

nr 910246 Non microfilmé

Institut d'Elevage et de Médecine
Vétérinaire des Pays Tropicaux
10, rue Pierre Curie
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort
7, avenue du Général-de-Gaulle
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

9874

Institut National Agronomique
Paris-Grignon
16, rue Claude Bernard
75005 PARIS

Muséum National d'Histoire Naturelle
57, rue Cuvier
75005 PARIS

**BIBLIOTHÈQUE
IEMVT**
10 rue P. Curie
94704 MAISONS-ALFORT Cedex



DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

**UTILISATION DE LA NALOXONE
POUR LA MAITRISE DE LA REPRODUCTION
CHEZ LA CHEVRE**

par

Jean Baptiste GARDY

année universitaire 1990 - 1991



Station de Physiologie de la Reproduction
NOUZILLY
37380 MONNAIE

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

UTILISATION DE LA NALOXONE
POUR LA MAITRISE DE LA REPRODUCTION
CHEZ LA CHEVRE

par

Jean-Baptiste GARDY

Lieu de stage : NOUZILLY

Organisme d'accueil : INRA Station de Physiologie de la Reproduction

Période du stage : 26 avril au 31 août 1991

Rapport présenté oralement le : 30 septembre 1991

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été réalisé dans l'Unité de Neuroendocrinologie Sexuelle de la Station Physiologie de la Reproduction de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

Je tiens à remercier de façon spéciale Monsieur Philippe CHEMINEAU de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour le précieux encadrement dont j'ai été l'objet.

Mes remerciements vont également à tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce travail. Je pense, en particulier, à Madame DAVEAU, Mademoiselle MAURICE et l'équipe du laboratoire de dosages, ainsi qu'à Monsieur Alain CARATY.

Pour sa gentillesse et son précieux support moral, Mademoiselle Karinne MILVILLE a aussi droit à mon remerciement et mon admiration.

S O M M A I R E

I - INTRODUCTION

II - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 - Saisonnement de la reproduction des caprins des zones tempérées

2.2 - Les différentes techniques d'induction de l'oestrus chez la chèvre

2.2.1 - *Les traitements photopériodiques*

2.2.2 - *L'effet bouc et effet chèvre induite*

2.2.3 - *Les traitements hormonaux*

2.2.4 - *Conclusion partielle*

2.3 - Les peptides opioïdes endogènes

2.3.1 - *Mise en évidence des opioïdes endogènes*

2.3.2 - *Les peptides opioïdes endogènes et leurs précurseurs*

2.3.3 - *Les peptides opioïdes et leurs récepteurs spécifiques*

2.3.4 - *Influence des peptides opioïdes endogènes sur les sécrétions hypophysaires*

2.4 - Les antagonistes des opioïdes endogènes

2.4.1 - *La naloxone et son mode d'action*

2.4.2 - *Influence de la naloxone sur la sécrétion des hormones hypophysaires gonadotropes chez les mammifères non saisonnés*

2.4.3 - *Influence de la naloxone sur la sécrétion de LH chez les mammifères saisonnés*

1) naloxone chez les ovins

2) La naloxone chez la chèvre

2.5 - Conclusion partielle

III - MATERIELS ET METHODES

3.1 - Méthodologie commune aux deux expériences

- Saison d'expérimentation
- Les détections de chaleurs
- Mise en lot
- Prélèvements sanguins
- Dosage de LH
- Dosage de la progestérone

3.2 - Méthodologie particulière de la première expérience

- Animaux
- Doses de naloxone administrées et Préparation

3.3 - Méthodologie particulière de la deuxième expérience

- Animaux
- naloxone et préparation des doses
- Endoscopie

3.4 - Analyse des résultats

IV - RESULTATS

4.1 - Première expérience : Influence des différentes doses de naloxone

4.2 - Deuxième expérience : Administration prolongée de naloxone

4.3 - Suivi du comportement d'oestrus et de l'ovulation

4.4 - Discussion

V - CONCLUSION GENERALE

RESUME

Ce travail consistant à montrer que la naloxone est capable d'influencer la pulsativité de la LH chez la chèvre en anoestrus est réalisé en deux étapes.

Dans une première expérience (effet dose) réalisée au mois de Mai, trois doses de naloxone (0,5 mg, 1 mg et 5 mg) sont administrées séparément par injection à différents lots de chèvres, en comparaison avec un lot témoin recevant du sérum physiologique. Trois chèvres sur cinq répondent à l'injection de 5 mg de naloxone ($P < 0,05$).

Dans une deuxième expérience (administration à répétition) réalisée au mois de Juin, les chèvres ont reçu par perfusion et/ou par injection des doses quotidiennes de naloxone (10 mg et 20 mg) pendant une période de 8 jours. La comparaison se fait avec un lot témoin ayant reçu durant cette période du sérum physiologique. L'analyse des résultats obtenus montre que la dose 10 mg, administrée par injection à raison de deux demi doses (5 mg) à 12 heures d'intervalle, augmente significativement par rapport au témoin le taux plasmatique moyen de LH (0,73 vs 0,60 ng/ml ; $P < 0,05$), la fréquence des pulses (0,90 vs 0,28 pulse en 6 heures ; $P < 0,05$) et leur amplitude (1,58 vs 0,72 ng/ml ; $P = 0,05$).

Aucun effet significatif n'est observé dans les autres lots. Un comportement d'oestrus est observé chez 3 chèvres sur 7 du lot 10 mg injection et chez 3 sur 4 du lot 20 mg perfusion. Cependant, l'endoscopie réalisée n'a révélé aucun signe d'ovulation chez aucune des femelles.

I - INTRODUCTION

Chez les petits ruminants (ovins, caprins), la durée de la saison de reproduction varie en fonction de la latitude. Près de l'Equateur, ils sont capables de se reproduire toute l'année, alors que sous les latitudes moyennes et élevées la saison de reproduction a une durée limitée. En France, les caprins sont au repos sexuel pendant à peu près les deux tiers de l'année, ce qui entraîne chez eux une alternance entre une saison sexuelle et une saison d'anoestrus.

Chez le bouc Alpin, il existe des modifications au cours de l'année du comportement sexuel et de l'activité spermatogénétique (10). Ces variations saisonnières de l'activité spermatogénétique se manifestent également par une diminution du poids testiculaire en période d'anoestrus.

Chez la chèvre Alpine, la saison de reproduction est caractérisée, en absence de gestation, par une activité oestrienne et ovarienne régulière, et la saison d'anoestrus un arrêt complet de ces activités. De ce fait, dans les conditions naturelles, les mise bas ont lieu à la fin de l'hiver et au printemps et l'essentiel de la production laitière est collectée à la fin de celui-ci. Dans ces conditions, il n'y a pas d'articulation entre l'offre et la demande de fromage de chèvre.

N.B. Les nombres entre parenthèses () correspondent aux références bibliographiques.

Il existe déjà depuis longtemps des techniques d'induction du comportement d'oestrus et de l'ovulation bien connues et utilisées par les éleveurs de chèvres. Des recherches sont en cours en vue de les perfectionner et d'en proposer d'autres.

Ce travail ne consiste pas à essayer une nouvelle technique mais à tester, compte-tenu du caractère polyfactoriel du mécanisme de l'activité hypothalamo-hypophysaire, une molécule bien connue en pharmacologie et en recherche fondamentale, la naloxone qui est un excellent antiopiacé, en vue de déterminer la plus faible dose pouvant provoquer des décharges significatives de LH en période d'anoestrus chez la chèvre Alpine française. Ceci permettra de juger de la possibilité d'un éventuel emploi de molécules similaires dans la mise en place de nouvelles techniques d'induction du comportement d'oestrus et de l'ovulation.

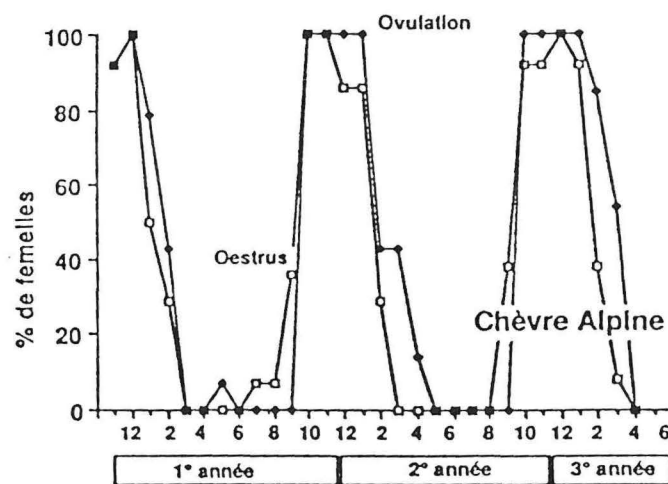


Fig. 1 : Distribution de l'oestrus et de l'ovulation pendant 3 années consécutives chez la Chèvre alpine française. D'après CHEMINEAU, 1989 (10).

II - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 - Saisonnement de la reproduction des caprins des zones tempérées

L'étude de la distribution des saillies fécondantes au cours de l'année chez la chèvre Alpine en Zone tempérée (10) montre un saisonnement très marqué avec une alternance d'une période où aucune fécondation n'est observée et une autre où toutes les fécondations annuelles sont regroupées. Il y a donc naturellement, chez la chèvre originaire des zones tempérées, une période d'activité et une période de repos sexuel. En l'absence de toute stimulation, les premières chaleurs se manifestent après le mois de Septembre et se succèdent jusqu'en Février en absence de gestation (10). De ce fait, les chèvres sont au repos sexuel pendant les deux tiers de l'année et ne peuvent être fécondées. Cette distribution des périodes de repos et d'activité sexuelle est stable dans le temps et dans l'espace, puisque quelles que soient les années et les zones d'élevage, le même phénomène est observé (Fig. 1).

Des chèvres Alpines, maintenues artificiellement dans un bâtiment photopériodique sous une photopériode tropicale simulée (11 à 13 heures de lumière par jour) pendant trente mois, commencent et terminent leur activité de comportement d'oestrus et leur activité ovulatoire à peu près en même temps que les femelles témoins maintenues sous le régime photopériodique tempéré : 8 à 16 heures de lumière par jour (10) (Fig. 2).

La photopériode constitue dans leur milieu d'origine le principal facteur entraîneur de l'activité saisonnière de reproduction (anoestrus saisonnier) des races ou des

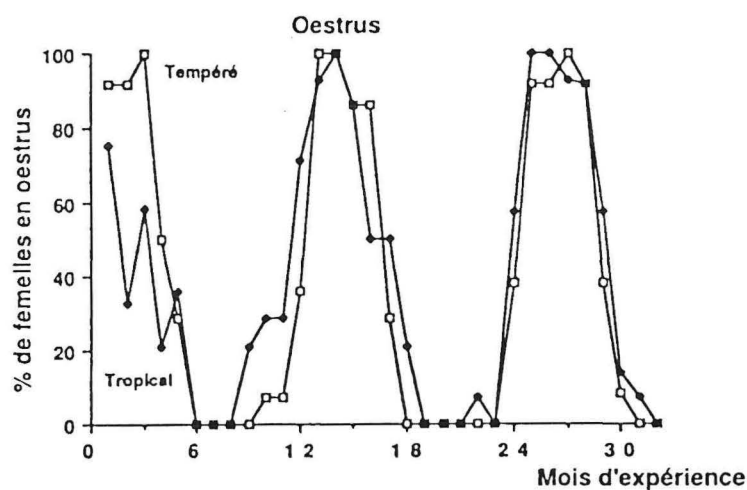


Fig. 2 : Distribution de l'oestrus chez deux groupes de chèvres alpines dont l'un placé en photo-période tropicale et l'autre, le témoin, tempérée (d'après CHEMINEAU, 1989) (10).

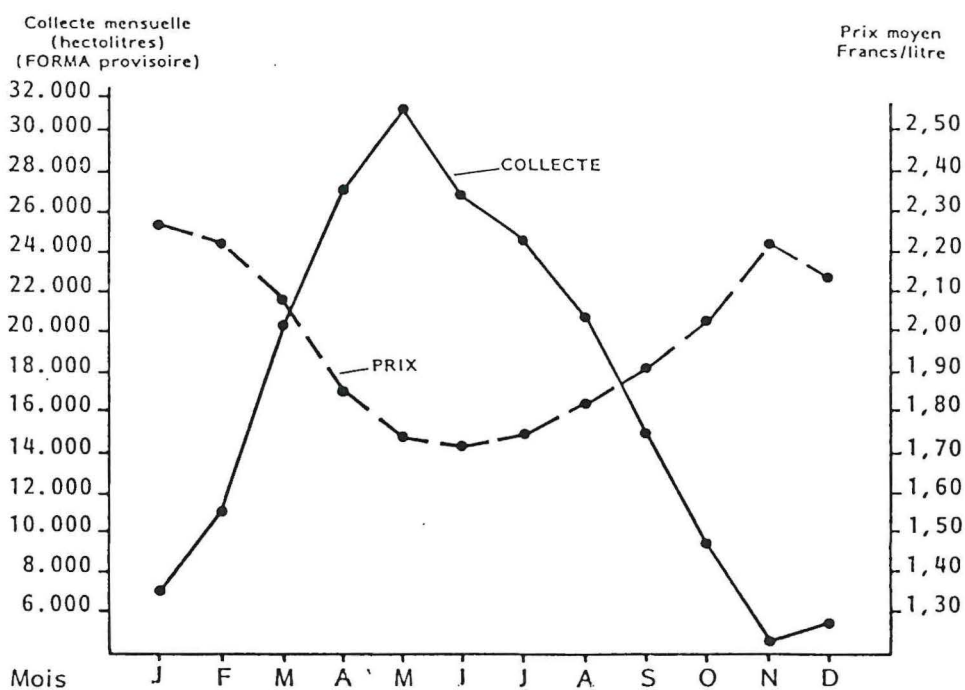


Fig. 3 : Variation de la quantité de lait collectée et du prix en fonction des périodes de l'année, d'après DIVOUX, 1989. Cité par SALTNER, 1989 (47).

populations caprines tempérées. Les jours courts ont un effet stimulateur sur la reprise de l'activité sexuelle, puisque la chèvre déclenche ses ovulations après un traitement de jours courts de 80 jours (9).

Il a été aussi démontré chez la brebis que les jours courts ne sont pas indéfiniment stimulateurs, puisqu'après environ 70 jours d'activité sexuelle, les femelles rentrent en anoestrus en devenant réfractaires aux jours courts. A l'instar des jours courts, les jours longs ont un effet inhibiteur sur la reproduction. Les brebis arrêtent leur activité ovulatoire environ 80 jours après le début des jours longs.

L'implication de la glande pinéale (épiphyse) dans la perception de la durée du jour et de ses variations par les animaux a été mise en évidence depuis longtemps. En effet, l'ablation de celle-ci empêche la réponse des animaux aux traitements photopériodiques (49). Chez les mammifères, l'information lumineuse est perçue par les yeux, puis véhiculée par voie nerveuse jusqu'à la glande pinéale. Celle-ci sécrète par la suite une indolamine : la mélatonine qui, véhiculée par le sang, informe le système nerveux sur la durée du jour, puisque cette molécule est synthétisée en absence de lumière, donc la nuit. De ce fait, les chèvres perçoivent des jours courts lorsque la durée de la nuit c'est-à-dire la durée de sécrétion de la mélatonine est longue. L'activité sexuelle saisonnière est en grande partie sous la dépendance de la cinétique d'élaboration de ce médiateur d'origine pinéaliennne.

Dans les conditions naturelles, la saison de mise bas des chèvres se situe au printemps. De ce fait, la production

laitière passe par un maximum en fin de printemps début été et un minimum en hiver. Dans ces conditions, la saisonnalité de la reproduction et donc de la production paraissent très mal adaptées à la demande de la consommation et, donc à l'industrie de transformation. Pour régulariser le marché, l'industrie est contrainte d'effectuer des reports de production entre le printemps et l'automne en stockant principalement le lait sous forme de caillé congelé (34). Cependant, cette technique occasionne de lourdes charges financières et ne permet pas la commercialisation d'une quantité de fromages constante. Le prix du lait varie donc fortement en fonction de la saison d'une façon inversement proportionnelle à la quantité disponible sur le marché (Fig. 3).

Actuellement, il existe plusieurs techniques permettant d'obtenir des fécondations en dehors de la saison sexuelle. Elles reposent soit sur la manipulation des facteurs de l'environnement des animaux, soit sur la manipulation des relations entre individus (effet bouc, effet chèvre induite), soit sur l'utilisation de traitement hormonal.

2.2 - Les différentes techniques d'induction de l'oestrus chez la chèvre

2.2.1 - *Les traitements photopériodiques*

Ces traitements reposent sur la manipulation de la lumière. Ils consistent à conjuguer, à la fois, l'effet de la lumière et de la mélatonine. Après un traitement lumineux de type jours longs où l'on utilise un éclairage quotidien entre 6 heures et 9 heures, puis un autre entre 22 heures et

24 heures, on met en place des implants de mélatonine d'une durée d'action de 90 jours. On obtient des taux de fertilité de 86 % quand on réalise un effet bouc à l'issue du traitement (9). Cependant, la mélatonine administrée dans les premiers mois de lactation entraîne une chute de la production laitière et de l'ingestion alimentaire (37).

2.2.2 - *L'effet bouc et effet chèvre induite*

Ce traitement utilisé pour grouper les chaleurs en période d'activité sexuelle est aussi utilisé pour avancer la période de reproduction chez les races saisonnées (5). Cependant, il est exceptionnel d'obtenir de bons résultats chez la chèvre avec l'effet bouc en pleine contre saison (mai à juillet). Pendant cette période, même s'il y a beaucoup de femelles qui répondent par des ovulations, la durée de la période d'activité induite ainsi que le faible pourcentage d'oestrus entraînent généralement une fertilité moyenne (11).

2.2.3 - *Les traitements hormonaux*

L'utilisation des progestagènes dans la synchronisation des chaleurs chez la chèvre est connue depuis longtemps (12). En effet, il est possible de recréer artificiellement un environnement hormonal à l'aide d'éponges vaginales imprégnées d'un progestatif de synthèse : l'acétate de fluorogestone (FGA) ou l'acétate de médroxy-progestérone (MAP). La technique anciennement préconisée (12) consistait à administrer pendant 18 à 21 jours le FGA sous la forme d'éponges vaginales dosées à 45 mg, associées à une injection de 400 UI de PMSG au retrait de l'éponge.

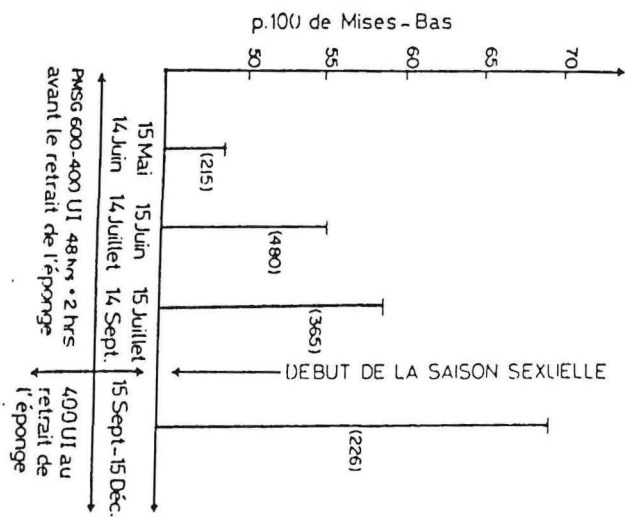


Fig 4 Fertilité de chèvres synchronisées avant et après le début de la saison sexuelle.
() : nombres de femelles-chèvres inséminées avec du sperme conservé à +4°C

D'après Cortéel, 1975 (12)

Saison d'I.A.	(Avril - 15 juin)	(16 juin - 15 sept.)
T.P.L + PMSG	53,2 % (1016)	57,3 % (5224)
T.P.C. + PMSG + CP	61,1 % (563)	59,1 % (2621)

Tableau 1 : Taux de fertilité et effectif en fonction de la saison et du traitement. Cité par GAUNEAU, 1990 (19).

Tableau 2 : Pourcentage de liaisons PMSG après les traitements en fonction de la réponse des chèvres, d'après BARIL et VALLET, 1991 (4).

1 ^{er} traitement :	œstrus		pas d'œstrus
% de liaison de PMSG avant 1 ^{er} traitement (nb de femelles)	6,2% (27)		23,60% (11)
2 ^e traitement :	œstrus	pas d'œstrus	pas d'œstrus
% de liaison de PMSG avant 2 ^e traitement (nb de femelles)	9,20% (17)	30% (10)	37,40% (11)

Les essais préliminaires de CORTEEL (1968) (cité par 12) avaient montré que ce même traitement peut induire l'oestrus chez la chèvre en anoestrus saisonnier si l'on injecte la PMSG 48 heures avant le retrait de l'éponge. Depuis ce traitement a largement été utilisé. Actuellement, cette technique est très employée, mais la durée d'imprégnation hormonale est souvent plus courte (11 jours) et l'injection de PMSG est souvent associée à celle d'un lutéolytique analogue de la $\text{PGF}_{2\alpha}$, le cloprosténol, 48 heures avant le retrait de l'éponge (Tableau 1).

Si cette technique est très utilisée dans l'induction du comportement d'oestrus chez les chèvres en anoestrus, et si elle donne jusqu'à présent de bons résultats, elle comporte malgré tout certaines limites. D'une part, la fertilité diminue lorsque les traitements se rapprochent des mises bas précédentes (Fig. 4). Le moment des traitements est donc un facteur limitant de la fertilité. D'autre part, les chaleurs obtenues avec cette technique ne sont pas suivies d'une cyclicité et on ne constatera des retours en chaleurs que quelques mois après, lors de la saison sexuelle normale (9). Ce qui conduit souvent à la scission du troupeau en deux lots, l'un mettant bas en contre saison et l'autre pendant la saison traditionnelle.

En outre, d'après des travaux plus récents (4), il semblerait que le traitement hormonal (FGA + PMSG), utilisé deux fois consécutives au cours de la même année, provoque une sécrétion d'anticorps anti-PMSG chez la chèvre. On suppose que les faibles taux de fertilité souvent enregistrés seraient liés à la présence de ces anticorps anti-PMSG (Tableau 2).

2.2.4 - Conclusion partielle

L'induction du comportement oestral chez la chèvre pendant la période de repos sexuel (Février à Septembre) répond en premier lieu à une préoccupation et une nécessité économique (répartition régulière de l'offre au cours de l'année). Les différents types de traitements d'induction mis au point jusque là, s'ils sont pour la plupart (traitement hormonal) très pratiqués par les éleveurs, comportent des limites (fertilité moyenne, baisse de la production laitière, apparition d'anticorps). Il faut donc chercher à mettre au point des traitements complémentaires qui soient si possible moins contraignants et plus performants. Dans cette optique, les antiopiacées (la naloxone entre autres), compte tenu de leurs propriétés qui leur permettent d'atténuer l'inhibition exercée par les opioïdes endogènes sur la sécrétion des gonadotrophines (LH, FSH), peuvent représenter une voie de recherche. Aussi, convient-il de faire ressortir l'influence des peptides opioïdes endogènes sur la sécrétion des hormones hypophysaires avant de mettre en relief les propriétés et l'importance des antiopiacées.

2.3 - Les peptides opioïdes endogènes

2.3.1 - Mise en évidence des opioïdes endogènes

La découverte des peptides opioïdes endogènes et leur rôle capital dans de nombreuses fonctions biologiques remontent à une vingtaine d'années environ. En effet, en 1973 plusieurs groupes de chercheurs, entre autres : PERT, SIMON et TERENIUS (38) ont mis en évidence la présence dans le système nerveux central des récepteurs aux opiacées, reconnaissant

spécifiquement la morphine et ses dérivés naturels ou synthétiques. L'existence de ces récepteurs endogènes reconnaissant des composés exogènes incita les biologistes à rechercher l'existence dans le système nerveux central de composés endogènes mimant l'action de la morphine en se liant aux récepteurs aux opiacés.

C'est ainsi qu'en 1975, KOSTERLITZ (cité par 38) a réussi à isoler du cerveau du porc deux pentapeptides aux propriétés morphinomimétiques : la méthionine-enkephaline (Met-EnK) et la leucine-enkephaline (Leu-EnK). Un an plus tard, un autre pentapeptide ayant lui aussi des propriétés morphinomimétiques et contenant trente et un acides aminés fut isolé à partir de l'hypophyse du chameau par les biologistes LI et CHUNG et baptisé : Bêta-Endorphine (β -End). Ce dernier peptide contient à son extrémité amino-terminale la séquence de la méthionine-enképhaline. A la même époque (1975), l'équipe du Professeur GOBSTEIN, travaillant sur l'hypophyse du porc mettait en évidence dans ce tissu un autre penta peptide très distinct des deux premiers, mais possédant aussi des propriétés morphinomimétiques. Ce peptide ne contenait pas de Méthionine. Il avait 17 acides aminés, avec la séquence, Tyr-Gly-Phe-Leu de la Leucine-Enkephaline à son extrémité amino-terminale. Ainsi l'appelait-on dynorphine. Par la suite, tous les peptides endogènes qui ont la propriété de mimer les effets de la morphine en se liant aux récepteurs aux opiacés furent désignés sous le nom de peptides opioïdes.

Les peptides opioïdes sont particulièrement synthétisés dans la région de l'hypothalamus médian, site qui est impliqué dans la régulation des sécrétions hypophysaires. Cependant,

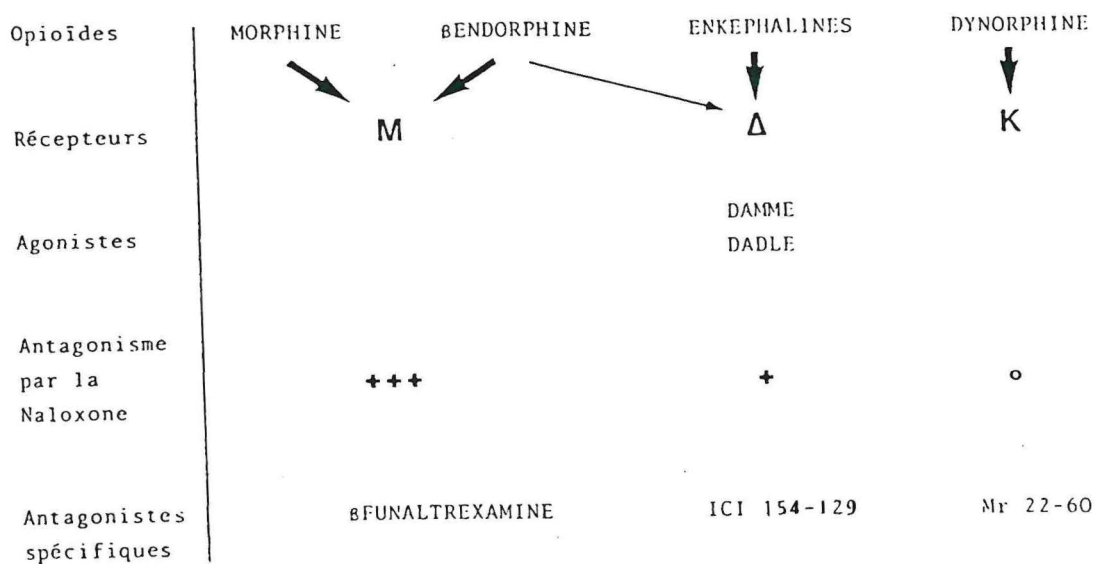


Fig. 5 : Opiodes, récepteurs, agonistes et antagonistes (d'après KUHN et SALTIEL, 1986).

Précurseurs	Peptides opioïdes endogènes	Autres peptides
Pre-opio-mélanocortine	βEndorphine	ACTH, γLPH...
Pro-Enképhaline	Met-Enképhaline	
	Leu-Enképhaline	
Pro-dynorphine	α et β Néo-Endorphine	
	Dynorphine	
	Leumorphine	

Fig. 6 : Systèmes d'opioïdes endogènes (d'après KUHN et SALTIEL, 1986).

ces opioïdes ne se rencontrent pas seulement dans le système nerveux central. Ils sont présents dans certaines composantes du système nerveux périphérique et dans des tissus non nerveux (38). WARDLAW a démontré que la synthèse de la Bêta-endorphine persiste même après une hypophysectomie (25).

2.3.2 - Les peptides opioïdes endogènes et leurs précurseurs

Les peptides opioïdes comprennent trois familles distinctes : les Bêta-endorphines, les enképhalines et les dynorphines. Les techniques de génétique moléculaire ont permis de montrer que ces trois familles de peptides opioïdes sont synthétisées à partir de trois précurseurs protéiques distincts (25). Les endorphines dont la Bêta-endorphine est la principale représentante ont pour précurseur la pro-opiomélanocortine, synthétisée essentiellement dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse (Fig. 6).

La Bêta-Endorphine plasmatique circule à des taux mesurables et sa régulation est identique à celle de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH) qui serait issue également du même précurseur (25). Il existe aussi un pool intra-cérébral de Bêta-endorphine à localisation hypothalamique qui est présente dans le liquide céphalo-rachidien. Les enképhalines (Met-Enk, Leu-Enk et les dérivés de la Met-Enk) ont pour précurseur la proenképhaline (Fig. 6). On les rencontre dans le plasma à des taux mesurables. Elles peuvent être libérées à partir de nombreux organes où elles ont été identifiées : tractus gastro-intestinal, système nerveux autonome, médullo-surrénale (25).

Les dynorphines (Leu-morphine, l' α et Bêta néo-endorphine et la dynorphine) ont pour précurseur la prodynorphine, isolée pour la première fois dans l'hypothalamus du porc. A l'instar des autres précurseurs, la maturation de la prodynorphine peut donner naissance à différents produits dans différentes régions du système nerveux central. Les enzymes protéolytiques responsables du processus de maturation, présentes dans différentes régions du système nerveux central peuvent découper la prodynorphine en différents endroits et générer des peptides opioïdes de différentes tailles, contenant les dynorphines ou les néo-endorphines. Ainsi, on a retrouvé des dérivés de la prodynorphine dans différentes régions du système nerveux et dans l'hypophyse du rat (38).

2.3.3 - Les peptides opioïdes et leurs récepteurs spécifiques

Les récepteurs spécifiques des opiacés sont situés dans le système nerveux central et plus spécialement, il sont localisés dans la substance péri-arqueducale et dans la corne postérieure de la moelle épinière (25). Ces récepteurs sont répartis en trois classes principales, selon des critères pharmacologiques : la classe μ , la classe δ et la classe K. Les récepteurs μ et δ présentent des distributions cérébrales différentes. Le contrôle des sensations douloureuses pourrait être assuré dans les structures cérébrales par une stimulation des récepteurs μ , alors que les récepteurs de type μ et δ pourraient être impliqués au niveau rachidien (44).

Les peptides opioïdes du groupe de l'endorphine agissent sur les récepteurs μ et dans une certaine mesure sur ceux de

Tableau 3 : Effet de l'administration intracérébroventriculaire de Beta-endorphine et de Naloxone sur la sécrétion de LH chez la brebis durant la saison sexuelle.
D'après HORTON, 1989.

Treatment	Pulse frequency (pulses/h)		Plasma LH concentration ($\mu\text{g/l}$)	
	Pre- injection	Post- injection	Pre- injection	Post- injection
Saline	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.2	8.3 ± 0.6	7.9 ± 0.6
Naloxone	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	5.8 ± 0.8	6.6 ± 0.7
β -Endorphin	1.3 ± 0.1	$0.4 \pm 0.2^{***}$	6.6 ± 0.5	$3.9 \pm 0.4^*$
Naloxone + β -endorphin	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	5.7 ± 2.1	5.9 ± 1.9

* $P < 0.05$, *** $P < 0.005$ compared with respective preinjection values (modified *t*-test of Clarke *et al.* (1986) and Student's paired *t*-test respectively).

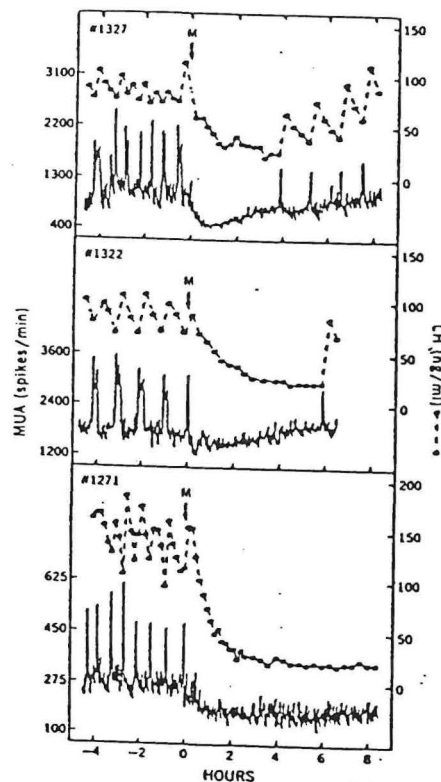


Fig. 7 : Effet de l'infusion intraveineuse de Morphine sur la sécrétion de LH chez 3 singes.
D'après KESNER, 1986.

la classe δ . Les peptides opioïdes du groupe des enképhalines agissent sur les récepteurs δ et ceux du groupe des dynorphines sur les récepteurs K (Fig. 5).

2.3.4 - Influence des peptides opioïdes endogènes sur les sécrétions hypophysaires

L'identification et la séquence des peptides opioïdes ont permis d'obtenir des agonistes, c'est-à-dire des produits de synthèse possédant les mêmes propriétés que les opioïdes endogènes. Outre la Bêta-endorphine, sont disponibles, un dérivé de la méthionine-enképhaline : la D-Ala²-Met-enképhaline, appelé DAMME et un dérivé de la Leuco-enképhaline : la D-Ala²-D-Leu⁵-enképhaline appelé DADLE.

L'identification des propriétés modulatrices de la morphine sur certaines sécrétions hypophysaires (23) a permis par utilisation des agonistes (DAMME et DADLE), d'initier la recherche sur le rôle des peptides opioïdes endogènes dans la régulation ou la modulation des sécrétions hypophysaires.

Les expériences réalisées sur le rat (26, 3, 39, 27, 36) ont montré que les peptides opioïdes endogènes dépriment la sécrétion des gonadostimulines (LH, FSH). Ces mêmes expériences, réalisées sur l'homme et sur quelques autres primates (13, 51, 15) ainsi que sur les ovins (35, 6) ont donné les mêmes résultats. En effet, l'administration de Bêta-endorphine ou d'enképhaline (DAMME et DADLE) entraîne chez l'homme et les autres mammifères des deux sexes, une chute significative du taux de LH et dans une moindre mesure celui de FSH (Tableau 3 ; Fig. 7).

Cependant, cet effet dépressif des opioïdes endogènes sur la sécrétion de LH n'est efficace que grâce à un rétro-contrôle positif des stéroïdes sexuels (6, 36, 29). En effet, le niveau de Bêta-endorphine dans la veine porte hypophysaire baisse considérablement après une ovariectomie pour n'augmenter qu'après l'administration de progestérone (42). La castration entraîne une chute de Bêta-endorphine au niveau de l'hypothalamus (42). Chez les primates, au cours du cycle, les taux de Bêta-endorphine sont faibles ou nuls au moment de la menstruation, augmentant légèrement en fin de phase folliculaire en atteignant un maximum pendant la phase lutéale, c'est-à-dire quand la progestérone est maximale (15). Après ovariectomie, les taux de Bêta-endorphine sont indétectables, ils augmentent un peu après un traitement oestrogéniques et atteignent un maximum en présence de progestérone (15). Chez les animaux saisonnés, tels que les ovins et les hamsters, il semblerait que les opioïdes endogènes ne soient actifs que durant la saison de reproduction. Car l'administration permanente de morphine (1 mg/kg de P.V.) chez le bélier entraîne une chute significative de la sécrétion de LH en fréquence et en amplitude à partir du mois d'Octobre, alors qu'aucun effet n'est observé durant la période d'anoestrus saisonnier (29). Chez la brebis, les peptides opioïdes ne modulent la sécrétion des gonadostimulines que durant la phase folliculaire et lutéale du cycle oestral (6). Cependant, étant donné que la phase folliculaire de la brebis est d'une très courte durée, on peut penser durant cette phase à un effet résiduel de la progestérone sécrétée durant la phase lutéale. Quoi qu'il en

Fig. 8 : Augmentation de la sécrétion pulsatile de prolactine et de LH après infusion de Naloxone. D'après CETEL et al., 1985. Cité par HOWLEET et REED (22).

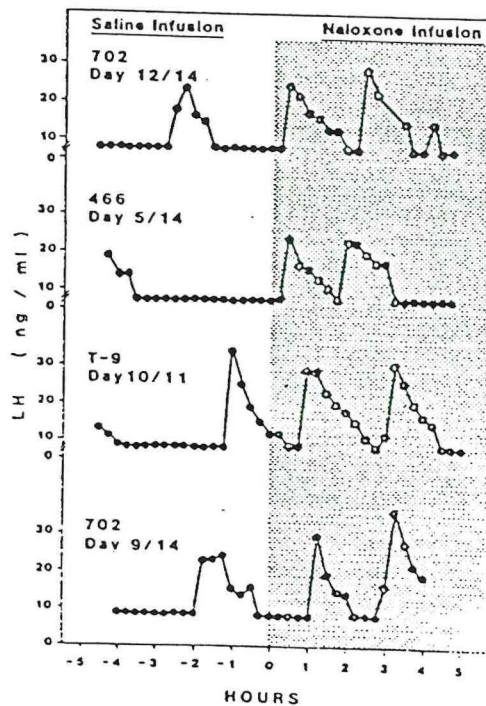
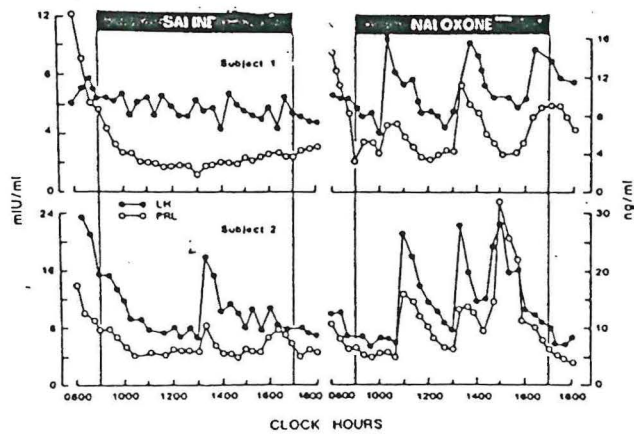


Fig. 9 : Effet de l'infusion de Naloxone sur la sécrétion de LH pendant la phase lutéale chez le singe. D'après VAN VUGT et FERIN, 1984 (50).

soit, les peptides opioïdes endogènes (surtout la Bêta-endorphine et les enképhalines) représentent un des maillons de la régulation polyfactorielle de la sécrétion des gonadotrophines (LH, FSH).

Cependant, l'action modulatrice des opioïdes n'est pas orientée uniquement vers les gonadostimulines. Elle concerne aussi la prolactine (PRL), l'hormone de croissance (GH), etc... Mais cette fois-ci, cette action a lieu dans le sens contraire par rapport à la précédente. En effet, l'administration intraveineuse de Bêta-endorphine ou de DAMME entraîne chez l'homme et les mammifères des deux sexes une ascension rapide et prolongée du taux de prolactine circulante (25). En outre, le DAMME stimule la libération de GH chez ces mêmes espèces.

2.4 - Les antagonistes des opioïdes endogènes

Si les peptides opioïdes endogènes (Bêta-endorphine, enképhalines) ont un effet dépressif sur la sécrétion des hormones hypophysaires gonadotropes (LH, FSH), l'administration de certaines substances (naloxone, naltrexone, WIN-3), considérées comme des antagonistes de ces opioïdes, entraîne une augmentation de la sécrétion de LH (Figs 8 et 9).

2.4.1 - *La naloxone et son mode d'action*

La naloxone ($C_{19}H_{21}NO_4$) est un composé quaternaire de poids moléculaire égal à 327,37 g. Elle est constituée de plusieurs noyaux aromatiques (Fig. 10). Cependant, dans la pratique, la naloxone se présente sous forme de chlorhydrate de naloxone ($C_{19}H_{22}ClNO_4$) parfaitement soluble dans l'eau,

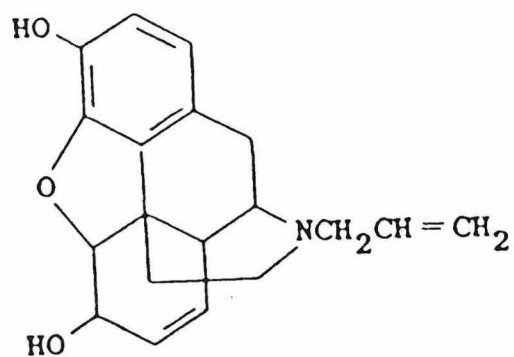


Fig. 10 : Formule développée de la Naloxone.

l'alcool et pratiquement insoluble dans l'éther. Après injection intraveineuse, la naloxone subit une dégradation rapide. Cette dégradation s'effectue selon un cycle entéro-hépatique : une désalkylation avec réduction du groupe 6 ceto et une glycuconjugaison donnent naissance à différents métabolites dont le 2-naloxone-glycuronide. L'élimination de la naloxone et ses métabolites est urinaire. Le délai d'action varie de une à deux minutes après injection intraveineuse et de 3 minutes après administration intramusculaire et sous-cutanée. La durée d'action par voie intraveineuse est de 20 à 30 minutes environ, par voie intramusculaire ou sous cutanée, elle est de 2 heures et demi à 3 heures. Quinze minutes après son injection, les concentrations cérébrales sont une fois et demie plus élevées que les concentrations plasmatiques (41).

2.4.2 - *Influence de la naloxone sur la sécrétion des hormones hypophysaires gonadotropes chez les mammifères non saisonnés*

Les expériences réalisées sur le rat (48, 40, 3, 43), l'homme et les autres primates (15, 13, 24, 50) ont montré que la naloxone, administrée par voie parentérale induit une augmentation de la sécrétion et de la concentration plasmatique de LH.

Cependant, les auteurs sont quasi unanimes à reconnaître qu'à l'instar des opioïdes endogènes, la naloxone n'est vraiment efficace qu'en présence d'une imprégnation suffisante par les stéroïdes sexuels (25, 20, 15, 28). En effet, la réponse des gonadotrophines à la naloxone chez le rat n'apparaît au cours de la puberté qu'à partir d'un certain

seuil de sécrétion androgénique (25). En outre, chez les primates, la naloxone n'entraîne une augmentation rapide de la sécrétion de LH que pendant la phase lutéale du cycle, c'est-à-dire en présence de progestérone (15). Chez la femme par contre, la naloxone provoque aussi une augmentation de la sécrétion de LH en fin de phase folliculaire, c'est-à-dire en présence de taux élevés d'oestradiol (15). L'injection de naloxone en phase lutéale chez les primates augmente de façon significative la fréquence des décharges de LH (50).

2.4.3 - *Influence de la naloxone sur la sécrétion de LH chez les mammifères saisonnés*

1) naloxone chez les ovins

Les études réalisées sur les ovins (33, 31, 30, 20, 21, 6, 7) et les hamsters (52, 42) ont montré également que l'administration de naloxone entraîne une augmentation de la sécrétion de LH. Cependant, ces résultats ne sont obtenus que pendant la saison sexuelle et en présence de stéroïdes sexuels. En effet, chez la brebis ovariectomisée, l'effet de la naloxone sur la LH ne se manifeste qu'après une injection d'oestradiol 17 β (20). En période d'anoestrus saisonnier (Février à Septembre), il semblerait que l'administration de naloxone n'a aucun effet sur la sécrétion de LH. Parallèlement, les brebis recevant des implants de Mélatonine au mois de Mai ne répondent favorablement à l'administration de Win-3 (autre antiopiacé) par une augmentation de la sécrétion de LH qu'à partir du deuxième mois qui suit la pose des implants (53), alors qu'aucune réponse n'a été enregistrée chez les femelles ne recevant que la Win-3. De la même façon,

BROOKS (7) montre, chez la brebis entière, que l'administration de naloxone (50 mg/h pendant 8 heures) au mois de Juin n'a aucun effet significatif sur la libération de LH alors que les brebis ovariectomisées recevant la même dose de naloxone et des implants de progestérone produisent une libération significative de LH à la même période. HORTON (21) a montré que la naloxone (40 mg/heure, pendant 6 heures consécutives), administrée à des brebis entières en anoestrus saisonnier n'avait aucun effet sur la libération de LH. Par ailleurs, les béliers pinéalectomisés recevant de la naloxone (4 à 6 mg/kg de P.V.) produisent une réponse significative en ce qui concerne la sécrétion de LH au mois de Mars, de Juin et de Septembre (29). Chez les béliers entiers, la naloxone (4-6 mg/kg de P.V.) entraîne une augmentation significative sur la sécrétion de LH pendant la saison sexuelle (Septembre à Décembre) alors qu'aucun effet significatif n'est observé au mois de Juin (29). En outre, le traitement prolongé des béliers entiers à la naloxone (1 mg/kg de P.V. chaque 4 heures, pendant 7 jours) d'Avril à Octobre, ne produit un effet significatif sur la LH que durant le mois d'Octobre (29).

Toutes ces observations prouvent que la naloxone, tout en étant un puissant antagoniste des opioïdes endogènes reste inactive en absence d'une imprégnation suffisante par les stéroïdes sexuels. Cependant, deux faits sont à retenir : d'une part, les doses utilisées jusque là sont très fortes (7, 29, 53, 21) et d'autre part, ces mêmes doses produisent des effets significatifs en présence de stéroïdes (progestérone) quelle que soit la saison.

2) La naloxone chez la chèvre

Les premiers essais concernant l'emploi de la naloxone dans l'induction de la sécrétion de LH et du comportement d'oestrus chez la chèvre en période d'anoestrus saisonnier ont été l'oeuvre de chercheurs mexicains (16, 17, 18). En effet, FUENTES a montré que la naloxone utilisée en intramusculaire à très faibles doses (0.4 et 0.8 mg/chèvre) produit une libération significative de LH aussi bien en fréquence qu'en amplitude chez les chèvres Alpines. Il pense que la naloxone utilisée à des doses fortes produit, en plus de l'effet antagoniste, des effets agoniste des opioïdes endogènes (16). Il n'a constaté aucune différence significative dans le nombre de pulses et l'amplitude de sécrétion de la LH entre les chèvres traitées à la GnRH et celles recevant de la naloxone à faibles doses (0.4 et 0.8 mg/chèvre). Dans les deux cas, on enregistre des pics allant jusqu'à 30 ng/ml, alors que le groupe témoin présente une sécrétion pulsatile de LH caractéristique de la période d'anoestrus saisonnier (1 pic < 5 ng/ml toutes les 5 heures).

En outre, il a démontré que utilisée encore à faibles doses (1 mg) pendant la saison sexuelle, la naloxone peut, en synergie avec les progestagènes (MAP, 45 mg en éponge intravaginale pendant 18 jours), avoir un effet significatif sur le taux d'ovulation de la chèvre Alpine (Tableau 4).

Tableau 4 : Effet de la naloxone sur la capacité d'ovulation de la chèvre Alpine, d'après FUENTES (17)

	Traitement	Oestrus	Tx ovulation
Groupe 1 (n=10)	MAP + Nal	9/10	1.9 ± .3
Groupe 2 (n=10)	MAP + Sol saline	10/10	1.2 ± .3

Parallèlement, il a aussi constaté que des chèvres en anoestrus recevant des progestagènes (MAP, éponge intravaginale) et quatre injections de naloxone (0.4 mg par chèvre) à 12 heures d'intervalle, soit 24 heures avant le retrait de l'éponge viennent en chaleur de 1 à 8 jours après le retrait des éponges (18).

2.5 - Conclusion partielle

Chez les espèces non saisonnées, les peptides opioïdes endogènes, particulièrement la Bêta-endorphine modulent la sécrétion des gonadotrophines (LH, FSH) en y exerçant une action dépressive (29). Cet effet dépressif est surtout exprimé pendant la phase lutéale du cycle, en présence de progestérone. Chez les espèces saisonnées, l'effet dépressif de ces opiacés sur la sécrétion de LH se manifeste surtout en période de reproduction (Septembre-Décembre). En période d'anoestrus, cet effet paraît être moins marqué du fait de l'inhibition exercée sur la sécrétion quantitative de stéroïdes sexuels par la photopériode (28). La naloxone qui est un antagoniste de ces opiacés endogènes n'est active qu'en présence de stéroïdes sexuels. Utilisée à des doses très fortes en période d'anoestrus chez les brebis et les béliers

(7, 29, 53, 21), elle ne produit aucun effet sur la sécrétion de LH. Cependant, des effets sont constatés quand les animaux sont pinéalectomisés (29) ou quand ils reçoivent de la mélatonine (53). Utilisée toute seule à des doses très faibles (0.4 et 0.8 mg/femelle) chez la chèvre en anoestrus, elle entraîne une libération significative de la LH, en fréquence et en amplitude (16). Aussi, les résultats obtenus par FUENTES, avec ces microdoses, nous-ont-ils incité à tester l'effet de doses similaires et à chercher la dose minimale pouvant provoquer le même effet chez la chèvre Alpine française.

III - MATERIELS ET METHODES

Deux expériences successives ont été conduites : la première (effet dose) a consisté en la détermination de la dose de naloxone minimale efficace pour provoquer une augmentation de la fréquence de décharge de LH. La seconde, après analyse des résultats de la première, a consisté en l'utilisation répétée de la naloxone (injection et perfusion) pour déterminer les effets à moyen terme sur la fréquence de la LH, l'oestrus et l'ovulation.

3.1 - Méthodologie commune aux deux expériences

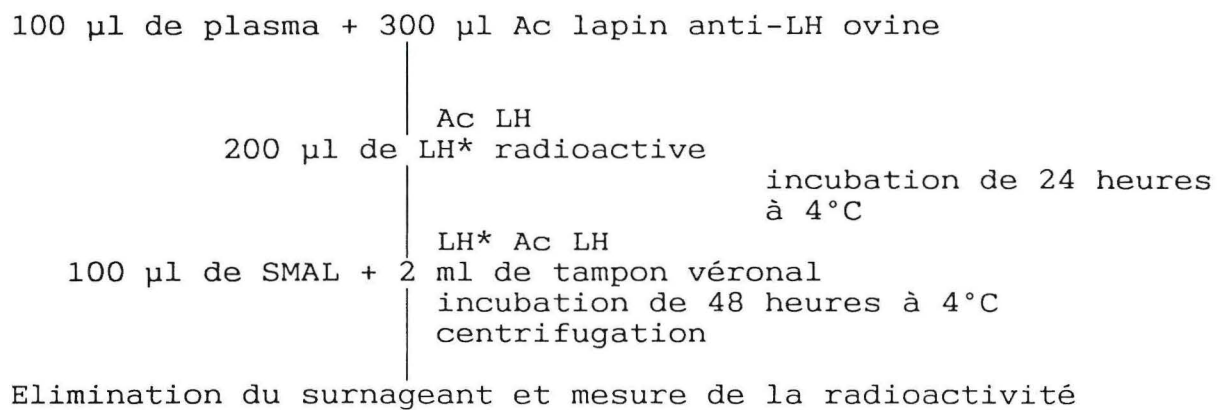
- Saison d'expérimentation

Ces expériences sont réalisées en pleine période d'anoestrus, au mois de mai et juin, sur des chèvres de races Alpine et Saanen. Ces femelles font l'objet d'un suivi préalable d'environ un mois (détection de chaleurs, analyse de cyclicité). Les femelles douteuses (montrant des signes de chaleurs ou ovulant) sont écartées. La première expérience (effet dose) a lieu le 7 mai et la seconde du 6 au 13 juin. Les détections de chaleurs et l'analyse de cyclicité se sont poursuivies pendant trois semaines après la fin de la seconde expérience.

- Les détections de chaleurs

Afin d'éviter un éventuel "effet bouc", les chèvres sont placées dans des cases situées à proximité des boucs. Des détections de chaleurs ont lieu deux fois par jour (9 heures et 16 heures), à l'aide d'un bouc vasectomisé. L'immobilité de la femelle lors du chevauchement par le mâle est le critère considéré pour caractériser l'oestrus.

Fig. 11 - Résumé des différentes étapes du dosage de LH



- Mise en lot

Vingt-quatre chèvres sur un effectif de 45 sont choisies. Elles sont réparties dans les lots expérimentaux en fonction du poids vif, de l'âge, de la date de mise bas précédente, de leur origine et du traitement préalable à l'aide du logiciel "Mislott". Pendant toute la phase expérimentale, elles ont reçu une ration quotidienne constituée d'un mélange de foin (légumineuse et graminée) d'ensilage et de céréale.

- Prélèvements sanguins

Ces prélèvements sont réalisés à la seringue ou au vacutainer dans la veine jugulaire droite. L'activité pulsatile de LH est appréciée à l'aide de prélèvements sanguins réalisés toutes les 20 minutes pendant 8 heures le jour de l'injection dans la première expérience ou pendant 6 heures à 3 reprises dans la seconde expérience (2e, 5e, 8e jour après le début de celle-ci).

L'activité ovulatoire cyclique est déterminée par analyse de la progestérone dans des prélèvements de sang réalisés 2 fois par semaine ou tous les 2 jours.

- Dosage de LH

Les taux plasmatiques de LH sont mesurés par dosage radioimmunologique selon la méthode décrite par PELLETIER *et al.*, (1982) pour doser la LH ovine, modifiée par MONTGOMERY *et al.*, (1985) et validée pour les caprins par CHEMINEAU *et al.*, (1982). Les plasmas (100 µL) sont dosés en double. La sensibilité (définie par : $B_0 - 2$ écart type de B_0) est $< 0,1$ mg/ml. Pour les valeurs inférieures ou égales à 1,60 mg/ml, le coefficient de variation (CV) est < 19 % et pour les valeurs supérieures à 1,60 mg/ml, le CV est < 7 %.

Tableau 5 : Résumé du protocole n° 1

Lot	A (Témoin)	B	C	D
Nombre de femelles	6	6	6	6
Naloxone (mg/femelle)	0	0,5	1	5
Sérum physio (ml/femelle)	2	2	2	2

- Dosage de la progestérone

La progestérone est dosée qualitativement (dosage rapide) selon la méthode de TERQUI et THIMONIER (1974).

3.2 - Méthodologie particulière de la première expérience

- Animaux

Les 24 chèvres choisies sont réparties en 4 lots contenant 6 femelles chacun. Le lot témoin a reçu du sérum physiologique et les 3 autres ont reçu chacun une dose distincte de naloxone (Tableau 5).

- Doses de naloxone administrées et préparation

Trois doses de naloxone (0,5 mg, 1 mg et 5 mg par femelle), à raison d'une dose et d'une seule injection par femelle et par lot, sont administrées en comparaison avec un lot témoin recevant du sérum physiologique. Les solutions sont préparées environ une heure avant injection. La naloxone est dissoute dans du sérum physiologique isotonique à la concentration définie. Les injections ont lieu en intramusculaire (IM) dans le cou, quatre heures après le début des prélèvements sanguins.

3.3 - Méthodologie particulière de la deuxième expérience

- Animaux

Les mêmes femelles sont conservées mais trois d'entre elles sont écartées, parce qu'ayant montré des signes d'oestrus. Il a été tenu compte de la première expérience pour la mise en lot. Un lot de six femelles sert de témoin, un autre de sept femelles reçoit une dose quotidienne de 10 mg de naloxone administrée en deux injections de 5 mg à 12 heures d'intervalle et deux autres lots de quatre femelles reçoivent

Tableau 6 : Résumé du protocole n° 2

Lot	A (Témoin)	B	C	D
Nombre de femelles	6	7	4	4
Naloxone (mg/femelle/jour)	0	10	10	20
Mode d'administration	∅	*	+	+
Durée traitement (jour)	8	8	8	8

(∅) : 2 injections de sérum physiologique isotonique stérile

(*) : 2 injections de 5 mg de naloxone par jour

(+) : perfusion

respectivement des doses de 10 et de 20 mg de naloxone par perfusion (Tableau 6).

- naloxone et préparation des doses

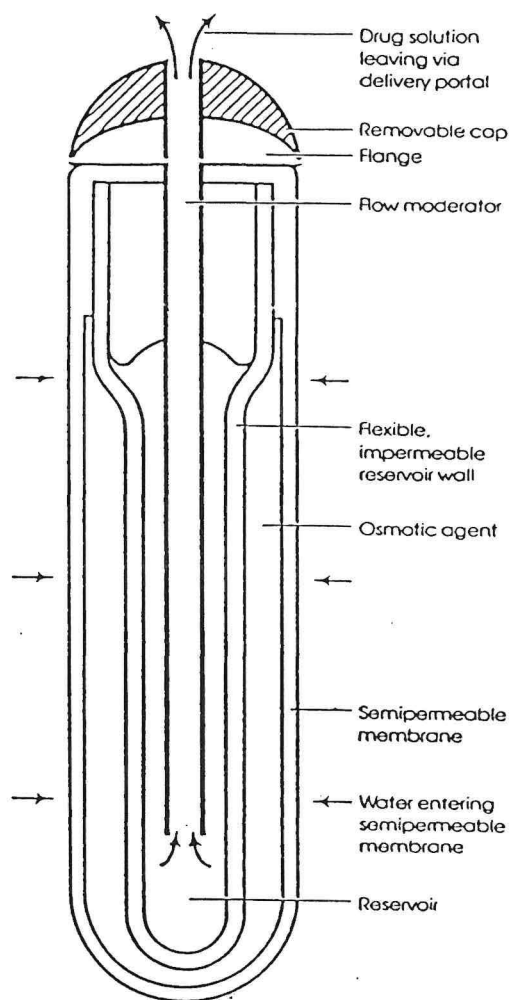
Les injections ont duré huit jours et ont lieu le matin à sept heures et le soir à dix neuf heures, en intramusculaire dans le cou. La solution, d'une concentration de 2,5 mg par ml est préparée par dissolution de la naloxone dans du sérum physiologique stérile. Pour les perfusions, la naloxone est dissoute également dans du sérum physiologique et distribuée par une pompe osmotique ALZET (fig 12) au rythme de 10 μ l de solution par heure (240 μ l en 24 heures). La capacité de la pompe est de 2 ml et sa durée de fonctionnement de 8 jours. Deux concentrations de chlorydrate de naloxone sont réalisées : une de 92 mg/ml (20 mg de naloxone par jour) et l'autre de 46 mg/ml (10 mg de naloxone par jour).

Les pompes sont placées en sous-cutané, à la partie intérieure de la cuisse gauche, après une petite opération sous anesthésie locale (Sylvocaine). La pose des pompes a lieu le 6 juin à partir de 9 heures et leur retrait le 14 juin à partir de 14 heures. Après leur retrait, elles sont examinées individuellement pour pouvoir apprécier leur fonctionnement et vérifier que la solution de naloxone a bien été distribuée.

- Endoscopie

Cinq jours après le retrait des pompes, une endoscopie a été réalisée sur toutes les femelles pour pouvoir observer directement les ovaires et détecter éventuellement la présence d'ovulation.

Fig. 12 - Pompe osmotique Alzet et ses compartiments



3.4 - Analyse des résultats

Les paramètres de sécrétion de LH (fréquence, amplitude des pulses) sont déterminés à l'aide du logiciel "PULSAR". La fréquence et l'amplitude moyenne des pulses sont calculées pour chaque profil de sécrétion. Les effets des différentes doses de naloxone sur l'amplitude et la fréquence des pulses sont déterminés à l'aide du test U de MANN et WHITNEY. Les taux plasmatiques moyens et les niveaux de base de LH sont comparés à l'aide du même test.

Tableau 7 : Résultat de l'effet dose. La dose 5 mg entraîne des effets significatifs (* $P < 0,05$) en nombre de réponses. Aucune différence significative dans l'amplitude des pulses (Moy±écart type).

	Témoin	0,5 mg	1 mg	5 mg
Nombre de femelles	6	6	6	5
Nombre de réponses après 20 mn	/	0	1	3*
Amplitude des pulses après Injection	1,23±0,72	1,10±0,72	0,93±0,23	1,14±0,28

IV - RESULTATS

4.1 - Première expérience : Influence des différentes doses de naloxone

Les résultats du tableau sept montrent qu'un significativement ($P < 0,05$) plus grand nombre de réponses a été obtenu avec la plus forte dose de naloxone (5 mg), tandis que la plus faible n'induit aucune réponse. En effet trois chèvres sur un effectif de cinq ont répondu par une augmentation de la concentration plasmatique de LH dans les minutes qui suivent l'injection intramusculaire de 5 mg de naloxone. Un seul pulse a été observé par chèvre après injection (fig 13). En outre, aucune différence significative n'a été observée dans l'amplitude des pulses entre les témoins dont les pulses sont endogènes et les femelles ayant répondu au traitement (Tableau 7).

4.2 - Deuxième expérience : Administration prolongée de naloxone

Les données du tableau 9 représentent les différents paramètres de sécrétions de la LH (Taux plasmatiques moyens, niveau de base, fréquence et amplitude des pulses).

L'analyse statistique montre qu'il existe une différence significative ($P < 0,05$) des taux plasmatiques moyens entre les chèvres du lot 5 mg injection ($0,73 \pm 0,14$ mg/ml) et celles du lot témoin ($0,60 \pm 0,002$ mg/ml). Tandis que la différence observée pour ce même paramètre entre le lot témoin et celui des 10 ou 20 mg perfusion n'est pas statistiquement différente.

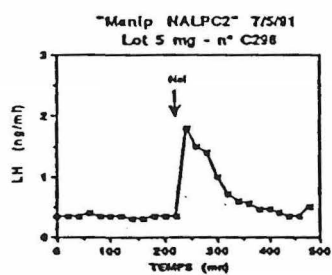
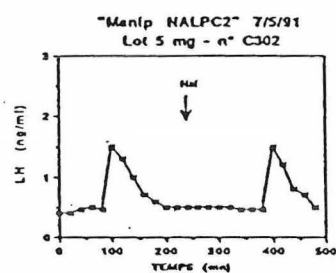
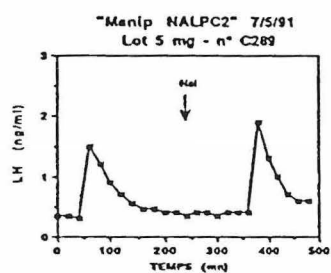
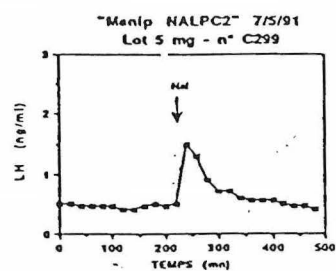
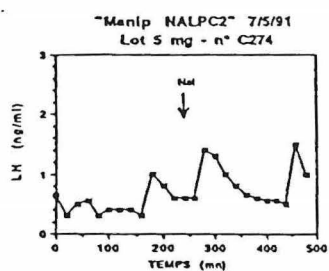


Fig.13- Reponse des chèvres à la dose de 5 mg de naloxone.

	Fréquence pulses (pulses/6 heures)	Amplitude pulses (ng/ml)	Niveau de base (ng/ml)	Taux plasmatiques moyens (ng/ml)
Témoin	0,28±0,44	0,72±0,37	0,61±0,08	0,60±0,02
10 mg Alzet	0,50±0,64	0,89±0,34	0,76±0,29	0,69±0,08
20 mg Alzet	0,42±0,42	0,46±0,32	0,59±0,08	0,60±0,03
5 mg inj.	0,90±0,53*	1,58±1,69*	0,71±0,19	0,73±0,14*

Tableau 9 : Les différents paramètres de sécrétion de LH : niveau de base, taux plasmatiques moyens, fréquence et amplitude (Moy±écart-type). * P<0,05 différents des témoins (Test U de mann-Whitney).

Catégorie	N° chèvre	Effectif	Date	Intervalle inj-oestrus ou pose pompe-oestrus (jour)
Témoin	287	1/6	11/06	5
10 mg Alzet	/	0/4	/	/
20 mg Alzet	286	3/4	11/06	5
	295		12/06	6
	305		12/06	6
5 mg inj	249	3/7	12/06	6
	289		13/06	7
	235		11/06	5

Tableau 10 : Résultat du suivi du comportement d'oestrus des différents lots de chèvres.

Par ailleurs, on ne remarque aucune différence significative dans les niveaux de LH plasmatique de base entre les chèvres témoins et celles des autres lots.

L'analyse statistique de la fréquence des pulses de LH montre également qu'il y a une différence significative ($P < 0,05$) entre le lot témoin ($0,28 \pm 0,44$ pulse/6h) et le lot 5 mg injection ($0,90 \pm 0,53$ pulse/6 h), tandis qu'aucune différence significative n'est observée entre le lot témoin et les deux autres (10 et 20 mg perfusion).

L'amplitude moyenne des pulses de LH des chèvres du lot témoin est de $0,72 \pm 0,37$ mg/ml, alors que celle des chèvres recevant deux injections quotidiennes de 5 mg de naloxone à 12 heures d'intervalle est de $1,58 \pm 1,69$ mg/ml. L'analyse statistique montre qu'il y a une différence significative ($P = 0,05$) d'amplitude entre ces deux lots. Pour les autres lots aucune différence significative n'est observée par rapport aux témoins pour ce paramètre.

4.3 - Suivi du comportement d'oestrus et de l'ovulation

Les résultats du tableau 10 montrent qu'un comportement d'oestrus est observé chez un certain nombre de femelles pendant la phase expérimentale, soit à partir du cinquième jour après le début de l'expérience. En effet, dans le lot de 20 mg perfusion, 3 chèvres sur un effectif de 4 ont présenté un comportement d'oestrus, tandis que dans le lot 5 mg injection également 3 chèvres sur sept ont présenté le même comportement.

Cependant, les résultats des analyses ont montré que la progestéronémie était restée très basse et constante pour

Tableau 11 : Résultat de l'observation endoscopique

Endoscopie du 19/06/91			
Catégorie	N° chèvre	ovaire gauche	ovaire droit
Témoin	250	1 Fx	1 Fx
	287	TGF (8 mm)	3GF
	291	néant	2GF
	300	2TGF (6 mm)+3GF	2TGF (6 mm)+3Fx
	308	néant	1TGF (6 mm)
	309	néant	1GF
10 mg perf.	248	1TGF (6 mm)	1GF
	285	1GF+Nb Fx	1TGF+Nb Fx
	299	1TGF (6 mm)+3GF	4Fx+2GF
	306	2GF	1TGF (8 mm)+1GF
20 mg perf.	286	3GF	1TGF (6 mm)
	295	3GF+4Fx	1GF+3Fx
	304	2GF	2GF
	305	1GF+3Fx	1TGF (8 mm)+3GF
5 mg inj.	235	2GF+Nb. Fx	NbFx+1GF
	249	NbFx+1GF	2GF+NbFx
	289	*	*
	292	3Fx+2GF	2GF+2Fx
	297	néant	néant
	302	1GF	1TGF (6 mm)+1GF
	303	2GF	1TGF (8 mm)+1GF

Fx = follicule moyen

GF = gros follicule

TGF = très gros follicule

NbFx = nombreux follicules moyens

* = adhérence

toutes les femelles pendant la phase expérimentale et les phases antérieures et postérieures ; ce qui indique l'absence d'ovulation.

En outre, les résultats de l'endoscopie réalisée 6 jours après la fin de l'expérience montrent qu'aucune femelle n'a ovulé ; même parmi celles qui avaient un comportement d'oestrus, puisqu'aucune trace de corps jaune n'est observée.

4.4 - Discussion

Contrairement à la chèvre Alpine Mexicaine (FUENTES et al., 1990) (16), l'Alpine française ne répond pas par des décharges de LH à l'administration de doses de naloxone inférieures à 5 mg. Ces doses semblent ne pas être suffisantes pour atténuer l'inhibition exercée par les opiacés endogènes sur la libération de cette hormone. En outre, la régulation de l'activité hypothalamo-hypophysaire étant un mécanisme polyfactoriel, on peut donc penser que la photopériode exerce une inhibition plus importante sous nos latitudes qu'au Mexique, mettant en jeu d'autres mécanismes inhibiteurs que ceux impliquant les opiacés. L'utilisation de naloxone pendant l'anoestrus "profond" se révélerait alors incapable de lever cette inhibition.

Il ne faut pas non plus négliger l'effet individuel, puisque l'on a constaté que toutes les femelles du même lot ne répondent pas à l'injection des 5 mg et qu'il y en a au moins une qui a répondu à celle de 1 mg. Ceci peut laisser envisager que le seuil entre une concentration de naloxone stimulante et une concentration non stimulante puisse aussi varier d'un

individu à l'autre et chez un même individu, d'un mode d'administration à l'autre.

L'objectif de la seconde expérience était de montrer que la naloxone administrée de façon répétée, à très faibles doses, pouvait modifier la pulsatilité de la LH en période d'anoestrus chez la chèvre et de trouver la plus faible dose efficace pouvant entraîner une augmentation significative de cette pulsatilité.

Les résultats obtenus semblent montrer qu'une dose quotidienne de 10 mg administrée par injection à raison de deux demi doses à 12 heures d'intervalle est la plus efficace pour agir sur la pulsatilité de la LH en taux plasmatiques, en fréquence et en amplitude.

Ces résultats semblent mettre aussi en évidence une plus grande efficacité de la naloxone quand elle est administrée par injection par rapport à la perfusion, puisque la même dose (10 mg) donne des résultats plus significatifs quand elle est injectée que quand elle est perfusée. En outre, dans les lots ayant reçu la naloxone par perfusion ainsi que dans le lot témoin, on observe une absence de pulses de LH chez un grand nombre de chèvres pendant les 3 rythmes, tandis que dans le lot injection toutes les femelles ont au moins un pulse par rythme.

D'autre part, les chèvres ayant reçu les 20 mg de naloxone par perfusion ne diffèrent pas significativement des témoins en ce qui concerne la pulsatilité de la LH. On ne peut mettre en cause le fonctionnement des pompes puisque l'analyse effectuée après leur retrait a montré que leur contenu a été libéré.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées. Cette dose (20 mg) pourrait être trop forte, certains auteurs (16) pensent, en effet, que la naloxone peut dans certains cas avoir des effets antagonistes sur la LH. On peut aussi penser au stress dû à la présence des pompes sous la peau, puisqu'il est généralement admis que la sécrétion de la LH peut être inhibée par le stress. Cependant, cette hypothèse doit être considérée avec beaucoup de réserve puisque chez le bélier, PAPINO (37a) a observé une augmentation de la pulsatilité de la LH pendant les 6 heures qui suivent la pose des pompes péristaltiques libérant 40 à 60 mg de naloxone par heure (en période d'activité sexuelle). En outre, chez les primates VAN VUGT et FERIN (50) ont observé les mêmes résultats pendant les cinq heures qui suivent l'opération.

L'hypothèse la plus vraisemblable serait une saturation continue des récepteurs à la naloxone pendant trop longtemps. Ceci aurait, dans ce cas, entraîné un effet antagoniste, puisque les 10 mg, quand ils sont administrés dans les mêmes conditions, n'ont pas eu non plus d'effet significatif par rapport aux témoins.

Toutes ces hypothèses restent à vérifier. Cependant, on a paradoxalement constaté que trois femelles sur un effectif de quatre dans le lot 20 mg ont eu un comportement d'oestrus. Ces chaleurs ne sont pas suivies d'ovulation, mais elles semblent quand même contradictoires par rapport aux résultats obtenus au niveau de la pulsatilité de la LH. Le fait que ces comportements d'oestrus soient observés à partir du cinquième jour après le début des traitements (Tableau 10), incite à penser que la sécrétion de la LH puisse être inhibée par une

augmentation de la sécrétion d'oestradiol. Les jours de prélèvement choisis ne permettant alors pas de mettre en évidence des changements dans la pulsatilité.

Néanmoins, le fait que d'une façon générale, les chèvres ayant un comportement d'oestrus n'ont pas ovulé montre que la naloxone ne peut, à de telles doses tout au moins, à elle seule, constituer un traitement d'induction du comportement d'oestrus et de l'ovulation. Cependant, le fait d'obtenir des résultats significatifs par rapport aux témoins avec l'injection répétée des 5 mg montre que la naloxone peut dans certaines conditions influencer la sécrétion de la LH en absence de taux élevés des stéroïdes sexuels (progestérone).

V - CONCLUSION GENERALE

Les résultats de ce travail préliminaire montrent que la dose minimale de naloxone apte à agir sur la pulsatilité de la LH chez la chèvre en anoestrus saisonnier est de l'ordre de 10 mg par jour, administrée par injection, à raison de deux demi doses à 12 heures d'intervalles ; puisque celle-ci dans ces conditions entraîne des effets significatifs sur les taux plasmatiques moyens, la fréquence et l'amplitude.

En outre, ces résultats semblent confirmer la thèse suivant laquelle la naloxone, administrée à très faibles doses, peut agir de façon significative sur la décharge de LH chez la chèvre en anoestrus (16), tandis qu'elle n'a aucun effet sur cette hormone chez les petits ruminants en anoestrus quand elle est administrée à des doses fortes (21).

Cependant, en ce qui concerne le comportement d'oestrus et d'ovulation, les données obtenues ne nous permettent pas de tirer une conclusion formelle sur le rôle de cette molécule. En effet, on a observé un comportement d'oestrus chez un certain nombre de femelles du lot injection aussi bien que dans le lot 20 mg. Mais ces chaleurs ne sont pas suivies d'une ovulation. Par contre, dans le lot 20 mg, l'apparition de comportement d'oestrus semble être quelque peu contradictoire avec le profil de sécrétion de LH.

Quoiqu'il en soit, les résultats obtenus au niveau de la pulsatilité montrent que l'on peut aller plus loin dans ce travail et essayer d'utiliser la naloxone à des doses similaires en synergie avec un traitement progestagène pour voir si elle peut, dans ces conditions, agir de façon significative sur l'ovulation. Il est tout aussi important de

voir si l'on peut obtenir ces mêmes résultats à n'importe quelle période de l'anoestrus, car il a été constaté chez la brebis traitée à l'oestradiol une plus grande efficacité de la naloxone au milieu de la période d'anoestrus qu'au début ou à la fin de cette période (46).

BIBLIOGRAPHIE

1. AKABORI, A. et BARRACLOUCH, C.A. Gonadotropin responses to naloxone May depend upon spontaneous activity in noradrenergic neurone at time of treatment. Brain Research, 1986, 362: 55-62.
2. ALLEN, L.G. et KALRA, S.P. Evidence that a decrease in opioid may evoke reovulatory luteinizing hormone release in the rat. Endocrinology, 1986, 6 (118): 2375-2379.
3. ALLEN, L.G. et al. Evidence that a decrease in opioid tone on proestrus changes the episodic pattern of luteinizing hormone (LH) secretion: implications in the preovulatory L.H. hypersecretion. Endocrinology, 1988, 3 (122): 1004-1013.
4. BARIL, G. et VALLET, J.C. Traitements hormonaux répétés : Prudence. La Chèvre, 1991, 133: 34-35.
5. BOUILLON, J. Synchronisation des chaleurs sans traitement hormonal: "effet bouc" - Effet chèvre induite. La Chèvre, 1983, 136: 41-44.
6. BROOKS, A.N. et al. Opioid modulation of LH secretion in the ewe. J. Reprod. Fert., 1986, 76: 693-708.
7. BROOKS, A.N. et al. Ovarian steroid involvement in endogenous opioid modulation of LH secretion in seasonally anoestrus mature ewes. J. Reprod. Fert., 1986, 76: 709-715.
8. CAACEDO, L. et al. Direct action of opioid peptides and Naloxone on gonadotropin secretion by cultured rat anterior pituitary cells. Life Sciences, 1985, 38: 617-625.
9. CHEMINEAU, P. Le désaisonnement des chèvres par la lumière et la mélatonine. La Chèvre, 1989, 171: 18-22.
10. CHEMINEAU, P. Le saisonnement de la reproduction des caprins des zones tempérées et des zones tropicales. Capricorne, 1989, 2 (2): 6-10.
11. CHEMINEAU, P. L'effet bouc : mode d'action et efficacité pour stimuler la reproduction des chèvres en anoestrus. INRA Prod. Anim., 1989, 2 (2): 97-104.
12. CORTEEL, J.M., Le contrôle du cycle sexuel de la Chèvre. In: Reproduction, sélection espèce caprine. Journée de la Recherche Ovine et Caprine. INRA-ITOVIC, 1975, 28-47.
13. DELITALA, G. et al. Participation of endogenous opiates on regulation of the hypothalamic pituitary testicular axis in normal men. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 1983, 6 (57): 1277-1283.

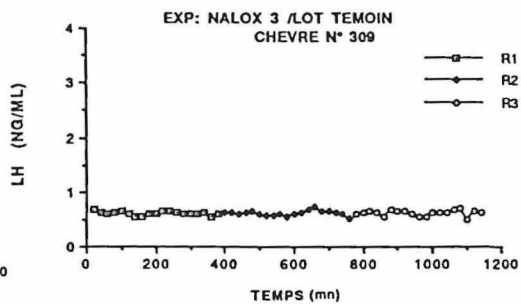
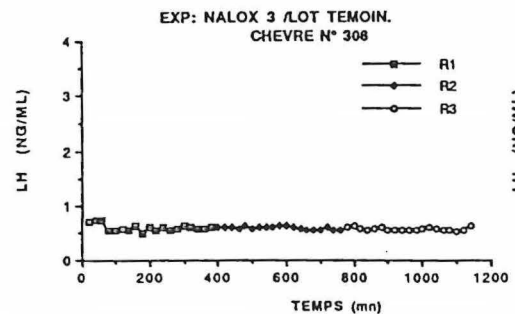
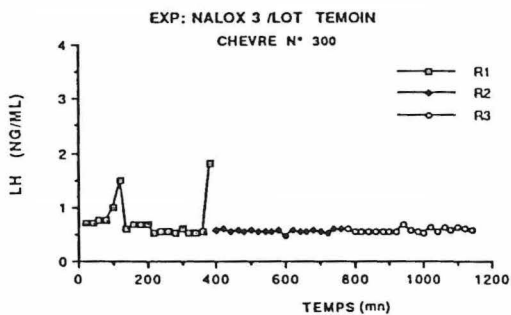
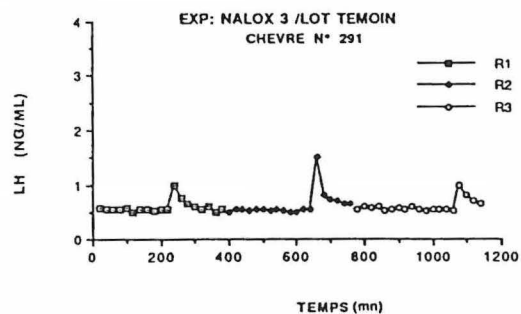
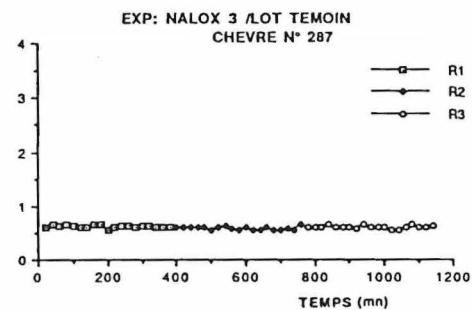
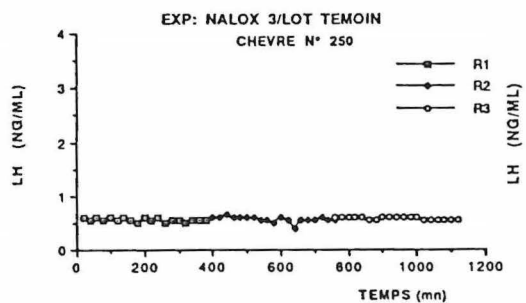
14. ESKES, G.A. Short day exposure eliminates the LH response to naloxone in golden hamsters. *Neuroendocrinology*, 1984, 39, 281-283.
15. FERIN, M. Les opiacés endogènes et le cycle menstruel du primate. *Ann. Endocr.*, 1987, 48: 6-7.
16. FUENTES, H. et al. Efecto de la naloxona sobre la secreción pulsátil de LH en la Cabra. *Azteca*, 1990, 135-141.
17. FUENTES, H. et RUIZ, S.H. El efecto de la naloxona sobre la capacidad ovulatoria de la capra alpina. *Azteca*, 1989, 103-105.
18. FUENTES, H. et PERAZA, C. El uso de la naloxona y la progesterona para adelantar la época de empache en la cabra alpina. *Azteca*, 1988, 24-27.
19. GAUNEAU, L. Traitement de superovulation de la chèvre laitière : étude de l'effet dose et de l'effet durée du traitement FSH. Nantes, ENVN, 1990. 165 p. Thèse Doct. Vet., Nantes, 1990, 86.
20. HORTON, R.J.E. et al. Seasonal and steroid-dependant effects on the modulation of LH secretion in the ewe by intracerebroventricularly administered Beta-endorphine or naloxone. *J. Endocr.*, 1989, 122: 000-000.
21. HORTON, R.J.E. and CLARKE, I.J. Lack of effect of morphine or naloxone on the oestrogen induced LH surge on anoestrus ewes. *J. Endocr.*, 1988, 119: 89-93.
22. HOWLETT, T.A. and RESS, L.H. Endogenous opioid peptides and human reproduction. In *Opioids and Reproduction*, 1988, 261-293 p.
23. JOHNSON, J.M. et al. Inhibition of pulsatile luteinizing hormone release by morphine micro-injection into mensecephalic dorsal raphe. *Life Sciences*, 1982, 30: 1473-1474.
24. KESNER, J.S. et al. The effect of morphine on the electrophysiological activity of the hypothalamic luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) pulse generator in the rhesus monkey. *Neuroendocrinology*, 1986, 43: 686-688.
25. KUHN, J.M. et SALTIEL, H. Rôles des peptides opioïdes endogènes dans la régulation des sécrétions hypophysaires. *Ann. Endocr.*, 1986, 47: 97-105.
26. LEADEM, C.A. et YOGENOVA, S.V. Effect of specific activation of Mu, Delta and Kappa-opioid receptor on the secretion of luteinizing hormone and prolactin in the ovariectomized rat. *J. Neuroendocr.*, 1987, 45: 109-117.

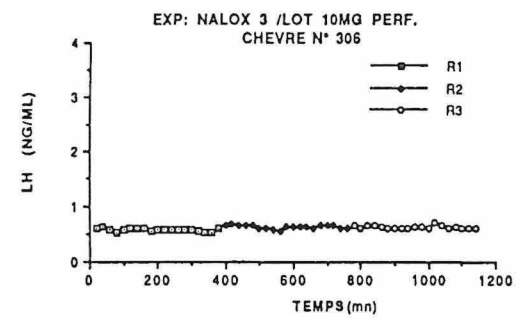
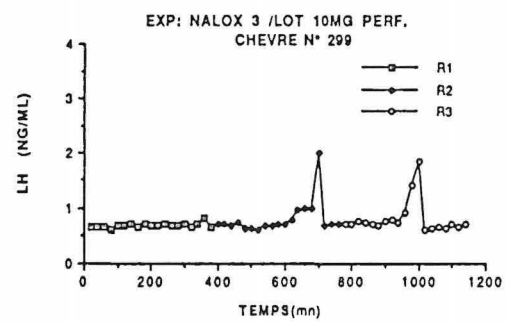
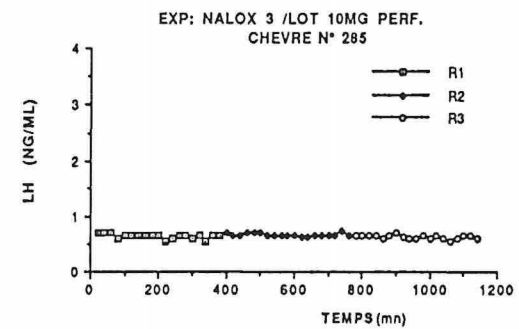
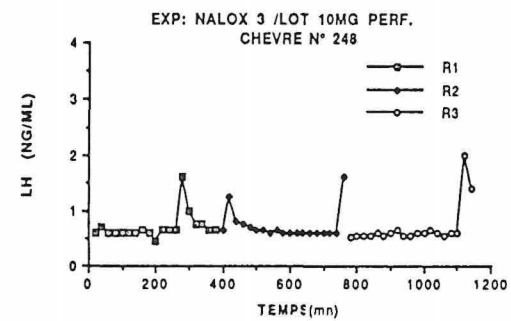
27. LIMONTA, P. et al. Gonadal steroid modulation of Brain opiod systems. J. Steroid. Biochem., 1987, 4-5 (27): 691-698.
28. LINCOLN, G.A. et al. Endogenous opiod control of pulsatile LH secretion in rams: modulation by photoperiod and gonadal steroides. J. Endocr., 1987, 115: 425-438.
29. LINCOLN, G.A. et EBLING, F.J.P. Endogenous opioids and the control of seasonal LH secretion in Soay rams. J. Endocr., 1985, 107: 341-353.
30. MALVEN, P.V. et al. Effet of naloxone and electro-acupuncture treatment on plasma concentration of LH in sheep. J. Endocr., 1984, 101: 75-80.
31. MALVEN, P.V. et IRONT, W.E. Effet of exogenous estradiol-17 β and progesterone on naloxone reversible inhibition of the release of Luteinizing hormone in ewes. J. Anim. Sci., 1987, 65: 1602-1609.
32. MALVEN, P.V. et al. Proceeding 10th International congress of animal reproduction and artificial insemination. Illinois, 1984, 3 p.
33. MALVEN, P.V. et JESHIN, L.S. Continuous measurement of cerebral arteriovenous difference of beta-endorphine in sheep. Neuroendocrinology, 1985, 40: 120-128.
34. MARGUIS, H.P. Synchronisation de l'oestrus et insémination artificielle dans l'espèce caprine. Toulouse, ENVT, 1990, 156 p. Thèse Doct. Vet., Toulouse, 1990, 4069.
35. MATTARERI, R.L. et MOBERG, G.P. The effect of opiod peptides on ovine pituitary gonadotropin secretion in vitro. Peptides, 1985, 6: 957-963.
36. NIKOLARAKIS, K.E. et al. Feed-bak inhibition of opiod peptide release in the hypothalamus of the rat. Neuroscience, 1987, 1 (23): 143-148.
37. NORMANT E. Induction de l'activité sexuelle pendant l'anoestrus chez la chèvre laitière par l'utilisation successive d'une photopériode fractionnée et l'injection de mélatonine. Mémoire de fin d'étude. Rennes, 1985, 30 p.
- 37a. PAPINO, P. Contribution à l'étude de l'intervention d'un stress sur le contrôle de la sécrétion de la LHRH. Mémoire de DEA, Nouzilly, 1989, 23p.
38. PATEY, G. et ROSSIER, J. Découverte, anatomie et biosynthèse des différentes familles de peptides opiodes endogènes. Ann. Endocr., 1986, 47: 71-87.
39. PIVA, F. et al. Stimulatory and inhibitory effects of the opioids on gonadotropin secretion. Neuroendocrinology, 1986, 42: 504-512.

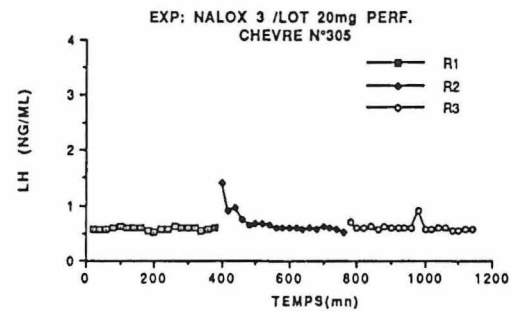
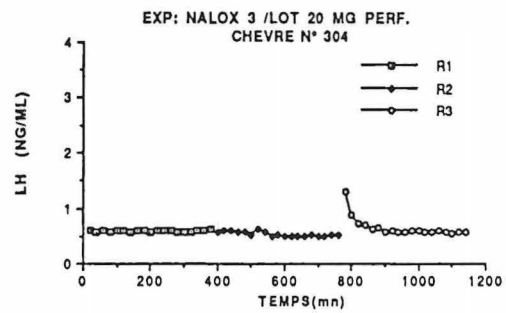
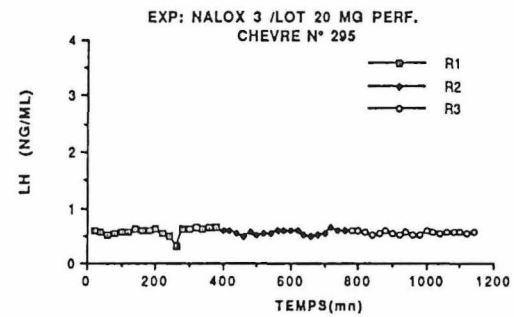
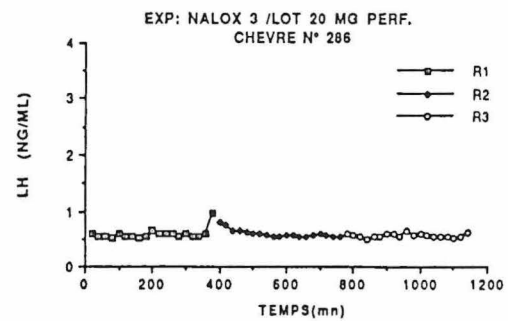
40. PIVA, R., MAGGI, P. et al. Effect naloxone on luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin secretion in the different phases of the estrous cycle. *Endocrinology*, 1985, 2 (117): 766-772.
41. PONT de NEMOURS, S.A., NARCOW. Naloxone. In: *Dictionnaire VIDAL*, 1990: 1131-1132 p.
42. ROBERTS, A.C. et al. The effects of castration, Testosterone replacement and photoperiode upon hypothalamic béta-endorphine levels in the male syrian hamster. *Neuroscience*, 1987, 3 (23): 1075-1082.
43. ROBERTS, D.L. ET BLANK, M.S. Antagonist of gonadotropin-releasing hormone blocks naloxone-induced elevations in serum luteinizing hormone. *Neuroendocrinology*, 1982, 35: 309-312.
44. ROGUES, B.P. Pharmacologie des différentes classes de récepteurs opioïdes cérébraux. *Ann. Endocr.*, 1986, 47: 88-96.
45. SOFRONIEW, M.V. Immunoreactive beta-endorphine and ACTH in the same neurons of the hypothalamic arcuate nucleus in the rat. *American Journal of Anatomy*, 1979, 2 (154), 283-289.
46. SCHAAL, R.E. et al. Post-pubertal maturation of endogenous opioïde regulation of luteinizing hormone secretion in the female sheep. *Biol. Reprod.*, 1991, 44: 760-768.
47. SOLTNER, D. (ed). La reproduction des animaux d'élevage. Saint Gemmes-sur-Loire, 1989, 1: 228 p.
48. SYLVESTER, P.W. et al. Effect of morphine naloxone on inhibition by ovarian hormone of pulsatile release of LH in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, 1982, 34: 269-273.
49. THIMONIER J. et al. Photopériodisme et reproduction : bases physiologiques. *J. Rech. Ovine et Caprine* (9è), 1984, 64: 78 p.
50. VAN VUGT, D.A., LAM, N.Y., FERIN, M. Reduced frequency of pulsatile luteinizing hormone secretion in the luteal phase of the rhesus Monkey. Involvement of endogenous opiates. *Endocrinology*, 1984, 3 (115): 1095-1101.
51. VELDHUIS, J.V. et al. Do α adrenergic mechanisms regulate spontaneous or opiate-modulated pulsatile luteinizing hormone secretion in man. *J. of Clin. Endocr. and Metab.*, 1983, 6 (57), 1292-1297.
52. WILKINSON, M. et al. Short day exposure eliminates the LH response to naloxone in golden hamster. *Neuroendocrinology*, 1984, 39: 282-283.

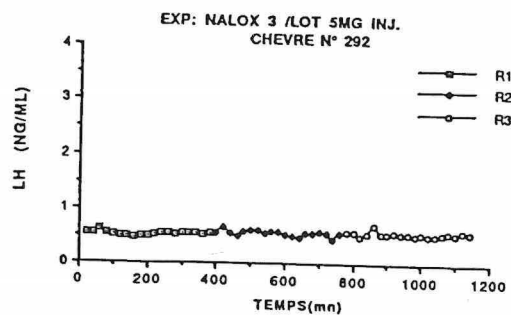
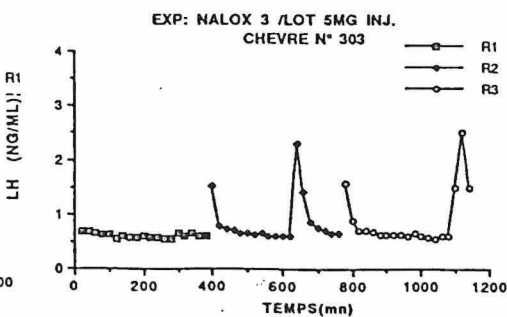
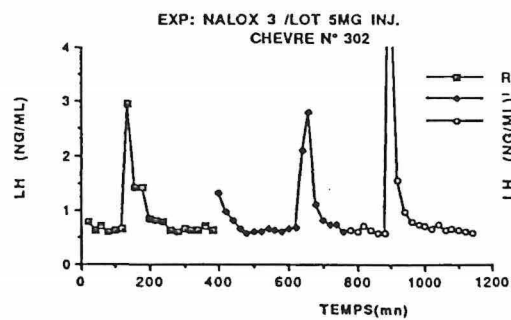
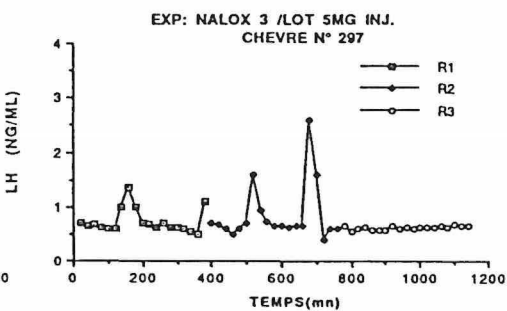
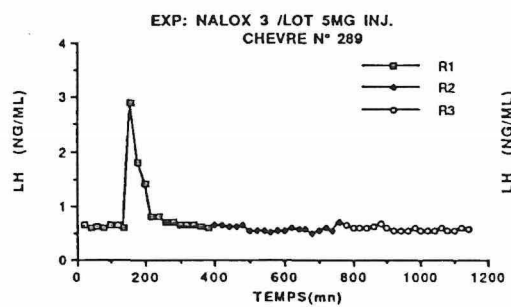
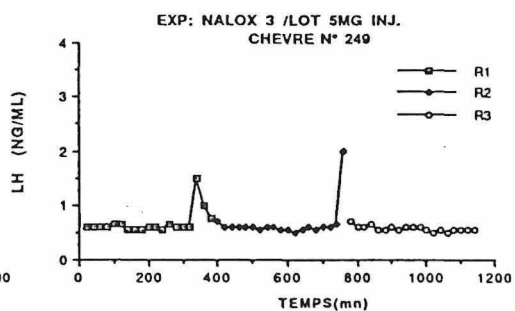
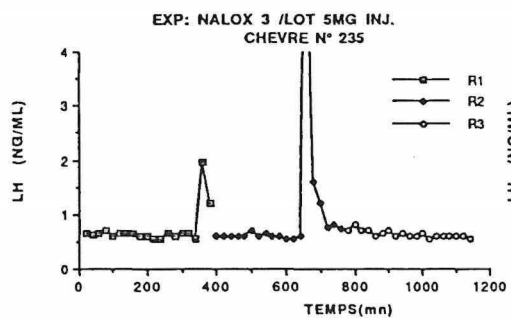
53. YANG, K.P. et al. Failure of melatonin to influence endogenous opioid effect on LH secretion in the anoestrus ewe. J. Reprod. Fert., 1989, 85: 397-403.

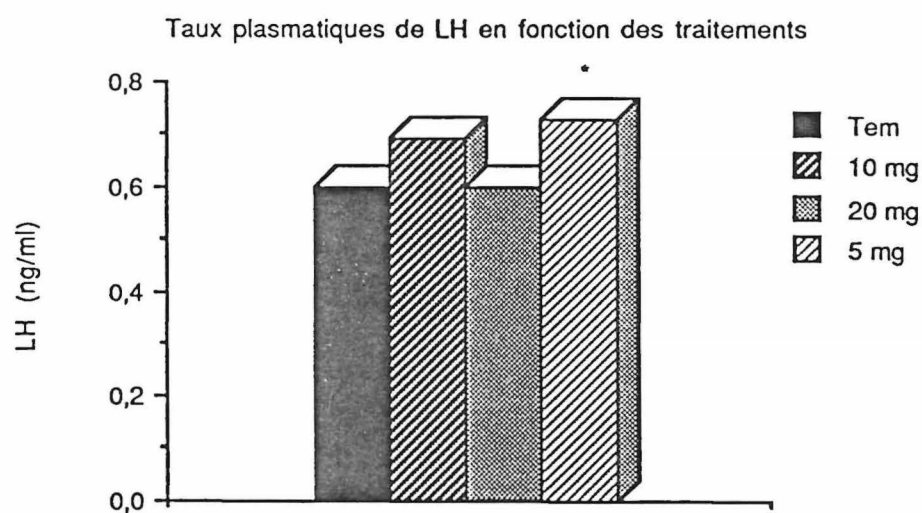
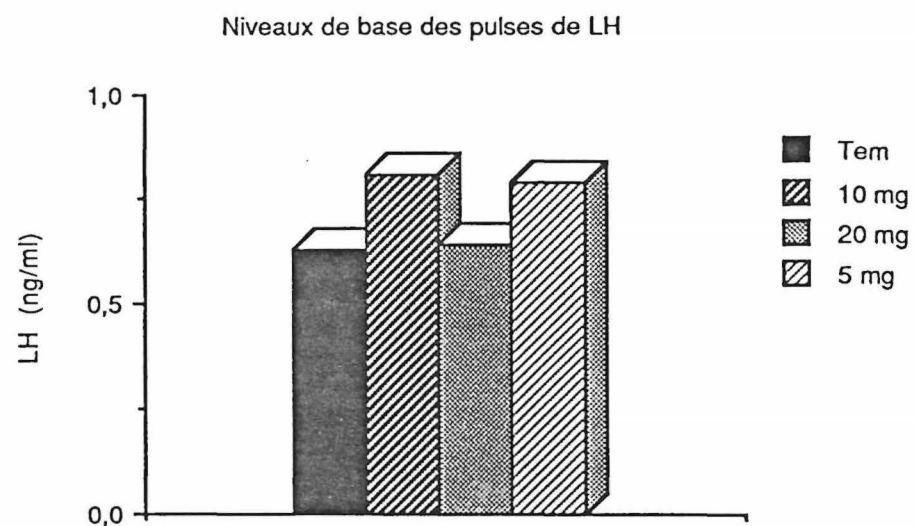
-ANNEXES-











* $p < 0,05$ (Test U de Mann-Whitney)

Fig.16-Niveau de base et taux plasmatiques moyens de LH des différents lots de chèvres.* $P < 0,05$ (Test U de Mann-Whitney)

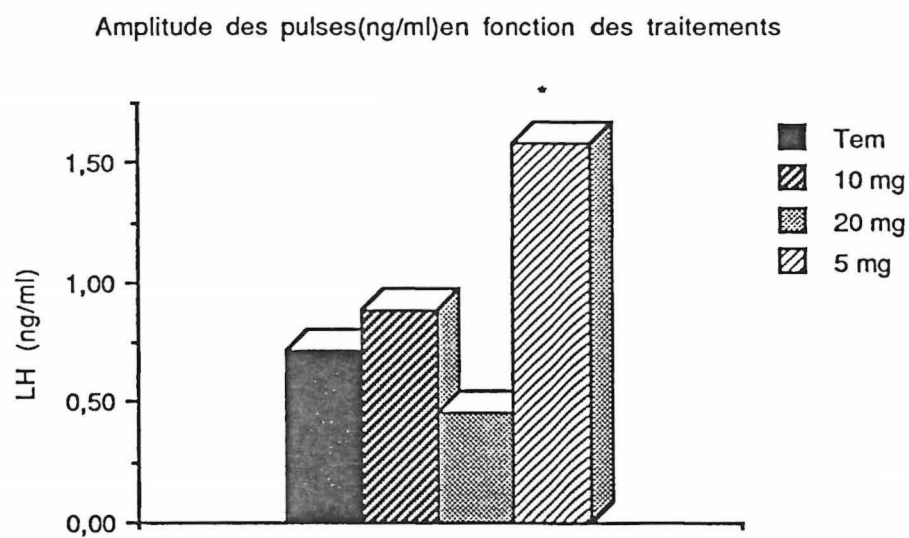
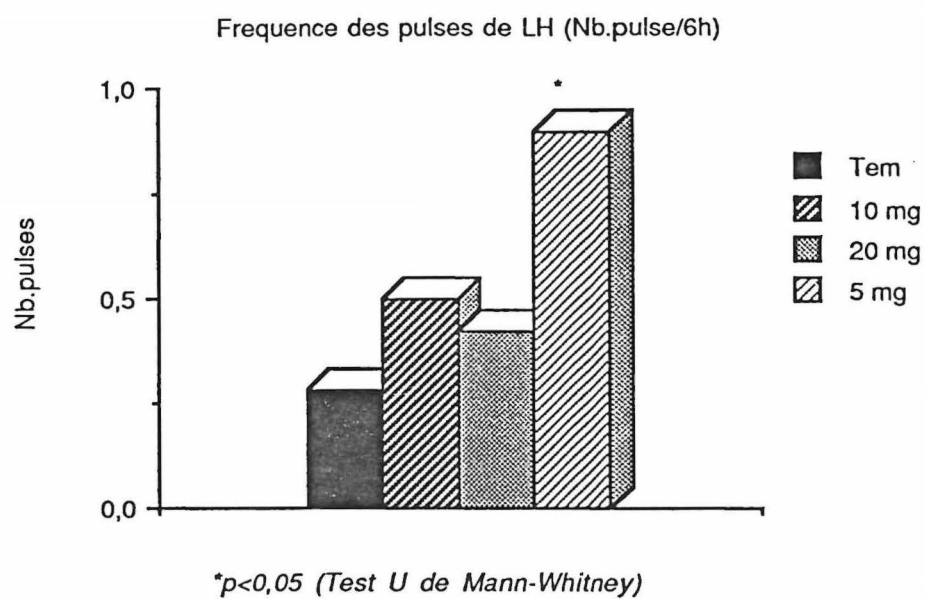


Fig.15-Fréquence et amplitude des pulses de LH des différents lots de chèvres.* $P < 0,05$ (Test U de Mann-Whitney)