 pulse par heure), cette pulsativité est fortement augmentée au moment de la phase folliculaire (environ 1 pulse par heure) ce qui stimule la sécrétion d'œstradiol. Une fois les niveaux d'œstradiol assez élevés, un rétrocontrôle positif sur la sécrétion de LH et FSH se met en place, induisant le pic pré-ovulatoire de LH et de FSH. L'ovulation a lieu 20h après le pic pré-ovulatoire de LH, et 5 jours après l'ovulation les cellules du follicule ovulatoire se lutéinisent pour former le corps jaune. Chez la chèvre alpine, les femelles expriment un comportement d'œstrus pendant environ 36h, cette phase démarre en période péri-ovulatoire, soit en moyenne entre 9h et 37h avant l'ovulation (Fatet et al., 2011). Au cours de cette phase, les femelles vont exprimer des comportements sexuels spécifiques permettant d'attirer et de stimuler le mâle.

- Le comportement sexuel des caprins

Comme défini précédemment, le comportement sexuel de la femelle peut être décomposé en trois stades : l'attractivité, la proceptivité et la réceptivité (Beach, 1976). La première phase (attractivité) est une phase passive pour la femelle, elle n'adopte pas de comportement particulier mais stimule passivement l'intérêt du mâle par l'émission de signaux sensoriels attractifs. Au cours de la phase de proceptivité, la femelle montre une grande agitation, se traduisant par une hausse de son activité locomotrice, une augmentation du nombre de vocalisations. Elle cherche activement à stimuler le mâle et à attirer son attention par l'expression de comportements spécifiques comme des frétillements de la queue ou encore par l'émission d'urine à proximité du mâle (Figure 22). Lors de cette phase on observe également des chevauchements de la part des femelle en œstrus sur d'autres femelles qu'elles soient elles-mêmes en œstrus ou non. Durant cette phase, la femelle cherche à stimuler le mâle mais continue de refuser ses avances. La phase de réceptivité est atteinte lorsque la femelle acceptera la monte. Cette phase se caractérise ainsi par une immobilisation active de la femelle lors du chevauchement par le bouc et l'adoption d'une posture spécifique, une courbure du dos facilitant l'intromission par le mâle (Figure 22, Fabre-Nys, 2000; Fabre-Nys and Gelez, 2007).

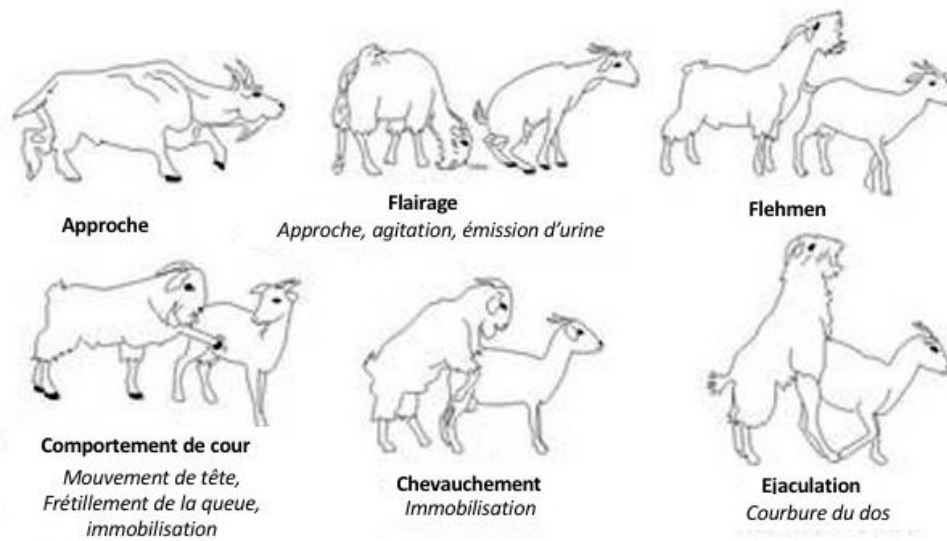


Figure 22. Comportement sexuel du bouc (en gras) et de la chèvre (en italique).
(Fabre-Nys, 2000)

Ces divers comportements de la femelle en œstrus ont pour conséquence de stimuler l'activité sexuelle du bouc et son intérêt pour les femelles en chaleur. Le bouc va donc, lui aussi, exprimer une série de comportements stéréotypés. Lors de la phase appétitive, le mâle cherche le contact de la femelle via la réalisation d'approches latérales. Le bouc adopte une posture particulière, tête basse, oreilles couchées et il aborde les femelles latéralement au niveau du flanc. Ce comportement s'accompagne souvent d'investigations de la zone ano-génitale de la femelle qui permettent une identification olfactive de l'état physiologique de la femelle. On observe régulièrement un comportement de flehmen lors de ces investigations ou lors du flairage de l'urine des femelles (Figure 23). Ce comportement de flehmen se caractérise par un retournement de la lèvre supérieure ; il est observé chez de nombreux mammifères et permet le passage actif des molécules olfactives de l'extrémité nasale vers l'organe voméronasal (Ladewig and Hart, 1980).



Figure 23. Comportement de flehmen (à gauche) et d'auto-marquage urinaire (à droite) chez le bouc.

Les approches latérales sont également souvent accompagnées de vocalisations particulières et de coups de membres antérieurs ; lorsque la femelle n'est pas réceptive elle fuit face aux avances du mâle. Au cours de cette phase appétitive, il n'est pas rare d'observer des comportements d'auto-marquage olfactif de la part des mâles (Figure 23). Les boucs vont alors arrondir leur dos afin de s'asperger la barbe, la face et la bouche d'urine ; ce comportement est très souvent suivi, lui aussi, d'un comportement de flehmen. La phase consommatoire débutera avec l'immobilisation active de la femelle qui va stimuler chez le mâle le comportement de monte et d'intromission. Cette phase prend fin avec l'éjaculation du mâle (Figure 22; Fabre-Nys, 2000).

2) Au cours de l'anœstrus saisonnier

Sous des latitudes tempérées, l'anœstrus saisonnier débute en février-mars pour s'achever en septembre. Cette période se traduit par une absence quasi-complète de cycles œstriens et de comportements sexuels. Cette absence d'activité sexuelle est due à un changement dans la sensibilité au rétrocontrôle de l'œstradiol sur le système nerveux central. Une brebis ovariectomisée, traitée par des implants d'œstradiol mimant la sécrétion observée en phase folliculaire, présente une sécrétion pulsatile de LH très différente en saison sexuelle et en anœstrus. Ainsi, au cours de l'anœstrus, cette femelle aura 1 à 2 pulses de LH par jour contre 2 pulses par heure en saison sexuelle. Cette femelle étant ovariectomisée et traitée par des implants d'œstradiol libérant une quantité constante de ce stéroïde, les concentrations plasmatiques circulantes d'œstradiol sont stables, la variation de la sécrétion de la LH est donc la conséquence d'une modification de la sensibilité du système nerveux central à l'œstradiol. Au cours de l'anœstrus, cette sensibilité est plus élevée et l'œstradiol aura une action inhibitrice très puissante sur la sécrétion de LH, qui par conséquence ne permet pas l'activité ovarienne cyclique de la femelle.

Lors des phases de transition entre la période de reproduction et la période de repos sexuel, les chèvres présentent régulièrement des cycles plus courts ainsi que des ovulations silencieuses, c'est-à-dire des ovulations non-accompagnées d'un comportement d'œstrus.

Ainsi, les caprins présentent, au cours de l'année, une alternance claire entre une saison de reproduction et une saison de repos sexuel. Il est courant d'observer le comportement de ces animaux pour en déduire les dates de démarrage et de fin de la saison de reproduction. Il est cependant courant d'observer au cours de la période de reproduction des femelles qui semblent en anœstrus, ces femelles ne présentent aucun comportement sexuel et semblent donc acycliques. La première cause d'absence de cyclicité au cours de la saison sexuelle est la pseudogestation, la chèvre présente les caractéristiques d'une gestation mais sans qu'il y ait eu de mise en reproduction : niveaux élevés de progestérone, prise de poids due à une accumulation de liquide dans l'utérus (hydromètre) et production de lait dans certains cas (Duquesnel et al., 1992). Cet état est causé par la persistance d'un corps jaune qui ne sera pas dégradé et qui va donc continuer à sécréter de la progestérone mimant un état de gestation. Le diagnostic de pseudogestation peut se faire par échographie, la chèvre présente une accumulation de liquide dans les cornes utérines mais aucun fœtus ne peut être détecté. La pseudogestation peut durer jusqu'à 5 mois soit la durée d'une gestation normale, sa fin peut être spontanée ou induite par

un traitement à base de prostaglandines PGF 2α (classiquement une injection sous-cutanée de cloprosténol) qui vont induire la dégradation du corps jaune persistant en moins de 24h. La femelle va alors expulser le liquide contenu dans son utérus et présentera de nouveau un comportement d'œstrus dans les 24 à 48h après l'injection de PGF 2α (Duquesnel et al., 1992). La pseudogestation est principalement observée chez les femelles ayant déjà eu des petits mais elle est également décrite chez la chevrette nullipare. L'incidence des pseudogestation est plus élevée en début et en fin de saison sexuelle ou alors dans le cadre d'ovulations induites que ce soit par des traitements hormonaux ou par la présence de mâles (Duquesnel et al., 1992).

B. Désaisonnement des caprins, une technique de maîtrise de la reproduction

Les caprins présentent donc une forte saisonnalité de leur reproduction ce qui a pour conséquence de concentrer les mises-bas au printemps. Cette saisonnalité de la reproduction entraîne donc une saisonnalité de la production, que ce soit la production de lait ou de viande de chevreaux. Ainsi en France la production laitière est divisée de moitié en hiver par rapport au printemps-été (autour de 25 millions de litres contre 50 millions de litre selon l'institut de l'élevage). Cette différence de taux de production induit logiquement une variation du prix d'achat du lait qui augmente fortement en hiver. Afin de profiter de ce meilleur prix, une partie des éleveurs caprins travaillent sur des troupeaux dits désaisonnés, c'est-à-dire des animaux qui, via l'utilisation de traitements hormonaux, lumineux, ou par l'effet mâle, sont mis à la reproduction au printemps lorsqu'ils sont naturellement en anœstrus saisonnier. Ainsi les caprins, en plus d'être de bons modèles pour l'étude de la fonction de reproduction, sont des animaux dont la maîtrise de la reproduction présente un fort intérêt agronomique.

1) Les traitements hormonaux

Ces traitements ont pour but de mimer la succession d'évènements endocrines régulant le cycle sexuel dans le but d'induire le comportement d'œstrus et l'ovulation au moment voulu ; cela permet également de synchroniser les femelles entre elles. Le traitement classique débute par la pose d'une éponge intra-vaginale imprégnée d'un analogue de la progestérone, l'acétate de fluorogestone, afin de mimer une phase lutéale bloquant ainsi la maturation ovocytaire et l'ovulation mais aussi de sensibiliser le système nerveux central aux effets de l'œstradiol

(Figure 24). Deux jours avant le retrait de l'éponge, les femelles reçoivent une injection intramusculaire de $\text{PGF}_{2\alpha}$ (cloprosténol) et de sérum de jument gravide (PMSG).

Le cloprosténol permettra de détruire un corps jaune préexistant mais aussi de mettre fin à une possible pseudogestation comme décrit précédemment. La PMSG de par sa double activité LH et FSH (Combarrous et al., 1984) stimule la croissance terminale mais aussi la maturation des follicules. Le retrait de l'éponge entraîne une chute des taux d'acétate de fluorogestone et simule la fin d'une phase lutéale ; l'action inhibitrice de cet analogue de la progestérone sur l'axe HHO est donc levée et la femelle présentera un comportement d'œstrus en moyenne 30h après le retrait de l'éponge (Figure 24).

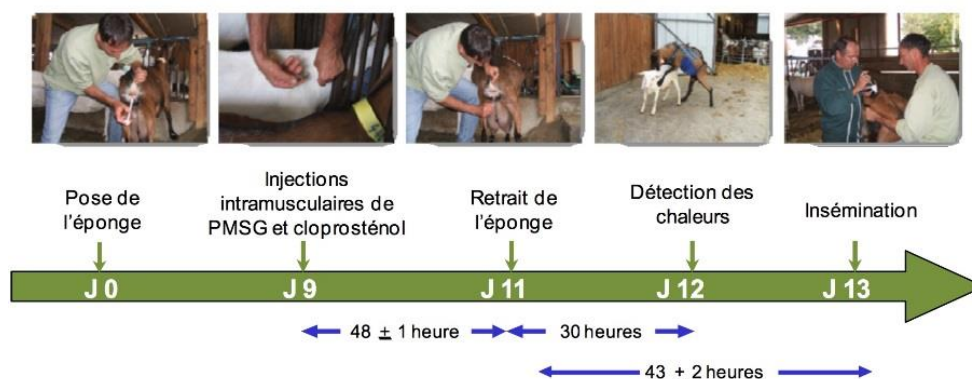


Figure 24. Le traitement hormonal classique de synchronisation de l'œstrus en caprin.
Fiche technique de l'institut de l'élevage (Idele)

Ce protocole est efficace mais l'injection répétée de PMSG induit une réponse immunitaire chez les femelles qui produisent alors des anticorps anti-PMSG réduisant fortement l'efficacité du traitement. En plus de ce problème de réponse immunitaire, ces traitements hormonaux sont de moins en moins acceptés au niveau de la société qui aspire à une agriculture plus respectueuse de l'environnement et du bien-être animal.

2) L'effet mâle

L'induction de l'ovulation par une exposition au mâle, aussi connu sous le nom d' « effet mâle » est un phénomène connu depuis des dizaines d'années dont les premières traces écrites, celles-ci remontent au 19^{ème} siècle :

« L'avantage qui résulte de la naissance très rapprochée des agneaux, a fixé l'attention de M. Morel de Vindé ; ayant remarqué qu'à l'époque de l'introduction des béliers, dans les troupeaux de brebis, il se trouvait constamment beaucoup moins de brebis en chaleur, qu'au bout d'une quinzaine de jours, il a conclu de cette observation, que la présence des béliers hâtait le retour des chaleurs des brebis, ... »

(Girard, 1813)

Ce phénomène premièrement décrit chez les ovins a été mis en évidence chez les caprins plus tard, la première trace bibliographique est attribué à Maurice Shelton en 1960 (Shelton, 1960). Dans ces deux espèces, l'effet mâle est décrit comme l'induction de l'ovulation et du comportement d'œstrus chez la femelle en anœstrus par la présence du mâle. En effet chez les caprins suite à la mise en présence d'un mâle, on observe une première vague d'œstrus et d'ovulations dans les 10 premiers jours puis une seconde vague 25-30 jours après l'introduction du bouc (Figure 25; Chemineau, 1983).

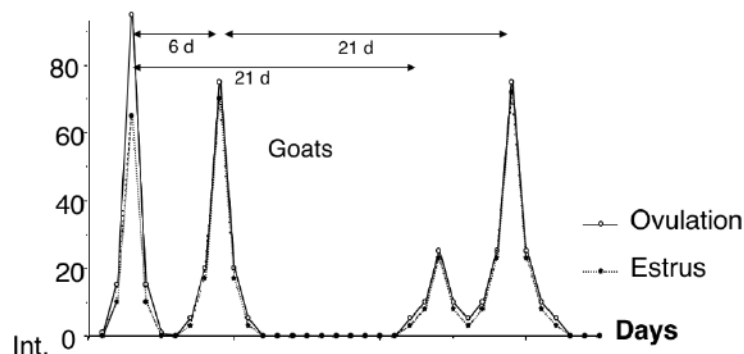


Figure 25. Ovulations et comportement d'œstrus chez la chèvre créole en réponse à l'introduction d'un mâle.

(D'après Chemineau et al., 2006)

Près de 100% des femelles ovulent dans les trois jours suivant l'introduction du mâle et plus de la moitié d'entre-elles présentent un comportement d'œstrus. Suite à cette première ovulation on observe deux cas de figures, la femelle peut présenter un cycle normal de 21 jours mais ce n'est le cas que de 25% des femelles. Les trois quarts des chèvres soumises à un effet mâle présentent un cycle court suite à l'ovulation induite (Figure 25). Ce cycle court dure moins de 6 jours, il semble être dû à un follicule ovulatoire de « mauvaise qualité » ce qui a pour conséquence la lutéolyse précoce du corps jaune. Ainsi contrairement aux cycles normaux au cours desquels les niveaux de progestérone vont atteindre 10-12ng/mL, dans le cas des cycles courts les niveaux de progestérone ne dépassent pas les 1-1,5ng/mL (Chemineau et al., 1984). Les femelles présentant ce type de réponse vont ainsi ré-ovuler très rapidement, dans les 6 jours, puis présenteront à la suite de cette seconde ovulation un cycle normal de 21 jours (Figure 25). Cette induction de l'ovulation chez des femelles en anœstrus saisonnier est dû à une réactivation de l'axe gonadotrope induite par la présence du mâle, on observe ainsi que le nombre de pulses de LH est multiplié par 3 après l'introduction du mâle (Chemineau et al., 1986b). Cette réponse au niveau de la sécrétion pulsatile de LH est très rapide puisque l'on constate une augmentation de cette sécrétion dans les 15 minutes suivant l'introduction du mâle (Bedos et al., 2014; Chemineau et al., 1986a; Vielma et al., 2009).

- Importance des signaux émis par le bouc et de son niveau d'activité sexuelle

Le facteur le plus important pour l'induction d'un effet mâle efficace, est le niveau d'activité sexuelle du mâle. Le bouc sexuellement actif va ainsi dégager une odeur spécifique lorsqu'il est en saison de reproduction, odeur qu'il ne dégage pas en période de repos sexuel ; le bouc actif exprimera également une série de comportements de cour (hausse du nombre de vocalisations, approches latérales, ...) non présents lors du repos sexuel. L'ensemble de ces signaux stimulent l'activité sexuelle de la femelle. L'exposition à un mâle sexuellement actif permet d'induire l'ovulation chez plus de 85% des femelles en anœstrus alors que l'exposition à des mâles entiers mais sexuellement inactifs ne permet d'induire l'ovulation que chez 5 à 15% des femelles en moyenne (Delgadillo and Vélez, 2010; Flores et al., 2000; Loya-Carrera et al., 2014; Ponce et al., 2014). En effet, seuls ces mâles sexuellement actifs permettent de stimuler chez la femelle des régions cérébrales clés dans la régulation de la fonction de reproduction que sont le noyau arqué et l'aire pré-optique (Bedos et al., 2016b). Par ailleurs, l'utilisation de ces mâles sexuellement actif a permis de simplifier les protocoles pour la réalisation d'un effet mâle

efficace par la suppression de différentes étapes comme la préalable isolation complète des femelles ou encore la nécessité de changer régulièrement le mâle pour avoir un niveau suffisant de stimulation (Delgadillo et al., 2009; Loya-Carrera et al., 2014; Zarazaga et al., 2017).

Parmi les signaux émis par le bouc, l'odeur semble jouer un rôle important puisqu'en 1990, une équipe allemande a stimulé 5 femelles avec des poils de bouc et parmi ces 5 femelles 3 ont eu un comportement d'œstrus et 2 ont ovulé suite à cette stimulation (Claus et al., 1990). Par ailleurs, des études plus récentes ont mis en évidence une hausse de l'activité cérébrale dans la région des neurones à GnRH et dans la région des neurones KNDy suite à une exposition à des poils de boucs (Ichimaru et al., 2008; Murata et al., 2011). Néanmoins, la stimulation de femelles par un bouc sexuellement actif mais sédaté, donc dégageant l'odeur caractéristique du bouc mais n'exprimant aucun comportement sexuel, ne permet pas d'induire l'ovulation (Martinez-Alfaro et al., 2014). Le mâle sédaté comme le mâle non sédaté, induisent une réponse rapide au niveau de la sécrétion de LH mais cette réponse n'est maintenue que dans le groupe de femelles exposées à un mâle non-sédaté. Les stimuli olfactifs permettent donc d'initier une réponse chez la femelle en anœstrus mais l'exposition physique à un mâle semble importante pour une réponse maximale. Des travaux se sont penché sur l'importance du contact direct mâle-femelle dans le cadre de l'effet mâle, le nombre de femelles qui ovulent est fortement diminué si le mâle est séparé de celles-ci par un couloir, 15% de ces femelles ovulent contre 88% des femelles ayant un contact direct avec le mâle (Chemineau, 1987). L'utilisation de boucs sexuellement actifs permet également de diminuer la durée de stimulation quotidienne permettant d'induire l'ovulation, ainsi le nombre de femelles qui ovulent est similaire, que l'exposition au mâle soit permanente ou réduite à 1h de contact chaque jour (Bedos et al., 2014). Ces mâles sexuellement actifs sont tellement efficaces dans l'induction de l'activité sexuelle chez la femelle, que lors d'une récente étude réalisée au Mexique, il a été démontré que la présence continue de ces boucs permet d'annuler totalement la survenue de l'anœstrus saisonnier et ce pendant deux années consécutives (Delgadillo et al., 2015).

Le niveau d'activité sexuelle du bouc est donc un facteur crucial dans la réalisation d'un effet mâle. Or, les boucs présentent eux aussi une saisonnalité de leur activité sexuelle. Afin d'avoir des mâles actifs capables de stimuler les femelles pendant la période d'anœstrus il est donc nécessaire de stimuler la libido de ces mâles. L'utilisation de traitements photopériodiques permet d'abolir les variations saisonnières de l'activité sexuelle du bouc (Delgadillo et al., 1992). Ainsi, l'exposition alternée à un mois de jours longs (16h de lumière par jour) puis un

mois de jours courts (8h de lumière par jour) tout au long de l'année permet de préserver une production spermatique constante (Delgadillo et al., 1992). Le traitement de stimulation des mâles utilisé classiquement dans le cadre d'un effet mâle consiste en une exposition continue pendant 2,5 mois des mâles à une photopériode longue de 16h de lumière quotidienne, les boucs sont ensuite exposés à des jours plus courts, soit la photopériode naturelle soit via un traitement de mélatonine (Delgadillo et al., 2001; Muñoz et al., 2016). Cette brusque transition d'une photopériode longue à une photopériode plus courte entraîne une hausse de la sécrétion de testostérone, une augmentation des volumes testiculaires et l'induction d'un comportement sexuel actif après 6 à 8 semaines d'exposition aux jours courts (Figure 26). L'utilisation d'implants de mélatonine est nécessaire lorsque la photopériode naturelle à la sortie des jours longs est trop longue pour induire seule la reprise de l'activité sexuelle, c'est le cas à partir de la mi-mars. Dans ce cas, des implants de mélatonine sont insérés en sous-cutané à la base de l'oreille du mâle, ces implants vont libérer de la mélatonine en continue mimant ainsi une phase de jours courts alors même que les animaux sont exposés à la photopériode naturelle. Ces boucs photo-stimulés présentent un comportement sexuel parfaitement similaire au comportement sexuel du bouc en période de reproduction (Bedos et al., 2016a).

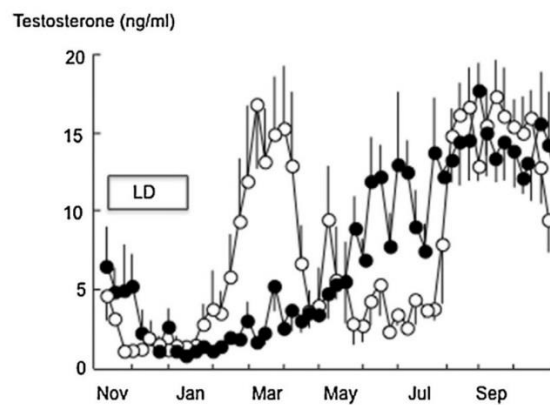


Figure 26. Le traitement photopériodique de jours longs permet d'induire la reprise de l'activité sexuelle chez le bouc. ● Boucs traités par des jours longs (LD) ○ Boucs en photopériode naturelle

(Delgadillo et al., 2014)

L'effet mâle permet ainsi d'induire et de synchroniser l'ovulation chez des chèvres en anœstrus saisonnier et ce en se substituant à l'utilisation de traitement hormonaux. Ce protocole est mis en place en France mais aussi dans de nombreux autres pays de par le monde et en particulier au Mexique où la production caprine est très importante.

- Protocoles d'effet mâle : des variations selon la latitude

L'effet mâle est une méthode utilisée dans divers pays, si le protocole général est très similaire, quelques aménagements semblent être nécessaires selon la latitude à laquelle se trouvent les animaux. En effet comme expliqué précédemment, les caprins sont une espèce saisonnée et le facteur principal régulant cette saisonnalité est la photopériode. Or la photopériode varie grandement avec la latitude, ainsi en France on observe des variations plus importantes de la durée du jour que dans les régions subtropicales comme le nord du Mexique. Ainsi au Mexique, la seule exposition des femelles à des mâles sexuellement actifs permet d'induire l'ovulation chez celles-ci. En France, la bibliographie indique que la simple exposition des femelles à un mâle ne permet pas d'induire l'ovulation. Ainsi, seul 10% des chèvres alpines simplement exposées à un mâle ovulent, ce taux passe à plus de 60% si les femelles sont elles aussi traitées à la lumière avec ou sans implant de mélatonine (Chemineau, 1989). La variation de photopériode plus importante induirait un état d'anœstrus plus profond et la fonction de reproduction femelle ne pourrait donc pas être réactivée par la seule présence d'un bouc. L'institut de l'élevage préconise ainsi en France le traitement lumineux pour les mâles et les femelles, les femelles doivent ainsi être soumises pendant 90 jours à un traitement de jours longs puis pendant 60 jours à un traitement de jours courts, des implants de mélatonine seront nécessaires si le traitement de jours courts démarre après la mi-mars comme décrits pour les mâles.

C. La puberté chez la chèvre

La chèvre Alpine se reproduit à l'automne, la gestation dure en moyenne 151 jours et la prolificité est de 1,7 chevreaux par chèvre (Amoah et al., 1996). Dans le cadre d'une reproduction classique, c'est-à-dire avec une naissance observée au printemps, les chevrettes alpines entrent en puberté à l'âge de 7-8 mois. Mais comme expliqué dans le paragraphe précédent, de nombreux élevages pratiquent le désaisonnement afin d'assurer une production tout au long de l'année, le décalage de la reproduction de l'automne au printemps induit donc un décalage des mises-bas qui ont lieu dans ce cas à l'automne. Ces chevrettes nées à l'automne atteignent donc l'âge de 7-8 mois au cours de l'anœstrus saisonnier. L'action inhibitrice de la photopériode ne permet pas la réactivation spontanée de l'axe HHO de ces femelles, elles n'ovuleront pour la première fois qu'à la saison de reproduction suivante c'est-à-dire autour de l'âge de 1 an (Delgadillo et al., 2007).

- Induction d'une puberté précoce chez la chevrette née à contre-saison

Pour des raisons de conduite du troupeau et des raisons économiques, les éleveurs ne souhaitent pas que ces femelles soient saillies qu'à l'âge de 1 an puisque cela prolonge la période dite « improductive » et que, dans ce cas, les primipares ne mettent pas bas en même temps que le reste du troupeau. En pratique, les éleveurs tentent donc d'induire la puberté chez ces jeunes femelles afin de pouvoir les mettre en reproduction vers l'âge de 7-8 mois comme c'est le cas pour les chevrettes nées en saison. Peu de moyens sont actuellement disponibles pour réaliser cet objectif, expliquant le faible taux de reproduction de ces chevrettes à 7-8 mois. En effet, il est fortement déconseillé de réaliser un traitement hormonal sur une chevrette non cyclée, la pose d'éponge est par ailleurs déconseillée avant l'âge de 7-8 mois et un poids vifs de 32Kg. L'utilisation de traitements photopériodiques semble être une bonne alternative permettant d'induire une réponse ovulatoire chez 70 à 90% des femelles mais un taux de gestation inférieur à 50% après insémination artificielle (Gateff et al., 2003). Peu de travaux ont testé l'effet de la seule présence du mâle sur la transition pubertaire de la jeune chevrette, une étude montre que la présence de bouc aurait un effet accélérateur sur la maturation sexuelle (Amoah and Bryant, 1984). Mais aucune donnée n'est disponible sur la quantification de cette avance de puberté, les profils hormonaux des individus n'ayant pas été suivis on ne peut pas affirmer que cette méthode induit une réelle induction précoce de la cyclicité ou si cela n'induit qu'une ovulation précoce qui serait suivie d'un retour à un état acyclique.

A l'heure actuelle extrêmement peu d'études ont permis de tester les conséquences d'une exposition précoce au bouc sur la puberté de la jeune chevrette. Le modèle caprin, de par sa saisonnalité permet, de plus, de prendre en compte le facteur « photopériode » avec le cas de ces chevrettes nées à contre-saison et présentant un retard de puberté. Par ailleurs, le modèle caprin permet de réaliser de nombreux prélèvements aisément et sans perturber la physiologie de l'animal, permettant un suivi fin de mécanismes neuroendocriniens impliqués dans la transition pubertaire comme la hausse de la sécrétion pulsatile de LH. La chèvre alpine semble donc un modèle adapté à l'étude de la régulation sociale de la transition pubertaire et des possibles conséquences physiologiques mais aussi comportementales d'une exposition précoce à un mâle adulte.

Chapitre II : Hypothèses de travail et objectifs de la thèse

Comme nous l'avons décrit précédemment, la transition pubertaire est une période cruciale pour un individu marquant le commencement de sa vie reproductive. Le mécanisme déclencheur de la transition pubertaire reste inconnu mais de nombreux facteurs internes comme externes à l'individu ont été identifiés comme étant des régulateurs de cette transition pubertaire pouvant selon les cas induire une puberté précoce ou bien l'inhiber.

Parmi ces facteurs, l'environnement social a été décrit comme un élément crucial comme le montre les travaux précurseurs de John Vandenberg chez les rongeurs (Vandenberg, 1976, 1974, 1969, 1967). Il a ainsi mis en évidence ce phénomène aujourd'hui connu sous le nom d' « Effet Vandenberg » qui caractérise, chez les rongeurs, l'induction d'une puberté précoce chez la femelle par une exposition précoce à un mâle adulte.

Cette thèse s'articule autour de plusieurs objectifs :

1. Avant de tester l'efficacité des mâles à induire une puberté précoce chez la femelle, nous avons testé l'efficacité d'un traitement photopériodique à induire l'activité sexuelle chez le bouc. Pour cela nous nous sommes appuyés sur le phénomène d'effet mâle, on sait en effet que, dans ce cas, seuls les boucs présentant un fort niveau d'activité sexuelle pourront induire l'ovulation chez les femelles en œstrus. Un protocole de stimulation par exposition à des jours longs est utilisé en latitudes subtropicales pour induire l'activité sexuelle chez le bouc, ces boucs stimulés sont très efficaces pour induire l'ovulation chez les femelles (Delgadillo and Vélez, 2010). L'utilisation d'un protocole similaire sous une latitude tempérée a été testée mais il s'est jusqu'alors révélé bien moins efficace que sous une latitude subtropicale (Chemineau, 1989).

Hypothèse : Le niveau d'activité sexuelle des boucs n'avait pas été suivi dans les expériences menées sous une latitude tempérée or on sait désormais que, dans le cadre de l'effet mâle, c'est un critère crucial pour l'induction de l'ovulation. Notre hypothèse est que si les mâles sont suffisamment sexuellement actifs, leur seule présence permettrait comme sous des latitudes subtropicales d'induire l'ovulation durant la période d'œstrus (article 1).

2a. Mettre en évidence les conséquences d'une exposition précoce à des mâles adultes sur la maturation sexuelle de la chevrette et caractériser l'importance du niveau d'activité sexuelle du mâle pour l'induction d'une puberté précoce. De jeunes femelles ont été exposées dès le sevrage à des mâles entiers ou à des mâles castrés, un groupe témoin de femelles est toujours resté isolé des mâles. Chaque groupe était hébergé dans un bâtiment différent pour éviter tout risque de contamination sensorielle.

Hypothèses : De précédents travaux laissent à penser que la présence de boucs permettrait d'induire une puberté précoce chez la jeune chevrette. Les femelles exposées à des mâles entiers devraient donc présenter une avance de leur première ovulation et une augmentation précoce de la sécrétion pulsatile de LH signe de la réactivation de l'axe HHO. Ces femelles devraient également présenter une accélération de la maturation du tractus génital. Et, en comparaison de femelles du même âge, ces femelles devraient, au moment de leur première ovulation, présenter des modifications au niveau des populations neuronales impliquées dans le contrôle de la fonction de reproduction. Pour caractériser cela nous avons étudié le système des neurones à GnRH, qui comme décrit précédemment jouent un rôle clé dans la régulation de la fonction de reproduction. Nous pensons que ce phénomène d'accélération pubertaire est due à l'émission de signaux par le mâle qui seraient androgéno-dépendants, la présence de mâles castrés ne devrait donc avoir aucune conséquence au niveau de la physiologie et du niveau de maturation centrale de la jeune chevrette, ces femelles devraient avoir des résultats identiques aux femelles isolées (article 2).

2b. Une expérience préalable du mâle peut-elle avoir des conséquences sur le comportement sexuel de la chevrette ? De jeunes femelles exposées ou non dès le sevrage à des mâles entiers ou à des mâles castrés ont été soumises à un traitement de synchronisation de l'œstrus avant d'être mises en contact avec des mâles sexuellement actifs.

Hypothèses : Nous pensons que les femelles préalablement exposées à un mâle entier présenteraient un meilleur comportement sexuel que les femelles isolées des mâles. Cela se caractériserait par d'avantage de comportement de proceptivité mais aussi par une plus grande réceptivité. Les femelles préalablement exposées à des mâles castrés pourraient présenter un niveau de comportement intermédiaire de par leur préalable expérience du mâle bien que sexuellement inactif (article 2).

3. La présence de boucs sexuellement actifs permet-elle de contrecarrer le retard de puberté observé chez les femelles nées à contre-saison, en automne ? De jeunes femelles nées suite à un effet mâle ont été séparées en 2 groupes au sevrage, un groupe est resté isolé des mâles alors que l'autre groupe a été exposé continuellement à des mâles sexuellement actifs.

Hypothèse : Des travaux réalisés récemment par Abecia et al montrent qu'il est possible d'avancer de 40 jours la première ovulation d'une agnelle née à contre-saison si celle-ci est exposée à des béliers sexuellement actifs (Abecia et al., 2016). Nous pensons donc que la présence de mâle pourrait limiter le retard de puberté chez les chevrettes nées à contre-saison mais il est possible que cette avance de puberté soit moins importante que celle observée les femelles nées en saison. En effet, elles atteindront l'âge de 7 mois, âge moyen de la puberté chez la chèvre, durant l'anœstrus saisonnier c'est-à-dire au moment où la photopériode a une action inhibitrice sur l'axe reproducteur (article 3).

4. Les femelles dont la puberté a été induite précocement par la présence de boucs présentent-elles une meilleure réponse à un effet mâle ? Afin de tester leur réponse à un effet mâle durant l'anœstrus saisonnier, de jeunes femelles exposées ou non dès le sevrage à des mâles entiers ou à des mâles castrés ont été mises en présences à l'âge de 1 an à des mâles sexuellement stimulés (traitement de jours longs). La réponse a été mesurée par des prélèvements de progestérone afin de comparer le taux de femelles ovulant dans chaque groupe.

Hypothèse : Des travaux réalisés dans les années 1980 chez la brebis de race mérinos, montrent que les femelles ayant eu une puberté précoce suite à une exposition au mâle, présentent 5 mois plus tard une meilleure réponse à l'effet mâle. Ces femelles ovulant davantage que les femelles dont la puberté n'a pas été induite (Murtagh et al., 1984). Nous faisons donc l'hypothèse que les femelles ayant ovulé de manière précoce pourraient avoir un meilleur taux de réponse à un effet mâle (article 4).

Chapitre III : Travaux de Recherche

Validation du protocole de photo-stimulation des boucs pour la réalisation d'un effet mâle sous une latitude tempérée

Article 1: Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes.

Chasles Manon¹²³, Chesneau Didier¹²³, Moussu Chantal¹²³, Delgadillo José Alberto⁴, Chemineau Philippe¹²³ & Keller Matthieu¹²³

¹INRA, UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre de recherche Val-de-Loire, Nouzilly, France

²CNRS, UMR 7247, Nouzilly, France

³Université François Rabelais de Tours, Tours, France

⁴Centro de Investigación en Reproducción Caprina, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, Mexico

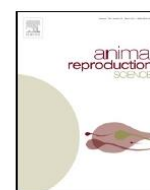
Animal Reproduction Science, 2016

Résumé de l'article

Ce travail préliminaire a visé à valider l'utilisation, sous une latitude tempérée, d'un protocole de stimulation des boucs permettant d'induire par la suite un effet mâle efficace. En effet, sous une latitude subtropicale, on sait que l'on peut induire l'ovulation chez des femelles en anœstrus par l'introduction de mâles sexuellement actifs préalablement stimulés par un traitement photopériodique. Cependant, sous des latitudes tempérées, la variation de la durée du jour est plus importante, cela pourrait être responsable d'une inhibition plus forte de l'activité sexuelle femelle. La faisabilité d'un tel protocole sous une latitude tempérée reste donc à vérifier.

Nous avons donc cherché à déterminer si, sous une latitude tempérée, un traitement photopériodique de jours longs pouvait induire une activité sexuelle intense chez le bouc alpin durant la période de saison sexuelle. Nous avons également testé l'efficacité de ces mâles à induire l'ovulation chez des femelles en anœstrus n'ayant subi aucun traitement préalable. Des boucs stimulés et non stimulés ont ainsi été mis en contact avec des femelles fin mars.

Les boucs qui ont été soumis au traitement lumineux présentaient des volumes testiculaires et des niveaux de testostérone plus élevés, ce traitement a donc permis d'induire une hausse de l'activité sexuelle du bouc. Par ailleurs l'exposition à ces boucs sexuellement actifs a permis d'induire l'ovulation chez davantage de femelles en anœstrus que l'exposition à des boucs non traités (87% vs 14%). Nos résultats indiquent que, sous des latitudes tempérées, il est possible d'induire l'ovulation chez des femelles en anœstrus saisonnier en utilisant seulement des boucs photo-stimulés. Nos résultats montrent également une grande sensibilité de l'axe reproducteur femelle aux indices sensoriels provenant du mâle sexuellement actif.



Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes



Manon Chasles^{a,b,c}, Didier Chesneau^{a,b,c,*}, Chantal Moussu^{a,b,c}, José Alberto Delgadillo^d, Philippe Chemineau^{a,b,c}, Matthieu Keller^{a,b,c}

^a INRA, UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre de recherche Val-de-Loire, Nouzilly, France

^b CNRS, UMR 7247, Nouzilly, France

^c Université François Rabelais de Tours, Tours, France

^d Centro de Investigación en Reproducción Caprina, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2015

Received in revised form 18 February 2016

Accepted 28 February 2016

Available online 2 March 2016

Keywords:

Goat

Male effect

Photoperiod

Ovulation

Sexual behavior

Temperate latitude

ABSTRACT

Goats are seasonal breeders and photoperiod is the main cue controlling the onset and offset of the breeding season. Nevertheless introducing a sexually active buck in a group of females during anestrus can stimulate their reproductive function and induce ovulation. This “male-effect” is very efficient under subtropical latitudes, when using sexually active males previously stimulated by a photoperiodic treatment. However, there is less evidence of its feasibility under temperate latitudes where the more important variation in day length could be responsible for a stronger inhibition of female sexual activity. The aim of this study was therefore to determine whether intense sexual activity can be induced in alpine bucks during the non-breeding season by a long-day treatment under temperate latitude and if these males could be used to produce an efficient male-effect. Bucks ($n = 21$) were divided in two groups, one submitted to a photoperiodic treatment from November 1st to January 15th and then switched to natural photoperiod, while the other group remained entirely under the natural photoperiod. The ones submitted to this light treatment exhibit higher testicular volume and testosterone level 6 weeks after the end of the treatment. At the end of March, bucks were used to stimulate anestrus does ($n = 41$) continuously for 15 days. We showed that (a) light treatment was efficient to induce an increase of sexual activity in bucks and (b) that the introduction of stimulated bucks among females induced a significantly higher proportion of ovulation in anestrus does than control bucks (86% vs 5%). Our results indicate that under temperate latitudes induction of ovulation in females during the anestrus season is feasible using bucks treated with long-days during winter.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Seasonality of reproduction is a common trait of many domestic species and this has been well studied in goats and sheep from temperate and subtropical latitudes. In seasonal breeds there is an alternation between a season of reproduction characterized in females by a succession

* Corresponding author at: Equipe Neuroendocrinologie des Interactions et Comportements Sexuels, Laboratoire de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 7247 INRA/CNRS/Université de Tours, INRA, F-37380 Nouzilly, France.

E-mail address: mkeller@tours.inra.fr (M. Keller).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.030>

0378-4320/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

of oestrus and ovulatory cycles and an anestrus and anovulatory period. In goats from subtropical and temperate latitudes, breeding season in females lasts from early autumn to late winter (Chemineau et al., 1992a), while bucks exhibit intense sexual activity from late summer to late winter (Delgadillo et al., 1992; Shelton, 1978).

Variation in day length has been highlighted as the main environmental cue that determines the time of breeding in goats (Chemineau et al., 2008; Delgadillo et al., 2004). However, other environmental parameters, such as socio-sexual signals, can have an impact on the onset of reproduction (Hutchinson, 1991; Martin et al., 2004; Rodríguez-Martínez et al., 2013). For example, introducing a male in a group of females induces and synchronizes their sexual activity: a phenomenon called the “male-effect”.

Interestingly, the success of the male effect can be increased, under subtropical latitudes, by the use of sexually active bucks which have been previously treated with a long-day light treatment, inducing an intense sexual activity during the non-breeding season in March and April (Chemineau et al., 1992b; Delgadillo et al., 2014, 2001). These sexually active males are very efficient to induce ovulations and estrous behavior in does during the seasonal anestrus (Delgadillo et al., 2002; Flores et al., 2000; Luna-Orozco et al., 2012).

Under temperate latitudes, it has been shown for instance that the use of light treatments for both males and females is needed to get an efficient “male-effect” (Chemineau, 1989; Chemineau et al., 1986). Indeed, despite the fact that photoperiodic treatment can stimulate successfully buck sexual behavior (Delgadillo et al., 1991), females do not show an efficient response following the introduction of these males: only 10% of untreated does ovulated when exposed to a stimulated buck from April 15th to May 27th, while 91% of ovulating does were detected in the group treated by light and melatonin at the same time (Chemineau, 1989). Hence, the protocols of induction of ovulation in goats under temperate latitudes always imply a treatment of both sexes before the “male-effect” (Pellicer-Rubio et al., 2007).

Therefore, performing successfully an efficient “male-effect” by using only light-treated bucks (and not females) has never been reported. Study showing the possibility to induce estrus in alpine does using only photo-stimulated bucks were carried under subtropical latitudes (Delgadillo and Vélez, 2010) but its feasibility under temperate latitudes has not yet been demonstrated.

Variation in day length, which is the main cue regulating seasonal breeding in goats, is much more important under temperate latitudes (from 8 to 16 h) than in the subtropics (from 10 to 14 h). This greater variation in the duration of photoperiod may induce, during the non-breeding season, a deeper anestrus in does raised under temperate latitudes and therefore, the response of those females to male stimulation could be less efficient. Therefore, the aim of our study was to test, in goats raised under temperate latitudes, whether photo-stimulated bucks, showing an intense sexual activity are efficient to induce ovulations in anestrus alpine does by the male effect. This hypothesis is based on our previous works performed under sub-tropical latitudes, which have shown the importance of male sexual

activity in obtaining a high percentage of does responding to the male effect.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Experiments were carried out from October 2013 to August 2014 in Nouzilly, France (latitude 47° 32N and longitude 0° 46E) on adult alpine goats (*Capra hircus*). A total of 62 animals were used, 41 multiparous non-lactating females and 21 males; they were maintained indoors during the experiment. Animals were fed daily with barley straw, lucerne hay and commercial concentrate, with free access to water and mineral blocks. All procedures were performed in accordance with the European directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and approved by an ethical committee for animal experimentation (CEEA VdL, Tours, France).

2.2. Photoperiodic treatment

Twenty-one bucks were used and were divided in two groups. One group (n = 11) was submitted to a photoperiodic treatment of long days (16 h of light and 8 h of darkness per day) from November 1st to January 15th. This treatment was provided in a light proof building and the intensity of the artificial light provided was at least 300lx at the level of the eyes of the animals. From January 16th to the end of the study, the light treatment was stopped and the bucks were moved to inside barns exposed to natural light and therefore exposed to the natural photoperiodic conditions (Fig. 1). This treatment is sufficient to stimulate the male reproductive activity, during the non-breeding season in temperate and subtropical goats, after 45–60 days of exposure to natural light variation or to short days (Delgadillo et al., 2014, 2002, 1991). Control males (n = 10) were housed into outside barns and therefore exposed to the natural variation of day length during the whole experiment.

2.3. Measures

To evaluate the efficiency of the photoperiodic treatment, the testicular volume and blood level of testosterone were assessed periodically from October to April following validated methods. Testicular volume was estimated for each buck periodically. The determinations were performed by the same operator to avoid inter-individual variations (Delgadillo et al., 2002; Oldham et al., 1978). Regarding blood samples, all males were collected by jugular venipuncture from October to end of March in 5 mL tubes containing heparin. Plasma was obtained after 30 min of centrifugation at 3500 g. Testosterone concentration was determined in duplicate samples using a radioimmunoassay as described previously (Hochereau-de-Reviere et al., 1990). Sensibility of this assay was 0.1 ng/mL. The mean intra-assay and inter-assay coefficient of variation were respectively <5% and <14%.

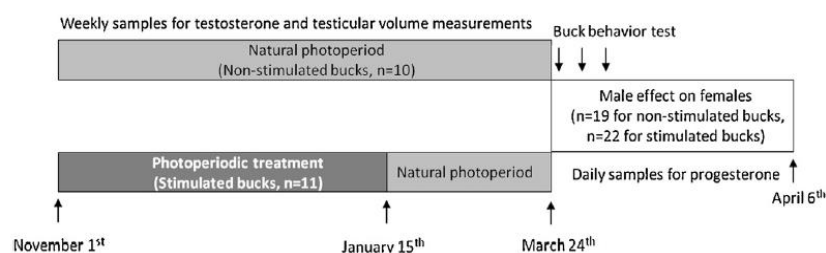


Fig. 1. Diagram of the experimental design with the number of bucks and does involved in each group. Bucks were divided in 2 groups, one exposed to natural photoperiod and one exposed to long day treatment from November 1st to January 15th. From March 24th to April 6th bucks were used to stimulate the females. Sexual behavior of bucks was tested the first 3 days of stimulation for 30 min. Daily blood samples were collected from females during the 15 days of stimulation to determine the progesterone concentration and thus detect ovulation.

2.4. Male effect

From March 24th to April 6th, anovulatory females were divided in two groups: in the first one ($n=22$) females were exposed to stimulated bucks while in the other group ($n=19$) they were exposed to control bucks. Four bucks out of each one of the two groups of bucks, were used to stimulate each group of females permanently during two consecutive weeks. In both groups, their selection was based on their testicular volume response to the photoperiodic treatment. Each group of females was subdivided in four sub-groups, hence a buck was used to stimulate five to six does in each group. Each morning bucks were switched between these subgroups to avoid possible inter-individual effects between the bucks. During the first three days, sexual behavior of the males was observed during 30 min each morning following the introduction of bucks. The occurrence of lateral approaches, ano-genital sniffings, flehmen, mounts, mounts with intromission and mounts with ejaculation were reported (Fabre-Nys and Gelez, 2007; Flores et al., 2000).

To detect ovulations, blood samples were obtained by jugular venipuncture from all females once a day from March 24th to April 6th in 5 mL tubes containing heparin. Plasma was obtained after 30 min of centrifugation at 3500 g. Concentration of plasma progesterone was determined in samples using an immunoenzymatic assay as described previously (Canépa et al., 2008). Sensibility of this assay was 0.25 ng/mL. The mean intra-assay and inter-assay coefficient of variation were respectively <9% and <6%. Females with progesterone concentration ≥ 0.5 ng/mL for at least one sample were considered to have ovulated (Delgadillo et al., 2002; Gallego-Calvo et al., 2014). For each does that ovulate we determined if they had a short or long cycle according to criteria described previously (Chemineau, 1987): short cycles are described by a maximum of 3 (or less) consecutive days of progesterone concentration ≥ 0.5 ng/mL, while normal ovarian cycles reach higher concentrations of progesterone, over than 2 ng/mL and last more than five days (Chemineau, 1987). The anovulatory state of goats has been checked before the male-effect by the determination of progesterone levels in weekly blood samples performed with an interval of 10 days between each sample.

2.5. Statistical analysis

Results are reported as mean \pm SEM (standard error of the mean). A Shapiro-Wilk test was performed to test the distribution of our data. Data for testicular volumes and testosterone concentrations were normally distributed ($p > 0.05$) and thus were compared using a two-way repeated-measures ANOVA to detect differences between treatments. The model included the type of treatment, the sampling day and the interaction between these factors. Treatment effect was then compared within each time point using pairwise comparisons by a t -test. Percentage of females ovulating and type of cycle were analyzed using the Fisher exact probability test. Behavioral results of treated and untreated bucks were compared using the Mann-Whitney test due to the non-normal distribution of the data. All analyses were performed using R software (R Core Team, 2014). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Response of males to the photoperiodic treatment

For testicular volume, a treatment-by-time interaction was detected ($F_{(12,234)} = 3.035$, $p < 0.001$). Comparison at different time points between the treated and control males revealed that testicular volumes in the control group remain at a low level from October to April. By contrast in the photoperiodic-treated group testicular volumes started to increase in March and peaked in early April to a mean value of 150 mL, at the time of the beginning of the male effect (Fig. 2).

For plasma testosterone concentration, a treatment effect ($F_{(11,98)} = 11.78$, $p = 0.001$) and a treatment-by-time interaction have been detected ($F_{(10,198)} = 12.54$, $p < 0.0001$). When comparing these concentrations between treated bucks and control, we found that it was significantly greater in control in December 18th ($p = 0.027$) and then significantly greater in the treated group from March 3rd ($p < 0.001$; Fig. 2), until the beginning of the male effect.

Regarding sexual behavior of bucks, occurrence of lateral approaches and ano-genital sniffing was greater in treated males than in the control ones ($p < 0.05$). Flehmen

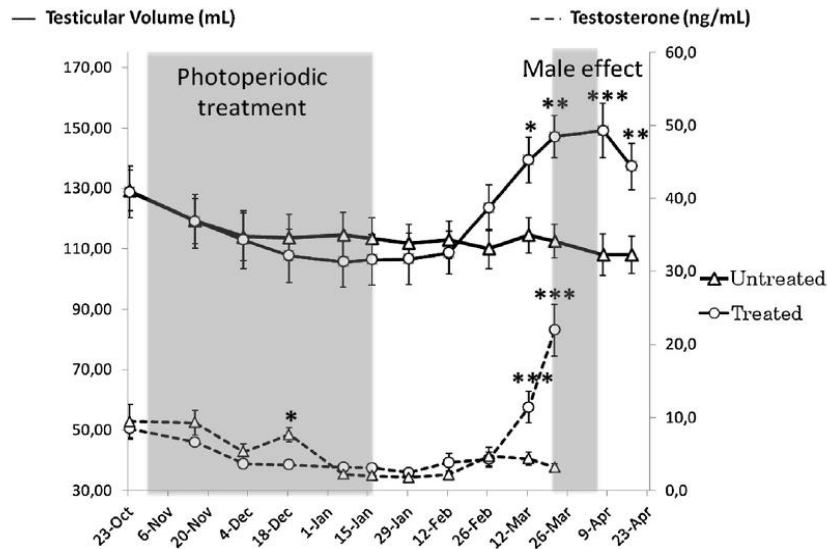


Fig. 2. Evolution of the testicular volume and plasma testosterone concentration of bucks with or without a photoperiodic treatment of long day (16 h of light per day). Testicular volumes (solid line, left scale) were assessed twice a month using an orchidometer. Blood samples for the testosterone (dotted line, right scale) assay were collected twice a month by jugular venipuncture. Data are shown in mean \pm SEM. Stars indicate significant differences between the photoperiodic-treated bucks (n = 11) when compared to the control bucks (n = 10) using a two-way repeated-measures ANOVA followed by Fisher LSD post hoc comparisons. (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

was also more frequently expressed in stimulated bucks than in control (p < 0.05) and mounting tended to be more frequent in treated than in untreated bucks (p < 0.07). Moreover none of control bucks showed mounting behavior while in the treated group, 3 bucks out of 4 bucks expressed at least one mount, therefore 100% of mounts observed were displayed by treated bucks. Due to its low occurrence, no significant difference can be observed for

mounting whether it was a mounting without or with intromission or ejaculation (Fig. 3).

3.2. Response of females to the male

The proportion of ovulating does was significantly greater in the group exposed to photoperiodic-treated bucks (Table 1). Indeed, 19 does out of 22 ovulated (86%),

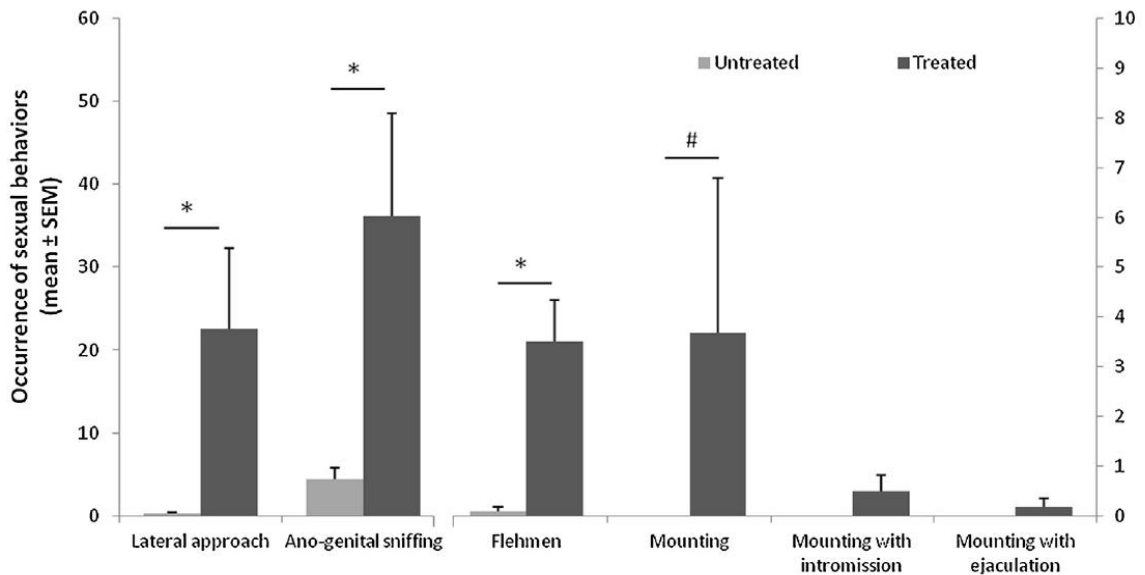


Fig. 3. Occurrence of sexual behaviors (mean \pm SEM) in bucks with or without long day photoperiodic treatment (16 h of light per day). Male sexual behavior was observed for 30 min the first 3 days of the introduction of males with females. Stars indicate significant differences between the photoperiodic-treated bucks (n = 11) when compared to the control bucks (n = 10) using a Mann-Whitney test. (#p < 0.07, *p < 0.05).

Table 1
Ovulatory response of anestrus female goats exposed to bucks treated or not with a photoperiodic treatment. Females were considered to have ovulated if progesterone concentration ≥ 0.5 ng/mL for at least one sample.

Groups	ovulatory females	short cycles	long cycles
Untreated (n = 19)	1/19 (5%) a	1/19 (5%)	0/19 (0%)
Treated (n = 22)	19/22 (86%) b	10/22 (45%)	9/22 (41%)

Different letter within a column denote significant difference ($p < 0.05$) using the Fisher exact probability test.

while in the group exposed to control bucks only 1 of the 19 does ovulated (5%; $p < 0.001$). In the group exposed to treated bucks, half of the does that ovulated exhibited a short cycle (10/22; 45%).

4. Discussion

For the first time, we report here that the use of sexually photostimulated bucks is especially efficient to induce ovulations in alpine goats during the anestrus season under temperate latitude. As observed under subtropical latitudes, increase of sexual activity induced by the photoperiodic treatment of long days in our alpine bucks enables them to stimulate very efficiently ovulation (>85%) in anestrus does, in spite of the strong seasonality of this breed (Amoah et al., 1996; Chemineau et al., 1992a; Fatet et al., 2011). This is consistent with previous results of stimulation of ovulation in anestrus goat using stimulated bucks carried under subtropical latitudes (Delgadillo and Vélez, 2010; Delgadillo et al., 2006, 2002; Flores et al., 2000; Ponce et al., 2015). However, there is a study performed under temperate latitudes on alpine goats that reported a lower stimulation of reproductive activity characterized by lower ovulations in does exposed to stimulated bucks (Chemineau, 1989). Similar results were obtained also under temperate latitudes but using another seasonal breed, the Saanen goats (Chemineau et al., 1986). The difference between these two experimentations and our results could be explained by the intensity of the sexual behavior of the bucks used to stimulate the females; indeed no measurements of the behavior or testosterone levels were performed in these previous experiments. Complementary role of the “female-to-female effect” may have enhance the ovulatory response of females: females in estrus are also known to be able to induce ovulation in other females (Restall et al., 1995; Rodríguez-Martínez et al., 2013).

In addition, our results confirm that a photoperiodic treatment of long days in winter followed by exposition to normal photoperiod, stimulates sexual activity in bucks during the season of sexual rest under temperate latitudes. Indeed 2.5 months of 16 h of light per day, from November 1st to January 15th induced a significant increase of testicular volume, testosterone secretion and sexual behavior in bucks. These results are highly consistent with previous study carried out in subtropical latitudes with the same breed of goat (Delgadillo and Vélez, 2010; Rivas-Muñoz et al., 2010) or with a Mexican local breed (Delgadillo et al., 2002; Flores et al., 2000). Indeed concerning testicular volume in both groups we saw a decrease from October to January; however, there is an increase in the size of testis

from March 24th to April 6th, in photoperiodic stimulated bucks only. This increase in testicular volume reflects an increase of spermatogenic activity in these bucks (Cameron et al., 1988). In addition, this increase occurs about 70 days after the end of the light treatment; a similar delay to that already observed in goats exposed to a photoperiodic treatment of long days under subtropical latitudes (Delgadillo et al., 2002, 2001). Testosterone plasma concentration follows the same pattern of variation than testicular volume with an increase approximately 40 days following the end of the photoperiodic treatment.

In treated bucks, a higher level of sexual behavior has been also observed that is consistent with the higher testosterone levels observed. Lateral approaches, ano-genital sniffing and flehmen were greater in light-treated bucks than in control bucks when exposed to anestrus does. Even if the difference of occurrence of mounts between the two groups is not significant due to important variation between individuals, there is evidence for treated-bucks to be more likely to mount does than control bucks. This stimulation of sexual behavior of bucks is critical because its importance for the success of a male-effect is now well known: a buck with high level of testosterone but expressing poor levels of sexual behavior is inefficient to induce an ovulation in anestrus does (Delgadillo et al., 2006; Martínez-Alfaro et al., 2014; Vielma et al., 2009).

In conclusion, the present study demonstrates that, as reported under sub-tropical latitudes, the use of sexually stimulated buck, under temperate latitudes, is a very efficient tool to stimulate ovulations in anestrus females, and therefore to highly reduce the variability usually observed when using the male effect.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

We thank Damien Capo, Olivier Lasserre and all the shepherds of the UEPAO INRA experimental unit (UE n°1297, EU0028) for providing care to the animals. We also thank Anne-Lyse Lainé, Corinne Laclie, Dominique Genetay and the whole staff of the hormonal assay laboratory for testosterone and progesterone assays. This work was supported by French National Research Agency (ANR) grant MALE-EFFECT (ANR11-ISV7-0001, 2011–2015) to Matthieu Keller. Matthieu Keller is a CNRS permanent research fellow. Manon Chasles is supported by a grant from the University of Tours, INRA and the French ministry of research.

References

- Amoah, E.A., Gelaye, S., Guthrie, P., Rexroad, C.E., 1996. Breeding season and aspects of reproduction of female goats. *J. Anim. Sci.* 74, 723–728.
- Cameron, A.W.N., Murphy, P.M., Oldham, C.M., 1988. Nutrition of rams and output of spermatozoa. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 17, 162–165.
- Canépa, S., Lainé, A., Bluteau, A., Fagu, C., Flon, C., Monniaux, D., 2008. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cah. des Tech. l'INRA* 64, 19–30.

- Chemineau, P., Normant, E., Ravault, J.P., Thimonier, J., 1986. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J. Reprod. Fertil.* 78, 497–504. <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0780497>.
- Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., Delgadillo, J.A., 1992a. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rumin. Res.* 8, 299–312. [http://dx.doi.org/10.1016/0921-4488\(92\)90211-L](http://dx.doi.org/10.1016/0921-4488(92)90211-L).
- Chemineau, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., Guérin, Y., Ravault, J.P., Thimonier, J., Pelletier, J., 1992b. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim. Reprod. Sci.* 30, 157–184. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90010-B](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(92)90010-B).
- Chemineau, P., Guillaume, D., Migaud, M., Thiéry, J.C., Pellicer-Rubio, M.-T., Malpoux, B., 2008. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 40–47. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01141.x>.
- Chemineau, P., 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats—a review. *Livest. Prod. Sci.* 17, 135–147. [http://dx.doi.org/10.1016/0301-6226\(87\)90059-5](http://dx.doi.org/10.1016/0301-6226(87)90059-5).
- Chemineau, P., 1989. *Le désaisonnement des chèvres par la lumière et la mélatonine*. *La Chèvre* 171, 18–22.
- R Core Team, 2014. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Delgadillo, J.A., Véliz, L.L., 2010. Stimulation of reproductive activity in anovulatory Alpine goats exposed to bucks treated only with artificially long days. *Animal* 4, 2012–2016. <http://dx.doi.org/10.1017/S1751731110001345>.
- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1991. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36, 755–770. [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90341-A](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(91)90341-A).
- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Rumin. Res.* 9, 47–59. [http://dx.doi.org/10.1016/0921-4488\(92\)90055-9](http://dx.doi.org/10.1016/0921-4488(92)90055-9).
- Delgadillo, J.A., Carrillo, E., Morán, J., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B., Mora, J., 2001. Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *J. Anim. Sci.* 79, 2245–2252.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernández, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpoux, B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J. Anim. Sci.* 80, 2780–2786. [http://dx.doi.org/10.1016/0921-4488\(92\)90055-9](http://dx.doi.org/10.1016/0921-4488(92)90055-9).
- Delgadillo, J.A., Cortez, M.E., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B., 2004. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reprod. Nutr. Dév.* 44, 183–193. <http://dx.doi.org/10.1051/rnd:2004024>.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Duarte, G., Vielma, J., Hernández, H., Fernández, I.G., 2006. Importance of the signals provided by the buck for the success of the male effect in goats. *Reprod. Nutr. Dév.* 46, 391–400. <http://dx.doi.org/10.1051/rnd:2006020>.
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Duarte, G., Vielma, J., Hernández, H., Bedos, M., Fitz-Rodríguez, G., Fernández, I.G., López-Sebastián, A., Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Zarazaga, L.A., Keller, M., Chemineau, P., 2014. Out-of-season control of reproduction in subtropical goats without exogenous hormonal treatments. *Small Rumin. Res.* 121, 7–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.01.011>.
- Fabre-Nys, C., Gelez, H., 2007. Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Horm. Behav.* 52, 18–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.04.001>.
- Fatet, A., Pellicer-Rubio, M.-T., Leboeuf, B., 2011. Reproductive cycle of goats. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 211–219. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.029>.
- Flores, J.A., Véliz, F.G., Pérez-Villanueva, J.A., Martínez De La Escalera, G., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol. Reprod.* 62, 1409–1414. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1409>.
- Gallego-Calvo, L., Gatica, M.C., Celi, I., Guzmán, J.L., Delgadillo, J.A., Zarazaga, L.A., 2014. No previous isolation of female goats is required for novel males to induce a male effect, especially if direct physical contact is established. *Theriogenology* 82, 1310–1315. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.08.015>.
- Hochereau-de-Reviere, M.-T., Copin, M., Seck, M., Monet-Kuntz, C., Cornu, C., Fontaine, I., Perreau, C., Elsen, J.M., Boomarov, 1990. Stimulation of testosterone production by PMSG injection in the ovine male: effect of breed and age and application to males carrying or not carrying the F Booroola gene. *Anim. Reprod. Sci.* 23, 21–32. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(90\)90012-5](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(90)90012-5).
- Hutchinson, J.S.M., 1991. Mammalian reproductive biology. *Anim. Reprod. Sci.* 25, 91–92. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320\(91\)90012-0](http://dx.doi.org/10.1016/0378-4320(91)90012-0).
- Luna-Orozco, J.R., Guillén-Muñoz, J.M., De Santiago-Miramontes, M.D.L.A., García, J.E., Rodríguez-Martínez, R., Meza-Herrera, C.A., Mellado, M., Véliz, F.G., 2012. Influence of sexually inactive bucks subjected to long photoperiod or testosterone on the induction of estrus in anovulatory goats. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 71–75. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-011-9889-y>.
- Martin, G.B., Milton, J.T.B., Davidson, R.H., Bancho Hunzicker, G.E., Lindsay, D.R., Blache, D., 2004. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 231–246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.014>.
- Martínez-Alfaro, J.C., Hernández, H., Flores, J.A., Duarte, G., Fitz-Rodríguez, G., Fernández, I.G., Bedos, M., Chemineau, P., Keller, M., Delgadillo, J.A., Vielma, J., 2014. Importance of intense male sexual behavior for inducing the preovulatory LH surge and ovulation in seasonally anovulatory female goats. *Theriogenology* 82, 1028–1035. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.024>.
- Oldham, C.M., Gherardi, P.B., Lindsay, D.R., Mackintosh, J.B., Adams, N.R., 1978. The influence of level of feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. *Aust. J. Agric. Res.* 29, 173–179.
- Pellicer-Rubio, M.-T., Leboeuf, B., Bernelas, D., Forgerit, Y., Pougnaud, J.L., Bonné, J.L., Senty, E., Chemineau, P., 2007. Highly synchronous and fertile reproductive activity induced by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by a natural photoperiod. *Anim. Reprod. Sci.* 98, 241–258. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.002>.
- Ponce, J.L., Hernández, H., Flores, J.A., Keller, M., Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 2015. One day of contact with photostimulated bucks is sufficient to induce ovulation in seasonally anestrus goats. *Theriogenology* 84, 880–886. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.019>.
- Restall, B.J., Restall, H., Walkden-brown, S.W., 1995. The induction of ovulation in anovulatory goats by oestrous females. *Anim. Reprod. Sci.* 40, 299–303.
- Rivas-Muñoz, R., Carrillo, E., Rodríguez-Martínez, R., Leyva, C., Mellado, M., Véliz, F.G., 2010. Effect of body condition score of does and use of bucks subjected to added artificial light on estrus response of Alpine goats. *Trop. Anim. Health Prod.* 42, 1285–1289. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-010-9563-9>.
- Rodríguez-Martínez, R., Ángel-García, O., Guillén-Muñoz, J.M., Robles-Trillo, P.A., De Santiago-Miramontes, M.D.L.A., Meza-Herrera, C.A., Mellado, M., Véliz, F.G., 2013. Estrus induction in anestrus mixed-breed goats using the female-to-female effect. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 911–915. <http://dx.doi.org/10.1007/s11250-012-0305-z>.
- Shelton, M., 1978. Reproduction and breeding of goats. *J. Dairy Sci.* 61, 994–1010. [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(78\)83680-7](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(78)83680-7).
- Vielma, J., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2009. Male sexual behavior contributes to the maintenance of high LH pulsatility in anestrus female goats. *Horm. Behav.* 56, 444–449. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.07.015>.

L'exposition précoce à un bouc permet d'induire une avance de puberté chez la chevrette.

Article 2: Exposure to sexually active bucks stimulate early puberty onset in does

Chasles Manon¹²³, Chesneau Didier¹²³, Moussu Chantal¹²³, Poissenot Kévin¹²³, Beltramo Massimiliano¹²³, Delgadillo José Alberto⁴, Chemineau Philippe¹²³ & Keller Matthieu¹²³

¹INRA, UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre de recherche Val-de-Loire, Nouzilly, France

²CNRS, UMR 7247, Nouzilly, France

³Université François Rabelais de Tours, Tours, France

⁴Centro de Investigación en Reproducción Caprina, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, Mexico

En préparation pour Endocrinology

Résumé de l'article

La puberté est un phénomène complexe sous la dépendance de nombreux facteurs internes comme externes. Chez les rongeurs, on sait que l'exposition précoce à un mâle induit une puberté précoce chez la jeune femelle. Néanmoins, il n'y a que très peu de données sur les modifications endocrines liées à ce phénomène de puberté induite. Nous avons donc choisi d'étudier les conséquences d'une exposition précoce au mâle dans l'espèce caprine. Une espèce chez qui, contrairement aux rongeurs, il est facile de réaliser des prélèvements réguliers et ce sans affecter la physiologie globale de l'individu, permettant un suivi fin des sécrétions endocrines. Par ailleurs, on sait que l'axe reproducteur de la chèvre adulte est très sensible aux signaux émis par le bouc : l'introduction d'un bouc dans un groupe de femelles en repos sexuel permet d'induire l'ovulation chez celles-ci, c'est l'effet mâle. Malgré cela très peu d'études ont cherché à mettre en évidence un potentiel effet d'accélération pubertaire chez la chèvre.

Nous avons donc mené deux expériences où des femelles étaient exposées à des mâles entiers, à des mâles castrés ou étaient isolées des mâles. La première expérience a permis un suivi des sécrétions endocrines et une détermination de l'âge à la première ovulation. La seconde expérience nous a permis de confirmer les résultats obtenus sur l'âge à la première ovulation mais aussi d'analyser le niveau de maturation du tractus génital des femelles.

Nous avons ainsi observé une réactivation précoce de l'axe gonadotrope chez les femelles exposées aux mâles entiers en comparaison des femelles des 2 autres groupes. Ces femelles ont en effet présenté une hausse de la sécrétion pulsatile de LH à la mi-septembre. Fin-septembre toutes les femelles exposées aux mâles ont ovulé et sont donc considérées pubères. Une avance de puberté d'1 mois et demi est observée pour ces femelles. Début octobre une partie des chèvres ont été euthanasiées, une hausse de 40% du poids de l'utérus est observée chez les femelles exposées aux mâles entiers, par ailleurs toutes ces femelles présentaient au moins un corps jaune alors qu'aucun n'a été observé sur les ovaires des femelles exposées aux mâles castrés ou isolées. Cependant, aucune différence n'a pu être mise en évidence par la comparaison de l'environnement des neurones à GnRH entre les différents groupes de femelles.

Nos résultats démontrent que la présence d'un bouc permet d'induire une maturation sexuelle précoce chez la femelle se caractérisant par une avance de la première ovulation et une accélération de la maturation du tractus génital. Par ailleurs, l'exposition à des mâles castrés n'ayant aucun effet, nous pouvons en conclure que les signaux émis par le bouc et permettant d'induire une puberté précoce sont dépendants du niveau d'activité sexuelle du mâle.

Abstract:

Early exposure to male is well known in rodents to induce a precocious puberty in prepubertal females (Vandenbergh effect). Here, we evaluated the age at puberty of young alpine goats when raised since weaning with intact bucks (INT), with castrated bucks (CAS) or isolated (ISOL). INT females exhibit an early puberty assessed by progesterone levels; they were pubescent at 6 months vs 7.5 months in the two other groups. Females with a precocious puberty had normal and regular cycles. Results were confirmed by the study of the LH pulsatility with an increased frequency of pulses just before the first rise of progesterone. Morphological study of the genital tract was consistent with those results: at 6 months, uterus of INT goats was 40% heavier than other goats. Moreover, INT females had a myometrium significantly thicker than other goats and they were the only females to exhibit corpora lutea.

Finally, no difference in the GnRH network (fiber density and number of synaptic appositions) can be detected between pubescent and non-pubescent females, suggesting that the male stimulations triggering puberty onset act probably on upstream neuronal networks.

INTRODUCTION

Puberty is the complex process of acquisition of reproductive functions. It is a period where morphological, physiological and behavioral processes renders individuals able to ensure sexual reproduction (Ebling, 2005). At this time, the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis that remained quiescent since childhood is reactivated. The secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) will stimulate the secretion of gonadotropin, leading to the onset of the cyclical ovarian activity in females (Grumbach, 2002).

Many factors, including genetic, metabolic and environmental influences, can affect the age at puberty (Bronson and Rissman, 1986; Dýrmundsson, 1981). Among environmental factors, sexual interactions with opposite-sex conspecifics can dramatically modulate the dynamics of puberty onset. Indeed in rodents, prepubertal exposure to intact male or to its odor induces an acceleration of puberty onset in females; this phenomenon is called “Vandenbergh effect” (Vandenbergh, 1976, 1969, 1967). By contrast, exposure to a castrated male has no impact on the age at puberty, suggesting that the signals emitted by the male that stimulate the female are androgen-dependent (Jouhannau et al., 2014; Vandenbergh, 1969).

In rodent, the most common measure used to determine the age at puberty in a non-invasive manner, is the date at vaginal opening (Rodriguez et al., 1997). However this measure is not the best predictor for the attainment of puberty as the first ovulation is not well correlated with vaginal opening (Safranski et al., 1993). In larger mammals such as sheep or goats, which are well recognized models in neuroendocrinology, we can make a more precise monitoring of the age at puberty through the assessment of ovulation. This can be measured by regular blood sampling for assaying of progesterone levels. Moreover, because of the size of those animals we can perform serial blood sampling over a long period without affecting the animal's homeostasy, allowing a valid study of endocrine secretion, including the LH pulsatility which is known to be reactivated during pubertal transition (Huffman et al., 1987; Watanabe and Terasawa, 1989). Some studies have suggested the possibility to accelerate puberty through male exposure in sheep (Al-Mauly et al., 1991; Dýrmundsson and Lees, 1972; Oldham and Gray, 1984) and pigs (Brooks and Cole, 1970; Pearce and Paterson, 1992). However these demonstrations were quite poor, and none of these studies evaluated the impact of the presence of the male on the gonadotropic axis including the dynamics of gonadotropin secretions, the genital tract maturation, or the neuroendocrine regulations.

Goats are a good model to study the physiological consequences of early exposure to male on the sexual maturation of females. Indeed, it is well known that the reproductive axis of

mature female goats is highly sensitive to socio-sexual signals provided by the bucks. For example, the introduction of a male in a group of anestrus goats induces ovulation and estrous behavior in those females (Chasles et al., 2016; Chemineau, 1987; Shelton, 1960). This effect is called the “male-effect” and many studies investigated the different factors influencing its efficiency. So far, we know that the main factor is the level of sexual activity of the buck. Indeed, introducing an inactive buck fail to induce a reactivation of the reproductive activity of females, whereas the introduction of a sexually active bucks induce ovulation within 4 days in more than 80% of females (Flores et al., 2000; Martinez-Alfaro et al., 2014; Ramírez et al., 2016). In addition, it has been demonstrated that exposure to sexually active bucks that have been previously sedated to prevent the expression of sexual behavior failed to induce ovulation (Martinez-Alfaro et al., 2014; Vielma et al., 2009).

One study scarcely reported possible impacts of buck exposure on the sexual maturation of young goats (Amoah and Bryant, 1984). Unfortunately, females from the control group (isolated females) were exposed to males before they reached spontaneous puberty, so no comparison of the age at puberty was possible. Moreover, females were considered pubescent when they accepted to be mounted by a buck, this measure does not finely reflect of the ovulatory state of females as young goats often exhibit ovulations without estrous behavior (Zarazaga et al., 2009). Hence, the aim of our experiment was to study the physiological consequences of an early exposure to bucks in prepubertal does at the different stages of the gonadotrope axis including occurrence of the first ovulation, genital tract maturation, induction of LH pulsatility and the GnRH neuronal network

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were carried out from March 2015 to October 2016 in Nouzilly, France (latitude 47° 32N and longitude 0° 46E) on alpine goats (*Capra hircus*). For this study, a total of 57 animals were used, 45 prepubertal females and 12 adult males sexually experienced. Animals were fed daily with barley straw, lucerne hay and commercial concentrate, with free access to water and mineral blocks. All procedures were performed in accordance with the European directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the local ethical committee for animal experimentation (CEEA VdL, Tours, France, n° 2015020215051490 and n°2015121817005126).

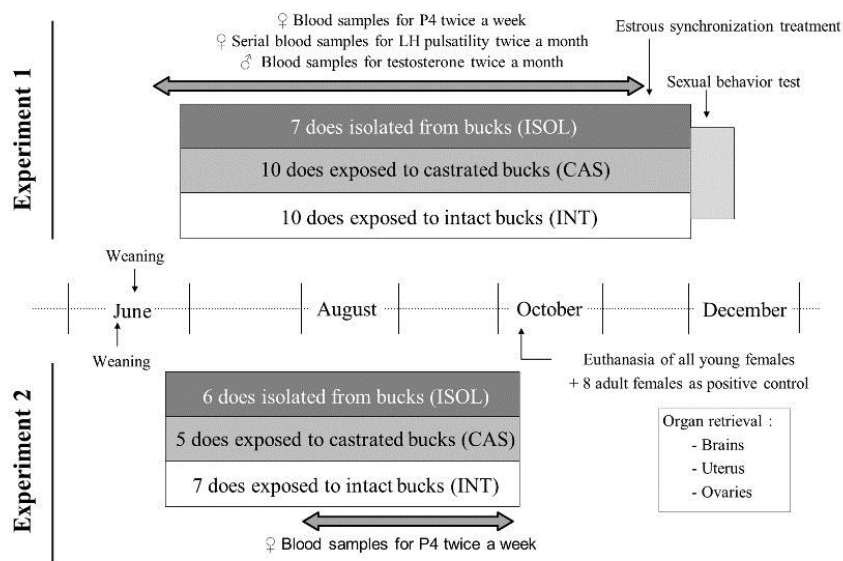


Figure 1. Diagram of the experimental design. At the age of 3 months, does were divided in 3 groups, one isolated from bucks (ISOL), one exposed to castrated bucks (CAS) and one exposed to intact bucks (INT). Stimulation was continuous behind a fence for 5 months and three times a week we allowed direct contact for 1 hour by introducing a buck into females' pen. Behavior of males and females was observed during this hour. **(A)** For the experiment 1, two weeks before the sexual behavior test early December, does were treated with progestagen intra-vaginal sponges to synchronize estrous. **(B)** For experiment 2, females have been euthanized early October to collect brains, uterus and ovaries.

Experiment 1. Endocrine and behavioral changes in prepubertal females exposed to sexually active bucks

Young does were born between March 28th and April 6th and weaned at 2.5 month of age; one week later they were allocated into three groups balanced for body weight; sisters were separated to avoid any genetic effect. From June 29th until November 30th, one group of females (INT, n=10) was exposed to intact bucks, another group (CAS, n=10) to castrated bucks and in the last one (ISOL, n=7) females were isolated from males (**Figure 1**). One month before the start of the exposure to males, 4 bucks were castrated under ketamine (Imalgene, Merial) and isoflurane (IsoFlo, Abbott, 3% with oxygen) anaesthesia. Blood samples were collected twice a month by jugular venipuncture from all males to follow their level of sexual activity through testosterone assay.

Exposure to bucks

Groups were housed in different barns to prevent odor contamination (distance between barns >300m). Exposure to bucks (2 males for 8-10 females) was continuous behind a fence and each week we switched bucks to avoid possible inter-individual and habituation effects. Throughout the exposure phase, we also allowed direct contact between bucks and goats for 1 hour, 3 times a week. During those interactions, males were fitted with an apron to prevent intromission and conception.

Bucks behavior was also observed to determine the number of physical contact with females, the number of lateral approaches and mount.

Evaluation of puberty onset and weight gain

The age at puberty was assessed by the determination of the onset of ovarian activity. To detect ovulations, blood samples were obtained by jugular venipuncture from all females twice a week from the age of 3 months in 5mL tubes containing heparin. Females with progesterone concentration $\geq 0.5\text{ng/mL}$ in 2 consecutive samples were considered to have ovulated and then to be pubescent (Gallego-Calvo et al., 2015; Urrutia-Morales et al., 2009). Throughout the experiment females were also weighed once a month to detect a possible metabolic effect and ensure that mean body weight remain similar in all groups. In addition, blood samples were taken from June to November to determine reactivation of LH pulsatile secretion. These blood samples were obtained twice a month by serial jugular venipuncture every 15 minutes for 5 hours in 5mL tubes containing heparin.

Female sexual behavior

At the end of the stimulation protocol, we compared the sexual behavior of the females according to their previous interactions with bucks. Indeed, we hypothesized that females previously exposed to sexually active males could express a better sexual behavior when interacting with bucks, due to their previous socio-sexual experience but also to the induced physiological maturation. Before the test, estrous of does have been synchronized by a hormonal treatment including intravaginal sponges impregnated with 45mg of fluorogestone acetate (Chrono-gest, Internet, Angers, France) and injections of 200 UI of eCG (Intervet, Angers, France) and 100 μg de cloprostenol (0.2 mL Estrumate, Internet, Angers, France). After 12 days, sponges were removed and the following day goats were exposed individually to a buck for 30min, interactions between animals were recorded using a video camera (Sony

Handycam). Bucks were fitted with an apron to prevent intromission and conception during the test. We reported for males the occurrence of vocalizations, flehmen, ano-genital sniffings, lateral approaches and mounts. For females we observed vocalizations, urinations, tail wagging and immobilization (Fabre-Nys and Gelez, 2007; Flores et al., 2000)..

Experiment 2. Sexual maturation induced by sexually active bucks at the level of the reproductive tract and the brain

Young does were born between March 28th and April 6th and weaned at 2.5 month of age; one week later they were allocated into three groups according to the same criteria than experiment 1. From June 20th until October 3rd, one group of females (INT, n=7) was exposed to intact bucks, another group (CAS, n=5) to castrated bucks and the last one (ISOL, n=6) was isolated from males (**Figure 1**). The bucks used to stimulate females and the stimulation protocol are the same as in experiment 1. Behavior was studied during close interactions three times a week as described above. Females were weighed monthly and the age at puberty was determined using the same method as experiment 1.

To compare the maturation of the gonadotrope axis at the level of the brain and genital tract between our three groups of females, females were sacrificed within 3 days early October by a licensed butcher, after injection of 5mL of ketamine (Imalgen, Merial). This date was chosen according to progesterone results to ensure that all INT females reached puberty. The day of euthanasia, another blood samples was taken from all females. After decapitation, heads were immediately perfused through both carotid arteries first with 2L of 1% sodium nitrite to wash the brain and then with 4L of a 4% paraformaldehyde solution to fix the tissues. Following perfusion, the brain was removed from the skull and post-fixed for 24h. Brains were then cut into blocks and post-fixed for another 24h. The tissues were then store in a solution of 20% sucrose until they sink. Brain blocks containing the hypothalamic region were sectioned at 30 μ m in the coronal plane with a cryomicrotome (Leica) and stored at 4 °C in PBS-azide buffer until staining.

Uterus and ovaries of all females were weighed and the number and type of ovarian follicles were counted as well as the number of corpora lutea. Follicles up to 3mm were registered as small follicles and bigger as large follicles (Crozet et al., 1995). Uterus were fixed for 24h by immersion in 4% paraformaldehyde and then stored at 4°C in a solution of 20% sucrose. One horn of each uterus was later sectioned at 2mm of the disjunction between horns. Sections were then embedded in OCT (Tissue-Tek), frozen in dry ice and sliced on a cryostat

(Leica) into 10 μ m. Slices were stored at -20°C until hematoxylin and eosin staining. Sections were first immersed for 30 sec in 70% ethanol, then washed for 5sec in water and immersed for 10 sec in a hematoxylin solution (Sigma). Sections were then put for 10 sec in a bluing reagent containing 0.1% bicarbonate and immersed for 10 sec in 70% ethanol before a short bath of 2 sec in an eosin solution (Sigma). Sections were then washed in ethanol followed by xylene and finally mounted with depex (Yee et al., 2014). Slices were then scanned at a magnification of x10 using the Axio Scan.Z1 slide scanner (Zeiss). Measures of the myometrium and endometrium thickness were performed with the Zen Blue Lite Software (Zeiss) using the “distance” tool.

Immunofluorescence

To evaluate the consequences of an early exposure to bucks on the maturation of the GnRH neuronal network, brains were retrieved as described above and immunofluorescence analysis were performed to quantify the number of GnRH cell bodies, the fiber density and the number of synaptic appositions on GnRH cell bodies. Immunofluorescence were performed on slices in the rostral and preoptic area (rPOA and mPOA) as most of GnRH cell bodies are located in those regions in goats (Zuccolilli et al., 1994).

GnRH labeling. Free-floating sections from rPOA and mPOA were rinsed in PBS for 10 min and incubated for 1h at room temperature (RT) in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 2% normal donkey serum (PBST-NDS). Sections were then incubated for 72h at 4°C with a solution containing an anti GnRH monoclonal antibody (1:2000; Millipore; MAB5456; **Table 1**) in PBST-NDS. Sections were then washed three times for 10 min in PBST and incubated for 2h at RT with Alexa 488-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:1000; Jackson ImmunoResearch Europe) in PBST-NDS. After three 10 min washes in PBS and an incubation of 10 min in Hoechst (1:5000) to label cell nuclei, sections were mounted in PBS, dried and cover slipped in fluoromount. Those sections were used to quantify the number of GnRH cell bodies and the fiber density.

Double-labeling GnRH/Synaptophysin. Free-floating sections from rPOA and mPOA were rinsed in PBS for 10 min and incubated for 1h at RT in PBS containing 0.3% Triton X-100 and 2% BSA (PBST-BSA). Sections were then incubated for 72h at 4°C with a solution containing a monoclonal mouse anti-GnRH antibody (1:1000; Millipore; MAB5456; **Table 1**) in PBST-BSA. Sections were then washed three times for 5 min in PBS and incubated for 2h at

RT with Alexa 488-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:1000; Jackson ImmunoResearch Europe) in PBST-BSA. After five washes of 5 min in PBS, sections were incubated overnight at 4°C in PBST-BSA. Sections were then incubated for 17h at 4°C with a solution containing a monoclonal mouse anti-synaptophysin antibody (1:1000; Sigma, S5768; **Table 1**) in PBST-BSA. Sections were then washed three times for 5 min in PBS and incubated for 1h at RT with Alexa 555-conjugated donkey anti-mouse IgG (1:1000; Jackson ImmunoResearch Europe) in PBST-BSA. After three 10 min washes in PBS and an incubation of 10 min in Hoechst (1:5000) to label cell nuclei, sections were mounted in PBS, let dry and then cover slipped in fluoromount. Those sections were used to quantify the number of synaptic appositions on GnRH neurons.

Table 1. *Antibody table.*

Target	Name of Antibody	Manufacturer, Catalog Number	Species; Monoclonal or Polyclonal	Dilution	RRID
Mammalian GnRH	Anti-GnRH, N-terminus, clone HU11B antibody	Millipore, MAB5456	Mouse ; Monoclonal	1 :2000 (single labelling) 1 :1000 (dual labelling)	AB_571014
Synaptophysin	Anti-Synaptophysin, clone SVP-38 antibody	Sigma-Aldrich, S5768	Mouse ; Monoclonal	1 :1000	AB_477523

Image analysis and quantification

Number of GnRH cell bodies were counted in two sections of the rPOA and one section of the mPOA. Density of GnRH fibers was counted using a previously validated method (Losa et al., 2011) on mPOA sections only to ensure the absence of cell bodies that would distort the results. Images were taken at x40 magnification in the same area for all animals. To avoid false density counting due to GnRH-ir cell bodies, images were taken in areas with no detectable cell bodies. Images were then binarized and depixelated to reduce background. Fibers were skeletonized to a thickness of 1 pixel to limit variations due to fiber brightness and thickness. Pixels were then counted using the Image J Voxel Counter plug-in (NIH) and reported as the proportion of total voxels containing GnRH-ir fibers.

Number of synapses on GnRH cell bodies were determined on 15 GnRH cell bodies per animal over two sections of the rPOA and one section of the mPOA. Sections were examined on a Zeiss LSM 700 confocal microscope providing a resolution of 400nm, stacks were acquired at x63 magnification with a 0.5 μ m interval. Method for the quantification of synaptic appositions is based on Imaris 9 software (Bitplane). A first step is the creation of the GnRH neuronal surface. GnRH signal was smoothed by a Gaussian filter and then the “create surface” tool was used to make a 3D reconstruction of the neurons. A threshold was applied to ensure the most accurate reconstruction. A second step is the identification of presynaptic elements using the “spot” tool to localize fluorescent objects with a diameter superior to 1 μ m, thus limiting the possibility for background to be detected as a presynaptic element. Using the “find spots close to surface” tool, only spots which are located inside a defined region are counted. In order to prevent quantification of false positive synaptic inputs, we defined that presynaptic elements have to be localized at a maximum distance of 0.5 μ m of the 3D reconstructed GnRH neuron to be counted (Fogarty et al., 2013; Schätzle et al., 2012).

Hormonal assay

Plasma was obtained after 30 minutes of centrifugation at 3500g. Testosterone concentration was determined in duplicate samples using a radioimmunoassay as described previously (Hochereau-de-Reviere et al., 1990). Sensibility of this assay was 0.1ng/mL, all samples were treated in a single assay.

Progesterone concentration was determined using an immunoenzymatic assay as described previously (Canépa et al., 2008). Sensibility of this assay was 0.25ng/mL. The mean intra-assay and inter-assay coefficient of variation were respectively <9% and <8.7%.

Concentration of plasma LH was determined using a radioimmunoassay according to the technique of Pelletier et al. (Pelletier et al., 1982), modified by Montgomery et al. (Montgomery et al., 1985) and validated for goats by Chemineau et al. (Chemineau et al., 1982). Sensibility of this assay was 0.1ng/mL and the mean intra-assay and inter-assay coefficient of variation were respectively <12% and <11%. LH pulses were detected using the DynPeak algorithm (Vidal et al., 2012).

Statistical Analysis

Results are reported as mean \pm SEM (standard error of the mean). A Shapiro-Wilk test was performed to test the distribution of the data. If data were normally distributed ($p > 0.05$) a parametric test was performed otherwise we used non-parametric tests.

Physiological and behavioral analysis. Weight data were compared groups using a two-way repeated-measures ANOVA. The model included the type of treatment, the time and the interaction between these factors. For LH data, due to non-normality distribution, for every rhythm of sampling, differences between groups were examined using Kruskal-Wallis tests followed by multiple comparisons by Tukey-Type test (« nparcomp » package). The age at puberty was examined using a Kaplan-Meier survival analysis and differences between groups were compared by the log-rank test. Behavioral results, were analyzed Mann-Whitney tests. Organ weight, the thickness of uterine layers, the number of ovarian follicles and are under the curve (AUC) were compared between the three groups of females using Kruskal-Wallis tests followed by the “nparcomp” test for multiple comparisons. The number of goats exhibiting at least one corpus luteum was compared using the Fisher exact probability test.

Image analysis. The number of GnRH neurons, the GnRH fiber density and the mean number of appositions on each GnRH neurons were compared between groups using Kruskal-Wallis tests followed by multiple comparisons by Tukey-Type test (« nparcomp » package).

All analyses were performed using R software (R Core Team, 2014). Statistical significance was set at $p < 0.05$

RESULTS

Behavior of bucks

Throughout the first experiment, testosterone levels remained low and did not fluctuate in castrated bucks. Unlike levels of testosterone in intact bucks that reached levels greater than 10ng/mL from late August to late November (**Figure 2A**).

In the first experiment, sexual behavior of bucks has been observed during 5 months. The first 2 months (July and August) no significant difference was detected between intact and castrated bucks (**Figure 2B**). Then (September to November), a dramatic increase in the occurrence of sexual behaviors was observed in intact bucks but not in castrated bucks. Hence, for those months, differences are detected between intact and castrated bucks for the number of ano-genital sniffing (September-: $p < 0.01$) and the number of mounts (September-November: $p < 0.01$). Concerning the occurrence of contacts between sexes a difference between our 2

groups of bucks can be highlighted only in September ($p < 0.05$). Highly similar results were observed during the second experiment (**Figure 2C**), no difference observed in the behavior of intact and castrated bucks from July to August. In September the number of contacts ($p < 0.01$), ano-genital sniffings ($p < 0.01$) and mounts ($p < 0.01$) was increased in intact bucks compared to castrated bucks.

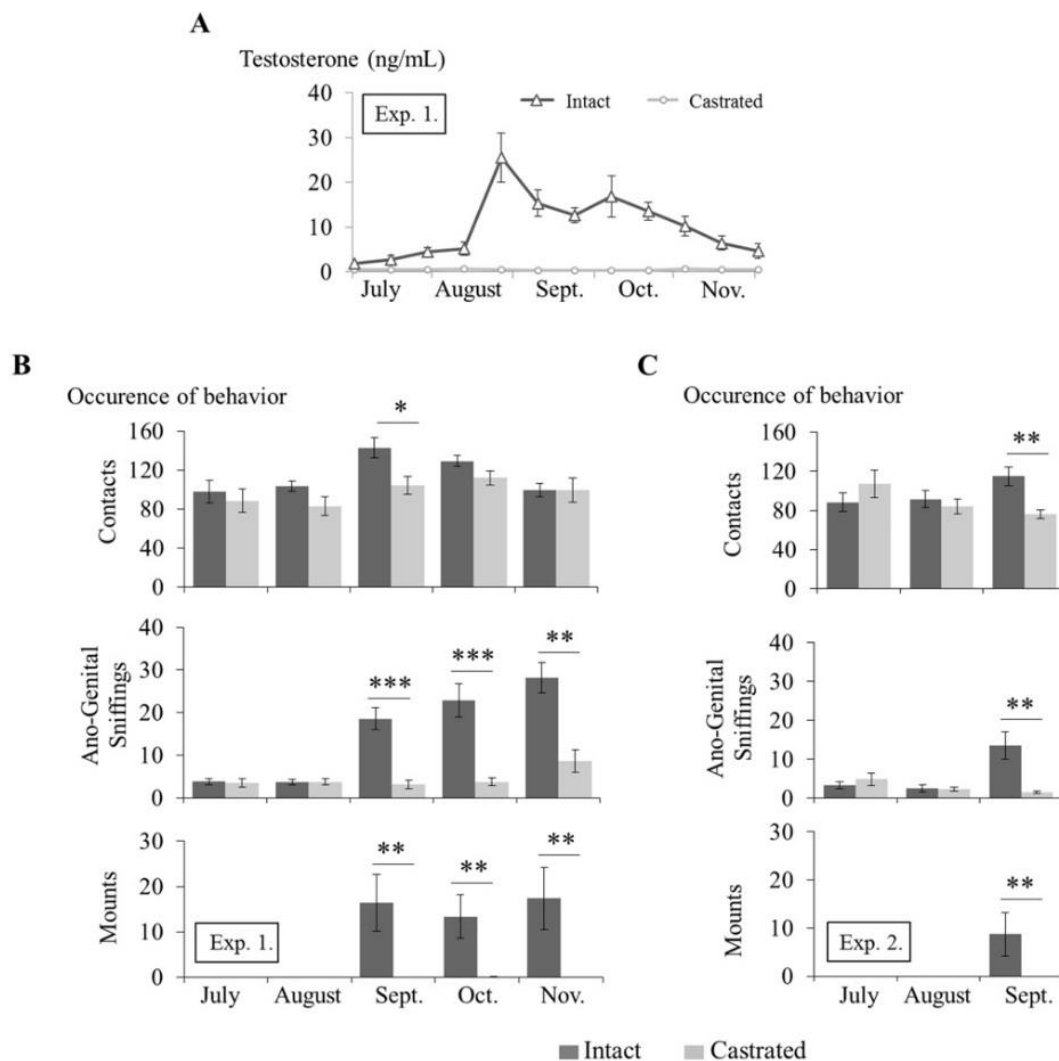


Figure 2. Behavior and testosterone levels of intact and castrated bucks throughout the stimulation of does in the first experiment. **(A)** From June 29th until November 30th, blood samples were obtained twice a month from all bucks, data are represented as mean \pm SEM. **(B-C)** Close interactions between sexes were allowed three times a week for 1 hour. Bucks behavior was observed during those times, data are represented as the mean occurrence per month of each behavior. Stars indicate significant differences between the intact bucks ($n=4$) when compared to the castrated bucks ($n=4$). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Physiological state of females

Regarding the weight gain, an effect of time but no difference between groups was detected for females of the first ($F_{(10,240)}= 489.4$, $p<0.001$; **Figure 3A**) and the second ($F_{(6,90)}= 589.1$, $p<0.001$; **Figure 3B**) experiments.

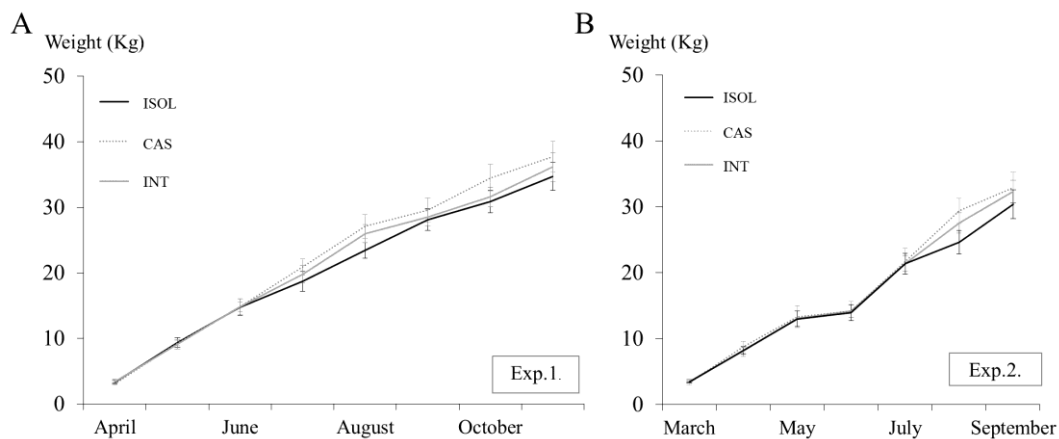


Figure 3. Changes in body weight in females of the experiment 1, from birth to 10 months of age (**A**) and of the experiment 2, from birth to 6 months of age (**B**). Young goats from the 3 groups were weighed monthly. Data are presented as mean \pm SEM and were analyzed using a two-way repeated-measures ANOVA.

Early exposure to male, effects on the endocrine secretions of females

For the first 6 rhythms of sampling, from late June to early September, no significant difference in the frequency of LH pulses can be observed between the three groups. During the seventh rhythm (mid-September), the LH pulsatility in INT goats is significantly higher than in ISOL goats ($p<0.05$) or CAS goats ($p<0.05$; **Table 2**).

This increase of LH pulsatility is associated with a decrease of the amplitude of pulses and occurred at the time of the first ovulation (**Figure 4A-B**). During the following rhythm, there is a tendency for the pulsatility in the ISOL group to be higher than in the CAS group ($p=0.052$) but not to the INT group ($p=0.1$). Nevertheless, at this time there is only one goat in each group that had a pulsatility higher or equal to 4 pulses in 5 hours. The increase of LH pulsatility is concomitant with the first rise of progesterone (**Figure 4B**).

Table 2. Frequency of LH pulses in 5 hours (mean \pm SEM) in goats exposed or not to castrated or intact bucks from June 29th. Blood samples were obtained every 15 min for 5h, sampling series were performed twice a month. Different groups were collected on 3 consecutive days. LH pulses have been identified using the Dynpeak algorithm.

Rhythms	ISOL (n=7)	CAS (n=10)	INT (n=10)
R1 (June 23-25)	1.29 \pm 0.57	0.80 \pm 0.20	1.30 \pm 0.21
R2 (July 7-9)	1 \pm 0.31	1.40 \pm 0.16	1.40 \pm 0.16
R3 (July 21-23)	1 \pm 0.22 [▲]	1.90 \pm 0.28 [▲]	1.80 \pm 0.25
R4 (Aug. 4-6)	1.29 \pm 0.18	1.60 \pm 0.27	1.80 \pm 0.13
R5 (Aug. 18-20)	1.14 \pm 0.14	1.70 \pm 0.26	1.80 \pm 0.20
R6 (Sept. 1-3)	1.29 \pm 0.18	1.80 \pm 0.33	2.20 \pm 0.53
R7 (Sept. 15-17)	1.86 \pm 0.26 ^a	1.90 \pm 0.23 ^a	3.60 \pm 0.50 ^b
R8 (Sept. 29-Oct. 1)	3 \pm 0.38 [▲]	1.80 \pm 0.29 [▲]	1.60 \pm 0.40
R9 (Oct. 13-15)	2.43 \pm 0.20	1.80 \pm 0.36	1.50 \pm 0.37
R10 (Oct. 27-29)	3 \pm 0.44	2.30 \pm 0.30	2.60 \pm 0.65
R11 (Nov. 10-12)	3.67 \pm 0.52	2 \pm 0.42	2.50 \pm 0.50

Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by multiple-comparisons test. Different superscript letters within each row denote significant difference ($p < 0.05$). Values with [▲] within the same row tended to be different ($p \leq 0.06$).

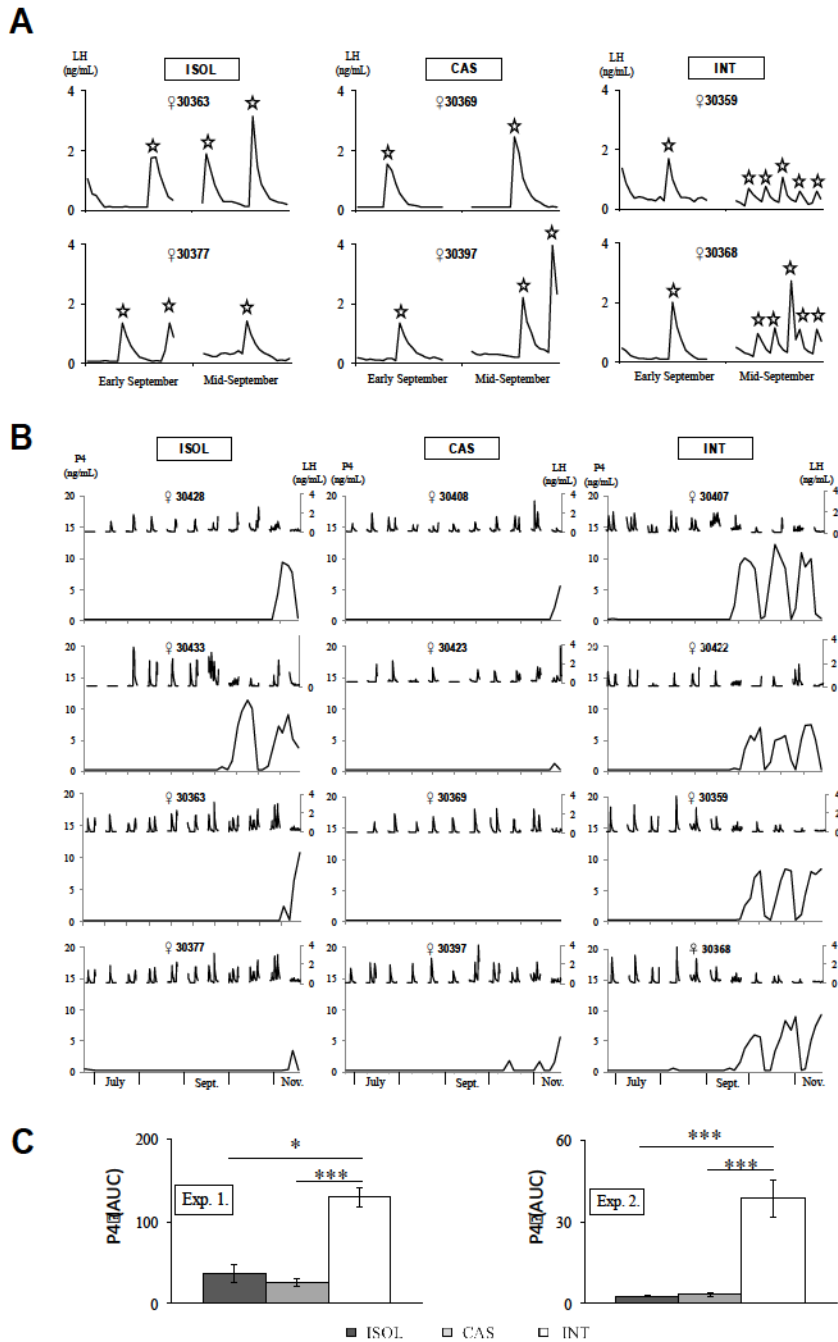


Figure 4. Endocrine changes in isolated females or females exposed to intact or castrated bucks. From June 29th one group of females has been exposed to castrated males (CAS, n=10), one to intact males (INT, n=10) and one group remains isolated from males (ISOL, n=7). **(A)** Focus on the LH pulsatility for the month of September in representative females. Concentration of LH has been determined twice a month in serial blood samples, every 15min for 5 hours. Stars indicate pulses detected by the Dynpeak algorithm. **(B)** Representative patterns of LH and progesterone secretion (ng/mL) throughout the first experiment. Blood samples were collected twice a week for P4. **(C)** Comparison of the cumulative serum progesterone secreted expressed by area under the curve (AUC) for females of both experiments. Data are shown as mean \pm SEM and the statistical significance was evaluated using Kruskal-Wallis tests (* p <0.05, *** p <0.001) P4, progesterone; LH, luteinizing hormone.

It is also interesting to notice that in the group of goats exposed to intact bucks, females continue to be cycling following their first ovulation; 8 out of the 10 goats exhibited 3 ovarian cycles during the period of sampling while in the two other groups most of goats exhibited only one cycle and 2 of the 17 does had two normal cycles (**Figure 4B**). For each experiment, we calculated the area under the curve (AUC) for the progesterone secretion. In both, the AUC was significantly higher in the INT group than in the ISOL and CAS group (**Figure 4C**).

Regarding the age at puberty assessed by the date at first ovulation, significant differences were observed between groups (**Figure 5**). In experiment 1, goats exposed to intact bucks had an earlier ovulation than goats exposed to castrated bucks ($Z=-3.3$, $p<0.001$) or isolated from bucks ($Z=3.4$, $p<0.001$). No difference was detected between those last two groups ($Z=-0.14$, $p=0.88$). In addition, half of does are pubescent at 177 days of age (D177) in the INT group whereas in the two other groups this ratio was reached only at D230, so with a delay of 53 days (**Figure 5A**). Results obtained in the second experiment are highly similar (**Figure 5B**). In this case, half of the does exposed to intact bucks were pubescent at D179 and no ovarian activity detected in the two other groups before euthanasia.

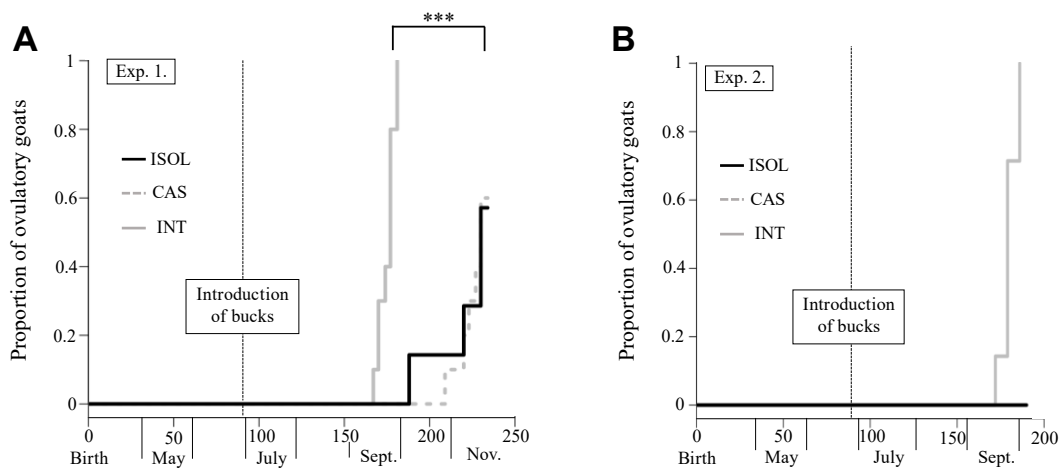


Figure 5. Proportion of ovulating goats isolated or exposed or not to intact or castrated bucks in the experiments 1 (A) and 2 (B). Blood samples for progesterone were collected twice a week in females isolated from males (ISOL), exposed to castrated (CAS) and exposed to intact males (INT). Females were considered to be pubescent when progesterone concentration ≥ 0.5 ng/mL in two consecutive samples. Statistical significance was evaluated using log-rank test (***) $p<0.001$.

Finally, in both experiments, we observe a great synchronicity of the first ovulation in females exposed to intact bucks, all of those females ovulated in a range of 14 days. As a comparison, in the first experiment, the 4 females that reached puberty in the ISOL group ovulated in a range of 45 days. A range of 25 days was observed for the 6 CAS females that ovulated during the experiment.

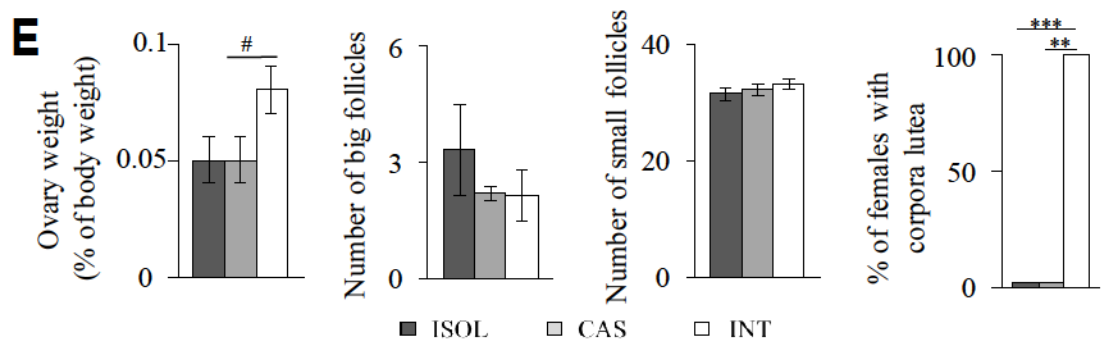
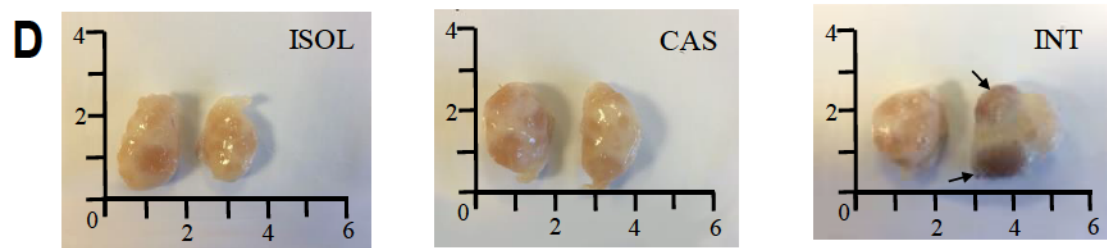
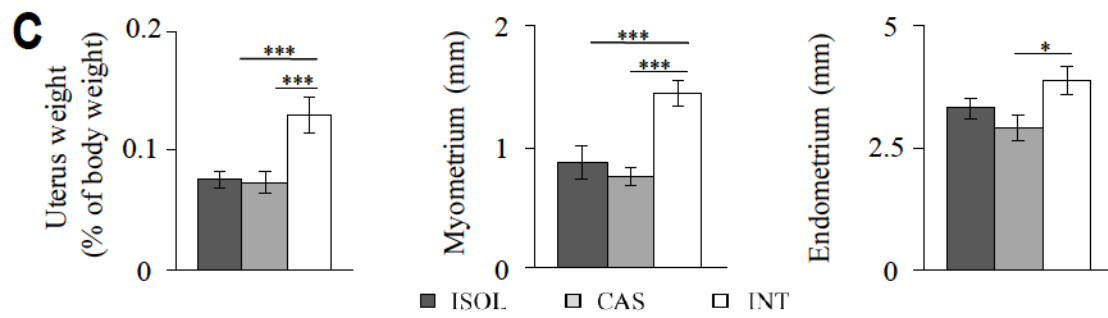
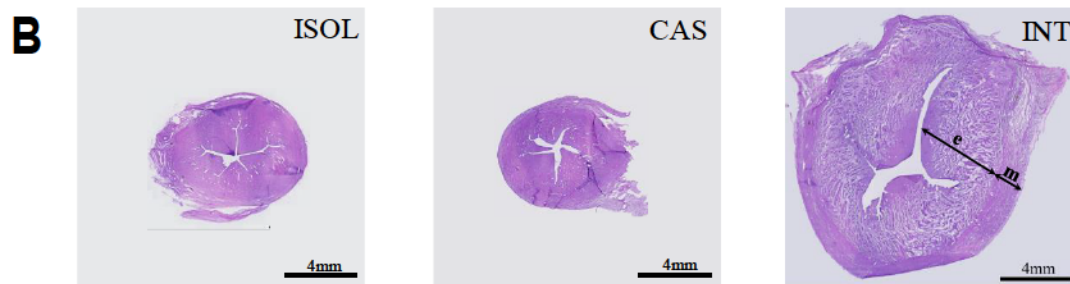
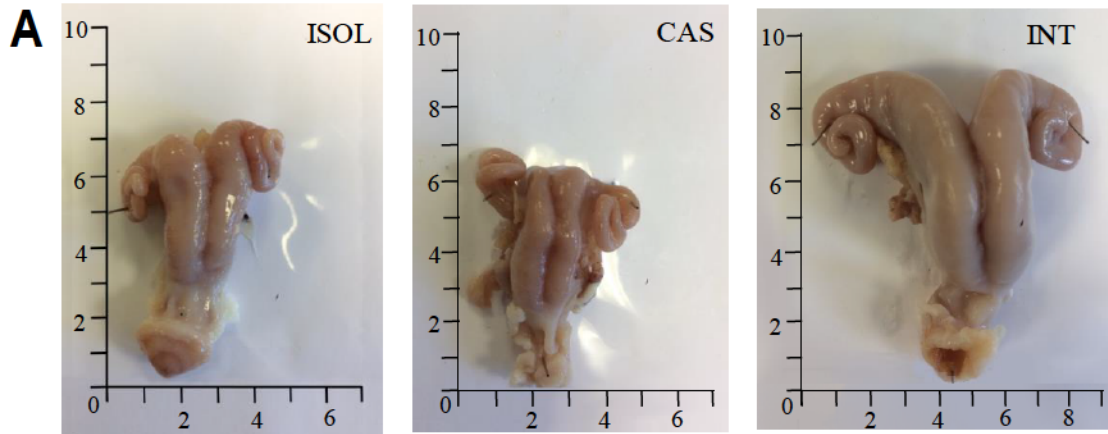
Early exposure to male, effects on the genital tract

In experiment 2, females were euthanized early October when all INT females were considered to be pubescent but none in the ISOL or CAS group (**Figure 5B**). Relative to body weight, the uterus weight of females previously exposed to intact bucks was significantly higher (+40%) than the uterus weight of females isolated or exposed to castrated ($p < 0.001$; **Figure 6A,C**). Comparing the thickness of different layers composing the uterine wall, we detected a significant increase of the myometrium size in INT females. Indeed, in INT females the myometrium is 60% thicker than in ISOL and CAS females ($p < 0.001$; **Figure 6B-C**). We also observe differences in the endometrium thickness but only between INT and CAS females ($p < 0.05$; **Figure 6B-C**), no significant difference was observed between INT and ISOL or between ISOL and CAS females.

The weight of the ovaries relative to body weight tended to be higher in INT females than in the two other groups ($p = 0.07$; **Figure 6D-E**). In addition, corpora lutea were observed in 100% of INT females but in none of CAS and ISOL females ($p < 0.01$; **Figure 6D-E**). Finally, no difference in the proportion of small and large follicles were detected between groups.

Figure 6. *Effects of a precocious exposure to intact or castrated bucks on the female genital tract. (A)* Representative pictures of uteri from ISOL, CAS and INT females. **(B)** Representative hematoxylin-eosin staining of uteri of the three group of females. We can distinguish the myometrium (m) and the endometrium (e). **(C)** Comparisons of the uterus weight, the myometrium and the endometrium thickness between ISOL, CAS and INT females. Data are expressed as mean \pm SEM. **(D)** Representative pictures of uteri from ISOL, CAS and INT females. Arrows indicate corpora lutea. **(E)** Comparisons of the ovarian weight, the number of big ($>0.2\text{mm}$) and small ($<0.2\text{mm}$) follicles in ovaries and the percentage of females with corpora lutea between ISOL, CAS and INT females. Data are expressed as mean \pm SEM. (# $p = 0.07$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

Figure on next page.



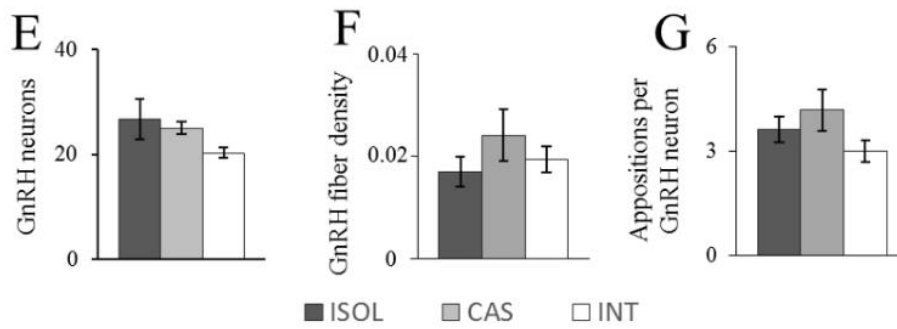
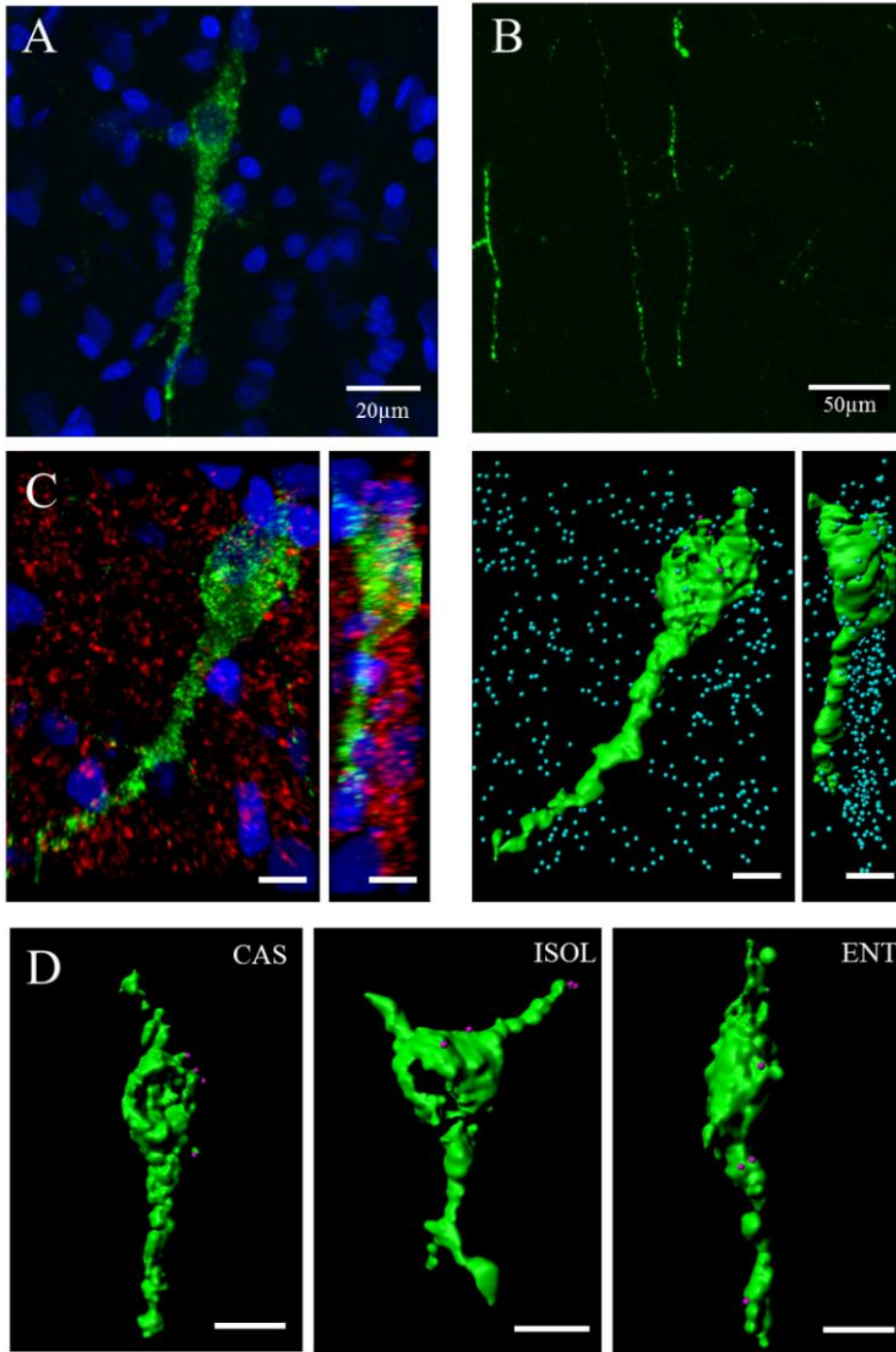
GnRH analysis

The mean number of GnRH neurons has been counted at the levels of the mPOA and rPOA and no statistical differences was detected between the three groups of females ($p > 0.05$; **Figure 7A,E**). Fiber density in the mPOA has been evaluated on z-stacks acquired through confocal microscopy, but again no effect of the previous exposure or isolation to bucks has been detected ($p > 0.05$; **Figure 7B,F**).

Comparison of the mean number of appositions per GnRH neuron has been performed after 3D reconstruction of GnRH neurons and detection of synaptophysin-ir puncta close to the neuron surface (distance $\leq 0.5\mu\text{m}$), those puncta are represented as purple spots (**Figure 7C-D**). The mean number of appositions per GnRH neuron did not differ according to their precocious exposure to bucks (**Figure 7D,G**), with a mean number of 3.64 ± 0.38 , 4.19 ± 0.6 and 3.02 ± 0.31 synaptic contact detected per neuron respectively for ISOL, CAS and INT females.

Figure 7. *Effects of a precocious exposure to intact or castrated bucks on GnRH neurons.* **(A)** Representative image of the GnRH (green) and Hoechst (blue) labelling. **(B)** Representative immunolabelling of GnRH fiber density in the mPOA. **(C)** Representative confocal image of immunolabelling for GnRH (green) and synaptophysin (red) and its 3D reconstruction using Imaris software. Nuclear labelling is shown by hoechst in blue. GnRH neuron surface is reconstructed by the “create surface” tool, blue spots represent all synaptophysin-ir puncta that had a diameter over $1\mu\text{m}$. Purple spots are synaptophysin-ir puncta that were at a maximal distance of $0.5\mu\text{m}$ of the neuronal surface, and are therefore defined as synaptic appositions. **(D)** Representative GnRH neuron reconstruction for each group and synaptic appositions. **(E)** Quantification of the number of GnRH neurons on rPOA and mPOA slices. Data are expressed as mean \pm SEM. **(F)** Quantification of the fiber density on mPOA slices. Data are expressed as mean \pm SEM. **(G)** Quantification of the number of synaptic appositions per GnRH neurons. Data are expressed as mean \pm SEM

Figure on next page.



Sexual behavior test during the breeding season

Finally, in experiment 1, does seems to have a similar behavior whatever their previous exposition or not to bucks ($p>0.05$; **Table 3**). We find no significant difference in the time spent at tail wagging or in the occurrence of immobilizations, and latency at first immobilization. Nevertheless, we observe a tendency for ISOL female to exhibit less tail wagging and to have a increase latency to first immobilization, but it failed to reached the significativity. Moreover, no difference can be detected in the number of goats that accepted to be mounted by bucks during the test, 4 of the 7 does previously isolated from males and 8 of the 10 does in both other groups ($p>0.05$).

Table. 3. Behavior of bucks and does exposed individually to each other after previous synchronization of estrous.

	ISOL (n=7)	CAS (n=10)	INT (n=10)	p-value	
♂	Vocalizations	30.28 ± 5.6	60.95 ± 12.91	64.55 ± 14.97	NS
	Flehmen	1.07 ± 0.3	2.3 ± 0.68	1.75 ± 0.33	NS
	Lateral approaches	37 ± 6	61.2 ± 12.5	68.35 ± 12.3	NS
	Mounts	13.57 ± 1.73	17.1 ± 3.3	16.15 ± 2.7	NS
	Latency at first mount (sec)	928.3 ± 224.8	493.6 ± 158.3	449.4 ± 162.2	NS
♀	Vocalizations	16.07 ± 2.55	8.9 ± 3.04	27.35 ± 8.67	NS
	Urinations	0.43 ± 0.14	0.6 ± 0.16	0.7 ± 0.18	NS
	Tail wagging duration (sec)	145 ± 42	220 ± 40.5	206.8 ± 29	NS
	Immobilizations	6.71 ± 2.37	8.7 ± 2.14	9.8 ± 1.5	NS
	Latency at first immobilization (sec)	930.4 ± 223.9	495.5 ± 158	326.1 ± 119.7	NS

Data are presented as mean ± SEM and were compared between groups using the Kruskal-Wallis test

DISCUSSION

Our results clearly proved that puberty of female kids can be accelerated by early and continuous exposure to sexually active adult bucks.

In this study we made a hormonal monitoring of animals from weaning until 7 months. We highlighted the possibility for intact bucks to induce an increase of the frequency of LH pulses in prepubertal does leading to a precocious puberty. Indeed, this group exhibited an increase of the LH pulsatility at mid-September, an increase that is not observed at this time in the 2 other groups. Possibility for bucks to regulate LH pulsatility in goats was known but only in adults in the case of the male-effect (Bedos et al., 2014; Chemineau et al., 1986b). Moreover thanks to our results, we are able to characterize hormonal variations at the time of the pubertal transition, especially regarding the LH pulsatility. Prepubertal does had a low frequency of LH pulses, 0.3 pulses per hour and at the time of pubertal transition this frequency increased to 0.7 pulses per hour. Those results are consistent with some acquired in sheep after the induction of puberty by presence of rams (Al-Mauly et al., 1991) where they found that prepubertal ewes had 0.3-0.4 pulses per hour and that pubertal ewes had 0.7 pulses per hour.

In the group of females isolated from bucks, we can see that they reached the frequency of 0.7 pulses per hour at the last rhythm of sampling, mid-November, so 8 weeks after the females exposed to intact bucks. This is consistent with the results obtained for the age at first ovulation that highlighted an interval of 1 month and half between these 2 groups. In the group exposed to castrated males, we did not observe any significant increase of the LH pulsatility even if we can detect ovulations in those females. Maybe this can be explained by a more scattered onset of puberty. Indeed, in this group we never detected more than one goat that exhibited a pulsatility higher or equal at 0.7 pulses per hour from late September to mid-November.

Goats that were exposed since weaning to these bucks had an earlier first ovulation. Half of them reached puberty at the age of 6 months (late September) whereas goats exposed to castrated bucks or isolated from bucks attained puberty at 7.5 months of age (mid-November). In addition, exposure to intact bucks is also efficient to synchronize ovulations because in the group exposed to sexually active males, all goats were pubescent in a range of 15 days. Our study also highlighted that after their first ovulation, goats with an induced precocious puberty remain cycling and following estrous cycles were normal.

Moreover, precocious exposure to intact bucks also induced an acceleration of the genital tract maturation. Uterus of females exposed to intact bucks were heavier, it seems that this was mainly due to an increase of the myometrium thickness, myometrium was 60% thicker in females that reached puberty. An increase of the endometrium was also detected in females exposed to intact bucks when compared to females exposed to castrated males but the increase was slighter. This difference of response of the two uterine layers can be explained by their different regulation during the life of the individual. In pigs, the glandular layer (endometrium) seems to develop simultaneously with the individual growth, whereas, the muscular layer (myometrium) increase more dramatically around puberty (Bartol et al., 1993).

Like observed in mice (Jouhannau et al., 2014; Vandenberg, 1969), exposure to castrated males had no effect on the age at puberty or on the genital tract maturation. Bucks provide signals that are responsible of the induction of puberty in females and those signals are only present in sexually active males. In mice chemosignals present in intact male urine are able to accelerate female puberty (Colby and Vandenberg, 1974; Jouhannau et al., 2015, 2014). In goats we have two major hypothesis regarding the cue that may influence the age at puberty, the buck odor and/or the buck behavior. Indeed, we know that the characteristic smell of the buck is not emitted by castrated bucks (Van Lancker et al., 2005); moreover it is well known that hair from intact but not castrated buck is efficient to induce reactivation of the gonadotrope axis in anovulatory goats (Claus et al., 1990; Iwata et al., 2000; Murata et al., 2011; Wakabayashi et al., 2013). Nevertheless anosmic does are still able to response to a male-effect but at a lower proportion, 50% versus 89% for normal does (Chemineau et al., 1986a). Moreover, stimulation by a sexually active buck that has been sedated and thus provide a strong odor without expressing any behavior, fail to induce ovulation (Martinez-Alfaro et al., 2014).

Our second hypothesis concerning the signal provided by the buck which is able to induce an early puberty is the male behavior. Intense male sexual behavior is crucial for the maintenance of LH pulsatility and to induce ovulation in goats (Martinez-Alfaro et al., 2014; Vielma et al., 2009). Our castrated males did not exhibit any sexual behavior, only one mount was performed in 5 months in this group; during the same time more than 400 mounts were performed by intact bucks. Another result consistent with this hypothesis is that sexual behavior of intact buck dramatically increased on September 2nd and 26 days later, on September 28th, all of the does in this group were pubescent but none in the other groups. We could hypothesized that only those three weeks of contact with active bucks were actually needed to induce a

precocious puberty. Maybe the months of exposure while bucks were inactives were not necessary and we could restrained the contact between male and young female to three weeks using sexually active bucks.

Interestingly, early exposure to bucks did not induce differences in the behavior of does when exposed to a sexually active bucks during the breeding season. We could imagine that goats previously exposed to active males would exhibit a stronger sexual behavior than females that never experiment this kind of sexual behavior before the test. But our results show that independently to their previous experience, goats exhibit a similar sexual behavior, there is no difference neither in the proceptivity or in the ratio of goats that accepted the mount. . This result shows that no previous exposure to male sexual behavior is needed for goats to have an adequate behavioral response during the breeding season. Nevertheless, to ensure that females were in a similar physiological state and none in luteal phase, females were synchronized with progesterone sponges, this could have minimized the differences we could observe during a “natural estrous”.

All of our results highlight that goats precociously exposed to intact bucks exhibit an early reactivation of their HPG axis characterized by an early first ovulation, a maintained cyclicity and an early uterine maturation. However, we failed to detect any difference in the organization of GnRH neurons. As expected the number of GnRH neurons did not differ between pubertal and non-pubertal goats (Lopez et al., 2016) but we hypothesized that pubertal goats would have a greater number of synaptic appositions than immature goats. We failed to detect any difference in term of synaptic contacts between the pubescent and immature goats. In ewes and mice an increase in the percentage of GnRH neurons receiving kisspeptine appositions is observed after puberty (Clarkson et al., 2010; Nestor et al., 2012). Investigations on the nature of the different synaptic appositions observed could explained the lack of difference we observed.

In conclusion, this study clearly proved that a precocious puberty can be induced in goats by a permanent exposure to experimented intact bucks. Females exposed to intact bucks exhibit an advance puberty of 1.5 months and they remain cycling after their first ovulation. They also present an acceleration of the uterine maturation shown by an increase of the uterine weight. Hence we demonstrate that intact bucks, when sexually active, provide a signal that induce a

precocious sexual maturation in young females. Females did ovulate just after buck introduction like observed in the male effect but all females exposed to intact bucks were pubescent 3 weeks after they show sexual behavior. The stimulation seems not to be immediate in this case, it is more likely that the stimulation has to be repeated for weeks to induce ovulations in young female goats. We can therefore hypothesize that early exposure to buck induces an acceleration of the central maturation of goats provoking a precocious puberty.

REFERENCES

- Al-Mauly, N.Z.N., Bryant, M.J., Cunningham, F.J., 1991. Effect of the introduction of rams on the pulsatile release of luteinizing hormone and the onset of reproductive activity in ewe lambs. *Anim. Prod.* 53, 209–214. doi:10.1017/S0003356100020146
- Amoah, E.A., Bryant, M.J., 1984. A note on the effect of contact with male goats on occurrence of puberty in female goat kids. *Anim. Prod.* 38, 141–144. doi:10.1017/S0003356100041477
- Bartol, F.F., Wiley, A.A., Spencer, T.E., Vallet, J.L., Christenson, R.K., 1993. Early uterine development in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48, 99–116.
- Bedos, M., Duarte, G., Flores, J.A., Fitz-Rodríguez, G., Hernández, H., Vielma, J., Fernández, I.G., Chemineau, P., Keller, M., Delgadillo, J.A., 2014. Two or 24 h of daily contact with sexually active males results in different profiles of LH secretion that both lead to ovulation in anestrus goats. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48, 93–99. doi:10.1016/j.domaniend.2014.02.003
- Bronson, F.H., Rissman, E.F., 1986. The biology of puberty. *Biol. Rev.* 61, 157–195. doi:10.1111/j.1469-185X.1986.tb00465.x
- Brooks, P.H., Cole, D.J., 1970. The effect of the presence of a boar on the attainment of puberty in gilts. *J. Reprod. Fertil.* 23, 435–440. doi:10.1530/jrf.0.0230435
- Canépa, S., Lainé, A.L., Bluteau, A., Fagu, C., Flon, C., Monniaux, D., 2008. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cah. des Tech. l'INRA* 64, 19–30.
- Chasles, M., Chesneau, D., Moussu, C., Delgadillo, J.A., Chemineau, P., Keller, M., 2016. Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes. *Anim. Reprod. Sci.* 168, 86–91. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.02.030
- Chemineau, P., 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats - a review. *Livest. Prod. Sci.* 17, 135–147. doi:10.1016/0301-6226(87)90059-5
- Chemineau, P., Gauthier, D., Poirier, J.C., Saumande, J., 1982. Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17beta and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. *Theriogenology* 17, 313–323. doi:10.1016/0093-691X(82)90091-7
- Chemineau, P., Lévy, F., Thimonier, J., 1986a. Effects of anosmia on LH secretion, ovulation and oestrous behaviour induced by males in the anovular creole goat. *Anim. Reprod. Sci.* 10, 125–132. doi:10.1016/0378-4320(86)90024-2
- Chemineau, P., Normant, E., Ravault, J.P., Thimonier, J., 1986b. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J. Reprod. Fertil.* 78, 497–504. doi:10.1530/jrf.0.0780497
- Clarkson, J., Han, S.-K., Liu, X., Lee, K., Herbison, A.E., 2010. Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty.

- Claus, R., Over, R., Dehnhard, M., 1990. Effect of male odour on LH secretion and the induction of ovulation in seasonally anoestrous goats. *Anim. Reprod. Sci.* 22, 27–38. doi:10.1016/0378-4320(90)90035-E
- Colby, D.R., Vandenberg, J.G., 1974. Regulatory effects of urinary pheromones on puberty in the mouse. *Biol. Reprod.* 11, 268–279. doi:10.1095/biolreprod11.3.268
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Dubos, M.P., 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 103, 293–298. doi:10.1530/jrf.0.1030293
- Dýrmondsson, Ó.R., 1981. Natural factors affecting puberty and reproductive performance in ewe lambs: A review. *Livest. Prod. Sci.* 8, 55–65. doi:10.1016/0301-6226(81)90030-0
- Dýrmondsson, Ó.R., Lees, J.L., 1972. Effect of rams on the onset of breeding activity in Clun Forest ewe lambs. *J. Agric. Sci.* 79, 269–271.
- Ebling, F.J.P., 2005. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 129, 675–683. doi:10.1530/rep.1.00367
- Fabre-Nys, C., Gelez, H., 2007. Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Horm. Behav.* 52, 18–25. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.04.001
- Flores, J.A., Véliz, F.G., Pérez-Villanueva, J.A., Martínez De La Escalera, G., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol. Reprod.* 62, 1409–1414. doi:10.1095/biolreprod62.5.1409
- Fogarty, M.J., Hammond, L. a, Kanjhan, R., Bellingham, M.C., Noakes, P.G., 2013. A method for the three-dimensional reconstruction of NeurobiotinTM-filled neurons and the location of their synaptic inputs. *Front. Neural Circuits* 7, 153. doi:10.3389/fncir.2013.00153
- Gallego-Calvo, L., Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Zarazaga, L.A., 2015. Reproductive performance response to the male effect in goats is improved when doe live weight/body condition score is increasing. *Anim. Reprod. Sci.* 156, 51–57. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.03.001
- Grumbach, M.M., 2002. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm. Res.* 57, 2–14. doi:10.1159/000058094
- Hochereau-de-Reviere, M.-T., Copin, M., Seck, M., Monet-Kuntz, C., Cornu, C., Fontaine, I., Perreau, C., Elsen, J.M., Boomarov, 1990. Stimulation of testosterone production by PMSG injection in the ovine male: effect of breed and age and application to males carrying or not carrying the “F” Booroola gene. *Anim. Reprod. Sci.* 23, 21–32. doi:10.1016/0378-4320(90)90012-5
- Huffman, L.J., Inskeep, E.K., Goodman, R.L., 1987. Changes in episodic luteinizing hormone secretion leading to puberty in the lamb. *Biol. Reprod.* 37, 755–761. doi:10.1095/biolreprod37.4.755
- Iwata, E., Wakabayashi, Y., Kakuma, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., 2000. Testosterone-Dependent Primer Pheromone Production in the Sebaceous Gland of Male Goat. *Biol. Reprod.* 62, 806–810. doi:10.1095/biolreprod62.3.806
- Jouhanneau, M., Cornilleau, F., Keller, M., 2014. Peripubertal exposure to male odors influences female puberty and adult expression of male-directed odor preference in mice. *Horm. Behav.* 65, 128–133. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.12.006
- Jouhanneau, M., Goudet, C., Moussu, C., Tashiro, T., Buatois, B., Mori, K., Ganem, G., Mori, K., Ganem, G., Keller, M., 2015. Peripubertal exposure to male chemosignals accelerates vaginal opening and induces male-directed odor preference in female mice. *Front. Ecol. Evol.* 3. doi:10.3389/fevo.2015.00034
- Lopez, J.A., Bedenbaugh, M.N., McCosh, R.B., Weems, P.W., Meadows, L.J., Wisman, B., Coolen, L.M., Goodman, R.L., Hileman, S.M., 2016. Does Dynorphin Play a Role in the Onset of Puberty in Female Sheep? *J. Neuroendocrinol.* doi:10.1111/jne.12445

- Losa, S.M., Todd, K.L., Sullivan, A.W., Cao, J., Mickens, J.A., Patisaul, H.B., 2011. Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian development in the peripubertal female rat. *Reprod. Toxicol.* 31, 280–289. doi:10.1016/j.reprotox.2010.10.002
- Martinez-Alfaro, J.C., Hernández, H., Flores, J.A., Duarte, G., Fitz-Rodríguez, G., Fernández, I.G., Bedos, M., Chemineau, P., Keller, M., Delgadillo, J.A., Vielma, J., 2014. Importance of intense male sexual behavior for inducing the preovulatory LH surge and ovulation in seasonally anovulatory female goats. *Theriogenology* 82, 1028–1035. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.07.024
- Montgomery, G.W., Martin, G.B., Pelletier, J., 1985. Changes in LH secretion after ovariectomy in Ile-de-France ewes in two seasons. *J. Reprod. Fertil.* 73, 173–183.
- Murata, K., Wakabayashi, Y., Sakamoto, K., Tanaka, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., Okamura, H., 2011. Effects of Brief Exposure of Male Pheromone on Multiple-Unit Activity at Close Proximity to Kisspeptin Neurons in the Goat Arcuate Nucleus. *J. Reprod. Dev.* 57, 197–202. doi:10.1262/jrd.10-070E
- Nestor, C.C., Briscoe, A.M.S., Davis, S.M., Valent, M., Goodman, R.L., Hileman, S.M., 2012. Evidence of a Role for Kisspeptin and Neurokinin B in Puberty of Female Sheep. *Endocrinology* 153, 2756–2765. doi:10.1210/en.2011-2009
- Oldham, C.M., Gray, S.J., 1984. The “ram effect” will advance puberty in 9–10 month old Merino ewes independent of their season of birth. *Anim. Prod. Aust.* 15, 727.
- Pearce, G.P., Paterson, A., 1992. Physical contact with the boar is required for maximum stimulation of puberty in the gilt because it allows transfer of boar pheromones and not because it induces cortisol release. *Anim. Reprod. Sci.* 27, 209–224. doi:10.1016/0378-4320(92)90059-M
- Pelletier, J., Garnier, D.H., de Reviers, M.M., Terqui, M., Ortavant, R., 1982. Seasonal variation in LH and testosterone release in rams of two breeds. *J. Reprod. Fertil.* 64, 341–346. doi:10.1530/jrf.0.0640341
- R Core Team, 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing, in: R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Ramírez, S., Bedos, M., Chasles, M., Hernández, H., Flores, J.A., Vielma, J., Duarte, G., Retana-Márquez, M.S., Keller, M., Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 2016. Fifteen minutes of daily contact with sexually active male induces ovulation, but delays its timing in seasonally anestrous goats. *Theriogenology* xxx, xxx. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.08.019
- Rodriguez, I., Araki, K., Khatib, K., Martinou, J.C., Vassalli, P., 1997. Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2. *Dev. Biol.* 184, 115–121. doi:10.1006/dbio.1997.8522
- Safranski, T.J., Lamberson, W.R., Keisler, D.H., 1993. Correlations among Three Measures of Puberty in Mice and Relationships with Estradiol Concentration and Ovulation. *Biol. Reprod.* 48, 669–673.
- Schätzle, P., Wuttke, R., Ziegler, U., Sonderegger, P., 2012. Automated quantification of synapses by fluorescence microscopy. *J. Neurosci. Methods* 204, 144–149. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.11.010
- Shelton, M., 1960. Influence of the Presence of a Male Goat on the Initiation of Estrous Cycling and Ovulation of Angora Does. *J. Anim. Sci.* 19, 368–375.
- Urrutia-Morales, J., Meza-Herrera, C.A., Escobar-Medina, F.J., Gamez-Vazquez, H.G., Ramirez-Andrade, B.M., Diaz-Gomez, M.O., González-Bulnes, A., 2009. Relative roles of photoperiodic and nutritional cues in modulating ovarian activity in goats. *Reprod. Biol.* 9, 283–294. doi:10.1016/S1642-431X(12)60032-1
- Van Lancker, S., Van Den Broeck, W., Simoens, P., 2005. Morphology of caprine skin glands involved

- in buck odour production. *Vet. J.* 170, 351–358. doi:10.1016/j.tvjl.2004.08.017
- Vandenbergh, J.G., 1967. Effect of the presence of a male on the sexual maturation of female mice. *Endocrinology* 81, 345–349. doi:10.1210/endo-81-2-345
- Vandenbergh, J.G., 1969. Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology* 84, 658–660. doi:10.1210/endo-84-3-658
- Vandenbergh, J.G., 1976. Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation. *J. Reprod. Fertil.* 46, 451–453. doi:10.1530/jrf.0.0460451
- Vidal, A., Zhang, Q., Médigue, C., Fabre, S., Clément, F., 2012. Dynpeak: An algorithm for pulse detection and frequency analysis in hormonal time series. *PLoS One* 7, e39001. doi:10.1371/journal.pone.0039001
- Vielma, J., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2009. Male sexual behavior contributes to the maintenance of high LH pulsatility in anestrus female goats. *Horm. Behav.* 56, 444–449. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.07.015
- Wakabayashi, Y., Yamamura, T., Sakamoto, K., Mori, Y., Okamura, H., 2013. Electrophysiological and Morphological Evidence for Synchronized GnRH Pulse Generator Activity Among Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin A (KNDy) Neurons in Goats. *J. Reprod. Dev.* 59, 40–48. doi:10.1262/jrd.2012-136
- Watanabe, G., Terasawa, E., 1989. In vivo release of luteinizing hormone releasing hormone increases with puberty in the female rhesus monkey. *Endocrinology* 125, 92–99.
- Yee, J., Limenta, L.M., Rogers, K., Rogers, S., Tay, V.S., Lee, E.J., 2014. Ensuring good quality rna for quantitative real-time pcr isolated from renal proximal tubular cells using laser capture microdissection. *BMC Res. Notes* 7, 62. doi:10.1186/1756-0500-7-62
- Zarazaga, L.A., Guzmán, J.L., Domínguez, C., Pérez, M.C., Prieto, R., Sánchez, J., 2009. Nutrition level and season of birth do not modify puberty of Payoya goat kids. *Animal* 3, 79–86. doi:10.1017/S1751731108003376
- Zuccolilli, G.O., Hamada, T., Ichikawa, M., Mori, Y., 1994. Sexual Dimorphism of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in the Goat Hypothalamus. *J. Reprod. Dev.* 40, 27–32.

Induction d'une puberté précoce chez des femelles nées à contre-saison par une exposition à des boucs sexuellement actifs.

Article 3: Precocious activation of reproductive function in autumn-born goats (*Capra hircus*) by exposure to sexually active bucks¹

Chasles Manon³⁴⁵, Chesneau Didier³⁴⁵, Moussu Chantal³⁴⁵, Delgadillo José Alberto⁶, Chemineau Philippe³⁴⁵ & Keller Matthieu²³⁴⁵

³INRA, UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre de recherche Val-de-Loire, Nouzilly, France

⁴CNRS, UMR 7247, Nouzilly, France

⁵Université François Rabelais de Tours, Tours, France

⁶Centro de Investigación en Reproducción Caprina, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, Mexico

En préparation pour *Biology of Reproduction*

¹ This work was supported by French National Research Agency (ANR) grant MALE-EFFECT (ANR11-ISV7-0001, 2011-2015) to Matthieu Keller

Résumé de l'article

Au cours de l'étude précédente, nous avons mis en évidence que la présence de mâles entiers permet d'induire une puberté précoce chez la jeune chevrette. Nous avons dans ce cas travaillé avec des chèvres nées au printemps, ce qui est la saison de naissance classique pour ces animaux. Or la chèvre est une espèce à reproduction saisonnée, la photopériode joue donc un rôle sur la modulation de la fonction de reproduction. On sait que des chevrettes nées à l'automne présenteront un retard de puberté avec une première ovulation détectée à l'âge d'un an contre 7 mois chez la femelle née au printemps. En effet, ces femelles atteignent l'âge moyen à la puberté (7 mois) autour du mois de mars, c'est-à-dire durant l'anœstrus saisonnier. L'action inhibitrice de la photopériode à cette période ne va pas permettre la réactivation de l'axe gonadotrope. La transition pubertaire aura donc lieu à la saison de reproduction suivante, à l'âge de 1 an. Notre but a donc été de déterminer si la présence de boucs pouvait contrecarrer le retard de puberté observé chez ces femelles.

Les résultats précédents ayant mis en évidence que le niveau d'activité sexuelle du mâle était un facteur crucial dans le phénomène d'accélération pubertaire chez les caprins, nous avons choisi d'exposer la moitié de nos chevrettes ($n=8$) à des mâles sexuellement actifs. Pour nous assurer que nos femelles soient continuellement en contact avec des mâles sexuellement actifs, 3 groupes de boucs ont été utilisés. Les boucs exposés aux femelles durant la période de repos sexuel ont été stimulés en utilisant le traitement photopériodique que nous avons préalablement validé (article 1). Un lot de 8 autres chevrettes est lui resté isolé de tout mâle durant l'ensemble de l'expérience.

Le suivi de la progestérone chez ces deux groupes de femelles a mis en évidence une première ovulation précoce chez les femelles exposées aux mâles sexuellement actifs. L'âge moyen à la puberté de ces femelles a été de 3 mois et demi, ce qui est beaucoup plus précoce que ce à quoi nous pouvions nous attendre au vu de nos résultats précédents. Par ailleurs, l'exposition aux boucs actifs a également permis de prolonger la cyclicité des femelles puisque les femelles stimulées ont arrêté de cycler un mois plus tard que les femelles isolées qui avaient atteint la puberté au cours de l'expérience. Néanmoins, les boucs actifs n'ont pas permis de maintenir cette cyclicité au-delà du mois de mars, il semblerait que dans notre cas, la photopériode devenue inhibitrice à cette période ait eu un impact plus fort sur la fonction de reproduction des jeunes femelles que la présence des mâles actifs.

Nos résultats montrent que l'avance de puberté est possible chez des chevrettes nées à contre-saison et que, dans l'espèce caprine, on peut réactiver l'axe gonadotrope très tôt, dès l'âge de 3 mois et demi. Ces femelles avec une puberté très précoce présentent par la suite une cyclicité normale et régulière.

Abstract:

Goats are seasonal breeders and the main cue controlling the timing of their breeding season is photoperiod. In addition, the season of birth impacts puberty onset: spring-born goats reach puberty at 7 months while autumn-born goats reach puberty at 1 year. However, social interactions are known to be another factor regulating reproductive function. This has been well demonstrated in the case of the male-effect. The level of male sexual activity is known to be crucial to induce an efficient male-effect. The aim of this study was therefore to determine whether exposure of autumn-born young female to sexually-active males could counteract this delay of puberty. Females were divided in two groups, one isolated from males (n=8) and one exposed to sexually-active bucks (n=8). To ensure that bucks were sexually active, 3 groups of 3-4 males were used, the ones used to stimulate females during the non-breeding season were previously stimulated by a photoperiodic treatment of long days. Females exposed to sexually-active males reached puberty earlier than isolated females. All stimulated females ovulated during the experiment and the mean age at puberty was of 3.5 months. This age is much younger to what is described in the literature. Moreover, those females exhibit an estrous behavior for most ovulations and stopped cycling later than isolated females. Despite this efficient effect of males, the stimulation by bucks failed to suppress totally the anestrous season, as no female ovulated from late March. Our results indicate that in goats, social interactions are crucial in the reactivation of the reproductive axis.

INTRODUCTION

Pubertal transition is a key period which marks the beginning of the reproductive life. During this period, males and females will acquire the physiological and behavioral ability for reproduction. For females, puberty is usually defined as the occurrence of the first ovulation (Ebling, 2005). This pubertal transition is the consequence of the reactivation of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis that remained quiescent since childhood.

This axis is highly sensible to internal and external factors (Bronson and Rissman, 1986). One of the most important external cue able to modify the HPG axis is the photoperiod.

Across small ruminants such as sheep or goats, some breeds are seasonal breeders; this is the case of alpine goats which, under temperate latitudes, exhibit a succession of estrous and ovulatory cycles from early autumn to late winter (Shelton, 1978). Alpine bucks also display seasonal variation of their sexual activity with a breeding period starting late summer and finishing late winter (Delgadillo et al., 1991). For those seasonal breeders, photoperiod do not only affect adults' reproductive functions but it also influence the start of the reproductive life of each individual by regulating the onset of puberty. It has been shown that under temperate (Papachristoforou et al., 2000) and subtropical (Delgadillo et al., 2007) latitudes, the onset of puberty will occur only during the breeding season. So for females, the age at first ovulation depend on their month of birth; spring-born goats reached puberty around 7 months of age, while does born out-of-season (Autumn) attain puberty only around 1 year of age (Delgadillo et al., 2007; Papachristoforou et al., 2000). Therefore, out-of-season birth induces a significant delay of puberty of 5 months.

If the photoperiod is considered to be the main environmental cue regulating reproductive functions in seasonal breeders, other factors such as social interactions can also modulate reproduction. In small ruminants the possibility to regulate reproduction by a modulation of the social environment is known since decades, especially the capacity of a male to induce ovulation while introduced into a group of anestrus females (Delgadillo et al., 2009; Girard, 1813). This phenomenon called « male-effect » has been well characterized in goats, highlighting that the main limiting factor for an efficient male-effect is the level of sexual activity of bucks (Flores et al., 2000). Under both temperate and subtropical latitudes, the use of photo-stimulated bucks increase significantly the success of the male-effect. The percentage of ovulatory females drops from 85-90% using photo-stimulated bucks to 5-10% using non-stimulated bucks (Chasles et al., 2016; Chemineau, 1983; Delgadillo and Vélez, 2010; Ponce et al., 2014). In goats, the reproductive axis of females seems highly sensitive to signals

provided by the buck, this is confirmed by a recent study that demonstrated that continuous exposure to sexually active bucks can completely prevent the seasonal anestrus (Delgadillo et al., 2015).

Some studies also reported that presence of a male could affect the onset of puberty of young ewes and goats (ewes: (Al-Maully et al., 1991; Kenyon et al., 2012; Oldham and Gray, 1984); goats: (Amoah and Bryant, 1984)). This highlights that social factors can affect the immature gonadotropic axis by inducing its precocious reactivation. Most of these studies were carried with spring-born young females, so less information is available about the possibility to modify the onset of puberty in autumn-born females. Those autumn-born females are known to have a delayed puberty. Therefore, it is possible to better understand the relative importance of social environment vs photoperiod in the regulation of puberty in seasonal breeders.

Recently one study carried in sheep highlighted that exposure to stimulated rams was efficient to induce a precocious puberty in autumn-born ewes (Abecia et al., 2016). Females exposed to sexually-active rams were pubescent 1.4 months before the control group. To our knowledge, there is no information about this possibility in goats. In this study we tested the hypothesis that exposure to sexually-active bucks will induce the onset of puberty of autumn-born females earlier than in females isolated from bucks.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were carried out from September 2016 to April 2017 in Nouzilly, France (latitude 47° 32N and longitude 0° 46E) on alpine goats (*Capra hircus*). We used a total of 26 animals for this study, 16 juvenile females and 10 adult males sexually experimented. Young females were born between August 24th and September 4th. They were weaned at 2.5 month old and one week later they were divided in two groups balanced for body weight. Sisters were separated to avoid any genetic effect. Animals were fed daily with barley straw, lucerne hay and commercial concentrate, with free access to water and mineral blocks. All procedures were performed in accordance with the European directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and approved by an ethical committee for animal experimentation (CEEA VdL, Tours, France, n°2016091910327211).

Photoperiodic treatment

To ensure that females were permanently exposed to sexually active bucks (SAB), the males were divided in three groups and two of them were successively submitted to a photoperiodic treatment of long days. This treatment consists of an exposure to artificial long days (16 hours of light and 8 hours of darkness per day) for 2 months and half in a light proof building. Light intensity in the light proof building was at least 300 lx at the level of the eyes of the animals. Following this light treatment, bucks were moved into open barns exposed to the natural photoperiodic conditions.

One group of bucks was exposed to artificial long days from September 15th to December 1st (SAB2, n=3) and another from November 4th to January 23rd (SAB3, n=3). Six weeks after, they were exposed to females: from January 15th to March 5th for SAB2 and from March 6th to April 24th for SAB3. SAB1 (n=4) bucks were used to stimulate females during the breeding season (from November 22nd to January 15th), hence they were naturally sexually active and did not need to be stimulated with a photoperiodic treatment.

This photoperiodic treatment is known to be efficient in inducing a sexually-active state in males during the non-breeding season after 45 to 60 days following the switch of exposure from artificial long days to natural photoperiod (Chasles et al., 2016; Delgadillo et al., 1991). The level of sexual behavior of photo-stimulated bucks has been shown to be as intense as the one of naturally sexually active bucks (Bedos et al., 2016a).

To evaluate the efficiency of the photoperiodic treatment, testicular volumes were assessed at the end of the photoperiodic treatment and during the first week of exposure to females. Measures were taken by the same operator to avoid inter-individual variations (Delgadillo et al., 2002; Oldham et al., 1978).

Pre-pubertal exposure to bucks

One group of 8 females was exposed to bucks (STIM) just after the weaning while the other group of 8 females remained isolated (ISOL) from any male. In the STIM group, exposure to bucks was continuous behind a fence from November 22nd until April 24th. Throughout this period, we allowed direct contact between bucks and goats for 1 hour 3 times a week; in this case, males were fitted with an apron to prevent intromissions and conceptions. During those close interactions, we observed the behavior of both males and females to detect estrous behavior and to ensure the sexually-active state of the bucks. Behaviors observed to asses of

the bucks' state were ano-genital sniffing, flehmen and lateral approaches. The number of contact between male and females was quantified to ensure that the bucks and goats motivation to interact was similar along the experiment. A goat was considered in estrous when it showed a state of excitement during which it vocalizes more, waggles her tail and accepts the mount by the buck.

Evaluation of puberty onset and weight gain

Age at puberty was assessed by the determination of the onset of ovarian activity. Ovulations were detected by assessing plasma progesterone (P4) concentrations twice a week. Blood samples were obtained by jugular venipuncture from all females from the age of 3.5 months till the age of 7.5 months in 5mL tubes containing heparin. Plasma was obtained after 30 minutes of centrifugation at 3500g and concentration of plasma progesterone was determined in samples using an immunoenzymatic assay as described previously (Canépa et al., 2008). Sensibility of this assay was 0.25ng/mL. The mean intra-assay and inter-assay coefficient of variation were <10%. Females with progesterone concentration ≥ 0.5 ng/mL in 2 consecutive samples were considered to have ovulated and then to be pubescent (Gallego-Calvo et al., 2015; Urrutia-Morales et al., 2009). Throughout the experiment, females were also weighed monthly.

Statistical Analysis

Results are reported as mean \pm SEM (standard error of the mean). A Shapiro-Wilk test has been performed to test the data distribution. If data were normally distributed ($p > 0.05$) a parametric test was performed, otherwise we used non-parametric tests. Weight data were compared between groups using a two-way repeated-measures ANOVA. Intra-group variations of the testicular volume were performed using paired Student t test and inter-groups variations were analyzed by the Kruskal-Wallis test. The age at puberty was examined using a Kaplan-Meier survival analysis and differences between groups were compared by the log rank test. Behavior of bucks and the number of cycles were analyzed using the Mann-Whitney test and percentages of cycling goats were compared using Fisher exact tests. Area under the curve (AUC) of progesterone secretion was calculated for each group following the trapezoidal rule, comparison between groups was performed by a Mann-Whitney test. All analyzes were performed using R software (R Core Team, 2014). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Sexual Activity of Bucks

Bucks from SAB2 and SAB3 groups exhibit a significant increase of their testicular volume between the end of the photoperiodic treatment and their first exposure to females (**Figure 1**; $p < 0.05$). A similar increase of 18% of their testicular volumes can be observed in those two groups. During the first exposure to females, the two groups of stimulated bucks had a similar testicular volume than natural sexually active bucks (**Figure 1**; $p > 0.05$).

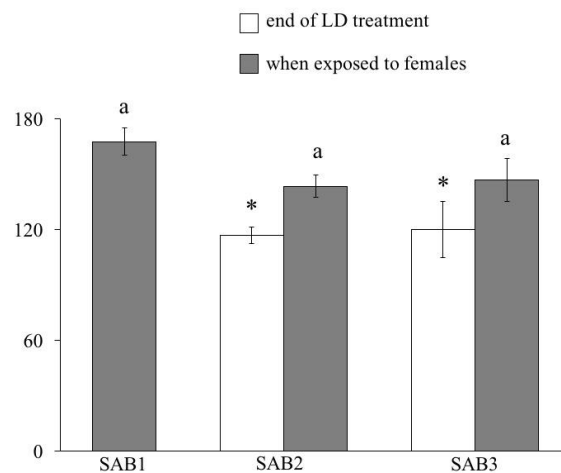


Figure 1. Variation of the testicular volume. Measure of the testicular volume was assessed by orchidometry the first day of exposure to females for each group of bucks: SAB1 (n=4), SAB2 (n=3) and SAB3 (n=3). For SAB2 and SAB3 bucks, a measure was also performed the last day of the long day treatment. Results are presented as mean \pm SEM. Stars indicate significant differences within a group using the paired Student t test ($*p < 0.05$). Different letters denote a significant difference between groups using a Kruskal-Wallis.

The sexual behavior of bucks has been observed for 5 months. No significant differences between the 3 groups of bucks can be detected looking for the number of physical contacts between males and females (**Figure 2**). An increase of the occurrence of appetitive behaviors is observed in bucks from the third group (SAB3), hence those bucks exhibit more ano-genital sniffing than the 2 other groups (SAB1-SAB3: $p < 0.05$; SAB2-SAB3: $p < 0.01$) and more flehmen than SAB1 ($p < 0.05$). No significant difference can be detected in the occurrence of lateral approaches among bucks' groups.

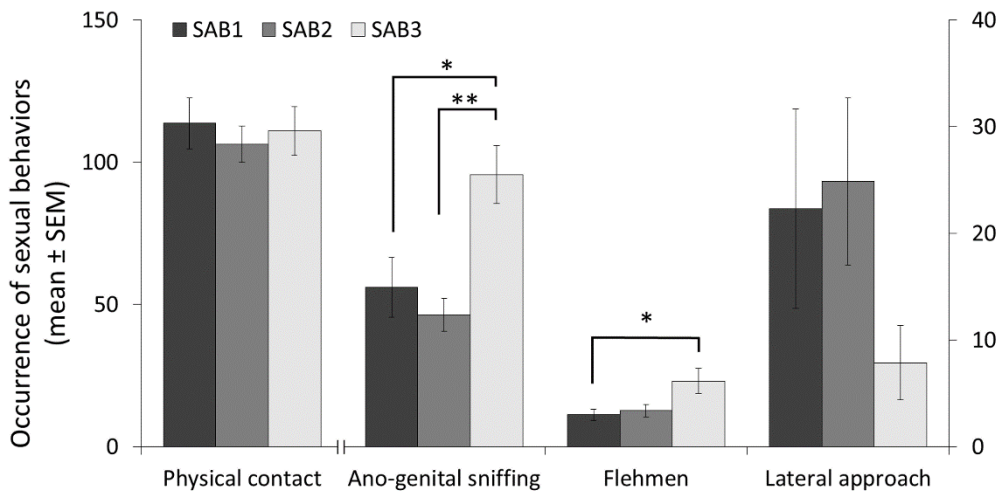


Figure 2. Occurrence of socio-sexual behaviors (mean ± SEM) of the three group of bucks. Behavior was observed for 1h three times a week when a single buck was introduced into the females' pen. SAB1 (n=4) were used from November 22nd to mid-January, SAB2 (n=3) from mid-January to mid-March and SAB3 from mid-March to late-April. Stars indicate significant differences between groups using a Kruskal-Wallis test (*p < 0.05, **p < 0.01).

Physiological state of females

Regarding the weight gain of the 2 groups of goats, a strong effect of time ($F_{(7,98)}=299.9$, $p<0.001$) and a treatment-by-time interaction were detected ($F_{(7,98)}=3.4$, $p<0.01$) but no group effect ($F_{(1,14)}=0.58$, $p=0.46$) can be observed (**Figure 3**). One single difference was observed between groups for the month of April, STIM females were heavier than ISOL females ($39.88 \pm 2.5\text{Kg}$ versus $34.75 \pm 2.5\text{Kg}$; $p<0.05$).

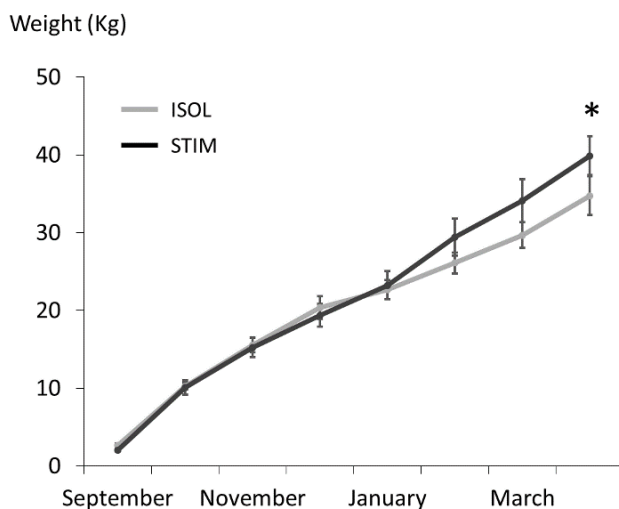


Figure 3. Changes in body weight in female kids from birth to 7 months of age. Females from the 2 groups, ISOL (grey line; n=8) and STIM (black line; n=8) were weighed monthly. Data are presented as mean ± SEM. Stars indicate significant differences between groups using a two-way repeated-measures ANOVA followed by pairwise t-test (*p < 0.05).

For the age at puberty assessed by the date at first ovulation, significant differences were observed between groups (**Figure 4A**). Goats exposed to sexually active bucks had an earlier first ovulation than isolated goats ($Z=-2.98$, $p<0.01$). On December 19th, 5/8 of STIM females were considered pubescent while none of the ISOL females reached puberty. The mean age at puberty in the STIM group was of 112 days, so when females were 3.6 months old. Moreover, at the end of the experiment (late April), all the females exposed to bucks were pubescent but only 4 of the 8 isolated females.

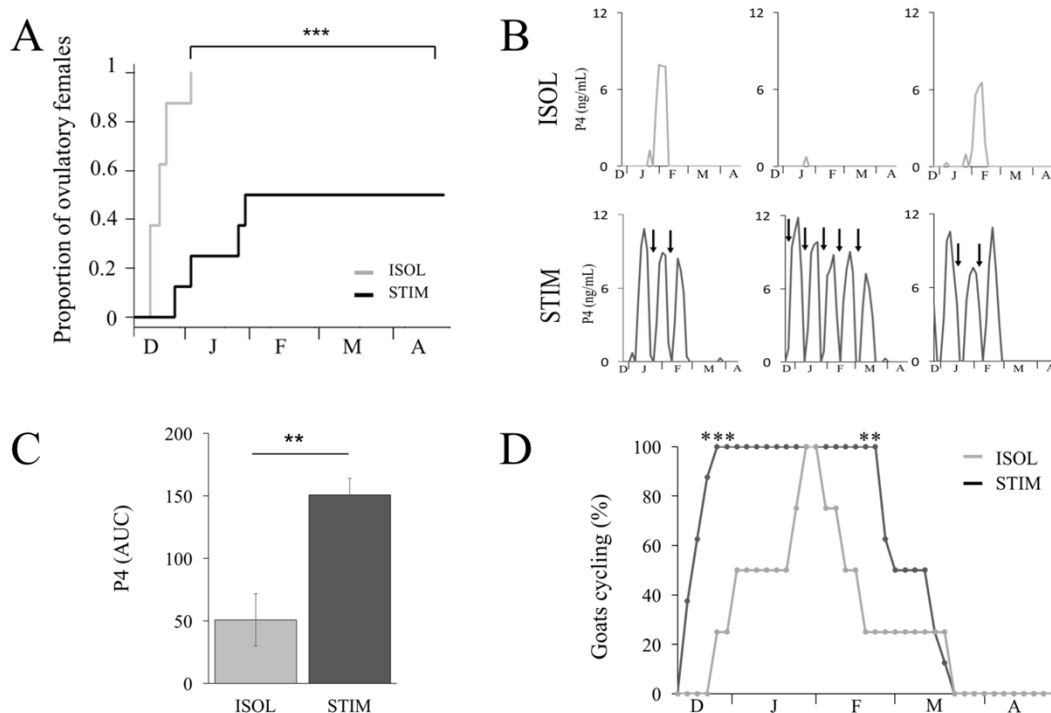


Figure 4. Physiological response of young goats exposed (STIM) or not (ISOL) to sexually active bucks. Blood samples for progesterone were collected twice a week from mid-December to late-April. **(A)** Cumulative proportions of young goats reaching puberty from ISOL (n=8) and STIM (n=8) groups. Females were considered pubescent when progesterone levels ≥ 0.5 ng/mL in two consecutive samples. Data were analyzed using log-rank test ($***p < 0.001$). **(B)** Representative patterns of the cyclicity of female exposed or not to bucks. STIM females were submitted to direct contact with bucks 3 hours a week, estrous behavior (indicated by arrows) was determined during those close interactions. **(C)** Comparison of the cumulative serum progesterone secreted expressed by area under the curve (AUC). Stars indicate significant differences between groups using a Fisher exact test ($**p < 0.01$). **(D)** Percentage of pubescent females cycling in the STIM (n=8) and ISOL (n=4) groups. Stars indicate significant differences between groups using a Fisher exact test ($*p < 0.05$).

Cyclicity and estrous behavior

Looking to ovulatory cycles determined by progesterone levels, we can observe that following their first ovulation all STIM females remained cycling for at least 2 other cycles (**Figure 4B**). In the ISOL group, only two females exhibited 2 cycles or more. For the STIM females, 28 ovulations were detected and during the same period 20 estrous episodes were observed during the 3 hours of direct contact allowed per week; so for this group 71% of the ovarian cycles were preceded by an estrous behavior (**Figure 4B**). Moreover, area under the curve (AUC) calculated for the progesterone secretion along the experiment (**Figure 4C**) was significantly higher in the STIM group than in the ISOL group ($p < 0.01$). Progesterone secretion was three times higher in STIM females which is consistent with the mean number of observed cycles for each group (3.5 ± 0.3 versus 1 ± 0.5 , for STIM and ISOL group respectively; $p < 0.01$).

The ovulatory cyclic activity has been monitored for all the 12 pubescent females (STIM $n=8$; ISOL $n=4$) from December to April (**Figure 4D**). STIM females started cycling earlier but also cycled longer than ISOL females. The period within which all females from a group were cycling was of 8.5 weeks in the STIM group and was only of 1 week in the ISOL group. The percentage of cycling goats was significantly higher in the STIM group for late-December and mid-February (**Figure 4D**, $p < 0.05$)

Moreover 50% of ISOL goats stopped cycling on February 13th while in the other group this same proportion of non-cycling goats was only observed on March 9th, STIM females were cycling on average 24 days longer than ISOL females.

DISCUSSION

To our knowledge, we reported for the first time that puberty of autumn-born young goats can be significantly advanced by exposure to sexually-active bucks, without any hormonal treatment. Females exposed to sexually-active bucks had a mean age at puberty of 3.5 months whereas without social stimuli, autumn-born young goats reach puberty around 1 year of age. Even spring-born young goats are pubescent approximately at 7 months of age (Delgadillo et al., 2007). Hence our study is demonstrating that the hypothalamic-pituitary-ovarian axis of young goats can be reactivated much earlier than previously described (as early as 3.5 months). This reactivation is really physiological because the induction of the first ovulation is followed by a normal cyclicity in these 3.5 months old females.

It is known that other factors such as the metabolic state can impact the age at puberty; as no difference in the body weight was detected between groups when they start ovulating, this factor is not responsible for the precocious puberty observed in females exposed to sexually active male.

Our results are consistent with the only other study about the induction of a precocious puberty in autumn-born females by sexually-active males which study was carried in sheep and where an advance of 1.4 months was reported. In this case, teased females were pubescent at a mean age of 7.8 months while controls females reached puberty at 9.2 months (Abecia et al., 2016). This difference can be partly explained by the different experimental design; indeed, we choose to expose females to bucks at weaning (3 months) so much earlier than in this study where rams were introduced when females were 5.5 month old. In our experiment, more than 85% of goats exposed to sexually active bucks reached puberty within a month after the first contact with males. We could imagine that if ewes have been exposed to rams earlier, they could have reached an even earlier puberty. Interestingly we observed a great synchronicity of the first ovulation in the group exposed to sexually-active males. In our study, all stimulated females reached puberty in a range of 3 weeks, while in the control group only 50% reached puberty over the 5 months of the experiment.

In this study, we did not only observe the age at first ovulation but we also characterized the following cyclicity of females. All young goats exposed to sexually-active bucks remain cycling after the first ovulation and ovarian cycles are similar to those observed in mature goats (Fatet et al., 2011). Furthermore, for most of the ovulation detected by progesterone levels, few days before, females exhibit an estrous behavior. In young goats, we observed, as already known, that most of first ovulations are silent; i.e. that there is no estrous behavior associated with ovulation (Zarazaga et al., 2009). Observation of the estrous behavior is still a commonly used manner to determine if a female is pubescent. According to our results, this method would fail to detect as pubescent females, females that only had one cycle and that did not show any sign of estrous behavior which is the case of 3 out of 8 of our isolated females.

Exposure to males can advance the onset of puberty, but it can also help for the maintenance of the ovarian cyclicity. Indeed, females continue cycling 3 weeks later when exposed to sexually-active bucks than when isolated from bucks. However, this enduring cyclicity ended

late March. Our first hypothesis was that this was due to the bucks that were no more enough sexually active to stimulate females. However, the analysis of the behavior of the group of bucks used at this time of the experiment (SAB3) does not show any sign of a decrease in their sexual activity, with a similar motivation to interact with females. Therefore, we conclude that the cyclicity arrest was rather due to the photoperiod than a lack of stimulation. Indeed, in goats, the anestrus season starts in March when day length increase (Chemineau et al., 1992), providing an inhibitory signal to the reproductive axis.

Those results are however not consistent with a recent study (Delgadillo et al., 2015), that highlighted to possibility to suppress totally the anestrus season in female goats by a continuous exposure to sexually active bucks. In our experiment, if active bucks enable an extent of the breeding season, they failed to totally override the anestrus period. This difference can be explained by several facts. First, magnitude of photoperiodic variations is different. Indeed Delgadillo's study (Delgadillo et al., 2015) was carried in Northern Mexico, where the day length can vary from 10 h at the winter solstice to 14 h at the summer solstice. Under temperate latitudes this variation is more important with, at the same dates, a photoperiod varying from 8 h to 16 h. The greater photoperiodic variation observed under temperate latitudes may results in a deeper anestrus and a stronger inhibitory effect of photoperiodic stimuli. Social factors could then be surpassed by the photoperiodic factor. The comparison of the two studies provides another parameter has to be taken into account which is the level of sexual experience of females. Indeed, Delgadillo's study (Delgadillo et al., 2015) involved only multiparous adult goats, so females with a high level of sexual experience. In our study, females were younger and had a very short experience of the male (i.e. continuous exposure behind a fence for 4 months with only 3 hours per week of direct contact). It is known that sexual experience can impact the quality of the female's response to the signal of the male. Multiparous ewes have a better response to a male-effect than nulliparous ewes (Ungerfeld, 2016). Even during the normal breeding season, reproductive performances of unexperienced ewes are significantly lower than performances of experienced ewes (Kenyon et al., 2014). In goats similar results were obtained during a male-effect experiment: when exposed to teaser bucks only 16% of unexperienced females exhibit an estrous behavior while 92% of multiparous females do so (Mellado et al., 2000).

In conclusion, presence of sexually-active bucks since weaning is highly efficient to induce a precocious puberty in autumn-born goats. It seems that presence of active bucks can induce an acceleration of the maturation of the female reproductive axis enabling young goats to ovulate, maintain a normal cyclicity and express an adequate estrous behavior as early as 3.5 months of age. This result was highly surprising as the commonly accepted age at puberty for goats born in spring is 7 months and one year for goats born in autumn. Presence of bucks also helped maintaining the cyclicity in young females but it failed to totally suppress the anestrus season as observed in mature females.

REFERENCES

- Abecia, J.A., Chemineau, P., Gómez, A., Keller, M., Forcada, F., Delgadillo, J.A., 2016. Presence of photoperiod-melatonin-induced, sexually-activated rams in spring advances puberty in autumn-born ewe lambs. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2016.04.011
- Al-Mauly, N.Z.N., Bryant, M.J., Cunningham, F.J., 1991. Effect of the introduction of rams on the pulsatile release of luteinizing hormone and the onset of reproductive activity in ewe lambs. *Anim. Prod.* 53, 209–214. doi:10.1017/S0003356100020146
- Amoah, E.A., Bryant, M.J., 1984. A note on the effect of contact with male goats on occurrence of puberty in female goat kids. *Anim. Prod.* 38, 141–144. doi:10.1017/S0003356100041477
- Bedos, M., Muñoz, A.L., Orihuela, A., Delgadillo, J.A., 2016. The sexual behavior of male goats exposed to long days is as intense as during their breeding season. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 184, 35–40. doi:10.1016/j.applanim.2016.08.002
- Bronson, F.H., Rissman, E.F., 1986. The biology of puberty. *Biol. Rev.* 61, 157–195. doi:10.1111/j.1469-185X.1986.tb00465.x
- Canépa, S., Lainé, A.L., Bluteau, A., Fagu, C., Flon, C., Monniaux, D., 2008. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cah. des Tech. l'INRA* 64, 19–30.
- Chasles, M., Chesneau, D., Moussu, C., Delgadillo, J.A., Chemineau, P., Keller, M., 2016. Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes. *Anim. Reprod. Sci.* 168, 86–91. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.02.030
- Chemineau, P., 1983. Effect on oestrus and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *J. Reprod. Fertil.* 67, 65–72. doi:10.1530/jrf.0.0670065
- Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., Delgadillo, J.A., 1992. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rumin. Res.* 8, 299–312. doi:10.1016/0921-4488(92)90211-L
- Delgadillo, J.A., De Santiago-Miramontes, M.A., Carrillo, E., 2007. Season of birth modifies puberty in female and male goats raised under subtropical conditions. *Animal* 1, 858–864. doi:10.1017/S1751731107000080
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Hernández, H., Poindron, P., Keller, M., Fitz-Rodríguez, G., Duarte, G., Vielma, J., Fernández, I.G., Chemineau, P., 2015. Sexually active males prevent the display of seasonal anestrus in female goats. *Horm. Behav.* 69, 8–15. doi:10.1016/j.yhbeh.2014.12.001

- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernández, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpoux, B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J. Anim. Sci.* 80, 2780–2786.
- Delgadillo, J.A., Gelez, H., Ungerfeld, R., Hawken, P.A.R., Martin, G.B., 2009. The “male effect” in sheep and goats-Revisiting the dogmas. *Behav. Brain Res.* 200, 304–314. doi:10.1016/j.bbr.2009.02.004
- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1991. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36, 755–770. doi:10.1016/0093-691X(91)90341-A
- Delgadillo, J.A., Vélez, L.I., 2010. Stimulation of reproductive activity in anovulatory Alpine goats exposed to bucks treated only with artificially long days. *Animal* 4, 2012–2016. doi:10.1017/S1751731110001345
- Ebling, F.J.P., 2005. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 129, 675–683. doi:10.1530/rep.1.00367
- Fatet, A., Pellicer-Rubio, M.-T., Leboeuf, B., 2011. Reproductive cycle of goats. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 211–219. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.029
- Flores, J.A., Véliz, F.G., Pérez-Villanueva, J.A., Martínez De La Escalera, G., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol. Reprod.* 62, 1409–1414. doi:10.1095/biolreprod62.5.1409
- Gallego-Calvo, L., Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Zarazaga, L.A., 2015. Reproductive performance response to the male effect in goats is improved when doe live weight/body condition score is increasing. *Anim. Reprod. Sci.* 156, 51–57. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.03.001
- Girard, L., 1813. Moyens employés avec succès, par M. Morel de Vindé, Membre de la Société d’Agriculture de Seine et Oise, pour obtenir, dans le temps le plus court possible, la fécondation du plus grand nombre des brebis portières d’un troupeau, in: *Ephémérides de La Société d’Agriculture Du Département de l’Indre Pour l’An 1813*. Château-Roux, Département de l’Indre, pp. 66–68.
- Kenyon, P.R., Thompson, A.N., Morris, S.T., 2014. Breeding ewe lambs successfully to improve lifetime performance. *Small Rumin. Res.* 118, 2–15. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.12.022
- Kenyon, P.R., Viñoles, C., Morris, S.T., 2012. Effect of teasing by the ram on the onset of puberty in Romney ewe lambs. *New Zeal. J. Agric. Res.* 55, 37–41. doi:10.1080/00288233.2012.693105
- Mellado, M., Olivas, R., Ruiz, F., 2000. Effect of buck stimulus on mature and pre-pubertal norgestomet-treated goats. *Small Rumin. Res.* 36, 269–274. doi:10.1016/S0921-4488(99)00122-4
- Oldham, C.M., Gherardi, P.B., Lindsay, D.R., Mackintosh, J.B., Adams, N.R., 1978. The influence of level of feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. *Aust. J. Agric. Res.* 29, 173–179.
- Oldham, C.M., Gray, S.J., 1984. The “ram effect” will advance puberty in 9–10 month old Merino ewes independent of their season of birth. *Anim. Prod. Aust.* 15, 727.
- Papachristoforou, C., Koumas, A., Photiou, C., 2000. Seasonal effects on puberty and reproductive characteristics of female Chios sheep and Damascus goats born in autumn or in February. *Small Rumin. Res.* 38, 9–15. doi:10.1016/S0921-4488(00)00143-7
- Ponce, J.L., Velázquez, H., Duarte, G., Bedos, M., Hernández, H., Keller, M., Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 2014. Reducing exposure to long days from 75 to 30 days of extra-light treatment does not decrease the capacity of male goats to stimulate ovulatory activity in seasonally anovulatory females. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48, 119–125. doi:10.1016/j.domaniend.2014.03.002
- R Core Team, 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing, in: R Foundation for

Statistical Computing. Vienna, Austria.

- Shelton, M., 1978. Reproduction and Breeding of Goats. *J. Dairy Sci.* 61, 994–1010. doi:10.3168/jds.S0022-0302(78)83680-7
- Ungerfeld, R., 2016. Reproductive response of mature and nulliparous yearling ewes to the ram effect during the non-breeding season. *Small Rumin. Res.* doi:10.1016/j.smallrumres.2016.05.017
- Urrutia-Morales, J., Meza-Herrera, C.A., Escobar-Medina, F.J., Gamez-Vazquez, H.G., Ramirez-Andrade, B.M., Diaz-Gomez, M.O., González-Bulnes, A., 2009. Relative roles of photoperiodic and nutritional cues in modulating ovarian activity in goats. *Reprod. Biol.* 9, 283–294. doi:10.1016/S1642-431X(12)60032-1
- Zarazaga, L.A., Guzmán, J.L., Domínguez, C., Pérez, M.C., Prieto, R., Sánchez, J., 2009. Nutrition level and season of birth do not modify puberty of Payoya goat kids. *Animal* 3, 79–86. doi:10.1017/S1751731108003376

Réalisation d'un effet mâle sur des chevrettes nullipares préalablement exposées ou non à des mâles.

Article 4: No impact of a previous experience with bucks and induced precocious puberty in nulliparous goats on the response to a male-effect.

Chasles Manon¹²³, Chesneau Didier¹²³, Moussu Chantal¹²³, Brachet Morgane¹²³, Delgadillo José Alberto⁴, Chemineau Philippe¹²³ & Keller Matthieu¹²³

³INRA, UMR 85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, Centre de recherche Val-de-Loire, Nouzilly, France

⁴CNRS, UMR 7247, Nouzilly, France

⁵Université François Rabelais de Tours, Tours, France

⁶Centro de Investigación en Reproducción Caprina, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, Mexico

En préparation

Résumé de l'article

Au cours des différentes expériences menées au cours de ma thèse, nous avons mis en évidence que, chez les caprins, l'environnement social est un facteur déterminant dans la transition pubertaire de la jeune femelle. L'exposition précoce à un bouc permet d'induire une puberté précoce. Des travaux menés en 1984 par J J Murtagh, tendent à montrer que, chez le mouton, les femelles chez qui l'ont a induit une accélération pubertaire par une exposition précoce à un mâle, présentent une réponse à un effet mâle supérieure que des femelles naïves du même âge. Par ailleurs, de nombreuses études montrent un effet de l'expérience sexuelle sur la réponse à un effet mâle, que ce soit chez les caprins ou les ovins, les femelles nullipares répondant moins bien que les femelles multipares. Nous avons donc voulu tester si les chevrettes exposées précocement à des mâles actifs et donc présentant une puberté précoce auraient une meilleure réponse ovulatoire que les chevrettes restées isolées ou exposées à des mâles castrés.

Nous avons donc réalisé un effet mâle en utilisant des boucs sexuellement stimulés selon le protocole de traitement photopériodique précédemment validé (Article 1). Les femelles exposées à ces mâles ont toutes montré un excellent niveau de réponse avec plus de 80% de femelles ovulant dans chaque groupe. Par ailleurs, aucune différence que ce soit dans la latence à l'ovulation ou dans le ratio de cycles courts/longs n'a pu être observé. Le comportement des femelles a été observé durant les 6 premiers jours de l'effet mâle et là encore aucune différence n'a pu être décelée. Les femelles montrant des comportements de proceptivité et de réceptivité comparables quel que soit leur niveau d'expérience du mâle.

Nos résultats ne confirment pas les données obtenues chez les ovins puisque la réponse à l'effet mâle des femelles ayant eu une puberté précoce est identique à celle des femelles ayant ovulé plus tardivement. Par ailleurs, aucun effet du niveau d'expérience sexuelle n'a pu être mis en évidence dans cette expérience. Il est possible que les boucs stimulés émettent des signaux si forts et soient si efficaces à induire une reprise de l'activité sexuelle que cela lisse les potentielles différences entre femelles expérimentées ou non.

Abstract:

In small ruminants, the male-effect is commonly used to induce ovulations during the non-breeding season, its efficiency can be modulated by the level of sexual experience of females. In both sheep and goats, nulliparous females have a lower response than in multiparous females. A study carried on sheep described that nulliparous females precociously exposed to males had an advance of their first ovulation but also a better response to a male-effect than same age females that were isolated from bucks. In our study we tested the impact of a precocious puberty on the response to a male-effect in goats and we investigated on the importance of previous experience with male to induce an efficient male-effect when using stimulated bucks. At weaning females were divided in three groups, one group continuously exposed to intact bucks (INT.EXP, n=10), one group continuously exposed to castrated bucks (CAS.EXP, n=9), and one group totally isolated from bucks (NO EXP, n=6). Exposure to intact bucks induced a precocious puberty in all INT.EXP females. No difference in the percentage of ovulatory females was detected as more than 80% of females from each group ovulated according to daily progesterone assays. They all ovulated within 4 days and they show a similar ratio of short/long cycles. Percentage of pregnant female was also the same in the three groups (over 60%) and the prolificacy was similar (around 1.5 kid per goat). The sexual behavior of females was quite similar despite their different level of sexual experience, with a similar occurrence of tail wagging and immobilizations when exposed to sexually active bucks. The only difference was detected in the occurrence of urinations that were significantly higher in INT.EXP than in CAS.EXP ($p<0.01$) and NO EXP ($p<0.05$). Bucks behavior did not significantly differ according to the group of female. Our results indicate that the occurrence of a precocious puberty as well as the level of sexual experience did not modify the female response to a male-effect using sexually active bucks.

Key words: Goats, male-effect, puberty, sexual behavior, sexual experience

INTRODUCTION

Reproductive function is seasonal in sheep and goats and is therefore regulated by photoperiod (Delgadillo et al., 2004; Ortavant et al., 1988; Rosa and Bryant, 2003; Shelton, 1978). In both species, there is an alternation between a breeding season during which females are ovulating regularly, and a period of sexual rest or anestrus. However, the sudden exposure of anestrus ewes or does to males can induce ovulation and the expression of estrous behavior in those females (Delgadillo et al., 2009; Delgadillo and Vélez, 2010; Ponce et al., 2015; Walkden-Brown et al., 1999, 1993a). This phenomenon commonly called the “male-effect” is frequently used to stimulate the sexual activity of females during anestrus.

Female body condition (De Santiago-Miramontes et al., 2008; Véliz et al., 2006), the level of sexual activity of the male (Bedos et al., 2016b; Chasles et al., 2016; Martinez-Alfaro et al., 2014) , and the female sexual experience are factors modulating the physiological and behavioral response to the introduction of the male during the anestrus period. In fact, several studies carried in goats and sheep highlighted that multiparous females had a better estrous and ovulatory response than nulliparous females. For example, a male-effect on Merino ewes resulted in more than 60% of ovulation in multiparous females but less than 40% of ovulation in nulliparous females (Chanvallon et al., 2010; Murtagh et al., 1984). This lower responsiveness is also observed on Merino ewes: only 67% of nulliparous ewes ovulate in response to a male-effect while 87% of multiparous ewes do so (Ungerfeld, 2016). In goats, the percentage of responsive females according to their parity seems even more important, with more than 90% of multiparous goats and less than 20% of nulliparous showing an ovulatory or estrous response (Mellado et al., 2000; Walkden-Brown et al., 1993b). However, another study carried in goats shown that both nulliparous and multiparous females can have a complete (100%) ovulatory response when exposed to bucks rendered sexually active by photoperiodic treatments (Luna-Orozco et al., 2008). In this study, sexually inexperienced females were those that never gave birth, but this does not presume of the absence of any sexual experience with bucks. In fact, nulliparous females in this study had previous visual, olfactory and auditory contact with bucks for one year (Luna-Orozco et al., 2008).

Puberty can be advanced in does or ewes exposed to sexually active males (Abecia et al., 2016; Amoah and Bryant, 1984; Chasles et al., in prep.; Kenyon et al., 2012; Oldham and Gray, 1984). Indeed, in these females, exposure to males advanced the first ovulation, the expression of estrous behavior, and the acceleration of the genital tract maturation (Chasles et al., in prep.). These effects is only observed if females are exposed to sexually active males, but

not to castrated or sexually inactive ones male (Abecia et al., 2016; Chasles et al., in prep.). To our knowledge, only one study explored the possible impact of a precocious puberty through male exposure, and therefore of precocious sexual experience, on the future response of females to a “male-effect”. This study carried on Merino sheep highlighted that pre-pubertal females previously exposed to rams, therefore showing an early occurrence of puberty, had a better ovulatory response than females without both accelerated puberty onset and sexual experience (Murtagh et al., 1984).

Therefore, the first aim of our study was to test if young goats that had a precocious puberty due to early exposure to bucks, may also have a better response to the “male-effect” than females not being exposed to males. In addition, we also evaluated the importance of the nature of this previous experience with bucks. Hence we performed a male-effect on nulliparous goats that had different levels of sexual experience. A group of females was naive as they remain isolated from bucks (NO EXP); a second group was exposed to intact bucks showing strong sexual activity during the sexual season (INT.EXP), and a third group was exposed to castrated bucks (CAS.EXP). We compared the level of response of those females when exposed to sexually active bucks during the non-breeding season according to their previous experience with bucks. We hypothesized that females with a precocious puberty will have a better response than naive females. It would be characterized by a higher percentage of ovulatory females, a decrease latency to the first ovulation and an increased fertility. Those females are also supposed to be more proceptive and receptive than females with no previous experience with bucks. We also hypothesized that the response of CAS.EXP females to the male-effect could be intermediate between INT.EXP and NO EXP responses as those females were exposed to sexually inactive bucks for several months but did not exhibit a precocious puberty.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were carried out from March 2015 to June 2016 in Nouzilly, France (latitude 47° 32N and longitude 0° 46E) in alpine goats (*Capra hircus*). For this study, a total of 31 animals were used, 25 females and 6 adult males. All the bucks used were sexually experienced. Animals were fed daily with barley straw, lucerne hay and commercial concentrate, with free access to water and mineral blocks. All procedures were performed in accordance with the European directive 2010/63/EU on the protection of animals used for

scientific purposes and approved by an ethical committee for animal experimentation (CEEA VdL, Tours, France, n° 2015020215051490).

Previous exposure to bucks and induction of a precocious puberty

Young females were born in spring and divided in three groups at weaning at the age of 2.5 months. One group was of females had no contact with bucks (NO EXP, n=6); a second group was exposed to castrated bucks (CAS.EXP, n=9), and the third group was exposed to intact bucks (INT.EXP, n=10). For CAS.EXP and INT.EXP groups, exposure to bucks was continuous behind a fence until late November and to ensure that females had a great experience of bucks and interacted well, bucks were introduced into the female pen three times a week for one hour. Bucks were fitted with an apron to prevent intromission and conception during direct contact periods. All the young goats from the INT.EXP group exhibited a precocious puberty characterized by an early first ovulation, and an acceleration of the genital tract maturation. None of the CAS.EXP or NO EXP females exhibit the same physiological modifications, and they all reached puberty on average 1.5 months later than INT.EXP (Chasles et al., in prep). Data about puberty acceleration due to buck exposure are not presented here as they were previously published (Chasles et al., in prep).

Hence we obtained females with different amount of socio-sexual experience with bucks: one group with no experience as they remained isolated since weaning (NO EXP), one group with a precocious puberty that was exposed to intact bucks during both the non-breeding and the breeding season (INT.EXP). The third group has an intermediate level of buck experience as they were exposed to castrated bucks, so they have no experience of the buck sexual behavior (CAS.EXP).

Stimulation of bucks

To test if a previous experience of bucks can impact on the females' response to a male-effect, goats from the three groups were exposed to bucks during the non-breeding season from March 29th to May 2nd. As we know that bucks must be sexually active to induce an efficient male-effect under temperate latitudes (Chasles et al., 2016), three bucks were submitted to a photoperiodic treatment of long days (16 hours of light and 8 hours of darkness per day) from November 2nd to January 22nd in a light proof building. The intensity of the artificial light provided was at least 300 lx at the level of the eyes of the animals. From January 23rd to the end

of the study, the light treatment was stopped and the bucks were moved to barns and exposed to natural photoperiodic variations. This light treatment is sufficient to stimulate the male reproductive activity, during the non-breeding season after 45 to 60 days of exposure to natural photoperiod (Chasles et al., 2016; Delgadillo et al., 2014, 2002, 1991). As a control, three intact bucks were exposed to the natural variation of day length throughout the experiment. To evaluate the efficiency of the photoperiodic treatment, the testicular volume was assessed twice a month from November to April following validated methods. The determinations of testicular volume were performed by the same operator to avoid inter-individual variations (Delgadillo et al., 2002; Oldham et al., 1978).

Male-effect

The anovulatory state of goats was verified before the male-effect by the determination of plasma progesterone levels in three blood samples per goat with an interval of a week between samples. From March 29th to May 2nd, anovulatory and nulliparous females were exposed permanently to stimulated bucks, one buck per group. Hence, a buck was used to stimulate seven to ten does in each group. Each morning bucks were switched between the three groups groups to avoid possible inter-individual effects between the bucks. Females were weighted before the male-effect to ensure there was no differences between groups, as the metabolic state can impact reproductive functions and the response to a male-effect in goats (De Santiago-Miramontes et al., 2008; Véliz et al., 2006). No difference in the goat mean weight was detected before introduction of males, with respectively for NO EXP, CAS.EXP and INT.EXP females a mean weight of 43.71 ± 3.21 kg, 46.10 ± 2.66 kg and 44.86 ± 2.82 kg ($p > 0.05$).

Sexual behavior

We recorded the sexual behavior of the males and females each morning the first six days, during the 30 min following the introduction of bucks. Observations were filmed using a SONY Handycam video camera and behaviors were quantified using the Behavioral Observation Research Interactive Software (BORIS) (Friard and Gamba, 2016). For bucks, we reported the occurrence of ano-genital sniffings, lateral approaches and mounts. For females we observed both the proceptivity by recording the number of urinations and tail wagging, and the receptivity by quantifying the number of immobilizations in response to a mount by the buck (Fabre-Nys and Gelez, 2007; Flores et al., 2000). Females were considered in estrous when

they show an increase in their general activity associated with tail wagging, bleating and were actively seeking for interaction with the male (Fabre-Nys and Gelez, 2007).

Detection of ovulation

Ovulations were detected by determination of plasma progesterone levels in daily blood samples obtained by jugular venipuncture from all females in 5 mL tubes containing heparin. Plasma was obtained after 30 min of centrifugation at 3,500 g. Progesterone concentration was determined using an immunoenzymatic assay as described previously (Canépa et al., 2008). All samples were run in a single assay with a sensibility of 0.25 ng/mL and an intra-assay coefficient of variation of 12%.

Females were considered having ovulated when they had at least one sample ≥ 0.5 ng/mL (Delgadillo et al., 2002; Gallego-Calvo et al., 2014). For each does that ovulated, the day of first ovulation and the type of cycle (short or long) were analyzed. The type of cycle was determined according to criteria described previously by Chemineau (Chemineau, 1987): short cycles are characterized by 3 or less consecutive days of progesterone concentration ≥ 0.5 ng/mL, while normal ovarian cycles reach higher concentrations of progesterone, over than 2 ng/mL and last more than five days.

Pregnancy rate and prolificacy

Pregnancy diagnosis was performed by transrectal ultrasonography early June, 2 months after the beginning of the male-effect. The prolificacy, number of kids born per female kidding, was also determined within each group.

Statistical Analysis

Results are reported as mean \pm SEM (standard error of the mean). Bi-monthly measures of testicular volumes were analyzed using a two-way repeated-measures ANOVA, the model included the type of treatment, the time and the interaction between these two factors. Differences at each time point were then detected using post-hoc pairwise comparisons by a t-test. The percentage of females showing estrous behavior, as the percentage of goats ovulating after introduction of males and their type of cycles were analyzed using the Fisher exact probability test. This test was also used to compare the proportion of female pregnant between groups. Female weight, bucks and goats' behavior data, prolificacy and results of ovulation day

were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis test. If significant difference was detected between groups a multiple comparisons post-hoc was then used to identify differences (“nparcomp” package). All analyses were performed using R software (R Core Team, 2014). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Photo-stimulation of bucks

A time ($F_{(12,48)} = 6.89$, $p < 0.001$), a treatment-by-time interaction ($F_{(12,48)} = 3.85$, $p < 0.001$), and a group effect were detected ($F_{(1,4)} = 8.83$, $p < 0.05$). In the untreated group, testicular volumes remain low during all the experiment, while in the treated group, testicular volume started to increase late February and peaked late March. Therefore, testis of treated bucks were greater than untreated ones from late February to mid-April (**Figure 1**).

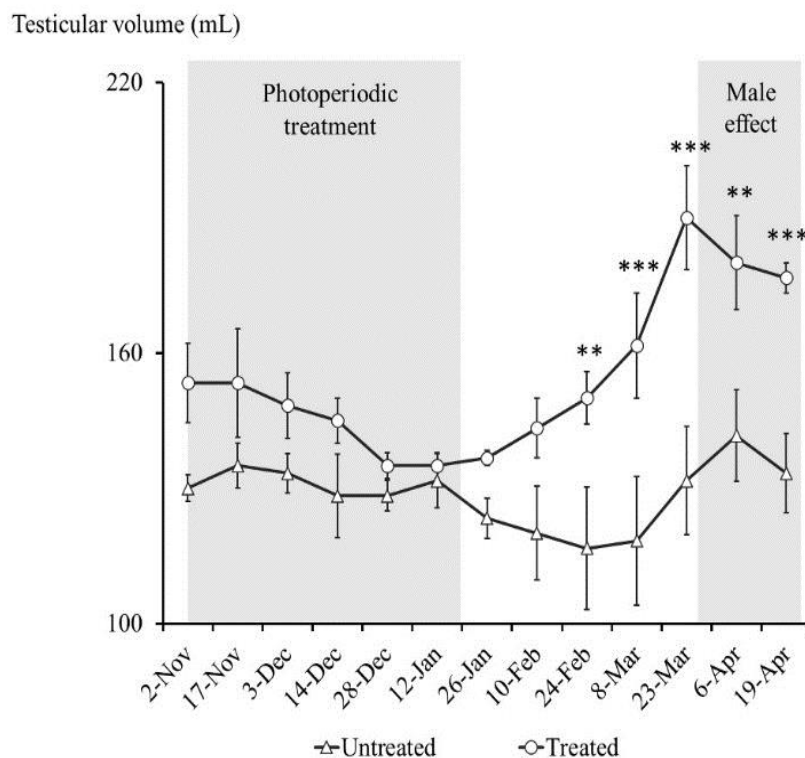


Figure 1. Variation of the testicular volume of bucks treated or not with a photoperiodic treatment of long day (16 h of light per day). Measure of testicular volume were taken twice a month using an orchidometer. Data are shown in mean \pm SEM. Stars indicate significant differences between photo-stimulated bucks ($n=3$) and control bucks ($n=3$) using a two-way repeated-measure ANOVA followed by pairwise t tests for post hoc comparisons (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Response of females to the male-effect

Behavioral response

Bucks behavior did not differ significantly when exposed to females with different levels of sexual experience (**Figure 2A**). The proportion of goats showing an estrous behavior on the first 6 days following buck introduction did not differ according to the previous exposure to bucks (67%, 55% and 60% for NO EXP, CAS.EXP and INT.EXP groups respectively; $p>0.05$). Regarding proceptive behavior of females, no difference was detected between groups for tail wagging ($p>0.05$). In contrast, the number of urinations per goat differed between groups ($p<0.1$, **Figure 2B**), and INT.EXP females urinated more frequently than CAS.EXP females ($p<0.01$) and NO EXP ($p<0.05$). No significant difference was observed between the three groups of goats for the occurrence of immobilizations ($p>0.05$, **Figure 2B**).

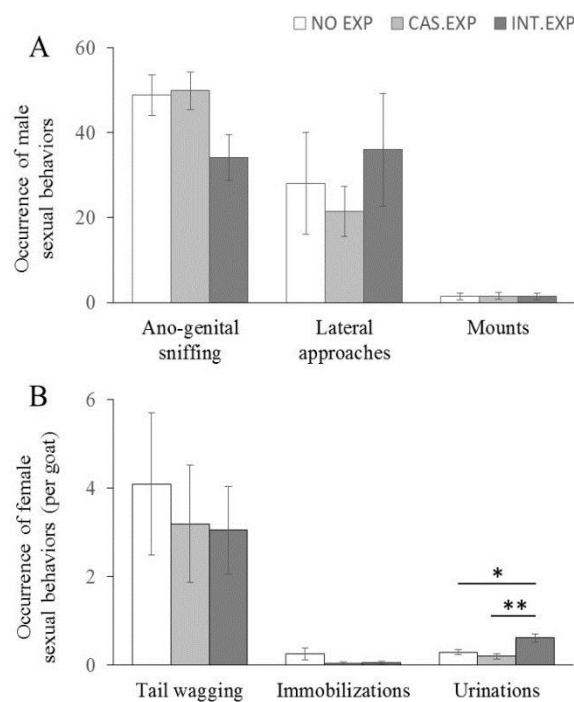


Figure 2. Occurrence of sexual behaviors of bucks (**A**) and goats (**B**) according to the level of sexual experience of females. Behaviors were observed for 30 min the first 6 days after the bucks were introduced in the different groups of females, naive females (NO EXP), females previously exposed to castrated bucks (CAS.EXP) or to intact bucks (INT.EXP). Data are shown in mean \pm SEM, for females data are expressed as a mean number of behavior per goat. Stars indicate significant differences between female groups when compared using a Kruskal-Wallis test followed by a multiple comparison post-hoc test (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

Ovulatory response

The proportions of ovulating does was similar between NO EXP (83%), CAS.EXP (100%), and INT.EXP (100%) groups ($p>0.05$; **Table 1**). The mean latency to ovulation (defined as the first day of progesterone $> 0.5\text{ng/ml}$) was also similar between groups: NO EXP: 4.2 ± 0.2 days, CAS.EXP: 4.3 ± 0.2 days, and INT.EXP: 4.8 ± 0.4 days ($p>0.05$; **Figure 3**). The ratio of short/long cycles did not differ between the three groups of goats ($p>0.05$; **Table 1**). All females that exhibited a short cycle at first ovulation presented a normal cycle at the second ovulation (**Figure 3**).

Table 1. *Ovulatory responses of anestrus goats exposed to photo-stimulated bucks. Females were considered to have ovulated if progesterone concentration $\geq 0.5\text{ng/mL}$ for at least one sample.*

Groups	Ovulatory females	Short cycles	Long cycles
NO EXP (n=6)	5/6 (83%)	4/6 (67%)	1/6 (17%)
CAS. EXP (n=9)	9/9 (100%)	7/9 (78%)	2/9 (22%)
INT.EXP (n=10)	10/10 (100%)	8/10 (80%)	2/10 (20%)

Data were analyzed using the Fisher exact probability test.

The proportion of females being pregnant one month after the buck introduction did not differ according to their degree of previous experience with bucks. Indeed, 4 out of 6 NO EXP females, 8 out of 9 CAS.EXP and 6 out of 10 INT.EXP females were diagnosed pregnant ($p>0.05$). No significant difference in the prolificacy of females was detected with a mean number of kid per goat kidding of 1.5 ± 0.29 , 1.5 ± 0.19 and 1.8 ± 0.2 ($p>0.05$) respectively for NO EXP, CAS.EXP and INT.EXP females.

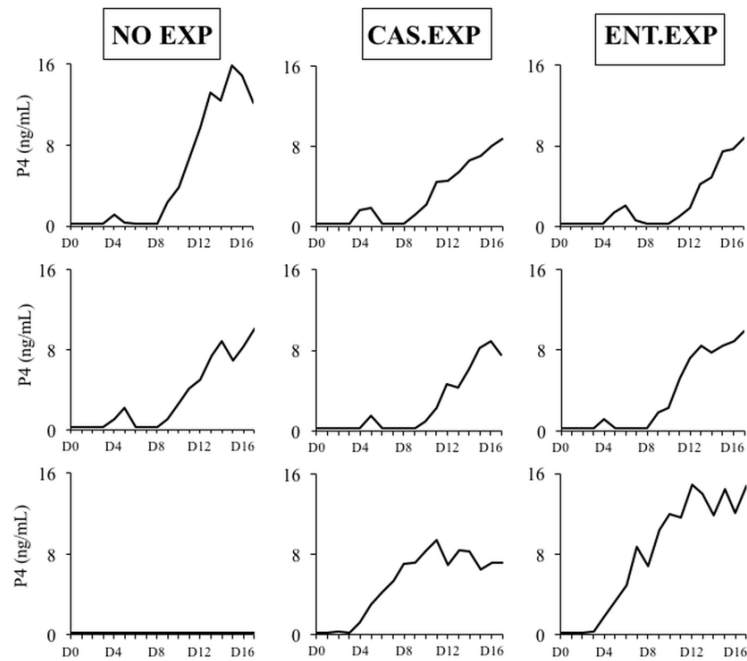


Figure 3. Representative pattern of the ovulatory response to a male-effect of females with or without previous experience with bucks. Blood samples for progesterone were taken daily from all females. Females were considered to have ovulate if they had at least one progesterone sample over 0.5ng/mL.

DISCUSSION

The results of the present study indicate that the previous experience with a sexually active buck, which induces a precocious puberty in goats, did not modify their future response to a male-effect. Indeed, following buck introduction, no difference in the proportion of ovulatory goats has been observed according to their previous exposure to bucks. Females that were isolated from bucks since weaning had an ovulatory response as good as females that were permanently exposed to sexually active bucks. Moreover, at least 80% of goats ovulated, a percentage that is similar to results we obtained using the same method in multiparous goats (Chasles et al., 2016).

However, those results are in contrast with most of studies carried in goats and sheep that compared the response between multiparous and nulliparous females in a male-effect. Indeed most of these studies highlighted a better response in multiparous females (Chanvallon et al., 2010; Ungerfeld, 2016; Walkden-Brown et al., 1993b). Our results are also different to results published by Murtagh (Murtagh et al., 1984) where a better ovulatory response was observed for nulliparous merino ewes that had a precocious puberty and a previous experience

with ram than for inexperienced nulliparous ewes. One reason explaining these differences could be the use, in our study, of sexually active bucks. These bucks, in which sexual activity has been stimulated by photoperiodic treatment, are known to exhibit a strong sexual behavior even during the non-breeding season; their behavior is in fact as intense as during the natural breeding season (Bedos et al., 2016a). It is now well established that the efficiency of a “male-effect” is closely related to the intensity of the sexual stimulation provided by the buck (Chasles et al., 2016; Delgadillo and Vélez, 2010; Flores et al., 2000; Martinez-Alfaro et al., 2014). Hence, exposure to highly sexually active bucks may have provide an intense stimulation of the female reproductive axis overcoming the lack of sexual experience and physiological immaturity in younger females.

Contrary to what we expected, females that had a precocious puberty and an extensive experience with bucks did not show a better response in term of latency to first ovulation, proportion of long cycles and fertility. Indeed, all females ovulated on average 3 days after buck introduction and no advance was observed for the females with a precocious puberty. The relative proportion of short and long cycle also did not differ according to the previous exposure to male and the associated induction of a precocious puberty. A high percentage of short cycles was observed, over 65% of goats experienced a short-lifespan corpus luteum, but all of them re-ovulated within a week and exhibit at this second ovulation a normal cycle. This phenomenon has been well described in goats and is commonly observed during male-effect experiments (Chemineau et al., 2006). Even if short cycles are frequently linked to silent ovulations (i.e. ovulations with no sign of estrous behavior), most of our females were in heat at their first ovulation. All females that had long cycles and half of the ones that had short cycles were considered in estrous the first three days following buck introduction. Those results disagree with results obtained in goats showing less estrous behavior in inexperienced females in comparison to experienced females (Mellado et al., 2000). Nevertheless, our results are consistent with a previous study using sexually active bucks highlighting that there is no need of previous experience to express sexual behavior in goats (Loya-Carrera et al., 2017). Again the level of stimulation provided by the bucks seems a key element in inducing physiological and behavioral response in naive female goats.

Taken together, our results indicate that inducing a precocious puberty in goats did not improve their ovulatory response to a “male-effect”. We also showed that a previous experience with bucks is not needed for anestrous nulliparous goats to have a physiological and behavioral response following exposure to sexually active bucks. It seems that previous exposure to male

is important in the case of limited stimulation, like exposure to male fleece (Gelez et al., 2004) or male vocalizations (Delgadillo et al., 2012); in such cases, females need to have already encounter the stimulus to be able to respond to them. In the case of continuous and direct exposure to highly active bucks, previous learning of male stimuli is not necessary, this is consistent with results showing that experience of males is not a prerequisite for a physiological response to their stimulation when using sexually active males (Hawken et al., 2008).

REFERENCES

- Abecia JA, Chemineau P, Gómez A, Keller M, Forcada F, Delgadillo JA. Presence of photoperiod-melatonin-induced, sexually-activated rams in spring advances puberty in autumn-born ewe lambs. *Anim Reprod Sci* 2016. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.04.011.
- Amoah EA, Bryant MJ. A note on the effect of contact with male goats on occurrence of puberty in female goat kids. *Anim Prod* 1984;38:141–4. doi:10.1017/S0003356100041477.
- Bedos M, Portillo W, Dubois J-P, Duarte G, Flores JA, Chemineau P, et al. A high level of male sexual activity is necessary for the activation of the medial preoptic area and the arcuate nucleus during the “male effect” in anestrus goats. *Physiol Behav* 2016;165:173–8. doi:10.1016/j.physbeh.2016.07.018
- Bedos M, Muñoz AL, Orihuela A, Delgadillo JA. The sexual behavior of male goats exposed to long days is as intense as during their breeding season. *Appl Anim Behav Sci* 2016;xxx:xxx. doi:10.1016/j.applanim.2016.08.002
- Canépa S, Lainé AL, Bluteau A, 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. *Cah Des Tech l’INRA* 2008;64:19–30.
- Chanvallon A, Blache D, Chadwick A, Esmaili T, Hawken PAR, Martin GB, et al. Sexual experience and temperament affect the response of Merino ewes to the ram effect during the anoestrous season. *Anim Reprod Sci* 2010;119:205–11. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.02.003.
- Chasles M, Chesneau D, Moussu C, Delgadillo JA, Chemineau P, Keller M. Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes. *Anim Reprod Sci* 2016;168:86–91. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.02.030.
- Chasles M, Chesneau D, Moussu C, Poissenot K., Delgadillo JA, Chemineau P, et al. Early exposure to intact bucks is efficient to advance the onset of puberty in young does. In Preparation.
- Chemineau P. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in anovulatory goats - a review. *Livest Prod Sci* 1987;17:135–47. doi:10.1016/0301-6226(87)90059-
- Chemineau P, Pellicer-Rubio M-T, Lassoued N, Khaldi G, Monniaux D. Male-induced short oestrous and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod Nutr Développement* 2006;46:417–29. doi:10.1051/rnd:2006022.
- De Santiago-Miramontes MA, Rivas-Muñoz R, Muñoz-Gutiérrez M, Malpaux B, Scaramuzzi RJ, Delgadillo JA. 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* 2008;105:409–16. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.11.008.
- Delgadillo JA, Cortez ME, Duarte G, Chemineau P, Malpaux B. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reprod Nutr Développement* 2004;44:183–93. doi:10.1051/rnd:2004024.
- Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PAR, Martin GB. The “male effect” in sheep and goats-

- Revisiting the dogmas. *Behav Brain Res* 2009;200:304–14. doi:10.1016/j.bbr.2009.02.004.
- Delgadillo JA, Vélez LI. Stimulation of reproductive activity in anovulatory Alpine goats exposed to bucks treated only with artificially long days. *Animal* 2010;4:2012–6. doi:10.1017/S1751731110001345.
- Delgadillo JA, Flores JA, Duarte G, Vielma J, Hernández H, Bedos M, et al. Out-of-season control of reproduction in subtropical goats without exogenous hormonal treatments. *Small Rumin Res* 2014;121:7–11. doi:10.1016/j.smallrumres.2014.01.011.
- Delgadillo JA, Flores JA, Véliz FG, Hernández HF, Duarte G, Vielma J, et al. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J Anim Sci* 2002;80:2780–6.
- Delgadillo JA, Leboeuf B, Chemineau P. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 1991;36:755–70. doi:10.1016/0093-691X(91)90341-A.
- Delgadillo JA, Vielma J, Hernández H, Flores JA, Duarte G, Fernández IG, et al. Male goat vocalizations stimulate the estrous behavior and LH secretion in anestrous goats that have been previously exposed to bucks. *Horm Behav* 2012;62:525–30. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.08.014.
- Edey TN, Kilgour R, Bremner K. Sexual behaviour and reproductive performance of ewe lambs at and after puberty. *J Agric Sci* 1978;90:83–91. doi:10.1017/S0021859600048619.
- Fabre-Nys C. Le comportement sexuel des caprins : contrôle hormonal et facteurs sociaux. *INRA Prod Anim* 2000;13:11–23.
- Fabre-Nys C, Gelez H. Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Horm Behav* 2007;52:18–25. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.04.001.
- Flores JA, Véliz FG, Pérez-Villanueva JA, Martínez De La Escalera G, Chemineau P, Poindron P, et al. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol Reprod* 2000;62:1409–14. doi:10.1095/biolreprod62.5.1409.
- Friard O, Gamba M. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol Evol* 2016;7:1325–30. doi:10.1111/2041-210X.12584.
- Gallego-Calvo L, Gatica MC, Celi I, Guzmán JL, Delgadillo JA, Zarazaga LA. No previous isolation of female goats is required for novel males to induce a male effect, especially if direct physical contact is established. *Theriogenology* 2014;82:1310–5. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.08.015.
- Gelez H, Archer E, Chesneau D, Campan R, Fabre-Nys C. Importance of learning in the response of ewes to male odor. *Chem Senses* 2004;29:555–63. doi:10.1093/chemse/bjh054.
- Hawken PAR, Evans ACO, Beard AP. Prior exposure of maiden ewes to rams enhances their behavioural interactions with rams but is not a pre-requisite to their endocrine response to the ram effect. *Anim Reprod Sci* 2008;108:13–21. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.031.
- Kenyon PR, Viñoles C, Morris ST. Effect of teasing by the ram on the onset of puberty in Romney ewe lambs. *New Zeal J Agric Res* 2012;55:37–41. doi:10.1080/00288233.2012.693105.
- Loya-Carrera JA, Ramírez S, Terrazas A, Hernández H, Vielma J, Duarte G, et al. Sexually inexperienced anestrous goats are able to exhibit sexual behaviours exposed to sexually active bucks. *J Anim Behav Biometeorol* 2017;5:64–71.
- Luna-Orozco JR, Fernández IG, Gelez H, Delgadillo JA. Parity of female goats does not influence their estrous and ovulatory responses to the male effect. *Anim Reprod Sci* 2008;106:352–60. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.05.011
- Martinez-Alfaro JC, Hernández H, Flores JA, Duarte G, Fitz-Rodríguez G, Fernández IG, et al. Importance of intense male sexual behavior for inducing the preovulatory LH surge and ovulation in seasonally anovulatory female goats. *Theriogenology* 2014;82:1028–35. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.07.024.

- Mellado M, Olivas R, Ruiz F. Effect of buck stimulus on mature and pre-pubertal norgestomet-treated goats. *Small Rumin Res* 2000;36:269–74. doi:10.1016/S0921-4488(99)00122-4.
- Murtagh JJ, Gray SJ, Lindsay DR, Oldham CM. The influence of the “ram effect” in 10-11 month-old Merino ewes on their subsequent performance when introduced to rams again at 15 months of age. *Anim Prod Aust* 1984;15:490–3.
- Oldham CM, Gray SJ. The “ram effect” will advance puberty in 9–10 month old Merino ewes independent of their season of birth. *Anim Prod Aust* 1984;15:727.
- Oldham CM, Gherardi PB, Lindsay DR, Mackintosh JB, Adams NR. The influence of level of feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. *Aust J Agric Res* 1978;29:173–9.
- Ortavant R, Bocquier F, Pelletier J, Ravault JP, Thimonier J, Volland-Nail P. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Aust J Biol Sci* 1988;41:69–85.
- Ponce JL, Hernández H, Flores JA, Keller M, Chemineau P, Delgadillo JA. One day of contact with photostimulated bucks is sufficient to induce ovulation in seasonally anestrous goats. *Theriogenology* 2015;84:880–6. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.05.019.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Found. Stat. Comput., vol. 1, Vienna, Austria: 2014.
- Rosa HJD, Bryant MJ. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin Res* 2003;48:155–71. doi:10.1016/S0921-4488(03)00038-5.
- Shelton M. Reproduction and Breeding of Goats. *J Dairy Sci* 1978;61:994–1010. doi:10.3168/jds.S0022-0302(78)83680-7.
- Ungerfeld R. Reproductive response of mature and nulliparous yearling ewes to the ram effect during the non-breeding season. *Small Rumin Res* 2016. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.05.017.
- Véliz FG, Poindron P, Malpoux B, Alberto Delgadillo J, Delgadillo JA. Positive correlation between the body weight of anestrous goats and their response to the male effect with sexually active bucks. *Reprod Nutr Dev* 2006;46:657–61. doi:10.1051/rnd:2006039.
- Walkden-Brown SW, Restall BJ, Henniawati. The male effect in the Australian cashmere goat. 1. Ovarian and behavioural response of seasonally anovulatory does following the introduction of bucks. *Anim Reprod Sci* 1993;32:41–53. doi:10.1016/0378-4320(93)90056-W.
- Walkden-Brown SW, Martin GB, Restall BJ. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J Reprod Fertil* 1999;52:243–57.
- Walkden-Brown SW, Restall BJ, Henniawati. The male effect in the Australian cashmere goat. 2. Role of olfactory cues from the male. *Anim Reprod Sci* 1993;32:55–67. doi:10.1016/0378-4320(93)90057-X.
- .
- .
- .

Chapitre IV : Discussion

Au cours de cette thèse, nous avons étudié les conséquences d'une exposition précoce à un bouc sur la fonction de reproduction de la chevrette. Dans l'espèce caprine, l'importance de l'environnement social sur la fonction de reproduction de la femelle mature avait été bien caractérisée dans le cadre de l'effet mâle. Nos résultats apportent désormais des données concrètes sur l'importance de cet environnement social sur la régulation de la puberté de la jeune chevrette. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la présence d'un bouc dès le sevrage permettait d'induire une accélération de la maturation sexuelle chez la femelle, caractérisée par une avance de la première ovulation et une maturation précoce du tractus génital. Nos travaux ont également permis de déterminer que, comme observé chez les rongeurs (Lombardi et al., 1976; Thorpe and DeCatanzaro, 2012; Vandenberg, 1969), cette avance de puberté est dépendante du niveau d'activité sexuelle du mâle stimulateur. En effet, dans les deux expériences que nous avons menées sur des femelles nées en saison, toutes les femelles exposées à des mâles sexuellement actifs ont présenté une puberté plus précoce que les femelles exposées à des mâles castrés ou isolées de tout mâle.

Ainsi nous avons clairement mis en évidence (article 2) que la présence de boucs entiers induisait, chez la chevrette, une réactivation précoce de l'axe hypothalamo-hypophysaire-ovarien. Ces femelles ont montré une augmentation précoce de la sécrétion pulsatile de LH. La fréquence des pulses de LH est doublée dans les jours précédant la première ovulation, passant de 0,4 à 0,8 pulse par heure. Ces résultats sont très similaires à ce que l'on observe durant la transition pubertaire spontanée chez le mouton. Une forte augmentation de la fréquence des pulses est observée déjà une semaine avant la première phase folliculaire de l'animal, la fréquence atteignant, à cette période, 0,8 pulse par heure chez la brebis (Huffman et al., 1987).

Ces femelles exposées aux boucs actifs présentent une première ovulation précoce, si l'âge auxquelles elles ont atteint la puberté varie selon les expériences, dans les 3 expériences de stimulation, nous avons observé une meilleure synchronisation de l'entrée en puberté. En effet dans chacune des expérimentations, un délai maximum de 3 semaines est observé entre la première et la dernière femelle ovulant suite à l'exposition au mâle actif. Par ailleurs, nous ne nous sommes pas contenté d'observer l'âge à la première ovulation mais nous avons également suivi la cyclicité des femelles. Nous avons ainsi observé que toutes les femelles présentant une puberté précoce ont continué de cycler de manière normale et régulière après leur première ovulation induite. La présence des boucs n'a donc pas induit qu'une réactivation transitoire de l'axe gonadotrope mais une réactivation durable dans le temps.

Les conséquences de la présence de mâles actifs ont également été évaluées au niveau du tractus génital femelle. L'analyse morphologique des ovaires (article 2) a conforté nos résultats, montrant qu'au même âge (6 mois), seules les femelles exposées à des mâles actifs présentaient des corps jaunes. Ces résultats ont par ailleurs validé la fiabilité du critère utilisé que nous avons utilisé pour déterminer qu'une femelle avait atteint la puberté. En effet, toutes les femelles considérées comme « pubères » selon l'analyse de leurs niveaux de progestérone présentaient au moins un corps jaune sur leurs ovaires. Aucun corps jaune n'a été observé sur les ovaires des femelles considérées selon ce même critère comme « impubères ».

L'exposition aux mâles actifs a également induit une hausse de 40% du poids de l'utérus. Cet effet de la présence de mâles sur le niveau de maturation du tractus génital avait également été observé chez les rongeurs. Ainsi dans le cadre de l'effet Vandenberg, une hausse du poids de l'utérus a été caractérisée, chez la souris comme chez le campagnol des prés, chez les femelles mises en présence de mâles intacts ou d'urine de mâles intacts (Baddaloo and Clulow, 1981; Lombardi and Vandenberg, 1977; Teague and Bradley, 1978; Thorpe and DeCatanaro, 2012). A notre connaissance, l'effet de la présence de mâle sur la maturation de l'utérus n'avait été mis en évidence que chez les rongeurs. Ainsi, nous avons montré pour la première fois que, dans l'espèce caprine, la présence de mâles n'induit pas seulement une première ovulation précoce mais également une accélération de la maturation du tractus génital femelle.

Une de nos hypothèses était que les femelles exposées précocement à un mâle sexuellement actif exprimeraient un meilleur comportement sexuel avec une hausse des comportements de proceptivité comme de réceptivité. Lors du test de comportement sexuel en saison, nous n'avons pas pu déceler de différences significatives entre le comportement de ces femelles et celui des femelles exposées à des mâles castrés ou isolées des mâles (Article 2). Néanmoins, pour les femelles isolées, on observe une tendance à une diminution de la durée de frétillement de queue et à une latence plus élevée entre le début du test et la première acceptation de la monte. Ces femelles ont, par ailleurs, semblé plus agitées que les autres, cela peut s'expliquer par le fait que ce soit leur premier contact avec un bouc, ces femelles étant restées isolées de tout mâle depuis leur sevrage. Nous avons en effet observé une agitation semblable chez les jeunes chevrettes exposées à des mâles entiers ou castrés lors des premières mises en contact direct avec ces derniers. De plus, pour assurer que les femelles soient dans un état hormonal semblable lors de notre test de comportement sexuel, celles-ci ont préalablement été

synchronisées via la pose d'éponges à progestagènes. Il serait intéressant de réitérer l'expérience avec des femelles en œstrus naturel et en travaillant sur des effectifs plus importants. En effet, nous avons observé une forte variabilité inter-individuelle au sein d'un même groupe, cela a pu masquer une partie des effets en particulier dans le groupe de femelles isolées dont l'effectif n'était que de 7 individus.

Lorsque les boucs sont sexuellement actifs, moins d'un mois de stimulation est nécessaire pour induire une puberté précoce chez la chevrette.

Lors de chacune de nos expérimentations, nous avons pu mettre en évidence que la présence de mâles intacts permettait d'induire une puberté précoce. On observe une forte similarité de l'âge à la puberté pour les femelles nées au printemps et exposées aux mâles entiers dès leur sevrage en juin, avec un âge moyen à la puberté de 177 jours dans la première expérience et de 179 jours dans la seconde, soit environ 6 mois. Néanmoins, on observe une forte disparité avec les femelles nées en automne et exposées aux mâles en novembre. En effet, dans ce cas-ci, les femelles exposées aux mâles entiers ont atteint la puberté beaucoup plus tôt, à l'âge de 3 mois et demi, soit 1 mois après le début de l'exposition aux mâles. Au vu des résultats obtenus précédemment, nous ne nous attendions pas à un tel résultat puisque les chevrettes ovulaient après 3 mois de contact continu avec les mâles.

Une différence majeure entre ces expériences est que, dans ce dernier cas, les mâles étaient sexuellement actifs dès le début de l'exposition puisque les femelles étant nées à l'automne, elles ont eu leurs premiers contacts avec les mâles en novembre. Or dans les premières expériences, si les femelles ont ovulé 3 mois après le début de la stimulation par les mâles, un délai de seulement 3 semaines est observé entre le moment où les boucs ont exprimé leurs premiers comportements sexuels et le moment où l'ensemble des femelles a atteint la puberté. Il semble donc qu'une stimulation de 3 semaines soit suffisante pour induire une puberté précoce chez la chevrette, à condition que les boucs soient sexuellement actifs dès le début de la stimulation. Les deux mois d'exposition à des boucs intacts mais sexuellement inactifs ne semblent donc pas nécessaires au phénomène d'accélération pubertaire. Ces résultats confirment ceux obtenus chez le mouton qui montrent que l'exposition à des béliers sexuellement actifs permet d'induire une accélération de la puberté chez la jeune brebis nées à contre-saison (Abecia et al., 2016). De plus, dans cette étude un délai similaire de 3 semaines est observé entre la première mise en contact avec le mâle et la détection des premières

ovulations chez les femelles. Ce délai de 3 semaines entre le début de la stimulation et l'induction de l'ovulation avait été évoqué dès 1982 par Fitzgerald et Butler. En effet, en voulant décrire les modifications hormonales liées à la transition pubertaire, ils ont remarqué que les agnelles nées lors de la saison de reproduction et exposées précocement au bélier présentaient une avance de puberté (Fitzgerald and Butler, 1982). Toutes ces femelles ayant atteint la puberté dans les 3 semaines suivant l'introduction du mâle.

Nous pouvons donc imaginer que l'utilisation de boucs sexuellement stimulés dès la première mise en contact en juin aurait pu induire chez les jeunes femelles une avance de puberté encore plus importante, comme observée pour les femelles nées à l'automne qui ont atteint la puberté à l'âge de 3 mois et demi. Néanmoins, dans le cas des femelles nées à contre-saison, la stimulation a débuté en novembre, c'est-à-dire pendant la saison de reproduction. Nous ne pouvons pas affirmer que la présence de boucs, bien que sexuellement actifs, permettrait d'induire une puberté précoce chez de jeunes femelles durant la période de repos sexuel. Il est possible que les stimuli du mâle ne puissent pas supplanter la photopériode inhibitrice chez de jeunes femelles immatures et inexpérimentées. Dans le cadre de l'effet mâle, il a longtemps été décrit un effet négatif de l'inexpérience des femelles sur le niveau de réponse aux stimuli du mâle (Mellado et al., 2000; Walkden-Brown et al., 1993b), mais il semblerait que l'utilisation de boucs présentant un haut niveau d'activité sexuelle permette d'obtenir, chez ces femelles naïves, un niveau de réponse comparable à celui de femelles ayant l'expérience du mâle, c'est ce que nous avons mis en évidence dans notre dernière expérience (Article 4).

L'exposition aux boucs actifs n'a pas permis d'éviter la survenue de l'anœstrus saisonnier chez la chevrete.

Des récents travaux ayant montré qu'une exposition continue à des boucs sexuellement actifs permettait d'obtenir des chèvres cyclant en continu sur 2 années consécutives (Delgadillo et al., 2015), nous avons donc voulu tester la possibilité de prévenir la survenue de l'anœstrus saisonnier chez de jeunes chevrettes par la même méthode. Si la présence des boucs actifs a permis de prolonger la période de reproduction des jeunes chevrettes en comparaison de femelles isolées du même âge, ils n'ont pas permis de maintenir la cyclicité tout au long de la saison de repos sexuel. En effet, à partir de fin mars, plus aucune ovulation n'a pu être observé chez les jeunes femelles qu'elles soient en contact ou non avec des mâles (Article 3). Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène. Premièrement, l'étude menée en 2015 a été réalisée au nord du Mexique, les variations photopériodiques sous cette

latitude subtropicale sont moins importantes que celles observées en France. En effet, la durée du jour varie de 10 à 14h sous une latitude subtropicale contre 8 à 16h sous une latitude tempérée. Cette plus grande amplitude de variation pourrait être responsable d'un signal inhibiteur plus fort sur l'axe gonadotrope que la seule présence de mâles actifs ne permettrait pas de supplanter. Une autre différence importante, entre l'expérimentation menée au Mexique et notre expérimentation, est le niveau d'expérience sexuelle des femelles mises en contact avec le mâle. En effet, dans cette étude, les femelles étaient des adultes et multipares alors que nous avons travaillé avec de jeunes femelles nullipares ayant eu une expérience sexuelle moins importante. Le premier contact de ces femelles avec un mâle n'a eu lieu que 5 mois plus tôt. Le niveau d'expérience sexuelle de la femelle pouvant visiblement affecter son niveau de réponse aux stimuli du mâle (Mellado et al., 2000; Walkden-Brown et al., 1993b), il est possible que nos chevrettes ai réponse de manière moins efficace aux signaux du mâle que l'aurait fait des chèvres adultes expérimentées. Par ailleurs, le fond génétique différent entre nos chèvres de race alpine et les chèvres mexicaines utilisées dans cette étude pourrait également être à l'origine d'une sensibilité variable tant vis-à-vis des signaux photopériodiques (Amoah et al., 1996) que des signaux émis par le mâle.

Ainsi, l'effet combiné d'une exposition à un signal photopériodique inhibiteur plus important ainsi que d'un niveau de réponse plus bas du à un manque d'expérience sexuelle pourrait être responsable de l'arrêt de la cyclicité de ces femelles malgré leur stimulation par des mâles sexuellement actifs.

Quelle est la nature du ou des stimuli impliqués dans l'accélération pubertaire chez les caprins ?

Comme expliqué ci-dessus, il semble que le niveau d'activité sexuelle du mâle soit un élément crucial dans l'induction d'une puberté précoce. En effet, dans chacune de nos expériences, les femelles exposées aux mâles castrés ont présenté des résultats extrêmement similaires aux résultats obtenus chez les femelles isolées de tout mâle. La présence de mâles castrés n'a donc aucun effet sur la maturation sexuelle de la jeune femelle. Par ailleurs, nos expérimentations ont montré que la durée de stimulation peut être réduite à 3 semaines si les boucs utilisés présentent un haut niveau d'activité sexuelle dès le premier jour de contact avec les femelles. Les signaux émis par le bouc et induisant chez la femelle une réactivation précoce de son axe gonadotrope sont donc de nature androgéno-dépendante. Il existe deux hypothèses majeures sur la nature des stimuli provenant du bouc et pouvant moduler la fonction de reproduction

femelle : son odeur et/ou son comportement sexuel. Chez les caprins comme les ovins, l'importance de ces deux modalités dans la régulation de la fonction de reproduction femelle a été majoritairement étudiée dans le cadre de l'effet mâle.

Ainsi lors d'un effet mâle, l'introduction d'un bouc sexuellement actif mais préalablement sédaté et donc n'exprimant aucun comportement sexuel ne permet pas d'induire l'ovulation chez les femelles (Martinez-Alfaro et al., 2014). Néanmoins, on observe une hausse de la sécrétion pulsatile de LH suite à l'introduction de ces mâles sédatés ; aucun effet n'est observé suite à l'introduction d'un mâle vigile mais sexuellement inactif (Vielma et al., 2009). Il y a donc un stimulus indépendant du comportement du bouc et qui permet d'induire une augmentation à court terme de la sécrétion pulsatile de LH. Ce stimulus est probablement olfactif, en effet le bouc en période de reproduction présente une odeur très caractéristique qui est totalement absente chez le bouc castré et le bouc entier en repos sexuel. Cette odeur est produite par des glandes cutanées présentes à l'arrière du crâne (Van Lancker et al., 2005). On sait de plus que chez les caprins, l'exposition à du poil de mâle actif permet d'induire une réactivation de l'axe gonadotrope chez des femelles en anœstrus (Claus et al., 1990; Iwata et al., 2000; Murata et al., 2011; Wakabayashi et al., 2013).

Par ailleurs, des travaux réalisés chez le mouton montrent que, lors d'un effet mâle, on observe chez la brebis, une hausse de l'activité cérébrale dans des régions cérébrales liées au traitement des odeurs. On observe ainsi une hausse du marquage c-fos au niveau des bulbes olfactifs principaux comme accessoires, du cortex piriforme et de l'amygdale corticale comme médiane (Gelez and Fabre-Nys, 2006). De plus, des chèvres anosmiques présentent un taux de réponse à l'effet mâle inférieur aux femelles ayant un système olfactif intact (Chemineau et al., 1986a). Chez les caprins, une molécule olfactive présente dans le poil de bouc, le 4-ethyloctanal, peut induire chez la femelle une hausse de l'activité électrique dans la région cérébrale régulant la génération de pulses de GnRH (Murata et al., 2014). Néanmoins, cette étude ayant été menée chez des chèvres ovariectomisées de race Shiba, une race non saisonnée, elle ne permet pas de prédire que cette molécule puisse induire l'ovulation chez de jeunes femelles immature ou même chez des adultes en anœstrus saisonnier.

Dans nos expériences, afin de maximiser la stimulation des femelles par le mâle, nous avons permis un contact direct entre mâles et femelles trois fois par semaine. Les boucs exprimaient lors de ces sessions un fort comportement sexuel. Nous ne pouvons donc pas discriminer dans notre cas de l'importance relative de l'odeur ou du comportement sexuel du mâle pour l'induction d'une puberté précoce. Il serait intéressant de répéter l'expérience en

limitant les interactions possibles entre mâles et femelles, par exemple en maintenant le bouc dans un enclos adjacent à celui des femelles. Les deux enclos seraient séparés par une barrière ajourée permettant aux femelles d'avoir accès aux signaux visuels, olfactifs et auditifs du mâle mais qui limiterait grandement les contacts physiques et ainsi les stimulations somatosensorielles. Un tel dispositif diminue, chez les porcins, de 50% l'effet stimulateur du verrat sur la transition pubertaire de la jeune femelle (Pearce and Paterson, 1992). Si l'exposition indirecte au bouc est suffisante à induire une première ovulation précoce chez la femelle, cela laisserait présumer que le signal stimulateur de mâle serait plutôt de nature olfactive. Il serait dans ce cas intéressant de chercher à déterminer les molécules olfactives présentes chez le mâle sexuellement actif mais absentes chez le mâle inactif. Ces molécules, dont le 4-ethyltoluène, pourraient être de bons candidats pour des essais de stimulation de la puberté par un stimulus olfactif. Nous avons d'ores et déjà commencé à collecter des échantillons de natures diverses (poils, salive, urine,..) chez des boucs entiers comme castrés. Les prélèvements sur les boucs entiers ont été réalisés à la fois lors de la saison de repos sexuel et pendant la période de reproduction. Nous avons également réalisé ces prélèvements sur des boucs sexuellement stimulés. Des analyses par GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse) devraient nous permettre, par comparaison de profils en mâles actifs et inactifs, d'identifier des molécules candidates. Le potentiel effet stimulateur de ces molécules pourra ensuite être testé *in vivo*, par exemple en étudiant dans un premier temps l'effet de l'exposition à ces molécules sur la sécrétion pulsatile de LH et l'induction de l'ovulation chez des femelles matures en œstrus saisonnier. Les molécules permettant de réactiver la fonction de reproduction de ces femelles adultes en repos sexuel pourraient par la suite être testées dans le cadre de l'induction d'une puberté précoce.

Par quel(s) mécanisme(s) les boucs induisent-ils une réactivation précoce de l'axe gonadotrope femelle ?

Nos résultats montrent sans ambiguïté que l'exposition précoce à un bouc sexuellement actif induit une réactivation précoce de l'axe gonadotrope de la femelle prépubère. L'introduction du mâle n'induit pas de réponse immédiate, un délai de 3 semaines semble nécessaire avant que l'on observe une hausse de la sécrétion pulsatile de LH ainsi que les premières ovulations chez les femelles. Le phénomène semble donc différent de celui de l'effet mâle où la réponse aux stimuli du mâle est quasi instantanée avec une augmentation de la

fréquence des pulses de LH dans les 15 minutes et une ovulation induite dans les 36 heures suivant l'introduction du mâle actif (Bedos et al., 2014; Chemineau et al., 1986a; Vielma et al., 2009). Cette cinétique d'action différente peut être expliquée par le niveau de maturité de l'axe reproducteur des femelles. En effet, dans le cas de l'effet mâle, les femelles exposées aux mâles sont sexuellement matures. L'axe gonadotrope de ces femelles est donc mature et, bien que moins actif puisque les femelles sont en anœstrus saisonnier, il est déjà capable de répondre aux stimuli du mâle. Comme décrit dans l'introduction de cette thèse, la transition pubertaire est la conséquence d'une réactivation au niveau central de la sécrétion de GnRH. Or nous avons exposé aux mâles, de jeunes femelles immatures âgées de 2 mois et demi, il est probable que l'axe gonadotrope encore immature de ces femelles ne soit pas encore capable de répondre aux signaux émis par le mâle. En effet, on sait par exemple que chez les jeunes agnelles, l'insertion d'implants à l'œstradiol ne permet pas d'induire de réponse en terme de LH (Foster and Karsch, 1975). La même opération répétée chez l'animal un peu plus âgé permet d'observer un début de réponse LH. Cette réponse s'accroît avec le développement de l'individu jusqu'à atteindre un niveau de réponse comparable à ce que l'on observe chez l'adulte (Foster and Karsch, 1975). Cela montre qu'une véritable maturation a lieu au cours du développement de l'individu. Notre hypothèse est donc que la présence de boucs sexuellement actifs a permis d'induire une accélération de la maturation centrale chez les jeunes chevrettes. Cette maturation précoce serait un processus se déroulant sur environ 3 semaines et elle permettrait, qu'après ce délai, les femelles soient « sensibles » aux signaux émis par le mâle.

Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différences au niveau du degré de maturation centrale du réseau de neurones à GnRH entre nos chevrettes pubères et impubères. Le nombre de contacts synaptiques moyens par neurone à GnRH étant resté constant entre nos différents groupes de femelles (Article 2). On peut expliquer ce résultat négatif par le fait que nous avons compté le nombre total d'appositions via l'utilisation d'un marqueur post-synaptique, la synaptophysine. Or il est possible que la présence du bouc ait induit d'une part une augmentation du nombre de contacts stimulateurs et d'autre part une diminution de contacts inhibiteurs. En effet, des résultats obtenus chez le mouton comme chez la souris et qui montrent une augmentation du nombre d'appositions de neurones à kisspeptine sur des neurones à GnRH chez la femelle pubère (Clarkson et al., 2010; Nestor et al., 2012). Nous avons tenté de réaliser un marquage de la kisspeptine afin de quantifier le nombre de neurones à kisspeptine et de quantifier le nombre d'apposition kisspeptine sur les neurones à GnRH. Malheureusement les immunomarquages pour la kisspeptine se sont avérés inexploitable pour des raisons qui nous

restent encore inconnues. Le marquage de la kisspeptine est pourtant un marquage largement utilisé au sein de notre laboratoire que ce soit sur des modèles murins, ovins ou caprins. Nous avons utilisé un protocole identique à ce qui avait auparavant été validé chez les caprins (Bedos et al., 2016b), nous ne nous attendions donc pas à de telles difficultés. Avec l'aide de chercheurs utilisant ce même marquage, nous avons réalisé de nombreux essais en modifiant la concentration de l'anticorps ou encore en réalisant des traitements préalables de démasquage des sites antigéniques. Aucune de ces stratégies n'a permis d'améliorer la qualité du marquage obtenu.

Des résultats obtenus dans le cadre de l'effet mâle, ont mis en évidence un effet stimulateur de la présence d'un mâle sur les populations neuronales impliquées dans la régulation de la reproduction. Ainsi chez les ovins, la présence d'un mâle induit une augmentation de l'activité des neurones à GnRH au niveau de l'OVLT et de l'APO, des populations impliquées dans la genèse du pulse pré-ovulatoire de LH (Gelez and Fabre-Nys, 2006). Cet effet sur les neurones à GnRH pourrait être direct mais pourrait aussi être la conséquence d'une activation préalable des neurones à kisspeptine. En effet, chez les ovins, l'exposition à un mâle induit une augmentation du marquage c-fos dans les neurones à kisspeptine de l'aire pré-optique médiane comme du noyau arqué, signe d'une hausse de leur activité (De Bond et al., 2013). Chez la chèvre, la majorité des neurones à kisspeptine de l'ARC co-expriment également la neurokinine B et la dynorphine et sont donc des neurones KNDy (Wakabayashi et al., 2010). Comme expliqué dans l'introduction, ces neurones KNDy sont au cœur de l'hypothèse actuelle de modulation du déclenchement pubertaire. Cette hypothèse suppose que ces neurones pourraient voir leurs connexions modifiées sous l'action de facteurs internes comme externes ce qui contrôlerait la stimulation de la sécrétion pulsatile de GnRH à l'initiation de la transition pubertaire (Uenoyama et al., 2014).

Ainsi lors de nos expériences, l'exposition aux signaux, probablement olfactifs, émis par les boucs sexuellement actifs de manière continue et sur plusieurs semaines a pu potentiellement induire une maturation précoce des neurones KNDy. Cela a pu favoriser les connexions excitatrices sur les neurones à GnRH tout en diminuant les connexions inhibitrices. Cela expliquerait par ailleurs pourquoi nous n'avons pas observé de différence sur le nombre de connexions globales sur les neurones à GnRH. L'augmentation des connexions excitatrices induisant une réactivation précoce de la sécrétion de GnRH et par voie de conséquence de l'ensemble de l'axe gonadotrope. Cela menant à terme à l'induction d'une première ovulation précoce. Ceci n'est qu'une hypothèse et de nouvelles expérimentations mériteraient d'être

menées afin de mettre au jour les phénomènes centraux impliqués dans la régulation sociale de la fonction de reproduction.

On sait en effet, que les neurones KNDy sont très interconnectés (Navarro et al., 2009), il est possible qu'au cours de la maturation pubertaire, on observe un accroissement du nombre de connexions réciproques entre les neurones KNDy du noyau arqué. Cela favoriserait la synchronisation de cette population neuronale et donc permettrait une sécrétion coordonnée de kisspeptine, neurokinine B et dynorphine pour une régulation de l'activité de ces neurones. Selon notre hypothèse, on observerait également un accroissement des connexions de type excitatrices de ces neurones sur les neurones à GnRH. Ainsi, avec l'augmentation de la sécrétion de kisspeptine, on observerait une hausse de la sécrétion de GnRH qui en stimulant la production des gonadotropines induirait une augmentation des niveaux d'œstradiol. Cet œstradiol pourrait ensuite, via les ER α , stimuler l'expression de la kisspeptine au niveau de l'aire pré-optique (Clarkson, 2013). Le nombre de neurones exprimant la kisspeptine augmenterait, et la stimulation des neurones à GnRH par la kisspeptine serait plus importante permettant d'atteindre des niveaux suffisants pour induire un premier pic pré-ovulatoire de LH.

On sait que la présence de mâle permet d'induire chez la chèvre mature une activation des neurones à kisspeptine du noyau arqué (De Bond et al., 2013), il est donc envisageable que chez la jeune chevrette immature, l'exposition à un mâle actif puisse avoir des conséquences sur cette même population neuronale. La présence de mâle pourrait stimuler précocement la création de connexions réciproques entre les neurones KNDy induisant, selon la cascade d'évènements décrits ci-dessus, une première ovulation précoce. Il serait donc particulièrement intéressant de comparer le nombre de connexions KNDy-KNDy entre femelles du même âge exposées ou non à des mâles, mais aussi d'étudier l'évolution de ces connexions au cours des 3 semaines d'exposition au mâle actif nécessaires à induire une puberté précoce. Notre hypothèse est que, suite à l'exposition aux mâles, les neurones KNDy vont subir des modifications dans la nature et le nombre de leurs connexions, induisant une hausse de la sécrétion de GnRH. Une étude de la nature des contacts synaptiques, connexion excitatrice ou inhibitrice, serait donc intéressante. Selon les travaux de Clarkson (2009a), cette hausse de la sécrétion de GnRH permettrait, via la stimulation de la sécrétion d'œstradiol, d'induire un accroissement du nombre de neurones exprimant la kisspeptine dans l'APO. Un comptage du nombre de ces neurones chez les femelles contrôles et au cours des 3 semaines d'exposition au mâle pourrait nous permettre de renforcer ou bien d'invalider notre hypothèse. Ces différentes mesures seraient réalisables par immunohistologie sur des animaux abattus à des temps définis

après le début de la stimulation par les mâles. Des femelles isolées des mâles seraient abattues en même temps afin de pouvoir comparer le niveau de maturation des neurones KNDy de femelles stimulées à celui de femelles non stimulées du même âge. L'induction d'une puberté précoce nécessitant un certain temps d'exposition au mâle (3 semaines), l'étude d'animaux après différents temps d'exposition pourrait potentiellement mettre en évidence une maturation progressive du centre générateur de la transition pubertaire et donc de mieux comprendre l'enchaînement des différents événements menant à l'induction d'une première ovulation précoce.

Qu'elles sont les possibles applications agronomiques ?

Nous avons ainsi mis en évidence que l'exposition à un bouc sexuellement actif permet d'induire une puberté précoce chez la jeune chevrette mais également de regrouper l'entrée en puberté des femelles sur quelques semaines seulement. Ces résultats pourraient trouver des applications en élevage, en effet, il y a une demande des éleveurs pour maîtriser la variabilité des résultats de première mise en reproduction. Dans les élevages, les chevrettes sont le plus souvent mises à la reproduction en même temps que les femelles adultes, cela permet de grouper les naissances facilitant ainsi la conduite du troupeau. Or comme nous l'avons-nous même observé dans nos expérimentations, l'âge auquel une chevrette atteindra spontanément la puberté peut être très hétérogène selon les animaux. Ainsi en mettant toutes les femelles en reproduction à une date donnée, il est certain qu'une partie des chevrettes n'auront pas atteint la maturité sexuelle et donc ne pourront donc pas être fécondée par le mâle. De plus, l'institut de l'élevage déconseille fortement la mise en place d'un traitement hormonal sur une chevrette non cyclée. Avec cette nouvelle approche, nous donnons donc de nouveaux moyens permettant de favoriser la mise en reproduction des jeunes femelles en même temps que le reste du troupeau.

Ainsi, dans les élevages pratiquant la reproduction en saison, il suffirait de mettre en place le protocole de stimulation que nous avons utilisé et un mois après que le bouc ait commencé à montrer des signes d'activité sexuelle, une majorité des chevrettes devraient être pubères. Les femelles pourraient ensuite être mise en contact avec un mâle pour une saillie naturelle ou bien être synchronisé via la pose d'éponges à progestagènes avant d'être inséminées artificiellement.

Pour les élevages pratiquant le désaisonnement, notre protocole d'induction de la puberté a deux avantages puisqu'il permet, en plus de limiter la variabilité de l'âge à la puberté,

de contrer le retard de puberté observée chez les chevrettes nées à contre-saison. En effet, les éleveurs ne souhaitent pas que ces femelles ne soient saillies qu'à l'âge de 1 an, cela induit une désynchronisation des mises-bas avec le reste du troupeau et cela prolonge la période dite « improductive » de l'animal. Or le surcoût lié à un retard de mise en reproduction est estimé à 10€ par mois et par animal n'ayant pas mis bas dans sa première année de vie. La mise en place de notre protocole permettrait donc de stimuler l'induction d'une puberté précoce chez ces femelles. Ainsi un mois avant la date prévue de mise en reproduction, les jeunes chevrettes devraient être mise en contact avec des boucs sexuellement actifs afin de stimuler chez celles-ci une maturation sexuelle précoce. Les femelles ainsi stimulées pourraient ensuite être intégrée au troupeau principal pour la mise en reproduction. Le point crucial dans ce cas-ci est d'exposer les jeunes femelles à des boucs sexuellement actifs, selon la date de début de mise en contact, il faudra utiliser des boucs sexuellement stimulés ou non. Dans le cas de ces femelles nées à contre-saison, il est cependant nécessaire de prendre en compte l'âge et le poids des animaux. En effet, bien que nous ayons démontré que l'induction de la puberté est possible dès 3 mois et demi, il n'est pas souhaitable de mettre en reproduction des animaux si jeunes. Une gestation trop précoce pouvant nuire au développement et à la santé de l'animal. Il est préconisé, pour la race Alpine, de ne faire saillir que les femelles pesant au minimum 32Kg. Un suivi du poids des chevrettes est donc nécessaire avant la mise en place du protocole d'induction de la puberté par exposition au mâle.

La découverte de l'importance des interactions sociales dans la régulation de la transition pubertaire chez la chèvre permettra ainsi la mise en place de nouveaux protocoles pour une conduite du troupeau plus efficace. Par ailleurs, les protocoles de stimulation que nous avons utilisés n'ont nécessité l'utilisation d'aucun traitement hormonal, ils sont donc tout à fait utilisable dans le cadre d'une agriculture biologique. De plus, les consommateurs sont aujourd'hui demandeurs d'une agriculture plus responsable et respectueuse de l'environnement comme du bien-être animal. En se passant des traitements hormonaux notre démarche visant à moduler la reproduction par des facteurs sociaux s'inscrit ainsi dans cet objectif.

Chapitre V : Conclusion

Le travail réalisé au cours de ma thèse a donc permis de mettre en évidence l'importance de l'environnement social sur la régulation de la transition pubertaire dans l'espèce caprine. En effet, nous avons pu démontrer que le bouc sexuellement actif émet des stimuli capables d'induire une maturation sexuelle précoce chez la jeune femelle. On observe, chez les femelles exposées à des mâles actifs, une avance de la première ovulation suivie d'une cyclicité régulière et une accélération de la maturation de l'utérus.

La mise en contact avec des boucs entiers permet en effet de réactiver précocement l'axe gonadotrope des jeunes femelles. Pour les chevrettes nées au printemps, l'exposition au mâle a permis d'induire une augmentation précoce de la pulsativité de la LH et une première ovulation avancée d'un mois et demi par rapport aux femelles isolées ou exposées à des mâles castrés. En comparaison de ces femelles, les femelles en contact avec des mâles entiers présentent également un utérus 40% plus lourd dû à un épaissement de l'endomètre et du myomètre. Chez des chevrettes nées à contre-saison nous avons pu contrecarrer le retard de puberté classiquement observé puisqu'en exposant ces femelles à des mâles actifs nous avons pu induire une maturation sexuelle très précoce. Ces femelles ayant ovulé pour la première fois à l'âge de 3 mois et demi au lieu de 1 an.

Nous avons donc décrit, chez la chèvre, un phénomène d'accélération pubertaire semblable à celui connu chez les rongeurs sous le nom d'effet Vandenberg. Comme chez les rongeurs, l'induction d'une puberté précoce nécessite une exposition à un mâle sexuellement actif. Nous avons mis en évidence qu'une exposition de seulement 3 semaines semble nécessaire à l'induction d'une puberté précoce chez la chevrete. Cela suggère que les stimuli émis par le bouc actifs sont très efficaces à induire une maturation précoce du centre générateur des pulses de GnRH.

Ce travail de thèse a donc permis de mieux comprendre l'importance des différents facteurs pouvant moduler la transition pubertaire dans l'espèce caprine et de caractériser les conséquences endocrines d'une exposition précoce à un mâle. Cela ouvre de nombreuses possibilités pour l'utilisation des facteurs sociaux comme une alternative aux traitements hormonaux chez les animaux sexuellement immatures.

Autres articles publiés au cours de la thèse



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Fifteen minutes of daily contact with sexually active male induces ovulation but delays its timing in seasonally anestrous goats



S. Ramírez^a, M. Bedos^b, M. Chasles^c, H. Hernández^a, J.A. Flores^a, J. Vielma^a, G. Duarte^a, M.S. Retana-Márquez^d, M. Keller^c, P. Chemineau^c, J.A. Delgadillo^{a,*}

^aCentro de Investigación en Reproducción Caprina (CIRCA), Programa de Posgrado en Ciencias Agrarias, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Torreón, Coahuila, Mexico

^bInstituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Juriquilla, Querétaro, Mexico

^cPhysiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, CNRS, Université de Tours, IFCE, Agreenium, Nouzilly, France

^dDepartamento Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 May 2016

Received in revised form 8 August 2016

Accepted 9 August 2016

Keywords:

Caprine

Male effect

Duration of contact

Photoperiod

Sexual behavior

ABSTRACT

The present experiment was conducted to determine (1) whether the sexually active bucks are able to stimulate the ovulatory activity of seasonal anestrous goats when the daily contact is reduced to 15 min/day during 15 days and (2) the exact ovulatory activity in anestrous goats exposed to bucks for 2 hours or less per day during 15 days. One group of goats ($n = 15$) was isolated from bucks. The other six groups ($n = 15$ each) were exposed to sexually active bucks ($n = 1$ each) for 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, or 24 hours during 15 days. Goats with plasma concentrations of progesterone greater than 0.5 ng/mL were considered to have ovulated. More than 93% of females exposed to bucks ovulated throughout the experiment regardless of the duration of contact with males, whereas none of them ovulated in the isolated group ($P < 0.0001$). The proportions of females that ovulated at least once did not differ among groups as well as the proportions of goats that displayed normal or short ovulatory cycles. The interval between the introduction of males and the first ovulation did not differ among groups of goats in contact with bucks for 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, or 2 hours. However, in these groups, this ovulation occurred about 2 days later than in females in contact with males during 4 or 24 hours (6.3 vs. 4.4 days; $P < 0.05$). We conclude that 15 minutes of daily contact with sexually active buck is sufficient to stimulate the ovulatory activity in seasonally anestrous goats, but the first ovulation is delayed in goats exposed to males for 2 h/day or less during 15 days in comparison with those in contact with males for 4 or 24 h/day.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The “male effect” is a powerful technique of sexual stimulation where the sudden introduction of a male can induce the sexual activity of female goats and ewes during the seasonal anestrus [1–3]. It is particularly useful in some breeds of goats and ewes originating from temperate or subtropical latitudes that show a reproductive seasonality

* Corresponding author. Tel.: +52 871 729 76 42; fax: +52 871 729 76 50.

E-mail address: joaldesa@yahoo.com (J.A. Delgadillo).

that hinders out-of-season reproduction. In practice, the exposition of female goats and ewes to a male induces and synchronizes the secretion of LH and ovulation [4–6]. Indeed, most goats exposed to males show a preovulatory LH surge, display estrous behavior, and ovulate within the first 5 days of contact with bucks [7,8]. After this first ovulation, females show a short ovulatory cycle and ovulate again between 5 and 8 days later. This second ovulation after introduction of males is usually followed by a normal life span CL [9–11].

The ovulatory response of goats and ewes exposed to males can be influenced by the intensity of sexual behavior. Indeed, bucks rendered sexually active during the nonbreeding season by previous exposure to long days induce most females to ovulate, whereas untreated, sexually inactive ones, failed or induce few females to ovulate [12,13]. Similar results are observed in sheep. Rams displaying a high sexual behavior induce a greater proportion of ewes to ovulate, whereas rams that display a weak sexual behavior lead to a small percentage of females to ovulate [14,15].

Another factor involved in the variation of the ovulatory response of goats and ewes exposed to males is the duration of contact between sexes. In fact, only 18% of ewes ovulate when exposed to rams for 1 day, whereas the proportion of females that ovulate increases to 53% and 61% when exposed to males 24 h/day for 4 and 15 days, respectively [14]. In contrast to ewes, in goats, the duration of daily contact between males and females can be drastically decreased without affecting the ovulatory response. In fact, all goats ovulated at least once when exposed 24 h/day for 1, 5, 10, or 15 days to sexually active bucks [16]. Interestingly, more than 89% of goats ovulated when exposed to sexually active bucks for 1, 2, or 4 h/day during 15 consecutive days, and this percentage did not differ from females in contact with males for 24 h/day (>95%) [17–19]. However, in females exposed to males for 2 or 1 h/day, ovulations tended to be delayed in comparison to those in contact with males for 4 or 24 h/day. In fact, from Days 1 to 4 after introducing the males, only 14% of females exposed to males for 1 h/day ovulated, whereas 50% of those exposed to males for 4 or 24 h/day did so. Nonetheless, at Day 18 after the introduction of the males, the percentages of females that ovulated in response to the male effect did not differ significantly between females in contact with males for 1, 4, and 24 h/day [19].

In this latter study, ovulations were assessed from the pattern of daily plasma progesterone concentrations from Days 1 to 10 and on Day 18 after exposure to males. Considering the low percentage of females that ovulated in the first 4 days of contact with males and the fact that at Day 18 the proportion of females that ovulated did not differ from those remaining in contact with males 24 h/day, the pattern of secretion of plasma progesterone did not allow to determine precisely the ovulatory events in these females (i.e., when the females ovulated and the characteristics of the ovulatory cycles: short or normal ovulatory cycles).

In addition, there are no data indicating whether the sexually active bucks are able to induce ovulations in goats exposed to them for less than 1 hour for 15 consecutive

days. Therefore, considering the arguments described previously, we conducted the current experiment to determine (1) whether the sexually active bucks are able to stimulate the ovulatory activity of seasonal anestrus goats when the daily contact is reduced to 15 min/day during 15 days and (2) the exact ovulatory activity in anestrus goats exposed to bucks for 2 hours or less per day during 15 days. Considering the previous results obtained with the sexually active males, we hypothesized that all durations of contact per day with sexually active bucks induce ovulatory activity of all females but that ovulation timing could be affected by the shorter durations of contact.

2. Materials and methods

2.1. Ethical note

The experimental procedures used in the present study were in accordance with the Official Mexican Rule for the technical specifications for the production, care, and use of laboratory animals [20].

2.2. General conditions of the study

The present study was conducted during the anestrus season using goats (*Capra hircus*) from the Laguna region in the state of Coahuila, Mexico (Latitude 26° 23' N and longitude 104° 47' O). The photoperiod in this region varies from 13 hours 41 minutes of light at the summer solstice to 10 hours 19 minutes of light at the winter solstice. In females isolated from males, the anestrus season lasts from March to August, and in males isolated from females, the sexual rest lasts from January to May [21,22]. All females were multiparous and had given birth between September and November; they were milked manually once a day during the study. Females and males were maintained in shaded open pens and fed with 2 kg of alfalfa hay (18% CP) and 200 g of commercial concentrate feed (14% CP; 1.7 Mcal/kg), with free access to water during the whole experiment.

2.3. Stimulation of the sexual behavior of males by exposure to long days

Six adult male goats were placed in a 10 × 5-m shaded open pen and subjected to a treatment of long days to stimulate their sexual activity during the nonbreeding season [13]. Briefly, males were exposed to artificial long days (16-hour light/8-hour darkness) from November 1, 2014 to January 15, 2015. From January 16, males were exposed to natural variations of photoperiod conditions until the end of the study (April 15). This photoperiodic treatment stimulates the secretion of testosterone from late February to late April and, as a consequence, enhances the intensity of sexual behavior and odor of males during these months corresponding to the nonbreeding season [13,16,23]. On March 23, males were individually exposed for 15 minutes to an anestrus goat, and we recorded the anogenital sniffings, nudgings, and mounting attempts [13,24,25]. All males displayed all the components of sexual behavior.

2.4. Preparation of females

All females were isolated from males from September until the onset of the study. On March 7, 17, and 27, 2015, goats were submitted to a transrectal ultrasonography to determine their ovulatory activity using an Aloka SSD-500 device connected to a transrectal 7.5-MHz linear probe [26]. Females that did not present any CL in the three ultrasonographies were considered anovulatory. None of the females presented CL, so they were all considered in seasonal anovulation.

2.5. Male effect

On March 29, 2015, the anovulatory goats were divided into seven groups ($n = 15$ each) balanced for body condition score (1.7 ± 0.07 each group) [27]. On March 31 (Day 0 of the study), the control group was isolated from males, whereas the other six groups were daily exposed to photostimulated males ($n = 1$ each) for 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, or 24 hours during 15 consecutive days. Males were introduced each day at 8 AM and removed from the females' pens after the end of each period of contact and allocated in another pen until the next day. To avoid an individual effect, males were daily rotated between groups of females. The distance between groups was more than 200 m, to avoid any interference between groups.

2.6. Measurements

The ovulatory activity was determined by plasma progesterone concentrations. To this end, daily blood samples were obtained from each female from Days 1 to 15 and on Day 18 after introduction of males. All 5-mL blood samples were collected by jugular venipuncture in tubes containing 30 μ L of heparin and centrifuged at $\times 3000g$ for 30 minutes. The obtained plasma was stored at -20 °C until progesterone concentrations were determined by the immunoenzymatic assay described by Canepa et al. [28]. Sensitivity was 0.25 ng/mL. The intra-assay and interassay coefficients of variation were 7% and 10%, respectively. Females with progesterone concentrations greater than 0.5 ng/mL were considered to have ovulated [9].

2.7. Definition and statistical analysis

The characteristics of the ovulatory cycles of goats exposed to males were determined using the duration of the luteal phase [10,16]. According to the duration of high plasma concentrations of progesterone (>0.5 ng/mL), we identified two types of luteal phases: short luteal phase (2–3 days), which corresponds to a short life span CL, and long luteal phase (>4 days), which corresponds to a normal life span CL. Thus, we identified three types of ovulatory response: (1) females that displayed a short luteal phase followed by a new ovulation; these goats ovulated twice, and we consider that they displayed a short ovulatory cycle; (2) females that displayed only a short luteal phase which was not followed by any increase in progesterone concentration; these goats ovulated once and then entered

in anovulation; (3) females that displayed a normal luteal phase after the first ovulation; these goats ovulated once, and we consider that they displayed a normal ovulatory cycle. The day of the first ovulation after male introduction was estimated as being the day of the first increase of progesterone above the threshold of 0.5 ng/mL for at least 2 days [16].

The total proportion of females that ovulated during the study, females that displayed short or long luteal phase, and females with short luteal phase but showing no further ovulation were analyzed using the chi-square test. When there was a statistical difference, the comparisons between groups were made using the Fisher exact test. The interval between the introduction of males and the first ovulation was compared between groups using a Kruskal–Wallis test. When there was a statistical difference, the comparisons between groups were made using the Mann–Whitney *U* test. All statistical analyses were performed using the statistical package SYSTAT 13 [29]. Results are expressed as mean \pm standard error of the mean.

3. Results

3.1. Ovulatory activity

More than 93% of females exposed to the sexually active males ovulated throughout the experiment regardless of the duration of contact with males, whereas none of them ovulated in the isolated group ($P < 0.0001$; Table 1). Interestingly, the proportions of females that ovulated at least once did not differ between groups of females that were in contact with males for 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, or 24 h/day (Table 1). In addition, the proportions of goats that displayed a normal or short ovulatory cycle did not differ among groups. Similarly, the proportions of goats that entered in anovulation after their luteal phase of short duration did not differ among groups (Table 1).

In goats isolated from males, plasma concentrations of progesterone remained low throughout the study, indicating anovulation. By contrast, in goats exposed to males, plasma concentrations of progesterone increased at least once over 0.5 ng/mL of plasma during the sampling series, indicating ovulation (Fig. 1). Indeed, in goats that displayed a short ovulatory cycle, concentrations of progesterone increased in two occasions, the first time during Days 4 to 8 and the second one during Days 10 to 14 after the introduction of males (see goat 428). On the contrary, in goats that displayed a normal ovulatory cycle after the first ovulation induced by bucks, concentrations of progesterone increased during one occasion during Days 4 to 12 after introduction of males and remained high until the end of study (see goat 1). Finally, in goats that ovulated once and stopped ovulating thereafter, progesterone increased only during 1 or 2 days, then remained low throughout the study (see goat 64).

A noticeable difference between groups appeared when considering the interval between the introduction of males and the first ovulation ($P < 0.0001$). Indeed, the interval elapsed between the introduction of males and the first ovulation was about 2 days greater in the groups in contact with males for 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, or 2 hours,

Table 1

Characteristics of the ovulatory response of seasonally anestrous goats isolated from bucks or exposed to sexually active males for 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, or 24 h during 15 consecutive days.

Groups	n	Females with ovulations (%)	Interval to the first ovulation (days)	Goats with normal luteal phase (%)	Goats with short luteal phase followed by a new ovulation (%)	Goats with short luteal phase followed by anovulation (%)
Isolated	15	0/15 (0) ^a	—	—	—	—
15 min	15	14/15 (93) ^b	5.7 ± 0.5 ^a	0/14 (0)	13/14 (93)	1/14 (7)
30 min	15	14/15 (93) ^b	6.3 ± 0.5 ^a	2/14 (14)	12/14 (86)	0/14 (0)
1 h	15	14/15 (93) ^b	7.1 ± 0.7 ^a	2/14 (14)	11/14 (79)	1/14 (7)
2 h	15	14/15 (93) ^b	6.2 ± 0.4 ^a	0/14 (0)	14/14 (100)	0/14 (0)
4 h	15	15/15 (100) ^b	4.6 ± 0.2 ^b	3/15 (20)	12/15 (80)	0/15 (0)
24 h	15	15/15 (100) ^b	4.2 ± 0.2 ^b	4/15 (27)	10/15 (66)	1/15 (7)

Males were rendered sexually active by exposure to long days (16 hours of light per day) from November 1 to January 15 followed by natural photoperiodic conditions.

^{a,b}Different superscripts within each column indicate significant difference ($P < 0.05$).

compared with those in contact with males during 4 or 24 hours ($P < 0.01$). However, this interval did not differ between groups of females in contact with males for 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, or 2 hours, or between groups in contact with males for 4 or 24 hours (Table 1).

4. Discussion

Our results show that the photostimulated, and therefore sexually active bucks, were able to stimulate the ovulatory activity of goats during the seasonal anestrous, even when the daily contact between males and females was reduced to 15 min/day during 15 consecutive days. In fact, the proportions of goats that ovulated did not differ among groups exposed to males for 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 4 hours, or 24 hours. In addition, our results show that the interval between the introduction of males and the first ovulation was delayed in females in contact with males for 2 hours or less compared with those in contact with males for 4 or 24 hours. Unambiguously, our findings and those published previously by our team [17,19] clearly show that in goats, a permanent contact between both sexes is not necessary to achieve an efficient reactivation of the ovulatory activity, if sexually active males are used.

In the present study, the proportions of goats that ovulated and the proportions of goats that displayed short or normal ovulatory cycles did not differ among groups, regardless the duration of contact with males. Our data are in agreement with the results reported by Bedos et al. [17,19], where goats remained in contact with males for 1, 2, 4, or 24 h/day during 15 days. Therefore, the main outcome of our study is that 15 daily minutes of contact with sexually active males was enough to induce ovulations in most goats. The latter results strongly suggest that this shortened daily duration of contact with males was enough to reactivate the GnRH-LH secretion and therefore allowing ovulation to occur [8,30].

It is likely that the success of short-duration contact between males and females to reactivate the ovulatory activity is related to the use of sexually active males, and several studies agree with this hypothesis. First, the sexually active bucks induced more females to ovulate than the untreated bucks, which displayed a weak sexual behavior

[26]. Second, the sexually active bucks stimulated and maintained high LH secretion allowing ovulation to occur in most females. On the contrary, the sexually inactive bucks only induced a short-term elevation of LH secretion avoiding ovulation to occur in the females exposed to them [8,31]. In the present study, the bucks were rendered sexually active by exposure to long days to increase their plasma testosterone concentrations, odor, and sexual behavior during the nonbreeding season, when the present study was performed. Therefore, we can conclude that the use of the sexually active males was an important element to reactivate the ovulatory activity of goats even when the daily contact was reduced to 15 daily minutes.

A delay in the first ovulation after introduction of males was observed when the duration of contact between sexes was reduced. Indeed, the interval between the males' introduction and the first ovulation was longer in females in contact with males for 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, or 2 hours, in comparison to the females being in contact with males for 4 or 24 hours. Our findings agree with those reported in goats exposed to males for 2 or 1 hour, in which ovulation was delayed in comparison with those in contact with males for 4 or 24 hours [19]. In our study, the delayed ovulation in goats in contact with males for 2 hours or less strongly suggests that the short duration of contact between both sexes probably provided a weaker stimulation. In the present study, we did not determine LH secretion, but we can speculate that the pattern of secretion of this hormone was similar of that described by Bedos et al. [19]. Indeed, in goats exposed to bucks for 2 h/day during 15 consecutive days, LH secretion increased each day at male introduction and decreased when males were removed; this pattern of LH secretion induced most of female to ovulate. By contrast, in goats exposed to males 24 h/day, LH secretion increased at male introduction and remained elevated until ovulation [19]. Therefore, our findings indicate that a short duration of contact ranging from 15 minutes to 2 hours is sufficient to induce ovulations in seasonal anovulatory goats, but these durations of contact between both sexes probably provided a weaker stimulation of the ovaries by LH secretion, delaying the first ovulation after male introduction.

In the study of Bedos et al. [19], they did not describe the characteristics of the ovulatory response of females

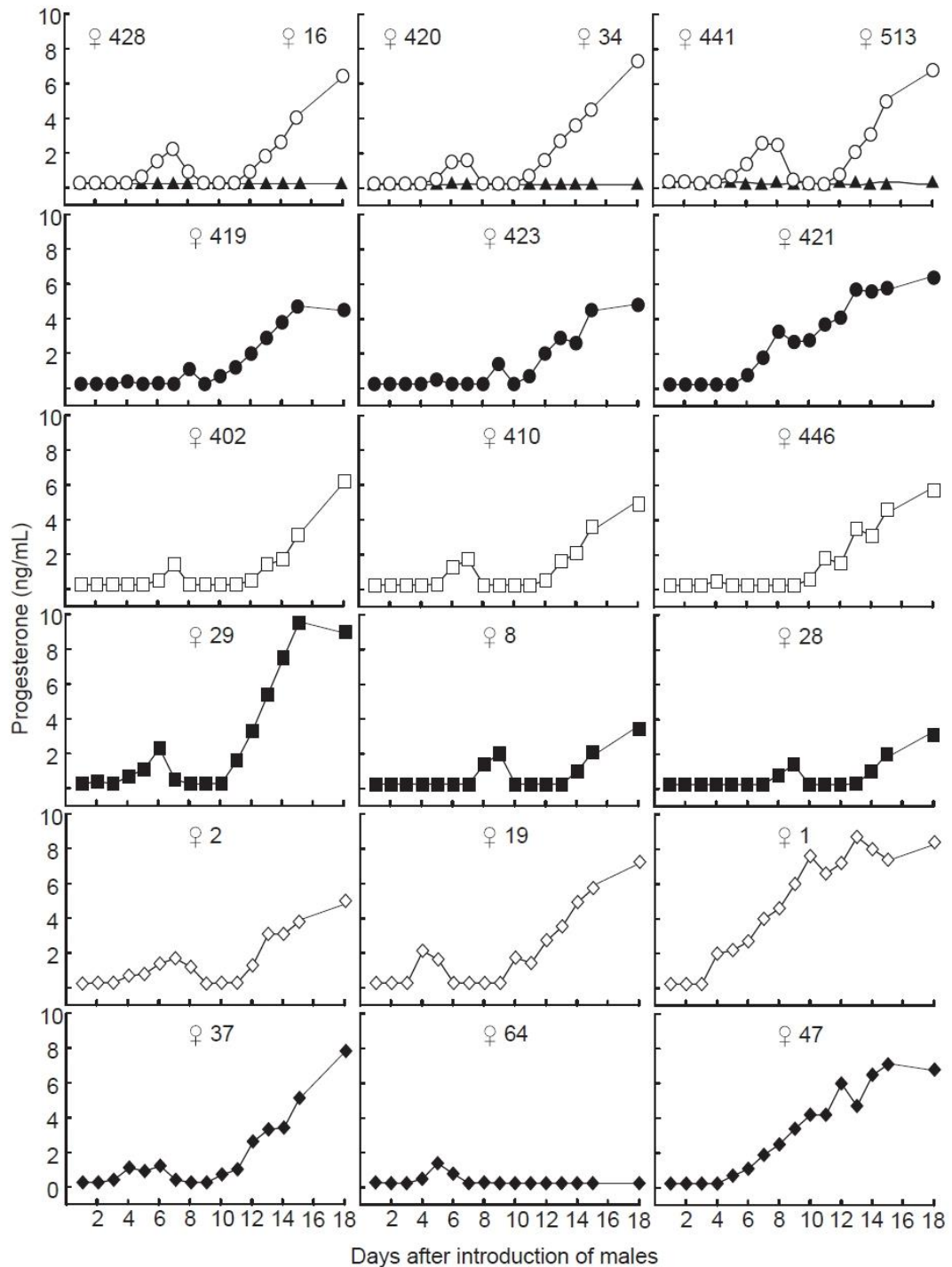


Fig. 1. Individual patterns of plasma progesterone concentrations in goats isolated from bucks (\blacktriangle) or exposed to the sexually active bucks for 15 minutes (\circ), 30 minutes (\bullet), 1 hour (\square), 2 hours (\blacksquare), 4 hours (\blacklozenge), or 24 hours (\blacklozenge) during 15 consecutive days. In goats isolated from males, plasma concentrations of progesterone remained low throughout the study, indicating anovulation (see goat 16). In goats displaying a short ovulatory cycle, concentrations of progesterone increased twice after introduction of males (see goat 428). In goats displaying a normal ovulatory cycle, concentrations of progesterone increased once after introduction of males and then remained high until the end of study (see goat 1). Finally, in goats that ovulated once and entered in anovulation, progesterone increased only 1 to 2 days, then decreased and remained low throughout the study (see goat 64). Bucks were rendered sexually active by exposure to artificial long days (16 hours of light per day) from November 1 to January 15 followed by natural photoperiodic conditions.

exposed to males for 1 or 2 hours during 15 days. In the present study, we were able to describe completely the ovulatory response of goats exposed to males when duration of contact was dramatically reduced. Indeed, a great proportion of goats in which the first ovulation was delayed displayed short ovulatory cycles, and this proportion did not differ from those in contact with males for 4 or 24 hours. In our study, the proportions of goats displaying short ovulatory cycles agree with previous studies that used the photostimulated bucks [26].

The determination of the ovulatory response of goats has important practical applications. In fact, most females that were exposed to males for 2 hours or less displayed a short ovulatory cycle, but the second luteal phase was of normal duration. Therefore, our findings strongly suggest that these goats could become pregnant even when the duration of contact with males is as short as 15 min/day, if males would remain with females for more than 15 days.

Acknowledgments

The authors are grateful to Jesús Esparza for facilitating the females used in the present study. The authors also thank Dolores López and Esther Peña for their secretarial and administrative support. They thank Anne-Lyse Lainé and the members of the hormonal assay platform of Nouzilly, France, for conducting progesterone assay. Sergio Ramírez was supported by a scholarship of the CONACYT during his doctoral studies. This work was funded by grant SEP-ANUIES-PRODEP-CONACYT (Red: "Conducta sexual y reproductiva en caprinos y ovinos"). This research was conducted as part of the CABRAA International Associated Laboratory between Mexico (UAAAN-CIRCA) and France (INRA-PRC).

References

- [1] Underwood EJ, Shier FL, Davenport N. Studies in sheep husbandry in Western Australia. V. The breeding season of Merino crossbred and British breed ewes in the agricultural districts. *J Department Agric West Aust* 1944;11:135–43.
- [2] Shelton M. Influence of the presence of a male goat on the initiation of oestrous cycling and ovulation of Angora does. *J Anim Sci* 1960; 19:368–75.
- [3] Delgadillo JA, Gelez H, Ungerfeld R, Hawken PAR, Martin GB. The "male effect" in sheep and goats—revisiting the dogmas. *Behav Brain Res* 2009;200:304–14.
- [4] Chanvallon A, Sagot L, Pottier E, Debus N, François D, Fassier T, et al. New insights into the influence of breed and time of the year on the response of ewes to the "ram effect". *Animal* 2011;5:1594–604.
- [5] Flores JA, Véliz FG, Pérez-Villanueva JA, Martínez de la Escalera G, Chemineau P, Poindron P, et al. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats. *Biol Reprod* 2000;62:1409–14.
- [6] Pellicier-Rubio MT, Leboeuf B, Bernelas D, Forgent Y, Pougnaud JL, Bonné JL, et al. Highly synchronous and fertile reproductive activity induced by the male effect during deep anoestrus in lactating goats subjected to treatment with artificially long days followed by natural photoperiod. *Anim Reprod Sci* 2007;98:241–58.
- [7] Chemineau P. Effect on oestrus and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *J Reprod Fertil* 1983;67:65–72.
- [8] Martínez-Alfaro JC, Hernández H, Flores JA, Duarte G, Fitz-Rodríguez G, Fernández IG, et al. Importance of intense sexual behavior for inducing the preovulatory LH surge and ovulation in seasonally anovulatory female goats. *Theriogenology* 2014;82:1028–35.
- [9] Chemineau P, Pellicier-Rubio MT, Lassoued N, Khaldi G, Monniaux D. Male-induced short estrous and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod Nutr Dev* 2006;46:417–29.
- [10] Chemineau P. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrus cycles in anovulatory goats—a review. *Livest Prod Sci* 1987; 17:135–47.
- [11] Ott RS, Nelson DR, Hixon JE. Effect of presence of the male on initiation of estrous cycle activity of goats. *Theriogenology* 1980;13:183–90.
- [12] Chasles M, Chesneau D, Moussua C, Delgadillo JA, Chemineau P, Keller M. Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes. *Anim Reprod Sci* 2016;168:86–91.
- [13] Delgadillo JA, Flores JA, Véliz FG, Hernández H, Duarte G, Vielma J, et al. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J Anim Sci* 2002;80:2780–6.
- [14] Signoret JP, Fulkerson WJ, Lindsay DR. Effectiveness of testosterone-treated wethers and ewes as teaser. *Appl Anim Ethol* 1982;9:37–45.
- [15] Perkins A, Fitzgerald JA. The behavioral component of the ram effect: the influence of ram sexual behavior on the induction of estrus in anovulatory ewes. *J Anim Sci* 1994;72:51–5.
- [16] Ponce JL, Hernández H, Flores JA, Keller M, Chemineau P, Delgadillo JA. One day of contact with photostimulated bucks is sufficient to induce ovulation in seasonally anestrus goats. *Theriogenology* 2015;84:880–6.
- [17] Bedos M, Flores JA, Fitz-Rodríguez G, Keller M, Malpoux B, Poindron P, et al. Four hours of daily contact with sexually active males is sufficient to induce fertile ovulation in anestrus goats. *Horm Behav* 2010;58:473–7.
- [18] Bedos M, Velázquez H, Fitz-Rodríguez G, Flores JA, Hernández H, Duarte G, et al. Sexually active bucks are able to stimulate three successive groups of females per day with a 4-hour period of contact. *Physiol Behav* 2012;106:259–63.
- [19] Bedos M, Duarte G, Flores JA, Fitz-Rodríguez G, Hernández H, Vielma J, et al. Two or 24 h of daily contact with sexually active males results in different profiles of LH secretion that both lead to ovulation in anestrus goats. *Domest Anim Endocrinol* 2014;48:93–9.
- [20] Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ciudad de México: D.F. Diario Oficial de la Federación; 2001.
- [21] Delgadillo JA, Canedo GA, Chemineau P, Guillaume D, Malpoux B. Evidence for an annual reproductive rhythm independent of food availability in male creole goats in subtropical northern Mexico. *Theriogenology* 1999;52:727–37.
- [22] Duarte G, Flores JA, Malpoux B, Delgadillo JA. Reproductive seasonality in female goats adapted to a subtropical environment persists independently of food availability. *Domest Anim Endocrinol* 2008;35:362–70.
- [23] Rivas-Muñoz R, Fitz-Rodríguez G, Poindron P, Malpoux B, Delgadillo JA. Stimulation of estrous behavior in grazing female goats by continuous or discontinuous exposure to males. *J Anim Sci* 2007;85:1257–63.
- [24] Muñoz AL, Bedos M, Aroña RM, Flores JA, Hernández H, Moussu C, et al. Efficiency of the male effect with photostimulated bucks does not depend on their familiarity with goats. *Physiol Behav* 2016;158:137–42.
- [25] Ponce JL, Velázquez H, Duarte G, Bedos M, Hernández H, Keller M, et al. Reducing exposure to long day from 75 to 30 days of extra-light treatment does not decrease the capacity of male goats to stimulate ovulatory activity in seasonally anovulatory females. *Domest Anim Endocrinol* 2014;48:119–25.
- [26] Delgadillo JA. Environmental and social cues can be used in combination to develop sustainable breeding techniques for goat reproduction in the subtropics. *Animal* 2011;5:74–81.
- [27] Walkden-Brown SW, Restall BJ, Scaramuzzi RJ, Martin GB, Blackberry MA. Seasonality in male Australian cashmere goats: long term effects of castration and testosterone or oestradiol treatment on changes in LH, FSH and prolactin concentrations, and body growth. *Small Rumin Res* 1997;26:239–52.
- [28] Canépa S, Lainé AL, Bluteau A, Fagu C, Flon C, Monniaux D. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progesterone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cah Techn Inra* 2008;64:19–30.
- [29] Systat 13. San José, CA, USA: Cranes Software International Ltd; 2009.
- [30] Hawken PAR, Martin GB. Sociosexual stimuli and gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone secretion in sheep and goats. *Domest Anim Endocrinol* 2012;43:85–94.
- [31] Vielma J, Chemineau P, Poindron P, Malpoux B, Delgadillo JA. Male sexual behavior contributes to the maintenance of high LH pulsatility in anestrus female goats. *Horm Behav* 2009;56:444–9.



SYMPOSIUM

The Preoptic Area and the RFamide-Related Peptide Neuronal System Gate Seasonal Changes in Chemosensory Processing

Kimberly J. Jennings,^{*} Manon Chasles,[†] Hweyryoung Cho,^{*} Jens Mikkelsen,[†] George Bentley,^{‡,§} Matthieu Keller,[¶] and Lance J. Kriegsfeld^{1,*}

^{*}Department of Psychology, University of California, Berkeley, CA 94720, USA; [†]Department of Neurology and Neurobiology Research Unit, Blegdamsvej 9, DK-2100 Copenhagen, Denmark; [‡]Department of Integrative Biology, University of California, Berkeley, CA 94720, USA; [§]The Helen Wills Neuroscience Institute, University of California, Berkeley, CA 94720, USA; [¶]Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR 0085 INRA, Centre Val-de-Loire, Nouzilly F-37380, France

From the symposium “Evolutionary Impacts of Seasonality” presented at the annual meeting of the Society for Integrative and Comparative Biology, January 4–8, 2017 at New Orleans, Louisiana.

¹E-mail: kriegsfeld@berkeley.edu

Synopsis Males of many species rely on chemosensory information for social communication. In male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), as in many species, female chemosignals potently stimulate sexual behavior and a concurrent, rapid increase in circulating luteinizing hormone (LH) and testosterone (T). However, under winter-like, short-day (SD) photoperiods, when Syrian hamsters are reproductively quiescent, these same female chemosignals fail to elicit behavioral or hormonal responses, even after T replacement. It is currently unknown where in the brain chemosensory processing is gated in a seasonally dependent manner such that reproductive responses are only displayed during the appropriate breeding season. The goal of the present study was to determine where this gating occurred by identifying neural loci that respond differentially to female chemosignals across photoperiods, independent of circulating T concentrations. Adult male Syrian hamsters were housed under either long-day (LD) (reproductively active) or SD (reproductively inactive) photoperiods with half of the SD animals receiving T replacement. Animals were exposed to either female hamster vaginal secretions (FHVSs) diluted in mineral oil or to vehicle, and the activation state of chemosensory processing centers and elements of the neuroendocrine reproductive axis were examined. Components of the chemosensory pathway upstream of hypothalamic centers increased expression of FOS, an indirect marker of neuronal activation, similarly across photoperiods. In contrast, the preoptic area (POA) of the hypothalamus responded to FHVS only in LD animals, consistent with its role in promoting expression of male sexual behavior. Within the neuroendocrine axis, the RF-amide related peptide (RFRP), but not the kisspeptin neuronal system responded to FHVS only in LD animals. Neither response within the POA or the RFRP neuronal system was rescued by T replacement in SD animals, mirroring photoperiodic regulation of reproductive responses. Considering the POA and the RFRP neuronal system promote reproductive behavior and function in male Syrian hamsters, differential activation of these systems represents a potential means by which photoperiod limits expression of reproduction to the appropriate environmental context.

Introduction

Species inhabiting temperate or boreal climates have adapted to survive winter through strict temporal regulation of reproduction, with the most energetically expensive phases of reproduction (e.g., lactation) restricted to times of year when resources are most abundant (i.e., spring). For Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*), reproduction is limited to

long-day (LD) photoperiods of spring and summer and exposure to winter-like, short-day (SD) photoperiods drives reproductive quiescence (Gaston and Menaker 1967). Quiescence can be observed through gonadal regression (Zucker and Morin 1977), but also through alterations in the responsiveness to sexually-relevant chemosensory cues (Morin and Zucker 1978; Anand et al. 2002). The neural

mechanisms by which photoperiod regulates chemosensory processing to limit reproduction to the appropriate season are currently unknown.

Female chemosignals (e.g., pheromones) elicit reproductive responses in males of many species (Nyby 2008; Liberles 2014), but male Syrian hamsters are especially reliant on chemosensory cues for social signaling. In the natural environment, solitary dwelling females scent mark using vaginal secretions to attract males to her burrow on the day of ovulation (Lisk et al. 1983). Female hamster vaginal secretions (FHVSs) are an “attractive” stimulus and exposure promotes expression of male sexual behavior (Murphy 1973; Johnston 1974; Darby et al. 1975). Lesions to either the main or accessory olfactory systems impair male sexual behavior (Murphy and Schneider 1970; Pfeiffer and Johnston 1994). In parallel to its behavior-promoting qualities, exposure to FHVS also stimulates a robust neuroendocrine response in the form of rapid release of luteinizing hormone (LH) and testosterone (T) (Macrides et al. 1974; Richardson et al. 2004).

In contrast to reproductively active males, hamsters housed under SD photoperiods fail to show either behavioral or neuroendocrine responses to these same chemosensory cues (Morin and Zucker 1978; Anand et al. 2002). Differences in responses to female chemosignals are not solely attributable to differences in circulating T. Expression of male sexual behavior is T-dependent (Whalen and Debold 1974; Powers and Bergondy 1983), and hamsters housed under SD photoperiods undergo gonadal regression and have correspondingly low concentrations of circulating T (Sisk and Turek 1983). However, T replacement is much less effective at restoring male sexual behavior in SD hamsters than in LD hamsters (Campbell et al. 1978; Morin and Zucker 1978; Miernicki et al. 1990; Pospichal et al. 1991). Thus, it is likely that photoperiod induces changes in the underlying neural substrates processing chemosignals to limit expression of reproductive responses to the appropriate season. The goal of the present study was to reveal these regulation centers by identifying neural loci that respond to female chemosignals differentially across photoperiods, and whose response in SD hamsters is not rescued by T replacement.

Photoperiod could impact chemosensory processing at any point in the chemosensory pathway, from early sensory processing by the main and accessory olfactory systems through integration by the medial amygdala (Coolen and Wood 1998; Petrulis 2013). Alternatively, early processing may remain consistent across photoperiods, but differences in downstream

hypothalamic target structures may gate behavioral or neuroendocrine output. To test these hypotheses, the present study examined induction of FOS, the protein product of the immediate early gene *fos* and indirect marker of neuronal activation, along the chemosensory pathway from sensory input to hypothalamic targets (Fiber et al. 1993; Petrulis 2013), in response to FHVS.

Considering the robust neuroendocrine component of male responses to female chemosignals, gating of chemosensory processing may also occur within elements of the neuroendocrine reproductive axis. Although chemosignal-induced increases in LH are presumed to be driven by upstream release of gonadotropin releasing hormone (GnRH), neither expression of GnRH mRNA nor rates of GnRH/FOS coexpression are altered by acute conspecific pheromonal stimulation (Gore et al. 2000; Richardson et al. 2004; Taziaux and Bakker 2015). The neuropeptide kisspeptin is expressed within neurons of the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) and arcuate nucleus of the hypothalamus and potently stimulates GnRH release (de Roux et al. 2003; Irwig et al. 2004; Lehman et al. 2013). Whereas the AVPV kisspeptin population projects directly to GnRH cell bodies (Yeo and Herbison 2011), the arcuate kisspeptin cell population acts on GnRH terminals in the mediobasal hypothalamus to facilitate GnRH release without necessitating changes in GnRH cell firing rate (or FOS coexpression) (d’Anglemont de Tassigny et al. 2008). The arcuate kisspeptin system has also been implicated in mediating male chemosignal-induced increases in LH in female goats (De Bond et al. 2013; Jouhannau et al. 2013; Sakamoto et al. 2013). Thus, we also examined these populations of kisspeptin cells as possible loci at which female chemosignals act to increase LH release.

In addition to kisspeptin, the neuropeptide RFamide-related peptide (RFRP; the mammalian ortholog of avian gonadotropin inhibitory hormone [GnIH]) also potently regulates release of GnRH and is sensitive to social context (Kriegsfeld et al. 2006; Calisi et al. 2011; Tobari et al. 2014; Jennings et al. 2016). In male Syrian hamsters, RFRP stimulates release of LH in both LD and SD photoperiods (Ancel et al. 2012), although the stimulatory nature of this effect is sex (Kriegsfeld et al. 2006) and species specific (Ubuka et al. 2012). Interestingly, RFRP may also directly regulate release of LH by the anterior pituitary through projections to the median eminence (Tsutsui et al. 2000; Kriegsfeld et al. 2006; Smith et al. 2012), suggesting an alternative pathway for chemosensory regulation of neuroendocrine

function. Finally, expression of RFRP is also strongly regulated by photoperiod, independent of changes in gonadal steroids (Revel et al. 2008; Mason et al. 2010), pointing to a potential role in integrating social and photoperiodic information to gate chemosensory responses.

Materials and methods

Animals

Adult (56 days of age, $n=37$) male Syrian hamsters (*M. auratus*; LVG (SYR)) obtained from Charles River (Wilmington, MA) were maintained on a 14:10 h light:dark cycle (LD, lights off 22:00 Pacific Standard Time [PST]) upon arrival. After a 10 day acclimation period, 23 hamsters were transferred to a 10:14 h light:dark cycle (SD, lights off 20:00 PST) and 14 remained in the LD photoperiod. Five adult (>60 days of age) female Syrian hamsters were housed under a 14:10 h light:dark cycle to supply FHVS. Hamsters were singly housed at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ in polypropylene cages ($48 \times 25 \times 21$ cm) furnished with Tek-Fresh Lab Animal Bedding (Harlan Teklab, Madison, WI). Tap water and Lab Diet Prolab 5P00 were available *ad libitum*. All procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the University of California at Berkeley and conformed to principles enumerated in the NIH guide for the use and care for laboratory animals.

Twelve weeks after transfer into SD photoperiod, 12 SD animals received subcutaneous Silastic capsules (1.98 mm I.D., 3.18 O.D.; Dow Corning, Midland, MI) containing crystalline testosterone propionate (TP) (20 mm TP bounded by 3 mm silicone sealant at each end, Sigma Aldrich, St Louis, MO) whereas remaining animals ($n=11$ SD, $n=14$ LD) received empty capsules, yielding three groups (LD, SD, SD+T). To implant capsules, hamsters were anesthetized with isoflurane vapors (3%; Clipper Distributing Company, St Joseph, MO) and capsules were inserted through a small midline incision in the nape of the neck. Silastic capsules were primed prior to implantation by submersion in 0.9% saline for 24 h, and yield plasma T concentrations within the physiological range for this species (Campbell et al. 1978). Hamsters received buprenorphine (0.1 mg/kg; Hospira, Lake Forest, IL) subcutaneously for post-operative analgesia.

FHVS exposure

Nine to eleven days after implantation of Silastic capsules, half of the animals in each group ($n=7$ LD, 6 SD, 6 SD+T) were exposed to FHVS whereas

the other half ($n=7$ LD, 5 SD, 6 SD+T) were exposed to vehicle. FHVSs were collected from intact, cycling females on the morning of estrus over the week preceding exposure and stored at -20°C . FHVSs were thawed shortly before exposure, diluted 1:2 with mineral oil, and kept on ice until use. Hamsters were weighed during the light phase approximately 12 h before exposure and assigned to a stimulus groups. Exposure was achieved by applying approximately 20 μL of diluted FHVS or vehicle directly to the snout using a standard laboratory spatula. Separate spatulas were used for FHVS and vehicle, and tools were cleaned with 70% ethanol between animals. All exposures occurred between 1 and 4 h after lights off (i.e., early part of the dark/active phase) under dim red light. Hamsters were then left undisturbed for 1 h before being transferred to another room for perfusion.

Perfusion and immunohistochemistry

Hamsters were deeply anesthetized with sodium pentobarbital solution (200 mg/kg) and perfused transcardially with 100 mL 0.9% saline followed by 300 mL 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.3). Paired testes, epididymis, brown adipose tissue (BAT), and epididymal white adipose tissue (EWAT) were collected and weighed to confirm animals had responded to SD photoperiod with gonadal regression appropriately. Brains were postfixed for 3 h in 4% paraformaldehyde followed by cryoprotection in 30% sucrose in 0.1 M PBS for 48 h. Brains were then frozen at -80°C until processed. A total of 40 μm coronal brain sections were collected on a Leica 2050S cryostat at -20°C . Slices were stored at -20°C in an ethylene glycol and sucrose based antifreeze until immunohistochemistry was performed.

To visualize the expression of FOS as well as the colocalization of FOS with kisspeptin or RFRP, double-label immunofluorescence was performed on separate sets of every fourth 40 μm brain section. Free floating sections were washed in PBS, incubated for 10 min in 0.5% hydrogen peroxide, washed in PBS again, and then blocked for 1 h in 2% normal goat serum suspended in 0.1% Triton X-100 (PBT). Sections were then incubated for 48 h at 4°C in either a rabbit polyclonal anti-GnIH antibody (1:120,000; PAC 123/124, Dr George Bentley) or a rabbit polyclonal anti-kisspeptin antibody (1:2000; Dr Jens Mikkelsen) with 1% normal goat serum in PBT. After incubation in the primary antibody, sections were washed in PBT, incubated for 1 h in biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:250, Vector

Laboratories, Burlingame, CA), 1 h in avidin–biotin–horseradish peroxidase complex (ABC Elite Kit, Vector Laboratories), and 30 min in 0.6% biotinylated tyramide solution, with PBT washes in between each step. After washing with PBS, cells were fluorescently labeled with CY-2 streptavidin conjugate (1:150, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) and washed with PBS again. Next, sections incubated for 48 h at 4 °C with a rabbit anti-FOS primary antibody (1:10,000; sc-52, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) and 1% normal donkey serum in PBT. Sections were then washed with PBT and labeled with the fluorophore CY-3 donkey-anti-rabbit (1:150, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Finally, sections were washed with PBS and counterstained with Hoechst (for Kisspeptin/FOS) or 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (for RFRP/FOS).

Microscopy and quantification

Sections were examined at the conventional light microscopy level using the standard wavelengths for CY-2 (488 nm), CY-3 (568 nm), and DAPI/Hoechst (358 nm) with a Zeiss Z1 microscope (Thornwood, NY). Each label was captured as a single image at $\times 200$ magnification without adjusting the plane of focus between captures and then superimposed digitally. Brain areas were examined by observers blind to the experimental conditions using Image J (NIH) to view the three channels independently or together.

Expression of FOS was manually quantified within the piriform cortex (anterior, median, posterior), septum, ventromedial hypothalamus (VMH), medial amygdala (postero-dorsal, MeApd, and postero-ventral, MeApv), anterior cortical amygdala (ACo), preoptic area (POA), bed nucleus of the stria terminalis (BNST), the accessory olfactory bulb (AOB) (granular and mitral layers), and the main olfactory bulb (MOB) granular layer using sections double labeled for kisspeptin and FOS. Every fourth section through the dorsomedial hypothalamus (DMH) was examined for colocalization of RFRP and FOS, and every fourth section through the AVPV was examined for colocalization of kisspeptin and FOS. Neuroanatomical regions were defined by reference to a published Syrian hamster atlas (Morin and Wood 2001). A cell was considered to be double labeled if FOS was expressed in the nucleus without extending beyond its predetermined borders. Cells without a clearly identifiable nucleus were not included in analysis.

A second population of kisspeptin cells is also found in the arcuate nucleus, but cell bodies are

not able to be visualized without pretreatment with colchicine to reduce fiber density. As a result, arcuate kisspeptin/FOS coexpression was not examined in this study. Instead, kisspeptin-immunoreactive (-ir) fiber density was quantified using a previously published approach (Losa et al. 2011). Briefly, images of kisspeptin-ir fibers were taken at $\times 400$ magnification from one section each corresponding to the anterior, median, and posterior arcuate nucleus. Images were then binarized and depixelated to minimize background, and fibers were skeletonized to a thickness of 1 pixel to control for variation in fiber thickness and brightness. The resulting pixels were quantified using the Image J Voxel Counter plug-in (NIH) and are reported as mean volume, or the proportion of voxels identified to contain kisspeptin-ir fibers.

Statistics

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). FOS colocalization data were arcsine transformed prior to analysis to meet assumptions of normality. Data (regional FOS expression; RFRP and kisspeptin cell counts; and FOS co-localization) were analyzed using two-way analyses of variance (ANOVAs) for each variable with stimulus (FHVS or vehicle) and photoperiod (LD, SD, or SD+T) as factors. If the ANOVA revealed a main effect of photoperiod, Tukey's tests were used to probe group differences. If the ANOVA revealed a significant interaction effect, planned comparisons using Fisher's LSD test were performed to examine the effect of FHVS compared with vehicle within each photoperiodic group. All results were considered statistically significant if $P < 0.05$.

Results

Confirmation of responsiveness to photoperiod exposure

As expected, animals exposed to SD photoperiods experienced gonadal regression and presented with smaller reproductive tissues than their LD counterparts. Body and tissue weights on the day of chemosensory exposure are listed in Table 1. Two-way ANOVAs revealed main effects of photoperiod for paired testes ($F_{(2, 29)} = 29.80$, $P < 0.001$), paired epididymis ($F_{(2, 29)} = 19.68$, $P < 0.001$), and EWAT ($F_{(2, 29)} = 6.45$, $P < 0.01$) weights. In all cases, both SD and SD+T animals have lower tissue weights than LD animals (Tukey's test; LD versus SD and LD versus SD+T $P < 0.05$, SD versus SD+T $P > 0.05$). There were no effects of photoperiod on body mass or BAT weights ($P > 0.05$ in both cases).

Table 1 Body and tissue weights on day of chemosensory exposure

Tissue weight (g)	LD						SD						SD+T					
	Vehicle			FHVS			Vehicle			FHVS			Vehicle			FHVS		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n
Body weight	194.1	8.5	7	197	7.5	7	186.6	9.9	5	164.9	12.8	6	191.3	5.2	6	176.5	15.6	6
Paired testes*	3.1	0.3	7	2.3	0.4	7	0.5	0.1	5	0.4	0.0	6	1.1	0.5	5	0.7	0.2	5
Paired epididymis*	1.2	0.1	7	1.0	0.2	7	0.4	0.1	5	0.3	0.0	6	0.6	0.2	5	0.4	0.1	5
BAT	0.5	0.0	7	0.5	0.1	7	0.5	0.0	5	0.4	0.0	6	0.4	0.0	5	0.5	0.1	5
EWAT*	5.9	0.7	7	5.7	0.5	7	4.1	0.7	5	3.2	0.7	6	4.1	0.5	5	4.2	0.9	5

*Denotes main effect of photoperiod $P < 0.05$.

There were no effects of stimulus or interactions between stimulus and photoperiod for any somatic weights ($P > 0.05$ in all cases).

FOS induction along the chemosensory pathway

Regional expression of FOS, an indirect protein marker of recent neuronal activation, in only two regions, the granular layer of the AOB and the POA, revealed a statistically significant interaction effect (AOB granular layer $F_{(2, 23)} = 6.43$, $P < 0.01$; POA $F_{(2, 30)} = 3.52$, $P = 0.04$) (Table 2). Planned comparisons revealed that FHVS exposure increased the number of FOS-ir cells in this region only within LD animals ($P = 0.04$), whereas no difference between FHVS and vehicle groups was detected within SD or SD+T animals ($P > 0.05$) (Fig. 1). In contrast, no differences between vehicle and FHVS were found within LD and SD groups for the AOB granular layer ($P > 0.05$), but FHVS exposure increased FOS expression in this region within the SD+T cohort ($P < 0.01$) (Table 2). For all other regions along the chemosensory pathway, the magnitude of FOS induction following FHVS exposure was grossly similar across photoperiods. ANOVAs revealed either a main effect of stimulus (ACo $F_{(1, 27)} = 9.756$, $P < 0.01$; MeApd $F_{(1, 27)} = 7.227$, $P = 0.01$; MeApv $F_{(1, 26)} = 10.47$, $p < 0.01$; VMH $F_{(1, 30)} = 5.201$, $p = 0.03$) or no effects on the number of FOS-ir cells. In no cases was a main effect of photoperiod discovered ($P > 0.05$ in all cases).

Responses within the reproductive axis

Total cell number and the proportion of cells colocalizing FOS was quantified for RFRP (within the DMH), and kisspeptin (within the AVPV) immunoreactive (-ir) cells. Additionally, kisspeptin-ir fiber density was quantified at three levels of the arcuate nucleus (anterior, median, and posterior). Of these metrics, an ANOVA revealed a significant interaction between stimulus and photoperiod only for the total

number of RFRP-ir cells ($F_{(2, 31)} = 4.790$, $P = 0.02$), with the number of cells reduced following FHVS exposure compared with vehicle exposure only within LD animals (Fisher's LSD $P < 0.001$) but not within either SD or SD+T animals ($P > 0.05$ in both cases) (Fig. 2A). In contrast, the proportion of RFRP-ir cells co-expressing FOS did not vary across groups ($P > 0.05$ for all ANOVA terms) (Fig. 2B).

Photoperiod-driven changes in RFRP immunoreactivity have been reported previously (Mason et al. 2010) and were replicated in the present study. A main effect of photoperiod was found for RFRP-ir cell number ($F_{(2, 31)} = 22.60$, $P < 0.001$), with LD animals overall displaying more RFRP-ir cells than both SD and SD+T animals, with SD+T animals similarly displaying more cells than SD animals (Tukey's test, $P < 0.05$ in each case) (Fig. 2A). Kisspeptin immunoreactivity has also been reported to vary across photoperiods in this species (Clarke and Caraty 2013), but in the present study, effects of both photoperiod and stimulus failed to reach statistical significance (Fig. 3). Only two AVPV kisspeptin-ir cells were found to co-express FOS (one cell each in a LD/FHVS and SD+T/Vehicle animal), so statistical differences in this measure were not analyzed.

Discussion

The present study sought to identify regions or cell types in the brain that restrict expression of reproductive responses to female chemosignals to the appropriate season, identified by their differential responses to FHVS across photoperiods. Analysis of neuronal activation in early chemosensory processing centers indicates that early sensory processing remains consistent across photoperiods, suggesting that photoperiodic regulation of downstream structures is critical for differences seen in reproductive output. Indeed, downstream chemosensory targets of

Table 2 Number of FOS-ir cells in regions of the chemosensory pathway following stimulus exposure

Region	LD						SD						SD+T					
	Vehicle			FHVS			Vehicle			FHVS			Vehicle			FHVS		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n
MOB granular layer	99.9	13.2	6	83.9	16.2	7	62.5	7.8	3	99.4	16.7	5	74.4	7.4	4	97.9	12.2	6
AOB granular layer*	115.1	25.1	5	100.8	12.8	7	132.8	22.8	2	93.0	8.2	5	67.0	16.2	4	150.2**	15.3	6
AOB mitral layer	28.6	5.1	5	29.9	2.3	7	14.5	3.5	2	22.3	3.6	5	21.8	5.2	4	30.9	4.7	6
Pyramiform cortex—anterior	21.3	8.2	7	54.4	25.3	5	27.4	11.4	5	63.5	26.2	6	34.4	12.8	5	43.7	19.5	6
Pyramiform cortex—median	29.4	14.2	7	71.6	24.8	7	33.4	10.7	5	69.3	29.4	6	61.2	28.2	6	29.7	8.8	6
Pyramiform cortex—posterior	22.1	7.0	7	58.6	19.0	7	41.8	13.9	5	62.7	15.4	6	39.8	11.0	5	33.0	12.5	6
ACo***	7.7	3.8	6	16.4	7.5	7	7.6	3.3	5	40.5	12.7	6	20.2	10.6	5	51.5	15.8	4
BNST	15.7	3.6	7	23.9	6.7	7	16.8	8.1	5	25.7	5.6	6	18.0	5.0	6	14.2	4.8	6
MeApd***	6.7	2.6	6	24.3	7.1	7	8.6	2.9	5	25.0	8.9	5	17.0	9.2	5	35.6	13.3	5
MeApv***	4.5	1.2	6	17.3	5.1	6	15.0	5.9	5	37.2	10.8	6	7.8	3.0	4	22.4	3.3	5
POA*	25.6	4.8	7	55.3**	17.5	7	24.0	7.2	5	37.2	3.7	5	56.2	8.7	6	33.0	9.0	6
Septum	2.6	0.9	7	6.6	3.9	7	2.4	1.7	5	5.2	2.2	6	5.7	2.7	6	2.5	0.8	6
VMH***	5.1	2.3	7	6.6	2.6	7	5.2	1.6	5	13.5	3.6	6	3.6	1.0	5	10.2	4.2	6

*Denotes interaction between stimulus and photoperiod $P < 0.05$.

**Denotes $P < 0.05$ compared with vehicle control in the same photoperiodic group.

***Denotes main effect of stimulus $P < 0.05$.

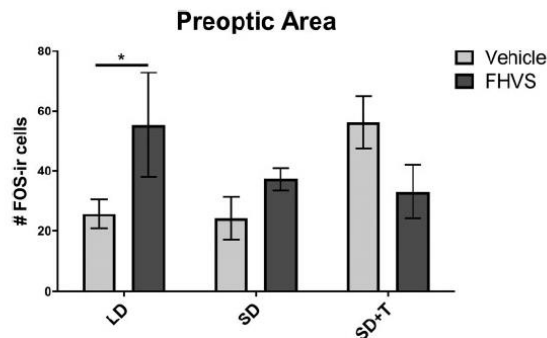


Fig. 1 Mean (\pm SEM) number of FOS-ir cells in the POA. Asterisk (*) denotes $P < 0.05$ comparing vehicle with FHVS exposed animals.

the POA of the hypothalamus and RFRP-ir cells within the DMH both respond to female chemosignals within LD but not SD hamsters. The POA and RFRP neuronal system promote reproductive behavior and function, respectively, in male Syrian hamsters (Hull and Dominguez 2007; Ancel et al. 2012). Importantly, responses within SD hamsters are not rescued by T replacement, mirroring previous reports of the inability of T replacement to rescue male sexual behavior under SD photoperiod (Campbell et al. 1978; Morin and Zucker 1978; Miernicki et al. 1990; Pospichal et al. 1991). Taken together, these data suggest that photoperiod acts on the POA and RFRP neuronal system in a

T-independent manner, contributing to the gating of chemosensory responsiveness in SD photoperiods (Fig. 4).

Despite differences in behavioral and neuroendocrine output in response to FHVS, neuronal activation of early chemosensory processing centers (e.g., MOB, ACo, BNST, MeA), as indirectly measured by FOS expression, does not vary across photoperiods and concentrations of circulating T. The significant interaction between stimulus and photoperiod seen for the AOB granular layer presents a notable exception to this statement. It is unclear why animals of the SD+T group would have a more robust response to FHVS than their SD or LD counterparts. However, it is unlikely this finding has strong biological significance in the present context, given that SD+T animals are similar to SD animals in their behavioral responses to the stimulus (Campbell et al. 1978; Morin and Zucker 1978; Miernicki et al. 1990; Pospichal et al. 1991). Overall, these findings are consistent with previous reports that detection of, and neural responses to, FHVS do not require high circulating T (Fiber and Swann 1996; Swann 1997; Romeo et al. 1998; Peters et al. 2004). However, exposure to SD photoperiod is independently associated with changes in sensitivity to steroid hormones and with morphological changes in many chemosensory processing centers (see Kriegsfeld and Bittman [2009] for review). Thus, it is possible that photoperiod-driven alterations to these structures

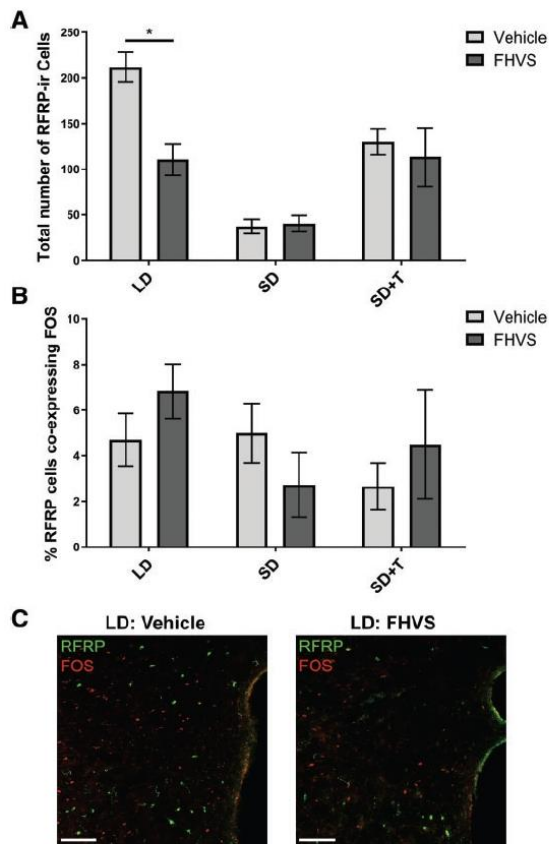


Fig. 2 (A) Mean (\pm SEM) number of RFRP-ir cells in the DMH. (B) Mean (\pm SEM) percentage of RFRP-ir cells co-expressing FOS. (C) Representative photomicrographs depicting RFRP-ir and FOS-ir cells in LD animals exposed to vehicle (left) or FHVS (right). In the online version of the manuscript, RFRP-ir cells are depicted in green and FOS-ir cells in red. Scale bar represents 100 μ m. * denotes $P < 0.05$ comparing vehicle to FHVS exposed animals.

might contribute to differential responsiveness to female chemosignals. Results of the current study suggest that any such photoperiod-driven changes within chemosensory centers do not interfere with neuronal activation by female chemosignals.

The POA is a major target of the chemosensory system and is essential for the expression of male sexual behavior (Coolen and Wood 1998; see Hull and Dominguez [2007] for review). The POA is a critical integration center of chemosensory and hormonal information, with removal of either input type to this region abolishing copulation (Wood and Newman 1995). In the present study, exposure to FHVS increases neuronal activation in this region in LD but not SD animals, consistent with a role in gating reproductive behavior. Induction of FOS after FHVS exposure within the POA has been reported to

require T (Swann 1997). However, our findings indicate that chemosensory activation of this region is not rescued by T replacement in SD animals, further paralleling regulation of behavior across photoperiods (Morin and Zucker 1978). Future research will be necessary to explore the specific mechanisms by which photoperiod regulates POA function to gate responsiveness to female chemosignals.

As mentioned previously, exposure to female chemosignals elicits a rapid increase in LH and T in LD hamsters, presumably to facilitate reproductive behavior and function upon encountering a potential mate (Anand et al. 2002; Richardson et al. 2004; Nyby 2008). Investigation of the kisspeptin and RFRP systems, both potent upstream regulators of GnRH and LH release in male Syrian hamsters, revealed RFRP to be differentially responsive to female chemosignals across photoperiods. The number of RFRP-ir cells decreased 1 h after FHVS exposure in LD but not SD animals, and this response was not rescued by T replacement. To our knowledge, this is the first report that the RFRP neuronal system is sensitive to chemosensory information. These data are consistent with building evidence that RFRP mediates social modulation of reproduction (Calisi et al. 2011; Tobar et al. 2014; Jennings et al. 2016; Peragine et al. 2017). In male Syrian hamsters, unlike many other mammalian species, RFRP acts to stimulate release of LH under both LD and SD photoperiods (Ancel et al. 2012). Thus, the acute decrease in RFRP-ir cell number observed in the present study may reflect acute release of the RFRP peptide, facilitating LH release in LD males in response to female chemosignals. A rapid release of the RFRP peptide would reduce the amount of peptide detectable with immunohistochemistry, leading to a reduction in total cell numbers. Changes in post-translational regulation cannot be excluded, but seem unlikely considering the rapid timecourse (1 h) and robust decrease ($\sim 50\%$). If true, the reduced detection of activated RFRP-ir neurons might also explain the absence of statistically significant changes in the proportion of RFRP-ir cells coexpressing FOS in response to FHVS. Regardless, these data point to the RFRP neuronal system as an important integration center for chemosensory and photoperiodic information. Expression of RFRP mRNA and peptide is regulated by photoperiod (Revel et al. 2008; Mason et al. 2010), and the high density of melatonin receptors in the DMH suggests RFRP neurons may be directly sensitive to photoperiod-driven changes in melatonin secretion (Maywood et al. 1996; Ubuka et al. 2005). Input onto RFRP neurons has not been extensively mapped, so it is unclear

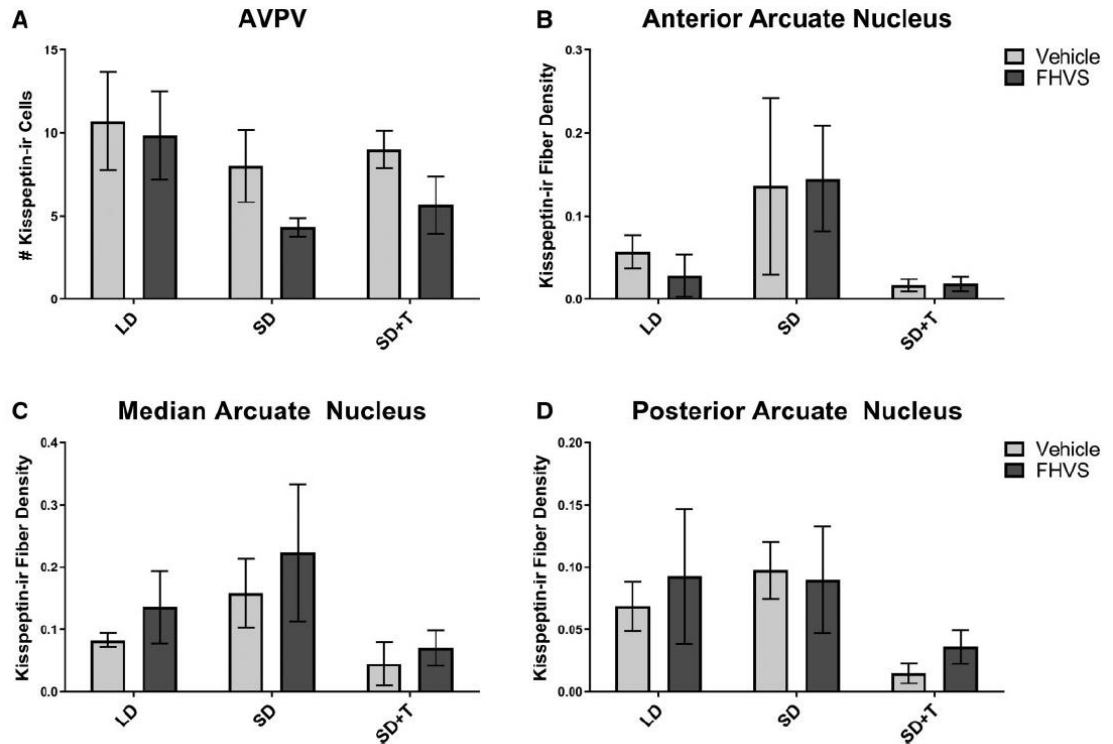


Fig. 3 (A) Mean (\pm SEM) number of kisspeptin-ir cells in the AVPV. (B) Mean (\pm SEM) volume of kisspeptin-ir fibers in the anterior arcuate nucleus. (C) Mean (\pm SEM) volume of kisspeptin-ir fibers in the median arcuate nucleus. (D) Mean (\pm SEM) volume of kisspeptin-ir fibers in the posterior arcuate nucleus.

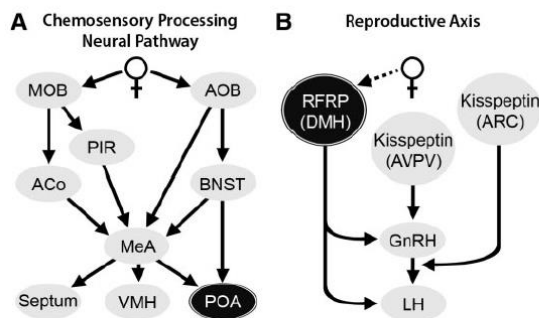


Fig. 4 Summary of present findings. (A) Diagram of neural loci through which chemosensory information is processed. Unlike upstream chemosensory processing loci, the response of the POA to chemosensory information is modulated by photoperiod, represented by dark shading. Symbol ♀ represents chemosensory information, i.e., FHVS. (B) Diagram of the neuroendocrine reproductive axis. The RFRP neuronal system is sensitive to chemosensory information, and this response is modulated by photoperiod. The dotted line indicates that the pathway by which chemosensory information is transmitted to the RFRP neuronal system remains to be established.

whether RFRP neurons receive direct input from chemosensory loci and whether any such afferents are modulated by photoperiod.

Photoperiodic modulation of RFRP neuronal responses to female chemosignals may also contribute to differences in evoked behavior. RFRP's actions on LH release are species and sex specific (Kriegsfeld et al. 2006; Ancel et al. 2012; Ubuka et al. 2012). RFRP inhibits sexual behavior in species/sexes in which RFRP also inhibits LH release (Bentley et al. 2006; Johnson et al. 2007; Piekarski et al. 2013; Ubuka et al. 2014). RFRP-ir neurons project to brain regions outside the neuroendocrine reproductive axis, suggesting a wider neuromodulatory role (Kriegsfeld et al. 2006). Relevant to the present investigation, RFRP neurons project to the POA, and chronic infusion of RFRP in female Syrian hamsters both reduced sexual behavior and altered expression of FOS in the POA, independent of downstream effects on sex steroids (Piekarski et al. 2013).

Findings in ungulates have implicated the kisspeptin population of the arcuate nucleus in mediating

male pheromone-induced increases in LH within females. Exposure to male chemosignals causes an increase in multiunit activity recorded in close proximity to arcuate kisspeptin cells coupled to increases in LH, and the male chemosignal-induced rise in LH is blocked by infusion of a kisspeptin antagonist (Murata et al. 2011; De Bond et al. 2013). We therefore hypothesized that the arcuate kisspeptin system may also respond to female chemosignals in male hamsters. Considering expression of kisspeptin in this region is regulated by photoperiod at least somewhat independently from changes in steroid hormones (Revel et al. 2006; Ansel et al. 2010), this population also seemed a promising candidate for photoperiodic gating of neuroendocrine responses. FHVS exposure did not cause changes in kisspeptin-ir fiber density in this region, but we were unfortunately unable to quantify the activation state of this population due to intense fiber staining obscuring cell bodies. Not unexpectedly, the current study detected no differences within the AVPV kisspeptin population after FHVS exposure. This population is implicated in sex steroid positive feedback and the control of ovulation in females (see Kriegsfeld [2013] for review), but is much smaller in males and has previously been found to be unresponsive to same- and opposite-sex exposure in mice (Szymanski and Keller 2014; Taziaux and Bakker 2015; Jennings et al. 2016).

Taken together, the present study identifies the POA and the RFRP neuronal system as important centers for the integration of photoperiodic and chemosensory information. Responses within these systems to female chemosignals are gated seasonally, and responsiveness is not rescued by T replacement in SD animals. These results mirror photoperiodic regulation of behavioral and neuroendocrine responses to female chemosignals (Morin and Zucker 1978; Miernicki et al. 1990; Anand et al. 2002). Thus, changes within the POA and RFRP neuronal system present a likely means by which photoperiod regulates processing of chemosensory cues to restrict reproduction to the appropriate season.

Acknowledgments

We thank Jenny Chang, Miranda Theriot, and the UC Berkeley Office of Laboratory and Animal Care for their technical assistance.

Funding

This work was supported by the National Institute of Health [grant HD-050470 to L.J.K.], National

Science Foundation [grant IOS-1257638 to L.J.K.], and The University of California France-Berkeley Fund [to L.J.K. and M.K.].

References

- Anand S, Losee-Olson S, Turek FW, Horton TH. 2002. Differential regulation of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in male siberian hamsters by exposure to females and photoperiod. *Endocrinology* 143:2178–88.
- Ansel C, Bentsen AH, Seberr ME, Tena-Sempere M, Mikkelsen JD, Simonneaux V. 2012. Stimulatory effect of RFRP-3 on the gonadotrophic axis in the male Syrian hamster: the exception proves the rule. *Endocrinology* 153:1352–63.
- Ansel L, Bolborea M, Bentsen AH, Klosen P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. 2010. Differential regulation of kiss1 expression by melatonin and gonadal hormones in male and female Syrian hamsters. *J Biol Rhythms* 25:81–91.
- Bentley GE, Jensen JP, Kaur GJ, Wacker DW, Tsutsui K, Wingfield JC. 2006. Rapid inhibition of female sexual behavior by gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). *Horm Behav* 49:550–5.
- Calisi RM, Diaz-Munoz SL, Wingfield JC, Bentley GE. 2011. Social and breeding status are associated with the expression of GnIH. *Genes Brain Behav* 10:557–64.
- Campbell CS, Finkelstein JS, Turek FW. 1978. The interaction of photoperiod and testosterone on the development of copulatory behavior in castrated male hamsters. *Physiol Behav* 21:409–15.
- Clarke IJ, Caraty A. 2013. Kisspeptin and seasonality of reproduction. *Adv Exp Med Biol* 784:411–30.
- Coolen LM, Wood RI. 1998. Bidirectional connections of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster brain: simultaneous anterograde and retrograde tract tracing. *J Comp Neurol* 399:189–209.
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Carlton MB, Colledge WH. 2008. Kisspeptin can stimulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release by a direct action at GnRH nerve terminals. *Endocrinology* 149:3926–32.
- Darby EM, Devor M, Chorover SL. 1975. A presumptive sex pheromone in the hamster: some behavioral effects. *J Comp Physiol Psychol* 88:496–502.
- De Bond JA, Li Q, Millar RP, Clarke IJ, Smith JT. 2013. Kisspeptin signaling is required for the luteinizing hormone response in anestrus ewes following the introduction of males. *PLoS One* 8:e57972.
- de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10972–6.
- Fiber JM, Adames P, Swann JM. 1993. Pheromones induce c-fos in limbic areas regulating male hamster mating behavior. *Neuroreport* 4:871–4.
- Fiber JM, Swann JM. 1996. Testosterone differentially influences sex-specific pheromone-stimulated Fos expression in limbic regions of Syrian hamsters. *Horm Behav* 30:455–73.
- Gaston S, Menaker M. 1967. Photoperiodic control of hamster testis. *Science* 158:925–8.

- Gore AC, Wersinger SR, Rissman EF. 2000. Effects of female pheromones on gonadotropin-releasing hormone gene expression and luteinizing hormone release in male wild-type and oestrogen receptor-alpha knockout mice. *J Neuroendocrinol* 12:1200–4.
- Hull EM, Dominguez JM. 2007. Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav* 52:45–55.
- Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80:264–72.
- Jennings KJ, Chang J, Cho H, Piekarski DJ, Russo KA, Kriegsfeld LJ. 2016. Aggressive interactions are associated with reductions in RFamide-related peptide, but not kisspeptin, neuronal activation in mice. *Horm Behav* 78:127–34.
- Johnson MA, Tsutsui K, Fraley GS. 2007. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm Behav* 51:171–80.
- Johnston RE. 1974. Sexual attraction function of golden hamster vaginal secretion. *Behav Biol* 12:111–7.
- Jouhannau M, Szymanski L, Martini M, Ella A, Keller M. 2013. Kisspeptin: a new neuronal target of primer pheromones in the control of reproductive function in mammals. *Gen Comp Endocrinol* 188:3–8.
- Kriegsfeld LJ. 2013. Circadian regulation of kisspeptin in female reproductive functioning. In: Kauffman AS, Smith JT, editors. *Kisspeptin signaling in reproductive biology*. New York (NY): Springer. p. 385–410.
- Kriegsfeld LJ, Bittman EL. 2009. Photoperiodism and reproduction in mammals. In: Nelson RJ, Denlinger DL, Somers DE, editors. *Photoperiodism: the biological calendar*. New York (NY): Oxford University Press. p. 503–42.
- Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, Ukena K, Tsutsui K, Silver R. 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2410–5.
- Lehman MN, Hileman SM, Goodman RL. 2013. Neuroanatomy of the kisspeptin signaling system in mammals: comparative and developmental aspects. In: Kauffman AS, Smith JT, editors. *Kisspeptin signaling in reproductive biology*. New York (NY): Springer. p. 27–62.
- Liberles SD. 2014. Mammalian pheromones. *Annu Rev Physiol* 76:151–75.
- Lisk RD, Ciaccio LA, Catanzaro C. 1983. Mating behaviour of the golden hamster under seminatural conditions. *Anim Behav* 31:659–66.
- Losa SM, Todd KL, Sullivan AW, Cao J, Mickens JA, Patisaul HB. 2011. Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian development in the peripubertal female rat. *Reprod Toxicol* 31:280–9.
- Macrides F, Bartke A, Fernandez F, D'Angelo W. 1974. Effects of exposure to vaginal odor and receptive females on plasma testosterone in the male hamster. *Neuroendocrinology* 15:355–64.
- Mason AO, Duffy S, Zhao S, Ubuka T, Bentley GE, Tsutsui K, Silver R, Kriegsfeld LJ. 2010. Photoperiod and reproductive condition are associated with changes in RFamide-related peptide (RFRP) expression in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *J Biol Rhythms* 25:176–85.
- Maywood ES, Bittman EL, Hastings MH. 1996. Lesions of the melatonin- and androgen-responsive tissue of the dorsomedial nucleus of the hypothalamus block the gonadal response of male Syrian hamsters to programmed infusions of melatonin. *Biol Reprod* 54:470–7.
- Miernicki M, Pospichal MW, Powers JB. 1990. Short photoperiods affect male hamster sociosexual behaviors in the presence and absence of testosterone. *Physiol Behav* 47:95–106.
- Morin LP, Wood RI. 2001. A stereotaxic atlas of the golden hamster brain. San Diego (CA): Academic Press.
- Morin LP, Zucker I. 1978. Photoperiodic regulation of copulatory behaviour in the male hamster. *J Endocrinol* 77:249–58.
- Murata K, Wakabayashi Y, Sakamoto K, Tanaka T, Takeuchi Y, Mori Y, Okamura H. 2011. Effects of brief exposure of male pheromone on multiple-unit activity at close proximity to kisspeptin neurons in the goat arcuate nucleus. *J Reprod Dev* 57:197–202.
- Murphy MR. 1973. Effects of female hamster vaginal discharge on the behavior of male hamsters. *Behav Biol* 9:367–75.
- Murphy MR, Schneider GE. 1970. Olfactory bulb removal eliminates mating behavior in the male golden hamster. *Science* 167:302–4.
- Nyby JG. 2008. Reflexive testosterone release: a model system for studying the nongenomic effects of testosterone upon male behavior. *Front Neuroendocrinol* 29:199–210.
- Peragine DE, Pokarowski M, Mendoza-Viveros L, Swift-Gallant A, Cheng HM, Bentley GE, Holmes MM. 2017. RFamide-related peptide-3 (RFRP-3) suppresses sexual maturation in a eusocial mammal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:1207–12.
- Peters KD, Hom SM, Wood RI. 2004. Testosterone and chemosensory detection in male Syrian hamster. *Horm Behav* 46:341–8.
- Petrulis A. 2013. Chemosignals, hormones and mammalian reproduction. *Horm Behav* 63:723–41.
- Pfeiffer CA, Johnston RE. 1994. Hormonal and behavioral responses of male hamsters to females and female odors: roles of olfaction, the vomeronasal system, and sexual experience. *Physiol Behav* 55:129–38.
- Piekarski DJ, Zhao S, Jennings KJ, Iwasa T, Legan SJ, Mikkelsen JD, Tsutsui K, Kriegsfeld LJ. 2013. Gonadotropin-inhibitory hormone reduces sexual motivation but not lordosis behavior in female Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Horm Behav* 64:501–10.
- Pospichal MW, Karp HD, Powers JB. 1991. Influence of daylength on male hamster sexual behavior: masking effects of testosterone. *Physiol Behav* 49:417–22.
- Powers JB, Bergondy ML. 1983. Androgenic regulation of chemoinvestigatory behaviors in male and female hamsters. *Horm Behav* 17:28–44.
- Revel FG, Saboureau M, Masson-Pevet M, Pevet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V. 2006. Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. *Curr Biol* 16:1730–5.

- Revel FG, Saboureau M, Pevet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD. 2008. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology* 149:902–12.
- Richardson HN, Nelson AL, Ahmed EI, Parfitt DB, Romeo RD, Sisk CL. 2004. Female pheromones stimulate release of luteinizing hormone and testosterone without altering GnRH mRNA in adult male Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Gen Comp Endocrinol* 138:211–7.
- Romeo RD, Parfitt DB, Richardson HN, Sisk CL. 1998. Pheromones elicit equivalent levels of Fos-immunoreactivity in prepubertal and adult male Syrian hamsters. *Horm Behav* 34:48–55.
- Sakamoto K, Wakabayashi Y, Yamamura T, Tanaka T, Takeuchi Y, Mori Y, Okamura H. 2013. A population of kisspeptin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus may be the central target of the male effect phenomenon in goats. *PLoS One* 8:e81017.
- Sisk CL, Turek FW. 1983. Developmental time course of pubertal and photoperiodic changes in testosterone negative feedback on gonadotropin secretion in the golden hamster. *Endocrinology* 112:1208–16.
- Smith JT, Young IR, Veldhuis JD, Clarke IJ. 2012. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) secretion into the ovine hypophyseal portal system. *Endocrinology* 153:3368–75.
- Swann JM. 1997. Gonadal steroids regulate behavioral responses to pheromones by actions on a subdivision of the medial preoptic nucleus. *Brain Res* 750:189–94.
- Szymanski LA, Keller M. 2014. Activation of the olfactory system in response to male odors in female prepubertal mice. *Behav Brain Res* 271:30–8.
- Taziaux M, Bakker J. 2015. Absence of female-typical pheromone-induced hypothalamic neural responses and kisspeptin neuronal activity in alpha-fetoprotein knockout female mice. *Endocrinology* 156:2595–607.
- Tobari Y, Son YL, Ubuka T, Hasegawa Y, Tsutsui K. 2014. A new pathway mediating social effects on the endocrine system: female presence acting via norepinephrine release stimulates gonadotropin-inhibitory hormone in the paraventricular nucleus and suppresses luteinizing hormone in quail. *J Neurosci* 34:9803–11.
- Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, Ishii S, Sharp PJ. 2000. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 275:661–7.
- Ubuka T, Bentley GE, Ukena K, Wingfield JC, Tsutsui K. 2005. Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3052–7.
- Ubuka T, Haraguchi S, Tobari Y, Narihiro M, Ishikawa K, Hayashi T, Harada N, Tsutsui K. 2014. Hypothalamic inhibition of socio-sexual behaviour by increasing neuroestrogen synthesis. *Nat Commun* 5:3061.
- Ubuka T, Inoue K, Fukuda Y, Mizuno T, Ukena K, Kriegsfeld LJ, Tsutsui K. 2012. Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology* 153:373–85.
- Whalen RE, Debold JF. 1974. Comparative effectiveness of testosterone, androstenedione and dihydrotestosterone in maintaining mating behavior in the castrated male hamster. *Endocrinology* 95:1674–9.
- Wood RI, Newman SW. 1995. Integration of chemosensory and hormonal cues is essential for mating in the male Syrian hamster. *J Neurosci* 15:7261–9.
- Yeo SH, Herbison AE. 2011. Projections of arcuate nucleus and rostral periventricular kisspeptin neurons in the adult female mouse brain. *Endocrinology* 152:2387–99.
- Zucker I, Morin LP. 1977. Photoperiodic influences on testicular regression, recrudescence and the induction of scotorefractoriness in male Golden hamsters. *Biol Reprod* 17:493–8.

Chapitre VI : Bibliographie

- Abecia, J.A., Chemineau, P., Gómez, A., Keller, M., Forcada, F., Delgadillo, J.A., 2016. Presence of photoperiod-melatonin-induced, sexually-activated rams in spring advances puberty in autumn-born ewe lambs. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2016.04.011
- Abel, B.S., Shaw, N.D., Brown, J.M., Adams, J.M., Alati, T., Martin, K.A., Pitteloud, N., Seminara, S.B., Plummer, L., Pignatelli, D., William, F.C.J., Welt, C.K., Hall, J.E., 2013. Responsiveness to a physiological regimen of GnRH therapy and relation to genotype in women with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 98, 206–216. doi:10.1210/jc.2012-3294
- Abel, T.W., Voytko, M. Lou, Rance, N.E., 1999. The effects of hormone replacement therapy on hypothalamic neuropeptide gene expression in a primate model of menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 2111–2118. doi:10.1210/jcem.84.6.5689
- Accorsi-Mendonça, D., Corrêa, F.M.A., Anselmo-Franci, J.A., de Oliveira, A.M., 2002. Influence of Estrogen and / or Progesterone on Isolated Ovariectomized Rat Uterus *Pharmacolo*, 208–213.
- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., Sugiura, H., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Inoue, K., Maeda, K.-I., 2007. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J. Reprod. Dev.* 53, 367–378. doi:10.1262/jrd.18146
- Al-Maully, N.Z.N., Bryant, M.J., Cunningham, F.J., 1991. Effect of the introduction of rams on the pulsatile release of luteinizing hormone and the onset of reproductive activity in ewe lambs. *Anim. Prod.* 53, 209–214. doi:10.1017/S0003356100020146
- Alkass, J.E., Aziz, D.A., Al-Nidawi, K.A., 1994. Genetic aspects of puberty in Awassi ewes. *Small Rumin. Res.* 14, 249–252. doi:10.1016/0921-4488(94)90049-3
- Amoah, E.A., Bryant, M.J., 1984. A note on the effect of contact with male goats on occurrence of puberty in female goat kids. *Anim. Prod.* 38, 141–144. doi:10.1017/S0003356100041477
- Amoah, E.A., Gelaye, S., Guthrie, P., Rexroad, C.E., 1996. Breeding Season and Aspects of Reproduction of Female Goats. *J. Anim. Sci.* 74, 723–728.
- Amoss, M., Burgus, R., Blackwell, R., Vale, W., Fellows, R., Guillemin, R., 1971. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 44, 205–210. doi:10.1016/S0006-291X(71)80179-1
- Amstalden, M., Cardoso, R.C., Alves, B.R.C., Williams, G.L., 2014. Reproduction Symposium: Hypothalamic neuropeptides and the nutritional programming of puberty in heifers. *J. Anim. Sci.* 92, 3211–3222. doi:10.2527/jas2014-7808
- Amstalden, M., Coolen, L.M., Hemmerle, A.M., Billings, H.J., Connors, J.M., Goodman, R.L., Lehman, M.N., 2010. Neurokinin 3 receptor immunoreactivity in the septal region, preoptic area and hypothalamus of the female sheep: Colocalisation in neurokinin B cells

- of the arcuate nucleus but not in gonadotrophin-releasing hormone neurones. *J. Neuroendocrinol.* 22, 1–12. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01930.x
- Andersson, A.M., Einarsson, S., Edqvist, L.E., 1983. Prepubertal LH, Oestradiol-17beta and Progesterone Pattern in Gilts. *Zentralblatt für Veterinärmedizin R. A* 30, 438–446.
- Armstrong, W.E., Tasker, J.G., 2014. *Neurophysiology of Neuroendocrine Neurons, Neurophysiology of Neuroendocrine Neurons.* John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. doi:10.1002/9781118606803
- Asaba, A., Hattori, T., Mogi, K., Kikusui, T., 2014. Sexual attractiveness of male chemicals and vocalizations in mice. *Front. Neurosci.* 8. doi:10.3389/fnins.2014.00231
- Avgar, T., Street, G., Fryxell, J., 2014. On the adaptive benefits of mammal migration. *Can. J. Zool.* 92, 481–490. doi:10.1139/cjz-2013-0076
- Backholer, K., Smith, J.T., Rao, A., Pereira, A., Iqbal, J., Ogawa, S., Li, Q., Clarke, I.J., 2010. Kisspeptin cells in the ewe brain respond to leptin and communicate with neuropeptide Y and proopiomelanocortin cells. *Neuroendocrinology* 151, 2233–2243. doi:10.1210/en.2009-1190
- Baddaloo, E.G.Y., Clulow, F. V., 1981. Effects of the male on growth, sexual maturation, and ovulation of young female meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Can. J. Zool.* 59, 415–421. doi:10.1139/z81-060
- Bartol, F.F., Wiley, A.A., Spencer, T.E., Vallet, J.L., Christenson, R.K., 1993. Early uterine development in pigs. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 48, 99–116.
- Bashour, N.M., Wray, S., 2012. Progesterone directly and rapidly inhibits GnRH neuronal activity via progesterone receptor membrane component 1. *Neuroendocrinology* 153, 4457–4469. doi:10.1210/en.2012-1122
- Batista, A.M., Silva, D.M.F., Rêgo, M.J.B.M., Silva, F.L.M., Silva, E.C.B., Beltrão, E.I.C., Gomes Filho, M.A., Wischral, A., Guerra, M.M.P., 2013. The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 141, 142–147. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.08.007
- Beach, F.A., 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm. Behav.* 7, 105–138. doi:10.1016/0018-506x(76)90008-8
- Bedos, M., Duarte, G., Flores, J.A., Fitz-Rodríguez, G., Hernández, H., Vielma, J., Fernández, I.G., Chemineau, P., Keller, M., Delgadillo, J.A., 2014. Two or 24 h of daily contact with sexually active males results in different profiles of LH secretion that both lead to ovulation in anestrous goats. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48, 93–99. doi:10.1016/j.domaniend.2014.02.003
- Bedos, M., Muñoz, A.L., Orihuela, A., Delgadillo, J.A., 2016a. The sexual behavior of male goats exposed to long days is as intense as during their breeding season. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 184, 35–40. doi:10.1016/j.applanim.2016.08.002
- Bedos, M., Portillo, W., Dubois, J.-P., Duarte, G., Flores, J.A., Chemineau, P., Keller, M., Paredes, R.G., Delgadillo, J.A., 2016b. A high level of male sexual activity is necessary

- for the activation of the medial preoptic area and the arcuate nucleus during the “male effect” in anestrus goats. *Physiol. Behav.* 165, 173–178. doi:10.1016/j.physbeh.2016.07.018
- Belchetz, P.E., Plant, T.M., Nakai, Y., Keogh, E.J., Knobil, E., 1978. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypophyseal gonadotropin-releasing hormone. *Science* (80-). 202, 631–633. doi:10.1126/science.100883
- Beltramo, M., Dufourny, L., 2015. Le système Kisspeptine : Au coeur du contrôle de la reproduction. *Bull. Acad. Vet. Fr.* 168, 67–76.
- Bennett-Clarke, C., Joseph, S.A., 1982. Immunocytochemical distribution of LHRH neurons and processes in the rat: Hypothalamic and extrahypothalamic locations. *Cell Tissue Res.* 221, 493–504. doi:10.1007/BF00215698
- Berardinelli, J.G., Fogwell, R.L., Inskoop, E.K., 1977. Effect of electrical stimulation or presence of a bull on puberty in beef heifers. *Theriogenology* 9, 133–141.
- Billings, H.J., Connors, J.M., Altman, S.N., Hileman, S.M., Holaskova, I., Lehman, M.N., McManus, C.J., Nestor, C.C., Jacobs, B.H., Goodman, R.L., 2010. Neurokinin B acts via the neurokinin-3 receptor in the retrochiasmatic area to stimulate luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 151, 3836–3846. doi:10.1210/en.2010-0174
- Blanvillain, C., Ancrenaz, M., Delhomme, A., Greth, A., Sempéré, A., 1997. The presence of the male stimulates puberty in captive female Arabian oryx (*Oryx leucoryx*Pallas, 1777). *J. Arid Environ.* 36, 359–366. doi:10.1006/jare.1996.0185
- Booth, W.D., 1984. A note on the significance of boar salivary pheromones to the male-effect on puberty attainment in gilts. *Anim. Prod.* 39, 149–152.
- Bourguignon, J.-P., Franchimont, P., 1984. Puberty-related increase in episodic LHRH release from rat hypothalamus in vitro. *Endocrinology* 114, 1941–1943.
- Bouvattier, C., Pienkowski, C. (Eds.), 2014. Puberté précoce. Springer Paris, Paris. doi:10.1007/978-2-8178-0521-4
- Bronson, F.H., 1985. Mammalian Reproduction: An Ecological Perspective. *Biol. Reprod.* 32, 1–26.
- Bronson, F.H., Desjardins, C., 1974. Circulating Concentrations of FSH, LH, Estradiol, and Progesterone Associated with Acute, Male-Induced Puberty in Female Mice. *Endocrinology* 94, 1658–1668. doi:10.1210/endo-94-6-1658
- Bronson, F.H., Rissman, E.F., 1986. The biology of puberty. *Biol. Rev.* 61, 157–195. doi:10.1111/j.1469-185X.1986.tb00465.x
- Brooks, P.H., Cole, D.J., 1970. The effect of the presence of a boar on the attainment of puberty in gilts. *J. Reprod. Fertil.* 23, 435–440. doi:10.1530/jrf.0.0230435
- Caldani, M., Batailler, M., Thiéry, J.C., Dubois, M.P., 1988. LHRH-immunoreactive structures in the sheep brain. *Histochemistry* 89, 129–139.

- Canépa, S., Lainé, A.L., Bluteau, A., Fagu, C., Flon, C., Monniaux, D., 2008. Validation d'une méthode immunoenzymatique pour le dosage de la progestérone dans le plasma des ovins et des bovins. *Cah. des Tech. l'INRA* 64, 19–30.
- Caraty, A., Locatelli, A., Martin, G.B., 1989. Biphasic response in the secretion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes injected with oestradiol. *J. Endocrinol.* 123, 375–382.
- Carter, D.S., Goldman, B.D., 1983. Antigonadal Effects of Timed Melatonin Infusion in Pinealectomized Male Djungarian Hamsters (*Phodopus sungorus sungorus*): Duration is the Critical Parameter. *Endocrinology* 113, 1261–1267.
- Castellano, J.M., Bentsen, A.H., Sánchez-Garrido, M.A., Ruiz-Pino, F., Romero, M., Garcia-Galiano, D., Aguilar, E., Pinilla, L., Diéguez, C., Mikkelsen, J.D., Tena-Sempere, M., 2011. Early metabolic programming of puberty onset: Impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system. *Endocrinology* 152, 3396–3408. doi:10.1210/en.2010-1415
- Castellano, J.M., Gaytan, M., Roa, J., Vigo, E., Navarro, V.M., Bellido, C., Dieguez, C., Aguilar, E., Sánchez-Criado, J.E., Pellicer, A., Pinilla, L., Gaytan, F., Tena-Sempere, M., 2006. Expression of KiSS-1 in rat ovary: Putative local regulator of ovulation? *Endocrinology* 147, 4852–4862. doi:10.1210/en.2006-0117
- Castellano, J.M., Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Nogueiras, R., Tovar, S., Roa, J., Vazquez, M.J., Vigo, E., Casanueva, F.F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M., 2005. Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 146, 3917–3925. doi:10.1210/en.2005-0337
- Chanvallon, A., Blache, D., Chadwick, A., Esmaili, T., Hawken, P.A.R., Martin, G.B., Viñoles, C., Fabre-Nys, C., 2010. Sexual experience and temperament affect the response of Merino ewes to the ram effect during the anoestrous season. *Anim. Reprod. Sci.* 119, 205–211. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.02.003
- Chasles, M., Chesneau, D., Moussu, C., Delgadillo, J.A., Chemineau, P., Keller, M., 2016. Sexually active bucks are efficient to stimulate female ovulatory activity during the anestrus season also under temperate latitudes. *Anim. Reprod. Sci.* 168, 86–91. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.02.030
- Chasles, M., Chesneau, D., Moussu, C., Poissenot, K., Beltramo, M., Delgadillo, J.A., Chemineau, P., Keller, M., n.d. Early exposure to sexually active bucks stimulate early puberty onset in does. in preparation.
- Chehab, F.F., Lim, M.E., Lu, R., 1996. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat. Genet.* 12, 318–320.
- Chemineau, P., 1983. Effect on oestrus and ovulation of exposing creole goats to the male at three times of the year. *J. Reprod. Fertil.* 67, 65–72. doi:10.1530/jrf.0.0670065
- Chemineau, P., 1987. Possibilities for using bucks to stimulate ovarian and oestrous cycles in

- anovulatory goats - a review. *Livest. Prod. Sci.* 17, 135–147. doi:10.1016/0301-6226(87)90059-5
- Chemineau, P., 1989. Le désaisonnement des chèvres par la lumière et la mélatonine. *La Chèvre* 171, 18–22.
- Chemineau, P., Daveau, A., Cognié, Y., Aumont, G., Chesneau, D., 2004. Seasonal ovulatory activity exists in tropical Creole female goats and Black Belly ewes subjected to a temperate photoperiod. *BMC Physiol.* 4, 12. doi:10.1186/1472-6793-4-12
- Chemineau, P., Daveau, A., Maurice, F., Delgadillo, J.A., 1992. Seasonality of estrus and ovulation is not modified by subjecting female Alpine goats to a tropical photoperiod. *Small Rumin. Res.* 8, 299–312. doi:10.1016/0921-4488(92)90211-L
- Chemineau, P., Gauthier, D., Poirier, J.C., Saumande, J., 1982. Plasma levels of LH, FSH, prolactin, oestradiol-17 β and progesterone during natural and induced oestrus in the dairy goat. *Theriogenology* 17, 313–323. doi:10.1016/0093-691X(82)90091-7
- Chemineau, P., Lévy, F., Thimonier, J., 1986a. Effects of anosmia on LH secretion, ovulation and oestrous behaviour induced by males in the anovular creole goat. *Anim. Reprod. Sci.* 10, 125–132. doi:10.1016/0378-4320(86)90024-2
- Chemineau, P., Normant, E., Ravault, J.P., Thimonier, J., 1986b. Induction and persistence of pituitary and ovarian activity in the out-of-season lactating dairy goat after a treatment combining a skeleton photoperiod, melatonin and the male effect. *J. Reprod. Fertil.* 78, 497–504. doi:10.1530/jrf.0.0780497
- Chemineau, P., Pellicer-Rubio, M.-T., Lassoued, N., Khaldi, G., Monniaux, D., 2006. Male-induced short oestrous and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod. Nutr. Développement* 46, 417–429. doi:10.1051/rnd:2006022
- Chemineau, P., Poulin, N., Cognié, Y., 1984. Sécrétion de progestérone au cours du cycle induit par l'introduction du mâle chez la chèvre créole en anœstrus : effets de la saison. *Reprod. Nutr. Développement* 24, 557–561. doi:10.1051/rnd:19840505
- Cheng, G., Coolen, L.M., Padmanabhan, V., Goodman, R.L., Lehman, M.N., 2010. The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: Sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology* 151, 301–311. doi:10.1210/en.2009-0541
- Cheung, C.C., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 1997a. Proopiomelanocortin Neurons Are Direct Targets for Leptin in the Hypothalamus. *Endocrinology* 138, 4489–4492.
- Cheung, C.C., Thornton, J.E., Kuijper, J.L., Weigle, D.S., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 1997b. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 138, 855–858.
- Cheung, C.C., Thornton, J.E., Nurani, S.D., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2001. A Reassessment of Leptin's Role in Triggering the Onset of Puberty in the Rat and Mouse. *Neuroendocrinology* 74, 12–21. doi:10.1159/000054666
- Chongthammakun, S., Claypool, L.E., Terasawa, E.I., 1993. Ovariectomy Increases in vivo

- Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Release in Pubertal, but not Prepubertal, Female Rhesus Monkeys. *J. Neuroendocrinol.* 5, 41–50.
- Chu, T.T., Edey, T.N., 1978. Reproductive performance of ewe lambs at puberty. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 12, 251.
- Clarke, I.J., Burman, K.J., Doughton, B.W., Cummins, J.T., 1986. Effects of constant infusion of gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes with hypothalamo-pituitary disconnection: Further evidence for differential control of LH and FSH secretion and the lack of a priming effect. *J. Endocrinol.* 111, 43–49.
- Clarke, I.J., Cummins, J.T., 1982. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 111, 1737–1739.
- Clarke, I.J., Henry, B.A., 1999. Leptin and reproduction. *Rev. Reprod.* 4, 48–55. doi:10.1530/ror.0.0040048
- Clarke, I.J., Smith, J.T., Henry, B.A., Oldfield, B.J., Stefanidis, A., Millar, R.P., Sari, I.P., Chng, K., Fabre-Nys, C., Caraty, A., Ang, B.T., Chan, L., Fraley, G.S., 2012. Gonadotropin-inhibitory hormone is a hypothalamic peptide that provides a molecular switch between reproduction and feeding. *Neuroendocrinology* 95, 305–316. doi:10.1159/000332822
- Clarke, I.J., Thomas, B., Yao, B., Cummins, J.T., 1987. GnRH Secretion throughout the Ovine Estrous Cycle. *Neuroendocrinology* 46, 82–88.
- Clarkson, J., 2013. Effects of estradiol on kisspeptin neurons during puberty. *Front. Neuroendocrinol.* 34, 120–131. doi:10.1016/j.yfrne.2013.02.002
- Clarkson, J., Boon, W.C., Simpson, E.R., Herbison, A.E., 2009a. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology* 150, 3214–3220. doi:10.1210/en.2008-1733
- Clarkson, J., d'Anglemont de Tassigny, X., Colledge, W.H., Caraty, A., Herbison, A.E., 2009b. Distribution of kisspeptin neurones in the adult female mouse brain. *J. Neuroendocrinol.* 21, 673–682. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01892.x
- Clarkson, J., Han, S.-K., Liu, X., Lee, K., Herbison, A.E., 2010. Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.* 324, 45–50. doi:10.1016/j.mce.2010.01.026
- Clarkson, J., Herbison, A.E., 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147, 5817–5825. doi:10.1210/en.2006-0787
- Claus, R., Over, R., Dehnhard, M., 1990. Effect of male odour on LH secretion and the induction of ovulation in seasonally anoestrous goats. *Anim. Reprod. Sci.* 22, 27–38. doi:10.1016/0378-4320(90)90035-E
- Clayton, R.N., Catt, K.J., 1981. Gonadotropin-releasing hormone receptors : characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocr. Rev.* 2, 186–209. doi:10.1210/er.2003-0002

- Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2014. Neuroendocrinology of Reproduction, in: McCartney, C., Marshall, J. (Eds.), Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology. pp. 3–33. doi:10.1016/B978-1-4557-2758-2.00001-9
- Cohen-Tannoudji, J., Locatelli, A., Signoret, J.P., 1986. Non-pheromonal stimulation by the male of LH release in the anoestrous ewe. *Physiol. Behav.* 36, 921–924. doi:10.1016/0031-9384(86)90453-1
- Colby, D.R., Vandenberg, J.G., 1974. Regulatory effects of urinary pheromones on puberty in the mouse. *Biol. Reprod.* 11, 268–279. doi:10.1095/biolreprod11.3.268
- Cole, D.J.A., Dyck, G.W., Nathan, S., 1982. Reproduction in the Gilt .4. The Effect of Rearing Gilts with Contemporary Castrated Males or Intact Males on the Attainment of Puberty. *Anim. Prod.* 35, 171–175. doi:10.1017/S000335610002732X
- Combarnous, Y., Guillou, F., Martinat, N., Cahoreau, C., 1984. Origine de la double activité FSH + LH de la choriogonadotropine équine (eCG/PMSG). *Ann. Endocrinol. (Paris)*. 45, 261–268.
- Cottrell, E.C., Campbell, R.E., Han, S.K., Herbison, A.E., 2006. Postnatal remodeling of dendritic structure and spine density in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology* 147, 3652–3661. doi:10.1210/en.2006-0296
- Cowley, J.J., Wise, D.R., 1972. Some effects of mouse urine on neonatal growth and reproduction. *Anim. Behav.* 20, 499–506. doi:10.1016/S0003-3472(72)80014-9
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Dubos, M.P., 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 103, 293–298. doi:10.1530/jrf.0.1030293
- Cunningham, M.J., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 1999. Leptin's Actions on the Reproductive Axis: Perspectives and Mechanisms. *Biol. Reprod.* 60, 216–222. doi:10.1095/biolreprod60.2.216
- d'Anglemon de Tassigny, X., Fagg, L.A., Dixon, J.P.C., Day, K., Leitch, H.G., Hendrick, A.G., Zahn, D., Franceschini, I., Caraty, A., Carlton, M.B.L., Aparicio, S.A.J.R., Colledge, W.H., 2007. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10714–10719. doi:10.1073/pnas.0704114104
- Dardente, H., Lomet, D., Robert, V., Decourt, C., 2016. Seasonal breeding in mammals: from basic science to applications and back. *Theriogenology*. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.045
- De Bond, J.-A.P., Li, Q., Millar, R.P., Clarke, I.J., Smith, J.T., 2013. Kisspeptin signaling is required for the luteinizing hormone response in anestrous ewes following the introduction of males. *PLoS One* 8, e57972. doi:10.1371/journal.pone.0057972
- de Roux, N., Genin, E., Carel, J.-C., Matsuda, F., Chaussain, J.-L., Milgrom, E., 2003. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10972–10976. doi:10.1073/pnas.1834399100

- De Santiago-Miramontes, M.A., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2009. Body condition is associated with a shorter breeding season and reduced ovulation rate in subtropical goats. *Anim. Reprod. Sci.* 114, 175–182. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.09.001
- De Santiago-Miramontes, M.A., Rivas-Muñoz, R., Muñoz-Gutiérrez, M., Malpoux, B., Scaramuzzi, R.J., Delgadillo, J.A., 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, 409–416. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.11.008
- Decourt, C., Tillet, Y., Caraty, A., Franceschini, I., Briant, C., 2008. Kisspeptin immunoreactive neurons in the equine hypothalamus. Interactions with GnRH neuronal system. *J. Chem. Neuroanat.* 36, 131–137. doi:10.1016/j.jchemneu.2008.07.008
- Delgadillo, J.A., Carrillo, E., Morán, J., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B., Mora, J., 2001. Induction of sexual activity of male creole goats in subtropical northern Mexico using long days and melatonin. *J. Anim. Sci.* 79, 2245–2252.
- Delgadillo, J.A., Cortez, M.E., Duarte, G., Chemineau, P., Malpoux, B., 2004. Evidence that the photoperiod controls the annual changes in testosterone secretion, testicular and body weight in subtropical male goats. *Reprod. Nutr. Développement* 44, 183–193. doi:10.1051/rnd:2004024
- Delgadillo, J.A., De Santiago-Miramontes, M.A., Carrillo, E., 2007. Season of birth modifies puberty in female and male goats raised under subtropical conditions. *Animal* 1, 858–864. doi:10.1017/S1751731107000080
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Duarte, G., Vielma, J., Hernández, H., Bedos, M., Fitz-Rodríguez, G., Fernández, I.G., López-Sebastián, A., Gómez-Brunet, A., Santiago-Moreno, J., Zarazaga, L.A., Keller, M., Chemineau, P., 2014. Out-of-season control of reproduction in subtropical goats without exogenous hormonal treatments. *Small Rumin. Res.* 121, 7–11. doi:10.1016/j.smallrumres.2014.01.011
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Hernández, H., Poindron, P., Keller, M., Fitz-Rodríguez, G., Duarte, G., Vielma, J., Fernández, I.G., Chemineau, P., 2015. Sexually active males prevent the display of seasonal anestrus in female goats. *Horm. Behav.* 69, 8–15. doi:10.1016/j.yhbeh.2014.12.001
- Delgadillo, J.A., Flores, J.A., Véliz, F.G., Hernández, H.F., Duarte, G., Vielma, J., Poindron, P., Chemineau, P., Malpoux, B., 2002. Induction of sexual activity in lactating anovulatory female goats using male goats treated only with artificially long days. *J. Anim. Sci.* 80, 2780–2786.
- Delgadillo, J.A., Gelez, H., Ungerfeld, R., Hawken, P.A.R., Martin, G.B., 2009. The “male effect” in sheep and goats-Revisiting the dogmas. *Behav. Brain Res.* 200, 304–314. doi:10.1016/j.bbr.2009.02.004
- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1991. Decrease in the seasonality of sexual behavior and sperm production in bucks by exposure to short photoperiodic cycles. *Theriogenology* 36, 755–770. doi:10.1016/0093-691X(91)90341-A

- Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1992. Abolition of seasonal variations in semen quality and maintenance of sperm fertilizing ability by photoperiodic cycles in goat bucks. *Small Rumin. Res.* 9, 47–59. doi:10.1016/0921-4488(92)90055-9
- Delgadillo, J.A., Vélez, L.I., 2010. Stimulation of reproductive activity in anovulatory Alpine goats exposed to bucks treated only with artificially long days. *Animal* 4, 2012–2016. doi:10.1017/S1751731110001345
- Delgadillo, J.A., Vielma, J., Hernández, H., Flores, J.A., Duarte, G., Fernández, I.G., Keller, M., Gelez, H., 2012. Male goat vocalizations stimulate the estrous behavior and LH secretion in anestrus goats that have been previously exposed to bucks. *Horm. Behav.* 62, 525–530. doi:10.1016/j.yhbeh.2012.08.014
- Dellovade, T.L., Merchenthaler, I., 2004. Estrogen Regulation of Neurokinin B Gene Expression in the Mouse Arcuate Nucleus Is Mediated by Estrogen Receptor alpha. *Endocrinology* 145, 736–742. doi:10.1210/en.2003-0894
- Dietrich, J.E. (Ed.), 2014. *Female Puberty, A Comprehensive Guide for Clinicians*. Springer New York, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4939-0912-4
- Dodé, C., Hardelin, J.-P., 2009. Kallmann syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 17, 139–146. doi:10.1038/ejhg.2008.206
- Driancourt, M.A., Levasseur, M.C., 2001. Cycles estriens et cycles menstruels, in: (Eds), C.T. et M.C.L. (Ed.), *La Reproduction Chez Les Mammifères et L’homme*. INRA Ellipses, Paris, France, pp. 680–698.
- Drickamer, L.C., 1974a. Sexual maturation of female house mice: Social inhibition. *Dev. Psychobiol.* 7, 257–265. doi:10.1002/dev.420070310
- Drickamer, L.C., 1974b. Contact stimulation, androgenized females and accelerated sexual maturation in female mice. *Behav. Biol.* 101–110. doi:10.1016/S0091-6773(74)91086-4
- Drickamer, L.C., 1977. Delay of sexual maturation in female house mice by exposure to grouped females or urine from grouped females. *J. Reprod. Fertil.* 51, 77–81. doi:10.1530/jrf.0.0510077
- Drickamer, L.C., 1979. Acceleration and delay of first estrus in wild *Mus musculus*. *J. Mammal.* 60, 215–216.
- Drickamer, L.C., McIntosh, T.K., Rose, E.A., 1978. Effects of ovariectomy on the presence of a maturation-delaying pheromone in the urine of female mice. *Horm. Behav.* 11, 131–137. doi:10.1016/0018-506X(80)90006-9
- Drickamer, L.C., Murphy, R.X., 1978. Female mouse maturation: effects of excreted and bladder urine from juvenile and adult males. *Dev. Psychobiol.* 11, 63–72. doi:10.1002/dev.420110110
- Dullaart, J., Kent, J., Ryle, M., 1975. Serum Gonadotrophin Concentrations in Infantile Female Mice. *J. Reprod. Fertil.* 43, 189–192.
- Duquesnel, R., Parisot, D., Pirot, G., Mialot, J.P., Saboureau, L., Etienne, P., Delaval, J.,

- Guéraud, J.M., Prengere, E., de Montigny, G., Guerrault, P., Perrin, G., Humblot, P., de Fontaubert, Y., Chemineau, P., 1992. La pseudogestation chez la chèvre. *Ann. Zootech.* 41, 407–415.
- Dýrmundsson, Ó.R., 1981. Natural factors affecting puberty and reproductive performance in ewe lambs: A review. *Livest. Prod. Sci.* 8, 55–65. doi:10.1016/0301-6226(81)90030-0
- Dýrmundsson, Ó.R., Lees, J.L., 1972. Effect of rams on the onset of breeding activity in Clun Forest ewe lambs. *J. Agric. Sci.* 79, 269–271.
- Ebling, F.J.P., 2005. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction* 129, 675–683. doi:10.1530/rep.1.00367
- Ebling, F.J.P., Lincoln, G.A., Wollnik, F., Anderson, N., 1988. Effects of Constant Darkness and Constant Light on Circadian Organization and Reproductive Responses in the Ram. *J. Biol. Rhythms* 3, 365–384.
- Eisen, E.J., 1975. Influence of the male's presence on sexual maturation, growth and feed efficiency of female mice. *J. Anim. Sci.* 40, 816–825.
- Eliasson, L., 1989. A Study on Puberty and Estrus in Gilts. *J. Vet. Med.* 36, 46–54.
- Estrada, K.M., Pompolo, S., Morris, M.J., Tilbrook, A.J., Clarke, I.J., 2003. Neuropeptide Y (NPY) delays the oestrogen-induced luteinizing hormone (LH) surge in the ovariectomized ewe: Further evidence that NPY has a predominant negative effect on LH secretion in the ewe. *J. Neuroendocrinol.* 15, 1011–1020. doi:10.1046/j.1365-2826.2003.01087.x
- Fabre-Nys, C., 2000. Le comportement sexuel des caprins : contrôle hormonal et facteurs sociaux. *INRA Prod. Anim.* 13, 11–23.
- Fabre-Nys, C., Gelez, H., 2007. Sexual behavior in ewes and other domestic ruminants. *Horm. Behav.* 52, 18–25. doi:10.1016/j.yhbeh.2007.04.001
- Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A., O'Rahilly, S., 1999. Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N. Engl. J. Med.* 341, 879–84. doi:10.1056/NEJM199909163411204
- Fatet, A., Pellicer-Rubio, M.-T., Leboeuf, B., 2011. Reproductive cycle of goats. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 211–219. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.029
- Fiol, C., Quintans, G., Ungerfeld, R., 2010. Response to biostimulation in peri-puberal beef heifers: Influence of male-female proximity and heifer's initial body weight. *Theriogenology* 74, 569–575. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.03.015
- Fitzgerald, J., Butler, W.R., 1982. Seasonal effects and hormonal patterns related to puberty in ewe lambs. *Biol. Reprod.* 27, 853–863. doi:10.1095/biolreprod27.4.853
- Flores, J.A., Véliz, F.G., Pérez-Villanueva, J.A., Martínez De La Escalera, G., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2000. Male reproductive condition is the limiting factor of efficiency in the male effect during seasonal anestrus in female goats.

Biol. Reprod. 62, 1409–1414. doi:10.1095/biolreprod62.5.1409

- Fogarty, M.J., Hammond, L. a, Kanjhan, R., Bellingham, M.C., Noakes, P.G., 2013. A method for the three-dimensional reconstruction of NeurobiotinTM-filled neurons and the location of their synaptic inputs. *Front. Neural Circuits* 7, 153. doi:10.3389/fncir.2013.00153
- Foote, W.C., Sefidbakht, N., Madsen, M.A., 1970. Puberal estrus and ovulation and subsequent estrous cycle patterns in the ewe. *J. Anim. Sci.* 30, 86–90.
- Foradori, C.D., Coolen, L.M., Fitzgerald, M.E., Skinner, D.C., Goodman, R.L., Lehman, M.N., 2002. Colocalization of progesterone receptors in parvicellular dynorphin neurons of the ovine preoptic area and hypothalamus. *Endocrinology* 143, 4366–4374. doi:10.1210/en.2002-220586
- Foster, D.L., Karsch, F.J., 1975. Development of the mechanism regulating the preovulatory surge of luteinizing hormone in sheep. *Endocrinology* 97, 1205–1209.
- Foster, D.L., Lemons, J.A., Jagge, R.B., Niswender, G.D., 1975. Sequential patterns of circulating LH and FSH in female sheep from early postnatal life through the first estrous cycles. *Endocrinology* 97, 985–994. doi:10.1210/endo-97-4-985
- Foster, D.L., Ryan, K.D., 1979. Endocrine mechanisms governing transition into adulthood: A marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in the lamb during puberty. *Endocrinology* 105, 896–904. doi:10.1210/endo-105-4-896
- Foster, D.L., Yellon, S.M., Olster, D.H., 1985. Internal and external determinants of the timing of puberty in the female. *J. Reprod. Fertil.* 75, 327–344. doi:10.1530/jrf.0.0750327
- Fraley, G.S., Ebling, F.J.P., Claypool, L.E., 1988. Timing of puberty by photoperiod. *Reprod. Nutr. Développement* 28, 349–364. doi:10.1051/rnd:19880302
- Franceschini, I., Lomet, D., Cateau, M., Delsol, G., Tillet, Y., Caraty, A., 2006. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci. Lett.* 401, 225–230. doi:10.1016/j.neulet.2006.03.039
- Friard, O., Gamba, M., 2016. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol. Evol.* 7, 1325–1330. doi:10.1111/2041-210X.12584
- Frisch, R.E., Revelle, R., 1970. Height and weight at menarche and a hypothesis of critical body weights and adolescent events. *Science* (80-.). 169, 254–255.
- Funes, S., Hedrick, J.A., Vassileva, G., Markowitz, L., Abbondanzo, S., Golovko, A., Yang, S., Monsma, F.J., Gustafson, E.L., 2003. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1357–1363. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.066
- Gallego-Calvo, L., Gatica, M.C., Celi, I., Guzmán, J.L., Delgadillo, J.A., Zarazaga, L.A., 2014. No previous isolation of female goats is required for novel males to induce a male effect, especially if direct physical contact is established. *Theriogenology* 82, 1310–1315. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.08.015

- Gallego-Calvo, L., Gatica, M.C., Guzmán, J.L., Zarazaga, L.A., 2015. Reproductive performance response to the male effect in goats is improved when doe live weight/body condition score is increasing. *Anim. Reprod. Sci.* 156, 51–57. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.03.001
- Gateff, S., Leboeuf, B., Desemery, C., Fouilland, C., Freleteau, M., Guillon, M.P., Jacquemet, C., Jenot, F., Raynaud, C., 2003. Maîtriser la reproduction des chevrettes à contre-saison, quels résultats avec le traitement lumineux et l'effet bouc ? *Rencontres Rech. Ruminants* 10, 123–126.
- Gelez, H., Archer, E., Chesneau, D., Campan, R., Fabre-Nys, C., 2004. Importance of learning in the response of ewes to male odor. *Chem. Senses* 29, 555–563. doi:10.1093/chemse/bjh054
- Gelez, H., Fabre-Nys, C., 2004. The “male effect” in sheep and goats: A review of the respective roles of the two olfactory systems. *Horm. Behav.* 46, 257–271. doi:10.1016/j.yhbeh.2004.05.002
- Gelez, H., Fabre-Nys, C., 2006. Neural pathways involved in the endocrine response of anestrus ewes to the male or its odor. *Neuroscience* 140, 791–800. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.02.066
- Ghizzoni, L., Barreca, A., Mastorakos, G., Furlini, M., Vottero, A., Ferrari, B., Chrousos, G.P., Bernasconi, S., 2001. Leptin inhibits steroid biosynthesis by human granulosa-lutein cells. *Horm. Metab. Res.* 33, 323–328. doi:10.1055/s-2001-15419
- Girard, L., 1813. Moyens employés avec succès, par M. Morel de Vindé, Membre de la Société d'Agriculture de Seine et Oise, pour obtenir, dans le temps le plus court possible, la fécondation du plus grand nombre des brebis portières d'un troupeau, in: *Ephémérides de La Société d'Agriculture Du Département de l'Indre Pour l'An 1813*. Château-Roux, Département de l'Indre, pp. 66–68.
- Goldsmith, P.C., Thind, K.K., Song, T., Jung, E., James, E.B., 1990. Location of the Neuroendocrine Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons in the Monkey Hypothalamus by Retrograde Tracing and Immunostaining. *J. Neuroendocrinol.* 2, 157–168.
- Goodman, R.L., 2015. Neuroendocrine Control of Gonadotropin Secretion: Comparative Aspects, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Academic Press, pp. 1537–1574. doi:10.1016/B978-0-12-397175-3.00033-8
- Goodman, R.L., Coolen, L.M., Anderson, G.M., Hardy, S.L., Valent, M., Connors, J.M., Fitzgerald, M.E., Lehman, M.N., 2004. Evidence that dynorphin plays a major role in mediating progesterone negative feedback on gonadotropin-releasing hormone neurons in sheep. *Endocrinology* 145, 2959–2967. doi:10.1210/en.2003-1305
- Goodman, R.L., Lehman, M.N., Smith, J.T., Coolen, L.M., De Oliveira, C.V.R., Jafarzadehshirazi, M.R., Pereira, A., Iqbal, J., Caraty, A., Ciofi, P., Clarke, I.J., 2007. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology* 148, 5752–5760. doi:10.1210/en.2007-0961

- Gordon, I., 2004. Controlling onset of puberty, in: Gordon, I. (Ed.), *Reproductive Technologies in Farm Animals*. CABI, Wallingford, pp. 255–268. doi:10.1079/9780851998626.0255
- Gore, A.C., 2002. *GnRH: The Master Molecule of Reproduction*. Springer US, Boston, MA. doi:10.1007/978-1-4757-3565-9
- Gouardères, C., Puget, A., Zajac, J.M., 2004. Detailed Distribution of Neuropeptide FF Receptors (NPFF1 and NPFF2) in the Rat, Mouse, Octodon, Rabbit, Guinea Pig, and Marmoset Monkey Brains: A Comparative Autoradiographic Study. *Synapse* 51, 249–269. doi:10.1002/syn.10305
- Grachev, P., Millar, R.P., O’Byrne, K.T., 2014. The role of neurokinin B signalling in reproductive neuroendocrinology. *Neuroendocrinology* 99, 7–17. doi:10.1159/000357734
- Gregg, D.W., Nett, T.M., 1989. Direct effects of estradiol-17 beta on the number of gonadotropin-releasing hormone receptors in the ovine pituitary. *Biol. Reprod.* 40, 288–293. doi:10.1095/biolreprod40.2.288
- Grumbach, M.M., 2002. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm. Res.* 57, 2–14. doi:10.1159/000058094
- Hallf, J.E., Brodie, T.D., Badger, T.M., Rivier, J., Vale, W., Conn, P.M., Schoenfeld, D., Crowley, W.F., 1988. Evidence of Differential Control of FSH and LH Secretion by Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) from the Use of a GnRH Antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 67, 524–531.
- Hawken, P.A.R., Evans, A.C.O., Beard, A.P., 2008. Prior exposure of maiden ewes to rams enhances their behavioural interactions with rams but is not a pre-requisite to their endocrine response to the ram effect. *Anim. Reprod. Sci.* 108, 13–21. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.06.031
- Henningsen, J.B., Ancel, C., Mikkelsen, J.D., Gauer, F., Simonneaux, V., 2017. Roles of RFRP-3 in the daily and seasonal regulation of reproductive activity in female Syrian hamsters. *Endocrinology* 158, 652–663. doi:10.1210/en.2016-1689
- Herbison, A.E., 2016. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat. Rev. Endocrinol.* doi:10.1038/nrendo.2016.70
- Herbison, A.E., Robinson, J.E., Skinner, D.C., 1993. Distribution of Estrogen Receptor-Immunoreactive Cells in the Preoptic Area of the Ewe: Co-Localization with Glutamic Acid decarboxylase but Not Luteinizing Hormone-Releasing Hormone. *Neuroendocrinology* 57, 751–759.
- Hochereau-de-Reviere, M.-T., Copin, M., Seck, M., Monet-Kuntz, C., Cornu, C., Fontaine, I., Perreau, C., Elsen, J.M., Boomarov, 1990. Stimulation of testosterone production by PMSG injection in the ovine male: effect of breed and age and application to males carrying or not carrying the “F” Booroola gene. *Anim. Reprod. Sci.* 23, 21–32. doi:10.1016/0378-4320(90)90012-5
- Hoffman, G.E., Finch, C.E., 1986. LHRH neurons in the female C57BL/6J mouse brain during reproductive aging: No loss up to middle age. *Neurobiol. Aging* 7, 45–48.

doi:10.1016/0197-4580(86)90026-6

- Hoffman, R.A., Reiter, R.J., 1965. Pineal Gland: Influence on Gonads of Male Hamsters. *Science* (80-). 148, 1609–1611.
- Homma, T., Sakakibara, M., Yamada, S., Kinoshita, M., Iwata, K., Tomikawa, J., Kanazawa, T., Matsui, H., Takatsu, Y., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Maeda, K., Tsukamura, H., 2009. Significance of Neonatal Testicular Sex Steroids to Defeminize Anteroventral Periventricular Kisspeptin Neurons and the GnRH/LH Surge System in Male Rats. *Biol. Reprod.* 81, 1216–1225. doi:10.1095/biolreprod.109.078311
- Hoover, J.E., Drickamer, L.C., 1979. Effects of urine from pregnant and lactating female house mice on oestrous cycles of adult females. *J. Reprod. Fertil.* 12, 545–551.
- Huffman, L.J., Inskeep, E.K., Goodman, R.L., 1987. Changes in episodic luteinizing hormone secretion leading to puberty in the lamb. *Biol. Reprod.* 37, 755–761. doi:10.1095/biolreprod37.4.755
- Ichimaru, T., Mogi, K., Ohkura, S., Mori, Y., Okamura, H., 2008. Exposure to ram wool stimulates gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the female goat. *Anim. Reprod. Sci.* 106, 361–368. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.05.012
- Iremonger, K.J., Herbison, A.E., 2014. Elucidating the Structure and Function of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Neuron Dendrites, in: *Neurophysiology of Neuroendocrine Neurons*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 271–299. doi:10.1002/9781118606803.ch12
- Irwig, M.S., Fraley, G.S., Smith, J.T., Acohido, B. V, Popa, S.M., Cunningham, M.J., Gottsch, M.L., Clifton, D.K., Steiner, R. a, 2004. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 80, 264–72. doi:10.1159/000083140
- Iwata, E., Wakabayashi, Y., Kakuma, Y., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., 2000. Testosterone-Dependent Primer Pheromone Production in the Sebaceous Gland of Male Goat. *Biol. Reprod.* 62, 806–810. doi:10.1095/biolreprod62.3.806
- Izard, M.K., Vandenbergh, J.G., 1982. The Effects of Bull Urine on Puberty and Calving Date in Crossbred Beef Heifers. *J. Anim. Sci.* 55, 1160–1168.
- Jayes, F.C., Britt, J.H., Esbenschade, K.L., 1997. Role of gonadotropin-releasing hormone pulse frequency in differential regulation of gonadotropins in the gilt. *Biol. Reprod.* 56, 1012–1019. doi:10.1095/biolreprod56.4.1012
- Johnson, M.A., Tsutsui, K., Fraley, G.S., 2007. Rat RFamide-related peptide-3 stimulates GH secretion, inhibits LH secretion, and has variable effects on sex behavior in the adult male rat. *Horm. Behav.* 51, 171–180. doi:10.1016/j.yhbeh.2006.09.009
- Jouhannau, M., Cornilleau, F., Keller, M., 2014. Peripubertal exposure to male odors influences female puberty and adult expression of male-directed odor preference in mice. *Horm. Behav.* 65, 128–133. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.12.006
- Jouhannau, M., Goudet, C., Moussu, C., Tashiro, T., Buatois, B., Mori, K., Ganem, G., Mori,

- K., Ganem, G., Keller, M., 2015. Peripubertal exposure to male chemosignals accelerates vaginal opening and induces male-directed odor preference in female mice. *Front. Ecol. Evol.* 3. doi:10.3389/fevo.2015.00034
- Karlson, P., Lüscher, M., Luscher, M., 1959. Pheromones': a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183, 55–56. doi:10.1038/183055a0
- Karsch, F.J., Foster, D.L., Legan, S.J., Ryan, K.D., Peter, G.K., 1979. Control of the preovulatory endocrine events in the ewe: Interrelationship of estradiol, progesterone, and luteinizing hormone. *Endocrinology* 105, 421–426. doi:10.1210/endo-105-2-421
- Kauffman, A.S., Gottsch, M.L., Roa, J., Byquist, A.C., Crown, A., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., Tena-Sempere, M., 2007. Sexual differentiation of *Kiss1* gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology* 148, 1774–1783. doi:10.1210/en.2006-1540
- Keen, K.L., Burich, A.J., Mitsushima, D., Kasuya, E., Terasawa, E., 1999. Effects of Pulsatile Infusion of the GABAA Receptor Blocker Bicuculline on the Onset of Puberty in Female Rhesus Monkeys. *Endocrinology* 140, 5257–5266. doi:10.1210/endo.140.11.7139
- Kenyon, P.R., Thompson, A.N., Morris, S.T., 2014. Breeding ewe lambs successfully to improve lifetime performance. *Small Rumin. Res.* 118, 2–15. doi:10.1016/j.smallrumres.2013.12.022
- Kenyon, P.R., Viñoles, C., Morris, S.T., 2012. Effect of teasing by the ram on the onset of puberty in Romney ewe lambs. *New Zeal. J. Agric. Res.* 55, 37–41. doi:10.1080/00288233.2012.693105
- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Maeda, K.I., 2005. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146, 4431–4436. doi:10.1210/en.2005-0195
- Kirkwood, R.N., Forbes, J.M., Hughes, P.E., 1981. Influence of boar contact on attainment of puberty in gilts after removal of the olfactory bulbs. *J. Reprod. Fertil.* 61, 193–196. doi:10.1530/jrf.0.0610193
- Kirkwood, R.N., Hughes, P., 1980. A note on the influence of “boar effect” component stimuli on puberty attainment in the gilt. *Anim. Prod.* 31, 209–211. doi:10.1017/S0003356100025022
- Kirkwood, R.N., Hughes, P.E., 1979. The influence of age at first boar contact on puberty attainment in the gilt. *Anim. Prod.* 29, 231–238. doi:10.1017/S000335610002345X
- Kirkwood, R.N., Hughes, P.E., 1981. A note on the influence of boar age on its ability to advance puberty in the gilt. *Anim. Prod.* 32, 211–213. doi:10.1017/S0003356100025022
- Kirkwood, R.N., Hughes, P.E., Booth, W.D., 1983. The influence of boar-related odours on puberty attainment in gilts. *Anim. Sci.* 36, 131–136. doi:10.1017/S0003356100040022
- Klein, B.G., 2013. Cunningham’s Textbook of Veterinary Physiology, *The Veterinary Journal.* doi:10.1016/S1090-0233(02)00181-8

- Klein, D.C., Coon, S.L., Roseboom, P.H., Weller, J.L., Bernard, M., Gastel, J.A., Zatz, M., Iuvone, P.M., Rodriguez, I.R., Bégay, V., Falcon, J., Cahill, G.M., Cassone, V.M., Baler, R., 1997. The Melatonin Rhythm-generating Enzyme : Molecular Regulation of Serotonin N- acetyltransferase in the Pineal Gland. *Recent Prog. Horm. Res.* 52, 307–355.
- Klosen, P., Sébert, M.E., Rasri, K., Laran-Chich, M.P., Simonneaux, V., 2013. TSH restores a summer phenotype in photoinhibited mammals via the RF-amides RFRP3 and kisspeptin. *FASEB J.* 27, 2677–2686. doi:10.1096/fj.13-229559
- Krajewski, S.J., Anderson, M.J., Iles-Shih, L., Chen, K.J., Urbanski, H.F., Rance, N.E., 2005. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J. Comp. Neurol.* 489, 372–386. doi:10.1002/cne.20626
- Krajewski, S.J., Burke, M.C., Anderson, M.J., McMullen, N.T., Rance, N.E., 2010. Forebrain Projections of Arcuate Neurokinin B Neurons Demonstrated by Anterograde Tract-Tracing and Monosodium Glutamate Lesions in the Ra. *Neuroscience* 166, 680–697. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.12.053.Forebrain
- Kriegsfeld, L.J., Mei, D.F., Bentley, G.E., Ubuka, T., Mason, A.O., Inoue, K., Ukena, K., Tsutsui, K., Silver, R., 2006. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2410–2415. doi:10.1073/pnas.0511003103
- Kuiri-Hänninen, T., Sankilampi, U., Dunkel, L., 2014. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: Minipuberty. *Horm. Res. Paediatr.* 82, 73–80. doi:10.1159/000362414
- Ladewig, J., Hart, B.L., 1980. Flehmen and vomeronasal organ function in male goats. *Physiol. Behav.* 24, 1067–1071. doi:10.1016/0031-9384(80)90049-9
- Langmore, N.E., Davies, N.B., Hatchwell, B.J., Hartley, I.R., 1996. Female song attracts males in the alpine accentor *Prunella collaris*. *Proc. Biol. Sci.* 263, 141–146. doi:10.1098/rspb.1996.0022
- Lapatto, R., Pallais, J.C., Zhang, D., Chan, Y.-M., Mahan, A., Cerrato, F., Le, W.W., Hoffman, G.E., Seminara, S.B., 2007. Kiss1^{-/-} mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54^{-/-} mice. *Endocrinology* 148, 4927–36. doi:10.1210/en.2007-0078
- Lee, J.-H., Miele, M.E., Hicks, D.J., Phillips, K.K., Trent, J.M., Weissman, B.E., Welch, D.R., 1996. KiSS-1, a Novel Human Malignant Melanoma Metastasis-suppressor Gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1731–1737. doi:10.1093/jnci/88.23.1731
- Lehman, M.N., Karsch, F.J., 1993. Do Gonadotropin-Releasing Neurons Contain Estrogen Immunocytochemical Study in the Suffolk Ewe. *Endocrinology* 133, 887–895.
- Lepri, J.J., Vandenbergh, J.G., 1986. Puberty in Pine Voles, *Microtus pinetorum*, and the Influence of Chemosignals on Female Reproduction. *Biol. Reprod.* 34, 370–377.
- Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, W., 1958. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 2587.

- Levin, R.N., Johnston, R.E., 1986. Social mediation of puberty: an adaptive female strategy? *Behav. Neural Biol.* 46, 308–324. doi:10.1016/S0163-1047(86)90254-2
- Levine, J.E., Pau, K.F., Ramirez, V.D., Jackson, G.L., 1982. Simultaneous Measurement of Luteinizing Hormone - Releasing Hormone and Luteinizing Hormone Release in Unanesthetized, Ovariectomized Sheep. *Endocrinology* 111, 1449–1455.
- Li, Q., Rao, A., Pereira, A., Clarke, I.J., Smith, J.T., 2011. Kisspeptin cells in the ovine arcuate nucleus express prolactin receptor but not melatonin receptor. *J. Neuroendocrinol.* 23, 871–882. doi:10.1111/j.1365-2826.2011.02195.x
- Li, S.Y., Li, X.F., Hu, M.H., Shao, B., Poston, L., Lightman, S.L., O’Byrne, K.T., 2014. Neurokinin B receptor antagonism decreases luteinising hormone pulse frequency and amplitude and delays puberty onset in the female rat. *J. Neuroendocrinol.* 26, 521–527. doi:10.1111/jne.12167
- Li, X.F., Kinsey-Jones, J.S., Cheng, Y., Knox, A.M.I., Lin, Y., Petrou, N.A., Roseweir, A., Lightman, S.L., Milligan, S.R., Millar, R.P., O’Byrne, K.T., 2009. Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLoS One* 4, e8334. doi:10.1371/journal.pone.0008334
- Lomas, D.E., Keverne, E.B., 1982. Role of the vomeronasal organ and prolactin in the acceleration of puberty in female mice. *J. Reprod. Fertil.* 66, 101–107. doi:10.1530/jrf.0.0660101
- Lombardi, J.R., Vandenbergh, J.G., 1977. Pheromonally induced sexual maturation in females: regulation by the social environment of the male. *Science* (80-). 196, 545–546. doi:10.1126/science.557838
- Lombardi, J.R., Vandenbergh, J.G., Whitsett, J.M., 1976. Androgen control of the sexual maturation pheromone in house mouse urine. *Biol. Reprod.* 15, 179–186. doi:10.1095/biolreprod15.2.179
- Loose, M.D., Terasawa, E.I., 1985. Pulsatile Infusion of Luteinizing Hormone-releasing Hormone Induces Precocious Puberty (Vaginal Opening and First Ovulation) in the Immature Female Guinea Pig. *Biol. Reprod.* 33, 1084–1093.
- Lopez, J.A., Bedenbaugh, M.N., McCosh, R.B., Weems, P.W., Meadows, L.J., Wisman, B., Coolen, L.M., Goodman, R.L., Hileman, S.M., 2016. Does Dynorphin Play a Role in the Onset of Puberty in Female Sheep? *J. Neuroendocrinol.* doi:10.1111/jne.12445
- Losa, S.M., Todd, K.L., Sullivan, A.W., Cao, J., Mickens, J.A., Patisaul, H.B., 2011. Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian development in the peripubertal female rat. *Reprod. Toxicol.* 31, 280–289. doi:10.1016/j.reprotox.2010.10.002
- Loya-Carrera, J.A., Ramírez, S., Terrazas, A., Hernández, H., Vielma, J., Duarte, G., Fernández, I.G., 2017. Sexually inexperienced anestrus goats are able to exhibit sexual behaviours exposed to sexually active bucks. *J. Anim. Behav. Biometeorol.* 5, 64–71.
- Loya-Carrera, J., Bedos, M., Ponce-Covarrubias, J.L., Hernández, H., Chemineau, P., Keller,

- M., Delgadillo, J.A., 2014. Switching photo-stimulated males between groups of goats does not improve the reproductive response during the male effect. *Anim. Reprod. Sci.* 146, 21–26. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.002>
- Luna-Orozco, J.R., Fernández, I.G., Gelez, H., Delgadillo, J.A., 2008. Parity of female goats does not influence their estrous and ovulatory responses to the male effect. *Anim. Reprod. Sci.* 106, 352–360. doi:[10.1016/j.anireprosci.2007.05.011](http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.05.011)
- Malpaux, B., Daveau, A., Maurice-Mandon, F., Duarte, G., Chemineau, P., 1998. Evidence that melatonin acts in the premammillary hypothalamic area to control reproduction in the ewe: Presence of binding sites and stimulation of luteinizing hormone secretion by in situ microimplant delivery. *Endocrinology* 139, 1508–1516. doi:[10.1210/endo.139.4.5879](http://dx.doi.org/10.1210/endo.139.4.5879)
- Malpaux, B., Daveau, A., Maurice, F., Gayrard, V., Thiery, J.C., 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, 752–760. doi:[10.1095/biolreprod48.4.752](http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod48.4.752)
- Malpaux, B., Skinner, D.C., Maurice, F., 1995. The Ovine Pars Tuberalis does not Appear to be Targeted by Melatonin to Modulate Luteinizing Hormone Secretion, but may be Important for Prolactin Release. *J. Neuroendocrinol.* 7, 199–206. doi:[10.1111/j.1365-2826.1995.tb00748.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2826.1995.tb00748.x)
- Malpaux, B., Vigié, C., Thiéry, J.C., Chemineau, P., 1996. Contrôle photopériodique de la reproduction. *INRA Prod. Anim.* 9, 9–23.
- Manabe, Y., Yamaguchi, M., Tanaka, T., Mori, Y., 1993. Estradiol-induced GnRH Surge in Ovariectomized Goats. *J. Reprod. Dev.* 39, 91–96.
- Marieb, E., 1999. Anatomie et physiologie humaine, REVUE DE L EDUCATION PHYSIQUE.
- Marksteiner, J., Sperk, G., Krause, J.E., 1992. Distribution of neurons expressing neurokinin B in the rat brain: Immunohistochemistry and in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.* 317, 341–356. doi:[10.1002/cne.903170403](http://dx.doi.org/10.1002/cne.903170403)
- Marshall, W.A., Tanner, J.M., 1969. Variations in the Pattern of Pubertal Changes in Boys. *Arch. Dis. Child.* 44, 13–23. doi:[10.1136/adc.45.239.13](http://dx.doi.org/10.1136/adc.45.239.13)
- Martinez-Alfaro, J.C., Hernández, H., Flores, J.A., Duarte, G., Fitz-Rodríguez, G., Fernández, I.G., Bedos, M., Chemineau, P., Keller, M., Delgadillo, J.A., Vielma, J., 2014. Importance of intense male sexual behavior for inducing the preovulatory LH surge and ovulation in seasonally anovulatory female goats. *Theriogenology* 82, 1028–1035. doi:[10.1016/j.theriogenology.2014.07.024](http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.07.024)
- Martos-Moreno, G.A., Chowen, J.A., Argente, J., 2010. Metabolic signals in human puberty: effects of over and undernutrition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 324, 70–81. doi:[10.1016/j.mce.2009.12.017](http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.12.017)
- Mason, A.J., Hayflick, J.S., Zoeller, R.T., Young, W.S., Phillips, H.S., Nikolics, K., Seeburg, P.H., 1986. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible

- for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* (80-). 234, 1366–1371. doi:10.1126/science.3024317
- Mayer, C., Acosta-Martinez, M., Dubois, S.L., Wolfe, A., Radovick, S., Boehm, U., Levine, J.E., 2010. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor alpha-signaling in kisspeptin neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 22693–8. doi:10.1073/pnas.1012406108
- Mellado, M., Olivas, R., Ruiz, F., 2000. Effect of buck stimulus on mature and pre-pubertal norgestomet-treated goats. *Small Rumin. Res.* 36, 269–274. doi:10.1016/S0921-4488(99)00122-4
- Melmed, S. (Ed.), 2010. *The Pituitary*, Third edition. Academic Press, Los Angeles.
- Mercer, J.G., Hoggard, N., Williams, L.M., Lawrence, C.B., Hannah, L.T., Morgan, P.J., Trayhurn, P., 1996. Coexpression of leptin receptor and preproneuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* 8, 733–735. doi:10.1046/j.1365-2826.1996.05161.x
- Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Ma, D., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Thresher, R.R., Malinge, I., Lomet, D., Carlton, M.B.L., Colledge, W.H., Caraty, A., Aparicio, S. a J.R., 2005. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1761–1766. doi:10.1073/pnas.0409330102
- Mitsushima, D., Hei, D.L., Terasawa, E., 1994. Gamma-Amino Butiric Acid is An Inhibitory Neurotransmitter Restricting the Release of Luteinizing Hormone Releasing Hormone Before the Onset of Puberty. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 395–399.
- Moenter, S.M., Caraty, A., Karsch, F.J., 1990. The Estradiol-Induced Surge of Gonadotropin-Releasing Hormone in the Ewe. *Endocrinology* 127, 1375–1384.
- Moll, J., Meijs-roelofs, H.M.A., Kramer, P., Dullaart, J., 1976. Effects of electrical stimulation and of direct current and high frequency lesions of the hypothalamus on gonadotrophin release and puberty in female rats. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 16, 433–441.
- Monniaux, D., Caraty, A., Clément, F., Dalbiès-Tran, R., Dupont, J., Fabre, S., Gérard, N., Mermillod, P., Monget, P., Uzbekova, S., 2009. Développement folliculaire ovarien et ovulation chez les mammifères. *INRA Prod. Anim.* 22, 59–76.
- Montgomery, G.W., Martin, G.B., Pelletier, J., 1985. Changes in LH secretion after ovariectomy in Ile-de-France ewes in two seasons. *J. Reprod. Fertil.* 73, 173–183.
- Muñoz, A.L., Bedos, M., Aroña, R.M., Flores, J.A., Hernández, H., Moussu, C., Briefer, E.F., Chemineau, P., Keller, M., Delgado, J.A., 2016. Efficiency of the male effect with photostimulated bucks does not depend on their familiarity with goats. *Physiol. Behav.* 158, 137–142. doi:10.1016/j.physbeh.2016.02.037
- Murata, K., Tamogami, S., Itou, M., Ohkubo, Y., Wakabayashi, Y., Watanabe, H., Okamura, H., Takeuchi, Y., Mori, Y., 2014. Identification of an Olfactory Signal Molecule that Activates the Central Regulator of Reproduction in Goats. *Curr. Biol.* 24, 681–686.

- Murata, K., Wakabayashi, Y., Sakamoto, K., Tanaka, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., Okamura, H., 2011. Effects of Brief Exposure of Male Pheromone on Multiple-Unit Activity at Close Proximity to Kisspeptin Neurons in the Goat Arcuate Nucleus. *J. Reprod. Dev.* 57, 197–202. doi:10.1262/jrd.10-070E
- Murtagh, J.J., Gray, S.J., Lindsay, D.R., Oldham, C.M., 1984. The influence of the “ram effect” in 10-11 month-old Merino ewes on their subsequent performance when introduced to rams again at 15 months of age. *Anim. Prod. Aust.* 15, 490–493.
- Nah, W.H., Park, M.J., Gye, M.C., 2011. Effects of early prepubertal exposure to bisphenol A on the onset of puberty, ovarian weights, and estrous cycle in female mice. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 38, 75–81. doi:10.5653/term.2011.38.2.75
- Nakahara, T., Uenoyama, Y., Iwase, A., Oishi, S., Nakamura, S., Minabe, S., Watanabe, Y., Deura, C., Noguchi, T., Fujii, N., Kikkawa, F., Maeda, K., Tsukamura, H., 2013. Chronic peripheral administration of kappa-opioid receptor antagonist advances puberty onset associated with acceleration of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. *J. Reprod. Dev.* 59, 479–484. doi:10.1262/jrd.2013-046
- Navarro, V.M., Fernández-Fernández, R., Castellano, J.M., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M.L., Gaytan, F., Aguilar, E., Pinilla, L., Dieguez, C., Tena-Sempere, M., 2004. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J. Physiol.* 561, 379–386. doi:10.1113/jphysiol.2004.072298
- Navarro, V.M., Gottsch, M.L., Chavkin, C., Okamura, H., Clifton, D.K., Steiner, R. a, 2009. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J. Neurosci.* 29, 11859–66. doi:10.1523/JNEUROSCI.1569-09.2009
- Nestor, C.C., Briscoe, A.M.S., Davis, S.M., Valent, M., Goodman, R.L., Hileman, S.M., 2012. Evidence of a Role for Kisspeptin and Neurokinin B in Puberty of Female Sheep. *Endocrinology* 153, 2756–2765. doi:10.1210/en.2011-2009
- Ojeda, S.R., Prevot, V., Heger, S., Lomniczi, A., Dziedzic, B., Mungenast, A., 2003. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann. Med.* 35, 244–255. doi:10.1080/07853890310005164
- Oldham, C.M., Gherardi, P.B., Lindsay, D.R., Mackintosh, J.B., Adams, N.R., 1978. The influence of level of feed intake on sperm-producing capacity of testicular tissue in the ram. *Aust. J. Agric. Res.* 29, 173–179.
- Oldham, C.M., Gray, S.J., 1984. The “ram effect” will advance puberty in 9–10 month old Merino ewes independent of their season of birth. *Anim. Prod. Aust.* 15, 727.
- Ortavant, R., Bocquier, F., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J., Volland-Nail, P., 1988. Seasonality of reproduction in sheep and its control by photoperiod. *Aust. J. Biol. Sci.* 41, 69–85.

- Ortavant, R., Pelletier, J., Ravault, J.P., Thimonier, J., Volland-Nail, P., 1985. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.* 7, 305–345.
- Panda, J.N., Turner, C.W., 1968. The role of melatonin in the regulation of thyrotrophin secretion. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. 57, 363–373. doi:10.1113/jphysiol.1968.sp008444
- Papachristoforou, C., Koumas, A., Photiou, C., 2000. Seasonal effects on puberty and reproductive characteristics of female Chios sheep and Damascus goats born in autumn or in February. *Small Rumin. Res.* 38, 9–15. doi:10.1016/S0921-4488(00)00143-7
- Paulin, C., Dubois, M.P., Barry, J., Dubois, P.M., 1977. Immunofluorescence Study of LH-RH Producing Cells in the Human Fetal Hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 182, 341–345.
- Pearce, G.P., Paterson, A., 1992. Physical contact with the boar is required for maximum stimulation of puberty in the gilt because it allows transfer of boar pheromones and not because it induces cortisol release. *Anim. Reprod. Sci.* 27, 209–224. doi:10.1016/0378-4320(92)90059-M
- Pelletier, J., Garnier, D.H., de Reviere, M.M., Terqui, M., Ortavant, R., 1982. Seasonal variation in LH and testosterone release in rams of two breeds. *J. Reprod. Fertil.* 64, 341–346. doi:10.1530/jrf.0.0640341
- Peluso, J.J., 2013. Progesterone receptor membrane component 1 and its role in ovarian follicle growth. *Front. Neurosci.* 7, 1–7. doi:10.3389/fnins.2013.00099
- Peragine, D.E., Pokarowski, M., Mendoza-Viveros, L., Swift-Gallant, A., Cheng, H.-Y.M., Bentley, G.E., Holmes, M.M., 2017. RFamide-related peptide-3 (RFRP-3) suppresses sexual maturation in a eusocial mammal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 1207–1212. doi:10.1073/pnas.1616913114
- Perry, G.A., 2016. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. *Theriogenology* 86, 373–378. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.051
- Pineda, R., Garcia-Galiano, D., Sanchez-Garrido, M.A., Romero, M., Ruiz-Pino, F., Aguilar, E., Dijcks, F.A., Blumenröhr, M., Pinilla, L., van Noort, P.I., Tena-Sempere, M., 2010. 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, E39-46. doi:10.1152/ajpendo.00108.2010
- Plant, T.M., Zeleznik, A., Knobil, E., 2015a. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction 4th Edition. Academic Press.
- Plant, T.M., Zeleznik, A.J., Hazlerigg, D., Simplício, A.A., 2015b. Chapter 34 – Seasonal Regulation of Reproduction in Mammals, in: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. pp. 1575–1604. doi:10.1016/B978-0-12-397175-3.00034-X
- Poling, M.C., Kauffman, A.S., 2015. Regulation and Function of RFRP-3 (GnIH) Neurons during Postnatal Development. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6, 3–8. doi:10.3389/fendo.2015.00150
- Poling, M.C., Kim, J., Dhamija, S., Kauffman, A.S., 2012. Development, sex steroid regulation,

- and phenotypic characterization of RFamide-related peptide (Rfrp) gene expression and RFamide receptors in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* 153, 1827–1840. doi:10.1210/en.2011-2049
- Poling, M.C., Quennell, J.H., Anderson, G.M., Kauffman, A.S., 2013. Kisspeptin neurones do not directly signal to RFRP-3 neurones but RFRP-3 may directly modulate a subset of hypothalamic kisspeptin cells in mice. *J. Neuroendocrinol.* 25, 876–886. doi:10.1111/jne.12084
- Ponce, J.L., Hernández, H., Flores, J.A., Keller, M., Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 2015. One day of contact with photostimulated bucks is sufficient to induce ovulation in seasonally anestrus goats. *Theriogenology* 84, 880–886. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.05.019
- Ponce, J.L., Velázquez, H., Duarte, G., Bedos, M., Hernández, H., Keller, M., Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 2014. Reducing exposure to long days from 75 to 30 days of extra-light treatment does not decrease the capacity of male goats to stimulate ovulatory activity in seasonally anovulatory females. *Domest. Anim. Endocrinol.* 48, 119–125. doi:10.1016/j.domaniend.2014.03.002
- Qi, Y., Oldfield, B.J., Clarke, I.J., 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, 690–697. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01886.x
- R Core Team, 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing, in: R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Ramaswamy, S., Guerriero, K.A., Gibbs, R.B., Plant, T.M., 2008. Structural interactions between kisspeptin and GnRH neurons in the mediobasal hypothalamus of the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*) as revealed by double immunofluorescence and confocal microscopy. *Endocrinology* 149, 4387–4395. doi:10.1210/en.2008-0438
- Ramírez, S., Bedos, M., Chasles, M., Hernández, H., Flores, J.A., Vielma, J., Duarte, G., Retana-Márquez, M.S., Keller, M., Chemineau, P., Delgadillo, J.A., 2016. Fifteen minutes of daily contact with sexually active male induces ovulation, but delays its timing in seasonally anestrus goats. *Theriogenology* xxx, xxx. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.08.019
- Ramirez, D. V, McCann, S.M., 1963. Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats. *Endocrinology* 72, 452–464. doi:10.1210/endo-72-3-452
- Roberson, M.S., Ansotegui, R.P., Berardinelli, J.G., Whitman, R.W., McInerney, M.J., 1987. Influence of Biostimulation by Mature Bulls on Occurrence of Puberty in Beef Heifers. *J. Anim. Sci.* 64, 1601–1605.
- Robinson, T.J., 1954. The necessity for progesterone with estrogen for the induction of recurrent estrus in the ovariectomized ewe. *Endocrinology* 55, 403–408.
- Rodríguez, I., Araki, K., Khatib, K., Martinou, J.C., Vassalli, P., 1997. Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2. *Dev. Biol.* 184, 115–121. doi:10.1006/dbio.1997.8522

- Rollag, M.D., Niswender, G.D., 1976. Radioimmunoassay of Serum Concentrations of Melatonin in Sheep Exposed to Different Lighting Regimens. *Endocrinology* 98, 482–489. doi:10.1210/endo-98-2-482
- Rosa, H.J.D., Bryant, M.J., 2003. Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rumin. Res.* 48, 155–171. doi:10.1016/S0921-4488(03)00038-5
- Safranski, T.J., Lamberson, W.R., Keisler, D.H., 1993. Correlations among Three Measures of Puberty in Mice and Relationships with Estradiol Concentration and Ovulation. *Biol. Reprod.* 48, 669–673.
- Sakamoto, K., Murata, K., Wakabayashi, Y., Yyou, K., Ohkura, S., Takeuchi, Y., Mori, Y., Okamura, H., 2012. Central administration of neurokinin B activates kisspeptin/NKB neurons in the arcuate nucleus and stimulates luteinizing hormone secretion in ewes during the non-breeding season. *J. Reprod. Dev.* 8, 700–706. doi:DN/JST.JSTAGE/jrd/2011-038 [pii]
- Scaramuzzi, R.J., Tillson, S.A., Thorneycroft, I.H., Caldwell, B. V, 1971. Action of exogenous progesterone and oestrogene on behavioural oestrus and luteinising hormone levels in the ovariectomised ewe. *Endocrinology* 88, 1184–1189.
- Schally, A. V, Arimura, A., Baba, Y., Nair, R.M.G., Matsuo, H., Redding, T.W., Debeljuk, L., 1971. Isolation and Properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 393–399.
- Schätzle, P., Wuttke, R., Ziegler, U., Sonderegger, P., 2012. Automated quantification of synapses by fluorescence microscopy. *J. Neurosci. Methods* 204, 144–149. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.11.010
- Schwanzel-Fukuda, M., Pfaff, D.W., 1989. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338, 161–164.
- Seminara, S.B., Messenger, S., Chatzidaki, E.E., Thresher, R.R., Acierno, J.S., Shagoury, J.K., Bo-Abbas, Y., Kuohung, W., Schwinof, K.M., Hendrick, A.G., Zahn, D., Dixon, J., Kaiser, U.B., Slaughaupt, S.A., Gusella, J.F., O’Rahilly, S., Carlton, M.B.L., Crowley Jr, W.F., Aparicio, S.A.J.R., Colledge, W.H., 2003. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N. Engl. J. Med.* 349, 1614–1627. doi:10.1056/NEJMoa035322
- Sharma, J.C., 1983. The genetic contribution to pubertal growth and development studied by longitudinal growth data on twins. *Ann. Hum. Biol.* 10, 163–171.
- Shelton, M., 1960. Influence of the Presence of a Male Goat on the Initiation of Estrous Cycling and Ovulation of Angora Does. *J. Anim. Sci.* 19, 368–375.
- Shelton, M., 1978. Reproduction and Breeding of Goats. *J. Dairy Sci.* 61, 994–1010. doi:10.3168/jds.S0022-0302(78)83680-7
- Siler-Khodr, T.M., Khodr, G.S., 1980. Studies in human fetal endocrinology: II. LH and FSH content and concentration in the pituitary. *Obstet. Gynecol.* 56, 176–181.
- Silverman, A.J., Antunes, J.L., Ferin, M., Zimmerman, E.A., 1977. The Distribution of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) in the Hypothalamus of the Rhesus

- Monkey. Light Microscopic Studies Using Immunoperoxidase Technique. *Endocrinology* 101, 134–142.
- Simonneaux, V., Ancel, C., 2012. RFRP neurons are critical gatekeepers for the photoperiodic control of reproduction. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 3, 1–9. doi:10.3389/fendo.2012.00168
- Sklar, C.A., Mueller, P.L., Gluckman, P.D., Kaplan, S.L., Rudolph, A.M., Grumbach, M.M., 1981. Hormone ontogeny in the ovine fetus. VII. Circulating luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in mid- and late gestation. *Endocrinology* 108, 874–880.
- Slob, A.K., Ooms, M.P., Vreeburg, J.T.M., 1980. Prenatal and Early Postnatal Sex Differences in Plasma and Gonadal Testosterone and Plasma Luteinizing Hormone in Female and Male Rats. *J. Endocrinol.* 87, 81–87.
- Smith, J.T., Acohido, B. V, Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2006a. KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J. Neuroendocrinol.* 18, 298–303. doi:10.1111/j.1365-2826.2006.01417.x
- Smith, J.T., Coolen, L.M., Kriegsfeld, L.J., Sari, I.P., Jaafarzadehshirazi, M.R., Maltby, M., Bateman, K., Goodman, R.L., Tilbrook, A.J., Ubuka, T., Bentley, G.E., Clarke, I.J., Lehman, M.N., 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, 5770–5782. doi:10.1210/en.2008-0581
- Smith, J.T., Cunningham, M.J., Rissman, E.F., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 2005. Regulation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Female Mouse. *Endocrinology* 146, 3686–3692. doi:10.1210/en.2005-0488
- Smith, J.T., Li, Q., Pereira, A., Clarke, I.J., 2009. Kisspeptin Neurons in the Ovine Arcuate Nucleus and Preoptic Area Are Involved in the Preovulatory Luteinizing Hormone Surge. *Endocrinology* 150, 5530–5538. doi:10.1210/en.2009-0712
- Smith, J.T., Li, Q., Yap, K.S., Shahab, M., Roseweir, A.K., Millar, R.P., Clarke, I.J., 2011. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology* 152, 1001–1012. doi:10.1210/en.2010-1225
- Smith, J.T., Popa, S.M., Clifton, D.K., Hoffman, G.E., Steiner, R.A., 2006b. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J. Neurosci.* 26, 6687–6694. doi:10.1523/JNEUROSCI.1618-06.2006
- Smyth, C., Wilkinson, M., 1994. A Critical Period for Glutamate Receptor-Mediated Induction of Precocious Puberty in Female Rats. *J. Neuroendocrinol.* 6, 275–284. doi:10.1111/j.1365-2826.1994.tb00583.x
- Sone, M., Nagata, H., Takekoshi, S., Osamura, Y., 2001. Expression and localization of leptin receptor in the normal rat pituitary gland. *Cell Tissue Res.* 305, 351–356. doi:10.1007/s004410100407

- Stevens, K., Perry, G.C., Long, S.E., 1982. Effect of ewe urine and vaginal secretions on ram investigative behavior. *J. Chem. Ecol.* 8, 23–29.
- Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M., Strosberg, A.D., 1998. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat. Genet.* 18, 213–215. doi:10.1038/ng0598-51
- Sullivan, K.A., Witkin, J.W., Ferin, M., Silverman, A.-J., 1995. Gonadotropin-releasing hormone neurons in the rhesus macaque are not immunoreactive for the estrogen receptor. *Brain Res.* 685, 198–200.
- Szymanski, L.A., Keller, M., 2014. Activation of the olfactory system in response to male odors in female prepubertal mice. *Behav. Brain Res.* 271, 30–38. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.051
- Teague, L.G., Bradley, E.L., 1978. The existence of a puberty accelerating pheromone in the urine of the male prairie deer mouse (*Peromyscus maniculatus bairdii*). *Biol. Reprod.* 19, 314–317. doi:10.1095/biolreprod19.2.314
- Thompson, L.H., Savage, J.S., 1978. Age at Puberty and Ovulation rate in Gilts in Confinement as Influenced by Exposure to a Boar. *J. Anim. Sci.* 47, 1141–1144.
- Thorpe, J.B., DeCatanzaro, D., 2012. Oestradiol treatment restores the capacity of castrated males to induce both the Vandenberg and the Bruce effects in mice (*Mus musculus*). *Reproduction* 143, 123–132. doi:10.1530/REP-11-0251
- Topaloglu, A.K., Reimann, F., Guclu, M., Yalin, A.S., Kotan, L.D., Porter, K.M., Serin, A., Mungan, N.O., Cook, J.R., Ozbek, M.N., Imamoglu, S., Akalin, N.S., Yuksel, B., O’Rahilly, S., Semple, R.K., 2009. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat. Genet.* 41, 354–8. doi:10.1038/ng.306
- Towne, B., Czerwinski, S. a, Demerath, E.W., Blangero, J., Roche, A.F., Siervogel, R.M., 2005. Heritability of age at menarche in girls from the Fels Longitudinal Study. *Am. J. Phys. Anthropol.* 128, 210–219. doi:10.1002/ajpa.20106
- Tricoire, H., Locatelli, A., Chemineau, P., Malpoux, B., 2002. Melatonin enters the cerebrospinal fluid through the pineal recess. *Endocrinology* 143, 84–90. doi:10.1210/en.143.1.84
- Tsutsui, K., Saigoh, E., Ukena, K., Teranishi, H., Fujisawa, Y., Kikuchi, M., Ishii, S., Sharp, P.J., 2000. A Novel Avian Hypothalamic Peptide Inhibiting Gonadotropin Release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 661–667. doi:10.1006/bbrc.2000.3350
- Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.I., 2014. KNDy neuron as a gatekeeper of puberty onset. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40, 1518–1526. doi:10.1111/jog.12398
- Ungerfeld, R., 2016. Reproductive response of mature and nulliparous yearling ewes to the ram effect during the non-breeding season. *Small Rumin. Res.* doi:10.1016/j.smallrumres.2016.05.017
- Urbanski, H.F., Ojeda, S.R., 1987. Activation of luteinizing hormone-releasing hormone

- release advances the onset of female puberty. *Neuroendocrinology* 46, 273–276. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2
- Urrutia-Morales, J., Meza-Herrera, C.A., Escobar-Medina, F.J., Gamez-Vazquez, H.G., Ramirez-Andrade, B.M., Diaz-Gomez, M.O., González-Bulnes, A., 2009. Relative roles of photoperiodic and nutritional cues in modulating ovarian activity in goats. *Reprod. Biol.* 9, 283–294. doi:10.1016/S1642-431X(12)60032-1
- van den Pol, A.N., Trombley, P.Q., 1993. Glutamate neurons in hypothalamus regulate excitatory transmission. *J. Neurosci.* 13, 2829–2836.
- Van Lancker, S., Van Den Broeck, W., Simoens, P., 2005. Morphology of caprine skin glands involved in buck odour production. *Vet. J.* 170, 351–358. doi:10.1016/j.tvjl.2004.08.017
- Vandenbergh, J.G., 1967. Effect of the presence of a male on the sexual maturation of female mice. *Endocrinology* 81, 345–349. doi:10.1210/endo-81-2-345
- Vandenbergh, J.G., 1969. Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology* 84, 658–660. doi:10.1210/endo-84-3-658
- Vandenbergh, J.G., 1974. Social determinants of the onset of puberty in rodents. *J. Sex Res.* 10, 181–193. doi:10.1080/00224497409550849
- Vandenbergh, J.G., 1976. Acceleration of sexual maturation in female rats by male stimulation. *J. Reprod. Fertil.* 46, 451–453. doi:10.1530/jrf.0.0460451
- Vandenbergh, J.G., Drickamer, L.C., Colby, D.R., 1972. Social and dietary factors in the sexual maturation of female mice. *J. Reprod. Fertil.* 28, 397–405. doi:10.1530/jrf.0.0280397
- Véliz, F.G., Poindron, P., Malpoux, B., Alberto Delgadillo, J., Delgadillo, J.A., 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, 657–661. doi:10.1051/rnd:2006039
- Vidal, A., Zhang, Q., Médigue, C., Fabre, S., Clément, F., 2012. Dynpeak: An algorithm for pulse detection and frequency analysis in hormonal time series. *PLoS One* 7, e39001. doi:10.1371/journal.pone.0039001
- Vielma, J., Chemineau, P., Poindron, P., Malpoux, B., Delgadillo, J.A., 2009. Male sexual behavior contributes to the maintenance of high LH pulsatility in anestrus female goats. *Horm. Behav.* 56, 444–449. doi:10.1016/j.yhbeh.2009.07.015
- Waite, C., Gerald, M.E., Little, A.C., Kraiselburd, E., 2006. Selective Attention Toward Female Secondary Sexual Color in Male Rhesus Macaques. *Am. J. Primatol.* 68, 738–744. doi:10.1002/ajp
- Wakabayashi, Y., Mori, Y., Ichikawa, M., Yazaki, K., Hagino-Yamagishi, K., 2002. A Putative Pheromone Receptor Gene Is Expressed in Two Distinct Olfactory Organs in Goats. *Chem. Senses* 27, 207–213. doi:10.1093/chemse/27.3.207
- Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V.M., Clifton, D.K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K.-I., Steiner, R.A., Okamura, H., 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, 3124–3132. doi:10.1523/jneurosci.5848-09.2010
- Wakabayashi, Y., Ohkura, S., Okamura, H., Mori, Y., Ichikawa, M., 2007. Expression of a vomeronasal receptor gene (V1r) and G protein α subunits in goat, *Capra hircus*, olfactory receptor neurons. *J. Comp. Neurol.* 503, 371–380. doi:10.1002/cne.21394
- Wakabayashi, Y., Yamamura, T., Sakamoto, K., Mori, Y., Okamura, H., 2013. Electrophysiological and Morphological Evidence for Synchronized GnRH Pulse Generator Activity Among Kisspeptin/Neurokinin B/Dynorphin A (KNDy) Neurons in Goats. *J. Reprod. Dev.* 59, 40–48. doi:10.1262/jrd.2012-136
- Walkden-Brown, S.W., Bocquier, F., 2010. Nutritional regulation of reproduction in goats, in: Presented at the International Conference on Goats. France, pp. 389–395.
- Walkden-Brown, S.W., Martin, G.B., Restall, B.J., 1999. Role of male-female interaction in regulating reproduction in sheep and goats. *J. Reprod. Fertil.* 52, 243–257.
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Henniawati, 1993a. The male effect in the Australian cashmere goat. 1. Ovarian and behavioural response of seasonally anovulatory does following the introduction of bucks. *Anim. Reprod. Sci.* 32, 41–53. doi:10.1016/0378-4320(93)90056-W
- Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Henniawati, 1993b. The male effect in the Australian cashmere goat. 2. Role of olfactory cues from the male. *Anim. Reprod. Sci.* 32, 55–67. doi:10.1016/0378-4320(93)90057-X
- Watanabe, G., Terasawa, E., 1989. In vivo release of luteinizing hormone releasing hormone increases with puberty in the female rhesus monkey. *Endocrinology* 125, 92–99.
- Watanobe, H., 2002. Leptin directly acts within the hypothalamus to stimulate gonadotropin-releasing hormone secretion *in vivo* in rats. *J. Physiol.* 545, 255–268. doi:10.1113/jphysiol.2002.023895
- Weems, P.W., Witty, C.F., Amstalden, M., Coolen, L.M., Goodman, R.L., Lehman, M.N., 2016. κ -opioid receptor is colocalized in GnRH and KNDy cells in the female ovine and rat brain. *Endocrinology* 157, 2367–2379. doi:10.1210/en.2015-1763
- Whisnant, C.S., Goodman, R.L., 1988. Effects of an opioid antagonist on pulsatile luteinizing hormone secretion in the ewe vary with changes in steroid negative feedback. *Biol. Reprod.* 39, 1032–1038. doi:10.1095/biolreprod39.5.1032
- Wildt, D.E., Seager, S.W.J., Chakraborty, P.K., 1981. Behavioral, Ovarian and Endocrine Relationships in the Pubertal Bitch. *J. Anim. Sci.* 53, 182–191.
- Wildt, L., Häusler, A., Marshall, G., Hutchinson, J.S., Plant, T.M., Belchetz, P.E., Knobil, E., 1981. Frequency and Amplitude of Gonadotropin-Releasing Hormone Stimulation and Gonadotropin Secretion in the Rhesus Monkey. *Endocrinology* 109, 376–385.
- Wildt, L., Marshall, G., Knobil, E., 1980. Experimental Induction of Puberty in the Infantile

Female Rhesus Monkey. *Science* (80-). 207, 1373–1375.

- Winter, J.S., Faiman, C., Hobson, W.C., Prasad, A. V., Reyes, F.I., 1975. Pituitary-gonadal relations in infancy. I. Patterns of serum gonadotropin concentrations from birth to four years of age in man and chimpanzee. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40, 545–551. doi:10.1210/jcem-40-4-545
- Wintermantel, T.M., Campbell, R.E., Porteous, R., Bock, D., Gröne, H.J., Todman, M.G., Korach, K.S., Greiner, E., Pérez, C.A., Schütz, G., Herbison, A.E., 2006. Definition of Estrogen Receptor Pathway Critical for Estrogen Positive Feedback to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons and Fertility. *Neuron* 52, 271–280. doi:10.1016/j.neuron.2006.07.023
- Wise, P.M., Ratner, A., 1980. Effect of ovariectomy on plasma LH, FSH, estradiol, and progesterone and medial basal hypothalamic LHRH concentrations old and young rats. *Neuroendocrinology* 30, 15–19.
- Wray, S., Grant, P., Gainer, H., 1989. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 8132–8136. doi:10.1073/pnas.86.20.8132
- Wray, S., Hoffman, G.E., 1986. Postnatal Morphological Changes in Rat LHRH Neurons Correlated with Sexual Maturation. *Neuroendocrinology* 43, 93–97.
- Yang, J.J., Caligioni, C.S., Chan, Y.-M., Seminara, S.B., 2012. Uncovering novel reproductive defects in neurokinin B receptor null mice: Closing the gap between mice and men. *Endocrinology* 153, 1498–1508. doi:10.1210/en.2011-1949
- Yee, J., Limenta, L.M., Rogers, K., Rogers, S., Tay, V.S., Lee, E.J., 2014. Ensuring good quality rna for quantitative real-time pcr isolated from renal proximal tubular cells using laser capture microdissection. *BMC Res. Notes* 7, 62. doi:10.1186/1756-0500-7-62
- Yellon, S.M., Foster, D.L., 1985. Alternate photoperiods time puberty in the female lamb. *Endocrinology* 116, 2090–2097. doi:10.1210/endo-116-5-2090
- Yen, S.S.C., Tsai, C.C., 1971. The Effect of Ovariectomy on Gonadotropin Release. *J. Clin. Invest.* 50, 1149–1153.
- Young, J., Bouligand, J., Francou, B., Raffin-Sanson, M.L., Gaillez, S., Jeanpierre, M., Grynberg, M., Kamenicky, P., Chanson, P., Brailly-Tabard, S., Guiochon-Mantel, A., 2010. TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 2287–2295. doi:10.1210/jc.2009-2600
- Zarazaga, L.A., Gatica, M.C., Hernández, H., Gallego-Calvo, L., Delgadillo, J.A., Guzmán, J.L., 2017. The isolation of females from males to promote a later male effect is unnecessary if the bucks used are sexually active. *Theriogenology* 95, 42–47. doi:10.1016/j.theriogenology.2017.02.023
- Zarazaga, L.A., Guzmán, J.L., Domínguez, C., Pérez, M.C., Prieto, R., Sánchez, J., 2009. Nutrition level and season of birth do not modify puberty of Payoya goat kids. *Animal* 3,

79–86. doi:10.1017/S1751731108003376

Zimmerman, D.R., Spies, H.G., Self, H.L., Casida, L.E., 1959. Ovulation rate in swine as affected by increased energy intake just prior to ovulation. *J. Anim. Sci.* 19, 295–301.

Zuccolilli, G.O., Hamada, T., Ichikawa, M., Mori, Y., 1994. Sexual Dimorphism of Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) in the Goat Hypothalamus. *J. Reprod. Dev.* 40, 27–32.

Induction d'une maturation sexuelle précoce chez la chevrette par une exposition prépubertaire au mâle.

Résumé

Chez les rongeurs, les facteurs sociaux sont connus pour pouvoir moduler la transition pubertaire. Ainsi une jeune souris femelle mise en contact avec un mâle adulte présentera une ouverture vaginale plus précoce qu'une femelle isolée du mâle. L'objectif de ma thèse a été de caractériser les conséquences d'une exposition précoce au mâle dans l'espèce caprine. Les caprins sont une espèce dont la reproduction est saisonnée et permettant, de par sa taille, une étude plus fine des sécrétions endocrines que les rongeurs. Nos résultats ont permis de mettre en évidence que la présence de boucs sexuellement actifs induit une puberté précoce chez les chevrettes, l'ovulation pouvant être induite dès l'âge de 3 mois et demi. Les femelles présentent suite à cette première ovulation une cyclicité régulière ainsi qu'une maturation précoce du tractus génital. Le niveau d'activité sexuelle du bouc est un facteur crucial à l'induction d'une puberté précoce chez la chèvre puisque la présence de mâles castrés n'a aucun effet et que les femelles sont toutes pubères dans le mois suivant l'entrée en saison sexuelle des mâles. Ce travail démontre, dans l'espèce caprine, un rôle crucial de l'environnement social dans la régulation de la maturation sexuelle. Plus particulièrement, cela met en évidence que la présence de boucs peut réactiver efficacement et de manière très précoce l'axe gonadotrope de jeunes chèvres immatures.

Mots clés : Puberté, Environnement social, Ovulation, Hypothalamus, LH, Comportement sexuel, Caprins

Résumé en anglais

In rodents, social factors are known to modulate the pubertal transition. Hence, young female mice exposed to adult male exhibit an earlier vaginal opening than young females isolated from male. The aim of my thesis was to characterize the consequences of a precocious exposure to male in another specie, goats. Goats are seasonal breeders and due to their size the fine study of endocrine secretions is easier than in rodents. Our results highlighted that an early exposure to sexually active bucks induces a precocious puberty in young female goats. The first ovulation can be induced as early as 3.5 months old, following this induced first ovulation, goats remain cycling regularly. Females precociously exposed to bucks also exhibit an acceleration of the genital tract maturation. The level of sexual activity of the male is a crucial criteria to induce a precocious puberty in goats as exposure to castrated bucks had no effect on the age at puberty. Moreover, all females exposed to intact bucks ovulated for the first time within a month after buck started to exhibit sexual behaviors. This work revealed, in goats, a crucial role of the social environment on the regulation of sexual maturation. More precisely, it highlights that exposure to bucks is highly efficient to reactivate precociously the gonadotrope axis of young immature goats.

Keywords: Puberty, Social environment, Ovulation, Hypothalamus, LH, Sexual behavior, Goats