



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

**Effets d'un traitement de GH administré in vivo sur le contrôle de l'activité ovarienne et sur la croissance folliculaire terminale chez la brebis Suffolk au cours des différents états physiologiques**

LAGACHE, Frédéric

*Award date:*  
1994

[Link to publication](#)

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTE DES SCIENCES**

---

**Effets d'un traitement de GH administré *in vivo* sur le contrôle de  
l'activité ovarienne et sur la croissance folliculaire terminale  
chez la brebis Suffolk au cours des différents  
états physiologiques.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques  
par**

**LAGACHE Frédéric**

**Effets d'un traitement de GH administré *in vivo* sur le contrôle de l'activité ovarienne et sur la croissance folliculaire terminale chez la brebis Suffolk au cours des différents états physiologiques.**

LAGACHE Frédéric

**Résumé**

Le premier objectif de ce travail est d'étudier l'évolution naturelle du profil de sécrétion de la GH au cours des différents états physiologiques de la brebis Suffolk et de la comparer à celle des gonadotropines hypophysaires (LH et FSH) et des stéroïdes ovariens (P<sub>4</sub> et E<sub>2</sub>). En milieu de saison de reproduction, les taux moyens de GH augmentent en fin de phase folliculaire du cycle, il en est de même au début de saison bien que les brebis ne paraissent pas être en cycle régulier. En anoestrus, on n'observe pas d'augmentation des sécrétions moyennes. Pour les autres hormones, l'évolution des profils de sécrétion confirme les résultats obtenus antérieurement au laboratoire. Le second objectif est d'étudier l'effet d'un traitement de GH recombinante bovine administrée *in vivo* sur la concentration plasmatique en GH, sur les mécanismes de la croissance folliculaire terminale, sur les taux d'ovulation et sur l'évolution de la sécrétion des hormones sexuelles aux cours des différents états physiologiques. Le traitement augmente le nombre de follicules recrutés, sélectionnés et dominants au cours des 3 périodes étudiées ainsi que le taux d'ovulation au début et en milieu de saison de reproduction. L'administration de GH augmente le taux plasmatique de l'hormone pendant au moins 15 heures en milieu de saison de reproduction, 8 heures en anoestrus et, en début de saison, il se maintient au moins 15 heures en fin de cycle contrairement aux autres jours. Le traitement ne modifie pas l'émission de LH mais diminue les taux moyens de FSH et supprime les vagues d'émission en début et milieu de saison. Le traitement augmente les sécrétions de P<sub>4</sub> en milieu de saison et d'E<sub>2</sub> en début de saison de reproduction.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : R. Paquay

Co-promoteur : J.-L. Bister

# **TABLE des MATIERES**

# TABLE DES MATIERES

## INTRODUCTION ET OBJECTIFS POURSUIVIS

## PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

|  |    |
|--|----|
| Chapitre 1 : Généralités concernant la fonction ovarienne de la brebis.....  | 1  |
| 1. <i>Introduction</i> .....   | 1  |
| 2. <i>Le cycle oestral de la brebis</i> .....                                | 1  |
| 3. <i>La gamétogenèse femelle</i> .....                                      | 2  |
| 3.1. L'ovaire.....   | 2  |
| 3.2. L'ovogenèse.....  | 3  |
| 3.3. La folliculogenèse basale.....  | 4  |
| 3.3.1. Initiation.....   | 4  |
| 3.3.2. Croissance des follicules.....  | 4  |
| 3.4. La croissance folliculaire terminale.....                               | 5  |
| 3.5. L'atrésie folliculaire.....   | 7  |
| 4. <i>Les hormones impliquées dans le contrôle du cycle oestral</i> .....    | 8  |
| 4.1. L'hormone hypothalamique: la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone)..... | 8  |
| 4.1.1. Structure.....  | 8  |
| 4.1.2. Mode d'action.....  | 8  |
| 4.1.3. Profil de sécrétion.....  | 8  |
| 4.1.4. Contrôle de la sécrétion.....   | 9  |
| 4.2. Les hormones gonadotropes hypophysaires: la LH et la FSH.....           | 9  |
| 4.2.1. Structure.....  | 9  |
| 4.2.2. Profil de sécrétion.....  | 9  |
| 4.2.3. Mode d'action.....  | 10 |
| 4.2.4. Rôles.....  | 10 |
| 4.2.5. Contrôle de la sécrétion.....   | 11 |
| 4.3. Les hormones stéroïdiennes.....   | 12 |
| 4.3.1. Biosynthèse des stéroïdes sexuels.....                                | 12 |
| a. Les oestrogènes.....  | 13 |
| b. La progestérone (P <sub>4</sub> ).....                                    | 14 |
| c. L'androstènedione ( $\Delta$ 4).....                                      | 14 |
| 4.3.2. Compartimentation de la stéroïdogenèse.....                           | 14 |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.3.3. Contrôle de la stéroïdogénèse.....                                   | 15        |
| 4.3.4. Profils de sécrétion au cours du cycle .....                         | 15        |
| 4.3.5. Mode d'action .....  | 16        |
| <b>5. Contrôle de la croissance folliculaire terminale.....</b>             | <b>16</b> |
| 5.1. Le recrutement.....  | 16        |
| 5.2. La sélection et la dominance .....                                     | 17        |
| 5.3. L'atrésie folliculaire.....  | 17        |
| <b>6. Effets de la saison sur l'activité ovarienne .....</b>                | <b>18</b> |
| 6.1. L'anoestrus .....  | 18        |
| 6.1.1. La stéroïdogénèse des follicules.....                                | 18        |
| 6.1.2. La sécrétion des gonadotropines .....                                | 19        |
| 6.1.3. L'influence de la photopériode .....                                 | 20        |
| 6.1.4. La croissance folliculaire .....                                     | 21        |
| 6.2. Le début de la saison de reproduction .....                            | 21        |
| 6.2.1. Sécrétions des gonadotropines et des stéroïdes.....                  | 21        |
| 6.2.2. Croissance folliculaire .....  | 22        |
| <br>  |           |
| <b>Chapitre 2 : L'hormone de croissance (GH).....</b>                       | <b>23</b> |
| <b>1. Localisation.....</b>   | <b>23</b> |
| <b>2. Structure .....</b>   | <b>24</b> |
| <b>3. Mode d'action.....</b>  | <b>24</b> |
| 3.1. Généralités.....   | 24        |
| 3.2. Complexe hormone-récepteur .....                                       | 25        |
| 3.3. Voies de signalisation .....   | 26        |
| 3.3.1. Voie des phosphorylations en cascade.....                            | 26        |
| 3.3.2. Voie des médiateurs lipidiques .....                                 | 26        |
| 3.4. Régulation des récepteurs de la GH .....                               | 27        |
| 3.5. Régulation de l'expression génique par la GH.....                      | 27        |
| <b>4. Contrôle de la sécrétion.....</b>                                     | <b>27</b> |
| 4.1. Contrôle par les hormones hypophysaires.....                           | 27        |
| 4.2. Substances et facteurs régulateurs de la sécrétion de GH.....          | 28        |
| <b>5. Les protéines de liaison.....</b>                                     | <b>29</b> |
| <b>6. Les effets de la GH.....</b>  | <b>30</b> |
| 6.1. Effets de la GH sur le développement de l'organisme.....               | 30        |
| 6.2. Effets sur le métabolisme protéique.....                               | 31        |
| 6.3. Effets sur le métabolisme des graisses et des hydrates de carbone..... | 31        |
| 6.4. Interactions avec l'insuline (Wright, 1980) .....                      | 32        |
| 6.5. Les effets de la GH sur l'activité de divers organes.....              | 33        |
| 6.6. Les effets de la GH sur l'ovaire.....                                  | 33        |

|   |           |
|---|-----------|
| 6.7. Autres effets de la GH.....                  | 34        |
| <b>Chapitre 3 : Le système IGF.....</b>           | <b>35</b> |
| <b>1. Les IGF.....</b>                            | <b>35</b> |
| 1.1. Structure.....                               | 35        |
| 1.2. Lieux de synthèse.....                       | 36        |
| <b>2. Les protéines de liaison.....</b>           | <b>36</b> |
| 2.1. Structure et synthèse.....                   | 36        |
| 2.2. Le "grand complexe".....                     | 37        |
| 2.3. Le "petit complexe".....                     | 38        |
| 2.4. Rôles.....                                   | 38        |
| <b>3. Les récepteurs.....</b>                     | <b>39</b> |
| 3.1. Le récepteur de type I.....                  | 39        |
| 3.2. Le récepteur de type II.....                 | 39        |
| <b>4. Régulation de l'expression des IGF.....</b> | <b>40</b> |
| <b>5. Rôles des IGF.....</b>                      | <b>40</b> |
| 5.1. IGF-I.....                                   | 40        |
| 5.2. IGF-II.....                                  | 41        |
| <b>6. Rôles des IGF dans l'ovaire.....</b>        | <b>41</b> |

## DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL PERSONNEL

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Chapitre 1 : Matériel et méthodes.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>1. Conditions expérimentales.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>2. Plans expérimentaux.....</b>  | <b>43</b> |
| 2.1. Effets de l'alimentation et du nycthémère sur l'émission de GH.....  | 43        |
| 2.2. Incidence de l'état physiologique sur les profils de sécrétion naturelle de GH et sur la réactivité des follicules durant un traitement de GH administré <i>in vivo</i> .....              | 44        |
| 2.2.1. Analyse des sécrétions hormonales au cours des différents états physiologiques sur des brebis traitées <i>in vivo</i> à la GH et sur des brebis témoins.....                             | 45        |
| 2.2.2. Analyse des croissances folliculaires et des taux d'ovulation au cours des différents états physiologiques sur des brebis traitées <i>in vivo</i> à la GH et sur des brebis témoins..... | 45        |
| <b>3. Méthodes utilisées.....</b>   | <b>46</b> |
| 3.1. Techniques et traitements utilisés <i>in vivo</i> .....  | 46        |
| 3.1.1. Synchronisation des cycles.....  | 46        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1.2. Injection de bGHrec .....   | 46        |
| 3.1.3. Prises de sang .....  | 46        |
| 3.1.4. Endoscopies .....   | 47        |
| 3.2. Dosages hormonaux.....  | 47        |
| 3.2.1. Principe du dosage radioimmunologique.....  | 47        |
| 3.2.2. Calcul des résultats.....   | 48        |
| 3.2.3. Solutions utilisées.....  | 49        |
| 3.2.4. Dosages des gonadotropines.....   | 49        |
| a. Dosage de la LH.....  | 49        |
| b. Dosage de la FSH.....   | 51        |
| 3.2.5. Dosage de l'hormone de croissance (GH).....   | 51        |
| 3.2.6. Dosages des stéroïdes.....  | 52        |
| a. Dosage de l'oestradiol (E2).....  | 52        |
| b. Dosage de la progestérone (P4).....   | 53        |
| 3.3. Analyses statistiques .....   | 54        |
| 3.4. Calcul des moyennes lissées .....   | 54        |
| <br>   |           |
| <b>Chapitre 2 : Résultats.....</b>   | <b>55</b> |
| <br>   |           |
| <b>I : Effets de l'alimentation et du nyctémère sur l'évolution des concentrations plasmatiques de GH : essai préliminaire .....</b>                                 | <b>55</b> |
| <b>1. Rappel des objectifs et protocole expérimental.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>2. Résultats .....</b>  | <b>55</b> |
| <b>3. Discussion.....</b>  | <b>57</b> |
| 3.1. Effets de l'alimentation.....   | 57        |
| 3.2. Effets du nyctémère .....   | 59        |
| <b>4. Conclusions.....</b>   | <b>60</b> |
| <br>   |           |
| <b>II : Influence d'un traitement à la GH et de l'état physiologique sur la croissance folliculaire et sur les profils de sécrétion de différentes hormones.....</b> | <b>61</b> |
| <b>1. Rappel des objectifs et protocole expérimental.....</b>  | <b>61</b> |
| 1.1. Etude des sécrétions hormonales .....   | 61        |
| 1.2. Etude des croissances folliculaires .....   | 62        |
| <b>2. Méthode de présentation des résultats pour la GH et pour la LH.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>3. Résultats obtenus en milieu de saison de reproduction.....</b>   | <b>64</b> |
| 3.1. Evolution des concentrations plasmatiques et de la pulsativité de la GH.....  | 64        |
| 3.1.1. Analyse des sécrétions de GH durant 17 jours.....   | 64        |
| 3.1.2. Analyse des sécrétions de GH durant 12 heures au jour 9.....  | 64        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.1.3. Analyse des sécrétions de GH pendant 24 heures au jour<br>16 .....               | 65        |
| 3.1.4. Conclusions .....  | 66        |
| 3.2. Effets d'un traitement de bGHrec sur la croissance folliculaire<br>terminale ..... | 66        |
| 3.3. Evolution des concentrations plasmatiques et de la pulsativité de la LH .....      | 67        |
| 3.3.1. Analyse des sécrétions de LH pendant 17 jours .....                              | 67        |
| 3.3.2. Analyse des sécrétions de LH pendant le jour 9 .....                             | 67        |
| 3.3.3. Analyse des sécrétions de LH pendant le jour 16.....                             | 68        |
| 3.3.4. Conclusions.....   | 68        |
| 3.4. Evolution des sécrétions de la FSH et des stéroïdes sexuels.....                   | 69        |
| 3.4.1. La FSH.....  | 69        |
| 3.4.2. La progestérone.....   | 69        |
| 3.4.3. L'oestradiol .....   | 70        |
| 3.4.4. Conclusion.....  | 70        |
| <b>4. Résultats obtenus en anoestrus.....</b>   | <b>71</b> |
| 4.1. Evolution des concentrations plasmatiques et de la pulsativité de la GH.....       | 71        |
| 4.1.1. Analyse des sécrétions de GH durant 17 jours.....                                | 71        |
| 4.1.2. Analyse des sécrétions de GH durant 12 heures au jour 9.....                     | 71        |
| 4.1.3. Analyse des sécrétions de GH pendant 24 heures au jour 16.....                   | 72        |
| 4.1.4. Conclusions.....   | 73        |
| 4.2. Effets d'un traitement de bGHrec sur la croissance folliculaire<br>terminale ..... | 73        |
| 4.3. Evolution des concentrations plasmatiques et de la pulsativité de la LH .....      | 74        |
| 4.3.1. Analyse des sécrétions de LH pendant 17 jours .....                              | 74        |
| 4.3.2. Analyse des sécrétions de LH pendant le jour 9 .....                             | 75        |
| 4.3.3. Analyse des sécrétions de LH pendant le jour 16.....                             | 75        |
| 4.3.4. Conclusions.....   | 75        |
| 4.4. Evolution des sécrétions de la FSH et des stéroïdes sexuels.....                   | 76        |
| 4.4.1. La FSH.....  | 76        |
| 4.4.2. La progestérone.....   | 76        |
| 4.4.3. L'oestradiol .....   | 76        |
| 4.4.4. Conclusion.....  | 77        |
| <b>5. Résultats obtenus au début de la saison de reproduction .....</b>                 | <b>78</b> |
| 5.1. Evolution des concentrations plasmatiques et de la pulsativité de la GH.....       | 78        |
| 5.1.1. Analyse des sécrétions de GH durant 17 jours.....                                | 78        |
| 5.1.2. Analyse des sécrétions de GH pendant 12 heures au jour<br>9.....                 | 79        |
| 5.1.3. Analyse des sécrétions de GH pendant 24 heures au jour 16.....                   | 79        |

|   |    |
|---|----|
| 5.1.4. Conclusions.....   | 80 |
| 5.2. Effets d'un traitement de bGHrec sur la croissance folliculaire et sur les<br>taux d'ovulation.....  | 81 |
| 5.3. Evolution des sécrétions moyennes et pulsatiles de la LH .....                                       | 82 |
| 5.3.1. Evolution des sécrétions de LH pendant 17 jours .....  | 82 |
| 5.3.2. Evolution des sécrétions de LH pendant le jour 9 .....   | 82 |
| 5.3.3. Evolution des sécrétions de LH pendant le jour 16.....   | 82 |
| 5.3.4. Conclusions.....   | 83 |
| 5.4. Evolution des sécrétions de FSH et des stéroïdes sexuels .....                                       | 83 |
| 5.4.1. La FSH.....  | 83 |
| 5.4.2. La progestérone.....   | 84 |
| 5.4.3. L'oestradiol .....   | 84 |
| 5.4.4. Conclusions.....   | 85 |
| 6. <b>Discussion</b> .....  | 86 |
| 6.1. Effets de l'expérimentation sur la croissance folliculaire et les profils<br>endocriniens.....       | 86 |
| 6.2. Evolution des sécrétions naturelles de GH.....   | 86 |
| 6.2.1. Effets du nyctémère et de l'alimentation.....  | 86 |
| 6.2.2. Evolution pendant le cycle.....  | 87 |
| 6.2.3. Evolution en fonction de la saison.....  | 88 |
| 6.3. Effets d'un traitement à la bGHrec sur les concentrations plasmatiques<br>de GH.....                 | 89 |
| 6.4. Effets d'un traitement à la bGHrec sur les croissances folliculaires et les<br>taux d'ovulation..... | 89 |
| 6.5. Effets d'un traitement à la bGHrec sur les sécrétions hormonales .....                               | 90 |
| 6.5.1. La LH.....   | 90 |
| 6.5.2. La FSH.....  | 91 |
| 6.5.3. La P4.....   | 91 |
| 6.5.4. L'E <sub>2</sub> .....   | 92 |
| 7. <b>Conclusions générales</b> .....   | 93 |
| 7.1. Emission naturelle de la GH, des hormones hypophysaires et des<br>stéroïdes ovariens.....            | 93 |
| 7.2. Les effets de l'administration de bGHrec.....  | 94 |
| 8. <b>Perspectives</b> .....  | 95 |

*Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont soutenu tout au long de sa réalisation.*

*Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur R. Paquay, mon promoteur, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour ses conseils judicieux lors de la rédaction et pour sa constante disponibilité.*

*Je remercie le Dr J-L. Bister, mon co-promoteur, pour sa constante disponibilité, sa bonne humeur et ses remarques judicieuses lors de la rédaction.*

*J'aimerais également adresser mes plus vifs remerciements à mademoiselle Bernadette Perrad pour son aide à toutes les étapes pratiques et didactiques de ce travail, ses conseils, sa confiance et ... son humour.*

*J'aimerais sincèrement remercier le Dr Bénédicte Noël pour son aide pratique et logistique sans oublier sa constante disponibilité, ses conseils et sa gentillesse.*

*Que tous les membres du personnel du Laboratoire de Physiologie Animale et du Centre de Recherches Ovines de Faulx-les-Tombes soient remerciés pour leur collaboration et l'accueil qu'ils m'ont réservé.*

*Je ne puis oublier aussi monsieur Derijders, directeur du département vétérinaire de la firme Eli Lilly Belgique, à la fois pour son accueil et pour avoir gracieusement fourni l'importante quantité d'hormone de croissance nécessaire aux expériences.*

*Je remercie également les docteurs Cognié et Monget de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Tours-Nouzilly ( I.N.R.A, France) pour leur accueil et pour avoir partagé leur connaissance sur l'hormone de croissance et le système IGF.*

*Un grand merci à mes parents dont le soutien tout au long de ces années fut pour moi le meilleur des encouragements.*

*Enfin merci beaucoup à Béatrice, Benoît, France et Laurent.*

## LISTE DES ABREVIATIONS

|                   |  |
|-------------------|--|
| A                 | Radioactivité de la fraction liée                |
| ADN               | Acide Désoxyribonucléique                        |
| AMPc              | Adénosine-5'-Monophosphate cyclique              |
| Ao                | Radioactivité de la fraction libre               |
| ARNm              | Acide Ribonucléique messenger                    |
| As                | Antisérum  |
| BG                | Back Ground                                      |
| BP                | Binding Protein                                  |
| Cf                | Concentration en hormone froide                  |
| Cm                | Concentration en hormone marquée                 |
| cm                | centimètre                                       |
| cpm               | coups par minute                                 |
| $\Delta_4$        | androstènedione                                  |
| DAG               | Diacylglycérol                                   |
| E1                | Oestrone   |
| E2                | Oestradiol                                       |
| E3                | Oestriol   |
| FGA               | Fluorogestone Acétate                            |
| FSH               | Follicle Stimulating Hormone                     |
| FSH-RH            | Follicle Stimulating Hormone - Releasing Hormone |
| GH                | Growth Hormone ; hormone de croissance           |
| GH-BP             | Growth Hormone - Binding Protein                 |
| bGH               | bovine Growth Hormone                            |
| bGHrec            | Hormone de croissance recombinante bovine        |
| eGH               | équine Growth Hormone                            |
| oGh               | ovine Growth Hormone                             |
| pGH               | porcine Growth Hormone                           |
| GnRH              | Gonadotropin Releasing Hormone                   |
| GRH               | Growth Releasing Hormone                         |
| H*                | Hormone marquée                                  |
| H <sub>2</sub> Od | eau distillée                                    |
| H <sup>o</sup>    | Hormone libre                                    |
| IGF               | Insulin Like Growth Factor                       |
| IGF-BP            | Insulin Like Growth Factor - Binding Protein     |
| IGF-I             | Insulin Like Growth Factor I                     |
| IGF-II            | Insulin Like Growth Factor II                    |

|                     |                                    |
|---------------------|------------------------------------|
| INH                 | Inhibine                           |
| IP3                 | Inositol-3-phosphate               |
| J                   | Jour                               |
| kDa                 | kilodalton                         |
| kg                  | kilogramme                         |
| LH                  | Luteinizing Hormone                |
| M6P                 | Mannose-6-Phosphate                |
| mg                  | milligramme                        |
| μl                  | microlitre                         |
| ml                  | millilitre                         |
| mm                  | millimètre                         |
| ng                  | nanogramme                         |
| P4                  | progestérone                       |
| P450 <sub>scc</sub> | Cytochrome P450 side chain clivage |
| PC                  | Phosphatidylcholine                |
| pg                  | picogramme                         |
| PGF2 $\alpha$       | Prostaglandine F2 $\alpha$         |
| PL                  | Placental Lactogen                 |
| PLC                 | Phospholipase C                    |
| PMSG                | Pregnant Mare Serum Gonadotropin   |
| PRL                 | Prolactine                         |
| RIA                 | Radioimmunoassay                   |
| SS                  | Somatostatine                      |
| T                   | Testostérone                       |
| TO                  | Taux d'ovulation                   |
| UI/g                | Unité Internationale / gramme      |
| °C                  | degré Celsius                      |

**INTRODUCTION**  
**et**  
**OBJECTIFS POURSUIVIS**

Au cours des trois dernières décennies, l'agriculture des pays développés a subi des changements considérables. La concentration numérique et géographique ainsi que l'accroissement de la taille des exploitations d'élevage se sont accompagnés d'une réduction du nombre de races employées et, dans beaucoup d'espèces, d'une forte sélection sur les caractères de production: production laitière, vitesse de croissance et qualité des carcasses.

Si l'importance sociale de l'élevage a diminué, son importance économique s'est accrue puisque la consommation de viande par tête d'habitant a fortement augmenté dans l'Union Européenne (de 48,2 kg en 1960 à 81,1 kg en 1985; Chemineau *et al.*, 1991).

Les élevages intensifs doivent être de plus en plus performants tout en gardant une production de qualité adaptée aux exigences du marché. Dans les élevages extensifs, qui subsistent encore parce que bien adaptés à des milieux difficiles, la maîtrise du moment de la reproduction pour faire coïncider les ressources fourragères et les besoins des animaux de ferme est essentielle. Dans ce contexte, la maîtrise de la reproduction des animaux de ferme est très vite apparue comme une des clés du développement de l'élevage.

La maîtrise de la reproduction présente plusieurs avantages considérables. Elle permet de choisir la période de mise bas, de diminuer les périodes improductives, d'optimiser la taille de la portée et enfin d'accélérer le progrès génétique.

Dans nos régions, la productivité de l'espèce ovine est relativement limitée, car les périodes d'anoestrus saisonnier et post-partum, ainsi que le faible taux d'ovulation observé chez la plupart de nos races viandeuses limitent l'efficacité de la reproduction. Partant, une amélioration de la productivité ovine passe par une maîtrise des processus de reproduction. Ceci n'est possible que si l'ensemble des mécanismes impliqués dans la reproduction sont bien connus. Beaucoup reste encore à faire dans ce domaine, car les processus sont complexes et incomplètement élucidés. C'est pourquoi le "Laboratoire de Physiologie Animale des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur" oriente ses recherches dans cette direction depuis plusieurs années. On y étudie les mécanismes ovariens et endocriniens qui interviennent au cours des différents états physiologiques de la brebis, ainsi que les effets de différents traitements hormonaux sur l'activité folliculaire.

Si les mécanismes de croissance et de maturation folliculaire font l'objet de nombreuses recherches, il n'en demeure pas moins vrai que les connaissances relatives aux différentes substances régulatrices agissant sur l'activité ovarienne sont encore incomplètes. Parmi ces différentes substances régulatrices, l'hormone de croissance (GH) est une hormone supplémentaire impliquée dans les mécanismes de régulation du développement folliculaire mais ses effets et ses modes d'action restent encore à éclaircir.

Afin d'approfondir les connaissances en la matière, nous avons choisi de centrer notre travail sur l'étude fondamentale des effets de l'hormone de croissance sur l'activité ovarienne de la brebis. Nous avons donc plus précisément étudié les effets de la GH administrée *in vivo* sur la croissance des follicules ovariens et sur l'évolution des sécrétions hormonales au cours des différents états physiologiques.

Les objectifs que nous nous sommes fixés peuvent être résumés comme indiqué ci-après.

Le **premier objectif** est d'étudier l'évolution naturelle du profil de sécrétion de la GH au cours des différents états physiologiques de la brebis Suffolk. Cette étude est menée en parallèle avec celle des profils de sécrétion des gonadotropines hypophysaires (LH et FSH) et des stéroïdes sexuels (progestérone et oestradiol-17 $\beta$ ). Chaque profil de sécrétion hormonale est établi à partir d'échantillons de sang prélevés, à un moment précis de la journée pendant 17 jours, soit la durée du cycle oestral de la brebis. Mais, sachant que la sécrétion de GH est influencée par divers facteurs environnementaux tels l'alimentation et le nyctémère, un test préliminaire a été réalisé afin de mettre en évidence les effets réels de ces deux facteurs sur l'émission de GH. Ce test nous a indiqué le moment optimum auquel il fallait procéder aux prises de sang quotidiennes pour éliminer autant que possible l'incidence des deux facteurs précités.

Le **second objectif** est d'étudier l'effet d'un traitement de GH recombinante bovine (bGHrec) administrée *in vivo* sur les mécanismes de la croissance folliculaire terminale et sur les taux d'ovulation au cours des différents états physiologiques. Nous avons également étudié les effets de ce même traitement sur l'évolution des sécrétions hormonales au cours des différents états physiologiques.

Ce travail est divisé en deux parties. La première est théorique; il s'agit d'une revue bibliographique qui comprend 3 chapitres : la description des phénomènes liés à la reproduction du mouton, l'hormone de croissance et le système des "Insulin like Growth Factors". La seconde reprend le travail personnel réalisé au cours de cette année et est divisée en 3 chapitres : matériel et méthodes, résultats et discussion, conclusions et perspectives.

**PREMIERE PARTIE**

**Revue bibliographique**

# CHAPITRE 1 : GENERALITES CONCERNANT LA FONCTION OVARIENNE DE LA BREBIS

## 1. Introduction

On distingue chez la brebis trois états physiologiques différents: l'activité sexuelle cyclique, l'anoestrus et la gestation.

L'**activité sexuelle** de la brebis est de type polyoestrus saisonnier et à ovulation spontanée intervenant à la fin de la période des chaleurs. La brebis n'est donc en cycle que durant une période déterminée de l'année au cours de laquelle elle présente plusieurs cycles oestriques successifs (Derivaux et Ectors, 1986). Le facteur clé déterminant la saison sexuelle est la photopériode. En effet, l'activité ovarienne débute généralement en photopériode décroissante et est maximale fin automne, début hiver.

Si la brebis n'a pas été fécondée pendant la période d'activité sexuelle, l'**anoestrus saisonnier** débute lorsque la durée des jours augmente, c'est-à-dire en février-mars pour la brebis Suffolk. Il est caractérisé par une absence d'ovulations accompagnées de comportement sexuel (Malpaux, 1988). En règle générale, l'arrêt des comportements d'oestrus va de pair avec celui des ovulations, mais des ovulations "silencieuses" sont parfois observées, notamment à l'approche de la saison de reproduction.

La **gestation**, quant à elle, est la période s'étendant de la fécondation à la parturition; sa durée est de 140 à 150 jours.

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéresserons uniquement à l'activité cyclique et à l'anoestrus saisonnier.

## 2. Le cycle oestral de la brebis

D'une durée moyenne estimée à 17 jours, le cycle de la brebis est divisé classiquement en 2 périodes:

- une **phase folliculaire**, allant du jour 14 au jour 0; elle correspond à la période où les ovaires ne portent plus de corps jaune actif et présentent une vague de croissance de follicules ovariens qui pourront atteindre la maturation et aboutir à l'ovulation (N.B: en

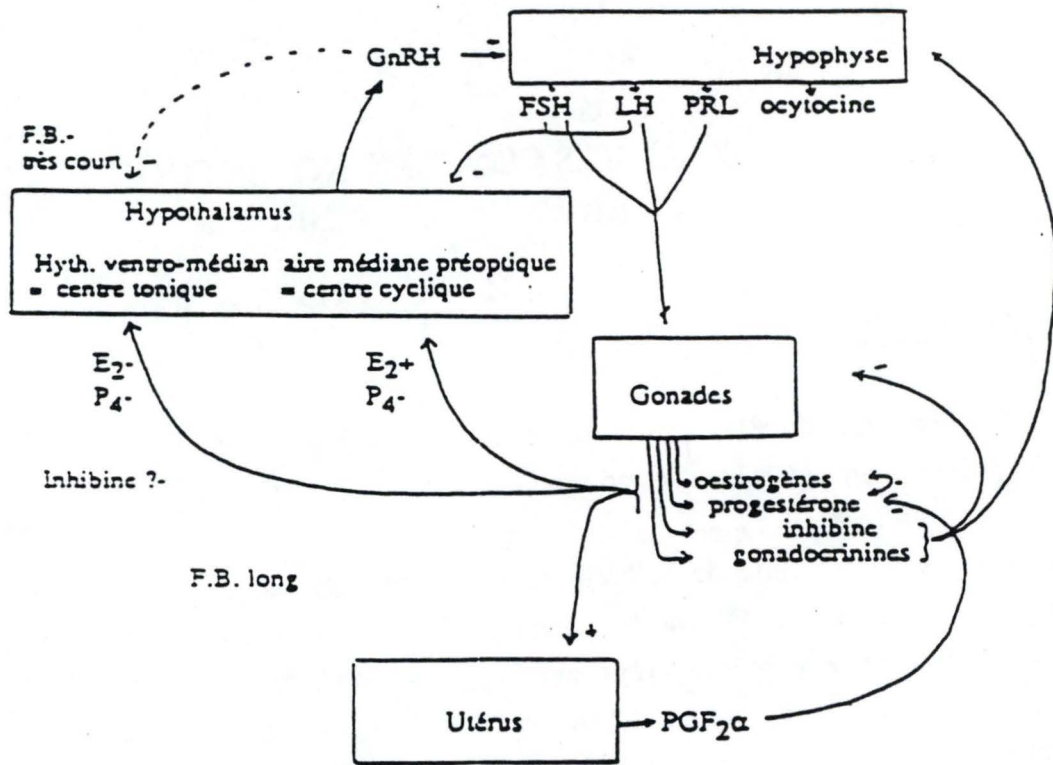


Figure 1: Contrôle endocrinien du cycle sexuel (Bister, 1991).

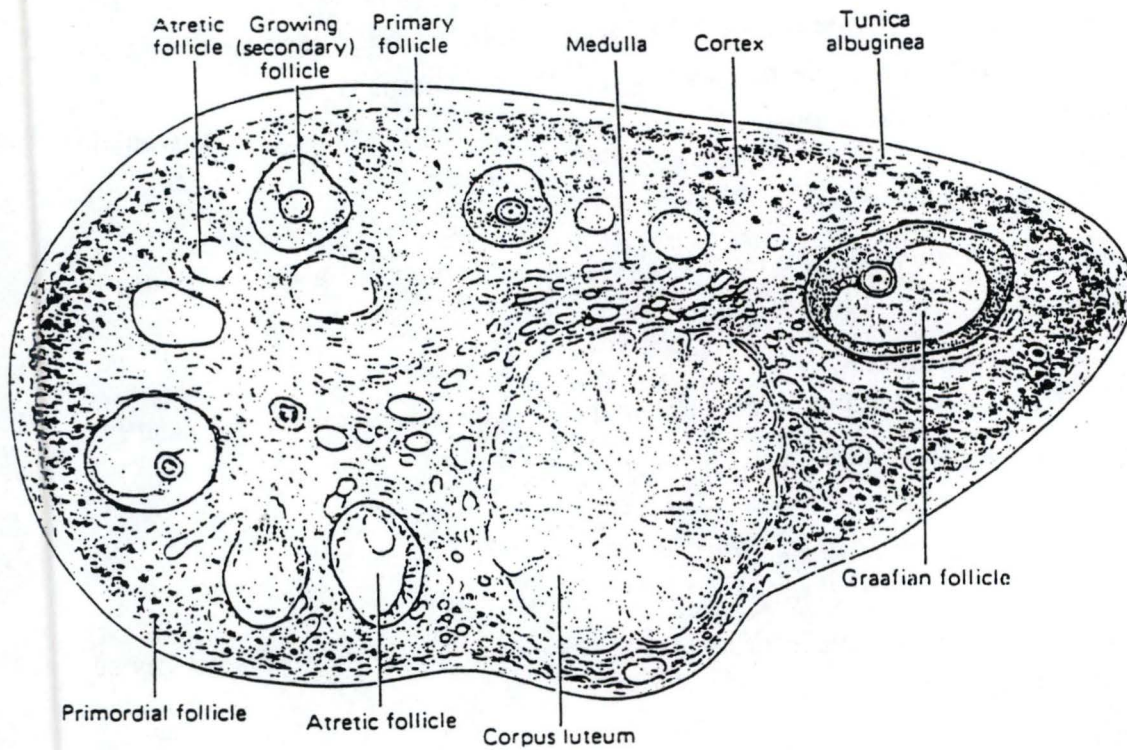


Figure 2: Structure histologique de l'ovaire (Junqueira et Carneiro, 1986).

physiologie animale, le jour de l'ovulation est considéré par convention comme le jour 0 du cycle);

- une **phase lutéale**, allant du jour 1 au jour 13; elle correspond à la période d'activité du (des) corps jaune(s) cyclique(s). Ceux-ci se forment au jour 1 à partir des follicules rompus suite à l'ovulation. Leur activité croît pour atteindre un maximum entre le 8<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour du cycle puis le corps jaune régresse à partir du 13<sup>ème</sup> jour : c'est la lutéolyse.

Au cours de ces deux phases, les modifications morphologiques et sécrétrices observées tant au niveau de l'ovaire que du tractus génital sont influencées par de nombreuses substances hormonales dont les plus spécifiques sont sécrétées par l'axe hypothalamus-hypophyse-ovaire-utérus (figure 1).

### 3. La gamétogenèse femelle

La gamétogenèse se passe, après la naissance, uniquement au sein de l'ovaire.

#### 3.1. L'ovaire (figure 2)

L'ovaire de brebis est un organe ovoïde de 1 à 3 cm de long et de 1 à 2 cm de large pour un poids de 3 à 7 grammes. Schématiquement, cet organe est composé :

- d'une **région médullaire** (médulla), constituée d'une zone parenchymateuse faite de tissu conjonctif lâche et d'une zone hilare fibreuse où pénètrent l'innervation ainsi que la vascularisation sanguine et lymphatique;
- d'une **région corticale**, siège de l'activité folliculaire, portant une centaine de milliers de follicules primordiaux, de nombreux follicules en croissance basale (au stade primaire, secondaire ou tertiaire), quelques follicules antraux en phase de croissance terminale et éventuellement un ou quelques corps jaunes.

Parallèlement à la croissance des follicules conduisant à l'ovulation puis à la lutéinisation, tous les stades d'involution folliculaire ou lutéale peuvent être observés. De plus, l'ovaire a une double fonction: produire des gamètes (27 chromosomes) et sécréter de

nombreuses hormones protéiques, peptidiques et surtout stéroïdiennes (Derivaux et Ectors, 1986; Bister, 1991; Driancourt *et al.*, 1991).

Chez le mammifère femelle, la gamétogenèse comporte deux phases: l'**ovogenèse**, pendant laquelle se constitue le stock de cellules germinales donc de follicules primordiaux, et la **folliculogenèse** qui est la succession des différentes étapes du développement du follicule depuis le moment où il sort de la réserve constituée au cours de l'ovogenèse jusqu'à son involution ou sa rupture au moment de l'ovulation.

On distingue encore une folliculogenèse "basale", permanente et indépendante de l'état physiologique de l'animal et une folliculogenèse "tonique" également appelée croissance folliculaire terminale influencée par les variations des concentrations en hormones gonadotropes au cours du cycle oestral (Driancourt *et al.*, 1984; Mc Neilly *et al.*, 1986).

Nous allons décrire ces différentes étapes en insistant plus particulièrement sur la croissance folliculaire terminale sur laquelle nous avons travaillé.

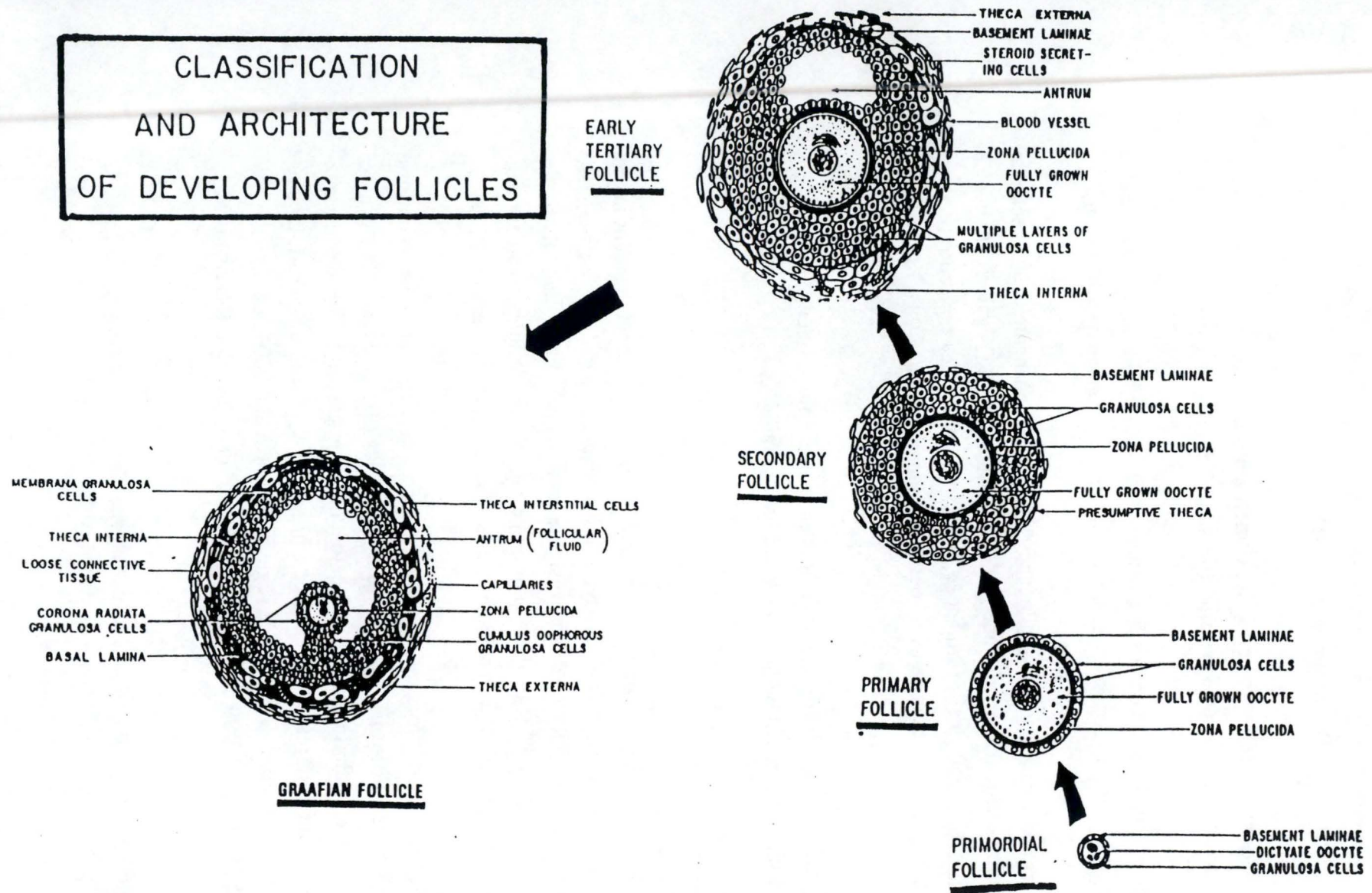
### 3.2. L'ovogenèse

Chez la brebis, le stock de follicules primordiaux se constitue pendant la vie foetale. Les cellules précurseurs des ovocytes, les ovogonies ou cellules ovogoniales, sont originaires de l'endoblaste de la vésicule ombilicale; après une phase de multiplication (entre le 30<sup>ème</sup> et le 90<sup>ème</sup> jour de gestation), ces cellules entament leur première division de méiose qui restera bloquée au stade diplotène (Mariana *et al.*, 1991).

Les ovocytes sont alors entourés par une couche de cellules de granulosa cuboïdales ou aplaties, et forment la réserve de follicules primordiaux. Ce stock de follicules commence à diminuer dès la vie foetale: une grande partie d'entre eux dégénèrent, tandis que d'autres démarrent leur croissance. Le nombre de ces follicules primordiaux est très variable. Il dépend de l'âge: de 50 000 à 200 000 chez l'agnelle à la naissance et de 20 000 à 86 000 chez une brebis Ile-de-France adulte (Mariana *et al.*, 1991).

Le contrôle de l'ovogenèse semble indépendant des gonadotropines.

**CLASSIFICATION  
AND ARCHITECTURE  
OF DEVELOPING FOLLICLES**



*Figure 3: Principales étapes de la croissance et de la différenciation folliculaire (Erickson et al., 1985).*

### 3.3. La folliculogénèse basale (figure 3)

La folliculogénèse basale est un phénomène continu car, chaque jour, des follicules entrent en phase de croissance. Elle ne concerne que les follicules de taille inférieure à 2 mm, soit du stade primordial au début du stade antral.

#### 3.3.1. Initiation

Selon Greenwald et Terranova (1988), chez le foetus ovin, l'initiation du développement folliculaire peut débuter à partir du 70<sup>ème</sup> jour de la gestation dès la formation des premiers follicules primordiaux.

Les facteurs qui déclenchent l'entrée en croissance sont encore très mal connus; il s'agit probablement d'un phénomène endogène de l'ovaire s'effectuant par l'intermédiaire de cybernines. Selon certains auteurs, les gonadotropines ne seraient pas impliquées car l'ablation de l'hypophyse (Driancourt *et al.*, 1987; Fry *et al.*, 1987) ou son inhibition chimique (Cognié, 1988) ou encore l'immunisation contre la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) (Mc Neilly *et al.*, 1986) provoque un arrêt du développement des follicules de diamètre supérieur à 2 mm, tandis que 40% des follicules de taille inférieure restent sains. Par contre, selon Driancourt et collaborateurs (1991), l'indépendance stricte de la folliculogénèse basale envers l'axe hypothalamo-hypophysaire ne serait pas encore démontrée. En effet, selon Scaramuzzi et collaborateurs (1993), les follicules préantraux possèderaient des récepteurs à la LH (Luteinizing Hormone) sur les cellules de la thèque et des récepteurs à la FSH (Follicle Stimulating Hormone) sur les cellules de la granulosa. Il semblerait donc que ces follicules soient capables de croître indépendamment des gonadotropines et cela malgré la présence de récepteurs. Par contre, le développement des follicules au-delà de 2 mm requiert impérativement l'action des gonadotropines (Turnbull *et al.*, 1977; Driancourt *et al.*, 1984). C'est ce qui différencie la croissance folliculaire terminale de la folliculogénèse basale.

#### 3.3.2. Croissance des follicules

Au cours de son évolution, le follicule passe par divers stades pour former le "pool" de follicules préantraux qui pourront ensuite entamer la phase de recrutement folliculaire (Yen et Jaffe, 1991). On distingue classiquement les follicules primordiaux, primaires, secondaires, tertiaires et antraux (Erickson *et al.*, 1985; Junqueira *et al.*, 1986). Les étapes du développement folliculaire concernent principalement les cellules folliculaires mais aussi l'ovocyte et le stroma entourant les follicules :

- les **follicules primordiaux** comprennent un ovocyte primaire entouré par une seule assise de cellules prégranulosales aplaties. Ils apparaissent au cours de la vie foetale et ont une taille moyenne de 30  $\mu\text{m}$  de diamètre.
- les **follicules primaires** constituent le premier stade de croissance des follicules. Ils sont constitués d'une assise de cellules granulosales cubiques entourant l'ovocyte I. Les ovocytes synthétisent et sécrètent des glycoprotéines formant la zone pellucide qui entoure l'ovocyte en le séparant des cellules granulosales. Tandis que la membrane basale ou de Sloviansky sépare l'ovocyte du stroma environnant.
- les **follicules secondaires** correspondent à la phase finale de croissance de l'ovocyte. Ils sont caractérisés par la prolifération des cellules granulosales et présentent une taille moyenne de 130  $\mu\text{m}$  de diamètre. Les cellules du stroma situées à l'extérieur de la membrane basale se différencient et se réarrangent en couches de cellules concentriques pour former la thèque.
- les **follicules tertiaires** possèdent, en plus de la granulosa, des couches cellulaires différenciées: la thèque interne et la thèque externe. La thèque interne est richement vascularisée et peut être considérée comme une glande endocrine, car elle sécrète des androgènes. La thèque externe, quant à elle, est faite principalement de tissu conjonctif.
- les **follicules antraux** ont comme particularité des cavités remplies de liquide folliculaire sécrété par les cellules de la granulosa. Ces cavités grandissent et finissent par fusionner pour ne plus former qu'un grand antrum dans lequel proémine le *cumulus oophorus*, excroissance de la granulosa formée de quelques assises de cellules folliculaires entourant l'ovocyte et la membrane pellucide. Ceci constitue le stade ultime de la croissance du follicule et est appelé follicule de De Graaf ou follicule préovulatoire. Par la suite ces follicules acquièrent les récepteurs aux gonadotropines et aux autres hormones qui dirigeront leur activité et leur développement lors de la croissance terminale.

#### 3.4. La croissance folliculaire terminale

La croissance folliculaire terminale ou folliculogenèse tonique est strictement dépendante des gonadotropines et ne concerne que les follicules à antrum de diamètre supérieur à 2 mm. Elle correspond à la rapide croissance terminale du follicule précédant l'ovulation.

Il existe deux processus distincts dirigeant le développement des follicules préovulatoires: le **recrutement** et la **sélection** (Di Zerega et Hodgen, 1981).

Le **recrutement** est le choix d'un ou plusieurs follicules antraux qui, à un moment donné, vont entamer un processus de croissance rapide. Parmi tous les

follicules recrutés au cours du cycle, quelques-uns seulement atteignent une taille préovulatoire; les autres subissent l'atrésie et disparaissent. Ce phénomène est appelé **sélection**. Seulement un ou quelques-uns d'entre eux appelés follicules **dominants** vont entamer un processus de maturation qui les conduira finalement à l'atrésie ou à l'ovulation suivant la phase du cycle (Fortune, 1994). Les **follicules ovulatoires** se caractérisent par une reprise de la méiose de l'ovocyte. L'ovule se détache de la granulosa, s'entoure de mucus et flotte dans le liquide folliculaire. Au moment de l'ovulation, le liquide folliculaire se répand dans la cavité péritonéale et l'ovule est capté par le pavillon de l'oviducte. Le follicule rompu se transforme alors en une glande endocrine appelée corps jaune et qui sécrète la P4 (progestérone).

Seuls les follicules de plus de 2 mm de diamètre peuvent entamer la croissance folliculaire terminale (Driancourt *et al.*, 1984; Tsonis *et al.*, 1984). Ce critère morphologique correspond en fait à une différenciation fonctionnelle. En effet, à partir de cette taille les follicules acquièrent un grand nombre de récepteurs membranaires à la LH au niveau de la thèque et à la FSH au niveau de la granulosa. Ils sont donc particulièrement sensibles aux hormones hypophysaires (Webb et Gauld, 1984; Fortune, 1994).

La sélection implique le tri final des follicules préovulatoires alors que les autres subissent l'atrésie (Driancourt *et al.*, 1984). Comme le recrutement, la sélection ne garantit pas l'ovulation (Fortune, 1994).

Il semblerait que les follicules sélectionnés aient au moins un diamètre de 4 mm (Driancourt *et al.*, 1984). En fait, à partir de cette taille les follicules possèdent des récepteurs à la LH aussi bien sur les cellules de la thèque que de la granulosa (Webb et Gauld, 1984).

Actuellement, deux hypothèses qui ne s'excluent pas nécessairement l'une l'autre tentent d'expliquer ce mécanisme de sélection engendrant l'apparition du(des) follicule(s) dominant(s):

- l'**hypothèse de la stabilité** rapporte que les follicules dominants se maintiennent en gardant une grande sensibilité aux gonadotropines et sont moins sensibles à la diminution du taux de FSH plasmatique vouant les autres follicules à l'atrésie;
- l'**hypothèse de l'élimination active** dispose que les follicules se maintiennent en supprimant activement la réponse des autres

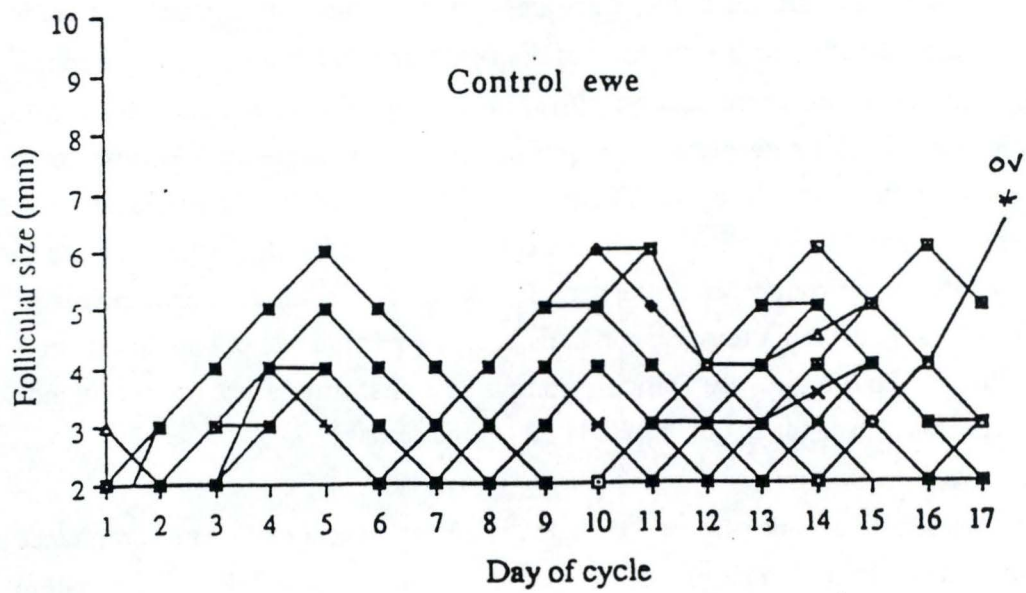


Figure 4: Profil de la croissance folliculaire (Noël et al., 1993).

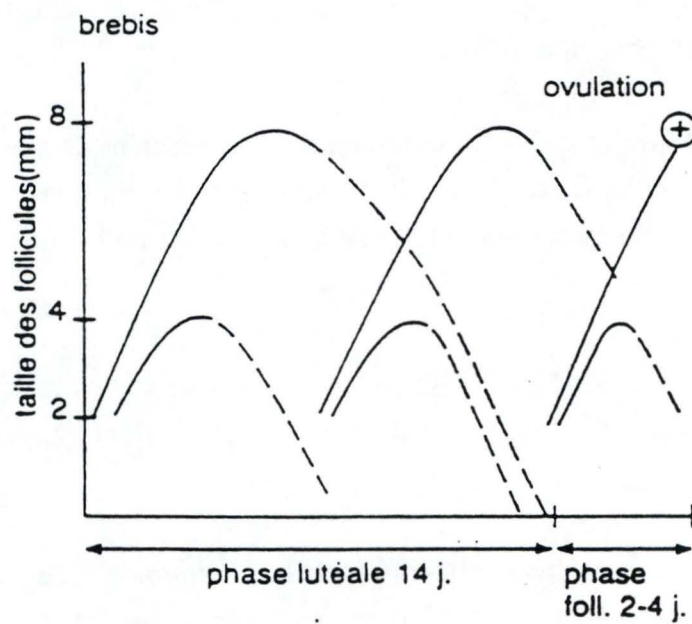


Figure 5: Evolution au cours du cycle du renouvellement des gros follicules (Driancourt et al., 1991).

follicules aux stimulations LH/FSH. Ces follicules dominants agiraient en sécrétant des facteurs qui inhiberaient le développement des autres follicules compétitifs (Di Zerega et Hodgen, 1981).

En recourant à des endoscopies quotidiennes réalisées pendant 17 jours, soit la durée d'un cycle oestral complet, Noël et collaborateurs (1993) ont montré que la croissance folliculaire présente une distribution trimodale au cours du cycle de la brebis Suffolk (figures 4 et 5). Le même phénomène est observé chez la brebis Texel (Jacques, 1989), chez des brebis à faibles taux d'ovulation ou prolifiques (Driancourt *et al.*, 1991), chez les bovins (Ireland et Roche, 1987) et chez les caprins (Ginther *et al.*, 1989).

Pendant la phase lutéale, certains follicules atteignent 4 à 7 mm au cours des deux vagues de croissance puis régressent. Ceci démontre que des follicules de taille préovulatoire peuvent se développer en présence de niveaux hormonaux très différents de ceux de la phase folliculaire, notamment en progestérone. Mais le recrutement du groupe de follicules parmi lesquels se trouve celui ou ceux qui ovulera(ont) se produit presque toujours pendant la phase folliculaire (Jacques, 1989; Noël *et al.*, 1993).

Les différents paramètres de la croissance folliculaire terminale (nombre de follicules recrutés, sélectionnés et dominants, ainsi que la vitesse de croissance et de régression des follicules dominants) ne sont pas affectés par la phase du cycle. Seule la taille moyenne des follicules dominants varie significativement avec un diamètre plus grand en phase folliculaire (Noël *et al.*, 1993). En revanche, Jacques (1989) ne détecte aucune différence significative quels que soient les paramètres envisagés.

### 3.5. L'atrésie folliculaire

Une large majorité des follicules ovariens sont donc voués à disparaître avant d'atteindre l'ovulation. Ceci est le résultat d'un processus involutif, appelé atrésie folliculaire, par lequel les follicules dégénèrent comme suite à l'arrêt des mitoses des cellules granulosales et à la destruction de l'ovocyte (Fortune, 1994).

Pendant l'atrésie, l'ovocyte ainsi que les cellules granulosales meurent et sont remplacés par du tissu fibreux tandis que les cellules thécales présentes à l'extérieur de la membrane basale se différencient et rejoignent le pool de cellules constituant le stroma (Yen et Jaffe, 1991). Cette atrésie est le destin de plus de 99% des follicules et s'observe à tous les stades du développement folliculaire.

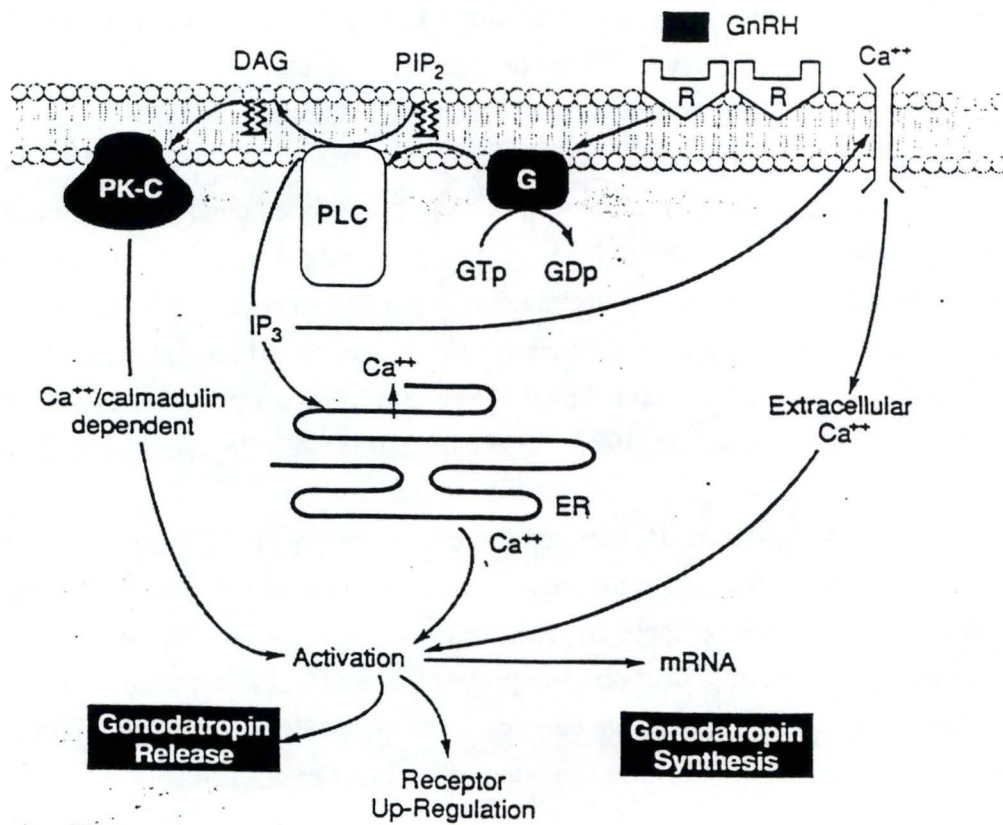


Figure 6: Mode d'action de la GnRH (Yen, 1991).

La GnRH lorsqu'elle est liée, induit une agrégation des récepteurs à la GnRH, un flux extracellulaire de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et une activation enzymatique menant à la formation d'une cascade de messagers secondaires.

Le complexe GnRH-récepteur formé se lie à la protéine G qui induit l'activité enzymatique de la phospholipase C (PLC). Le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) est hydrolysé par la PLC pour former 2 messagers secondaires : le phosphatidylinositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et le diacylglycérol (DAG). Ce dernier active la protéine kinase C (PKC) qui régule ensuite la synthèse et la glycosylation des gonadotropines et stimule les récepteurs à la GnRH. Les fonctions de l' $\text{IP}_3$  sont d'induire la mobilisation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et d'ouvrir les canaux à  $\text{Ca}^{2+}$ . Le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire initie la sécrétion des gonadotropines.

## **4. Les hormones impliquées dans le contrôle du cycle oestral**

Le fonctionnement de l'ovaire, et plus particulièrement la maturation folliculaire, relèvent de mécanismes neuroendocriniens dans lesquels interviennent de manière prépondérante, mais non exclusive, l'appareil hypothalamo-hypophysaire et les gonades. D'autres éléments du système endocrinien participent également à ce fonctionnement : épiphyse, thyroïde, surrénales, placenta.

Dans le cadre de ce travail, nous décrivons le système de régulation par les hormones hypothalamiques (GnRH), hypophysaires (LH et FSH) et gonadiques (androgènes, oestrogènes et progestagènes).

### **4.1. L'hormone hypothalamique: la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone)**

#### **4.1.1. Structure**

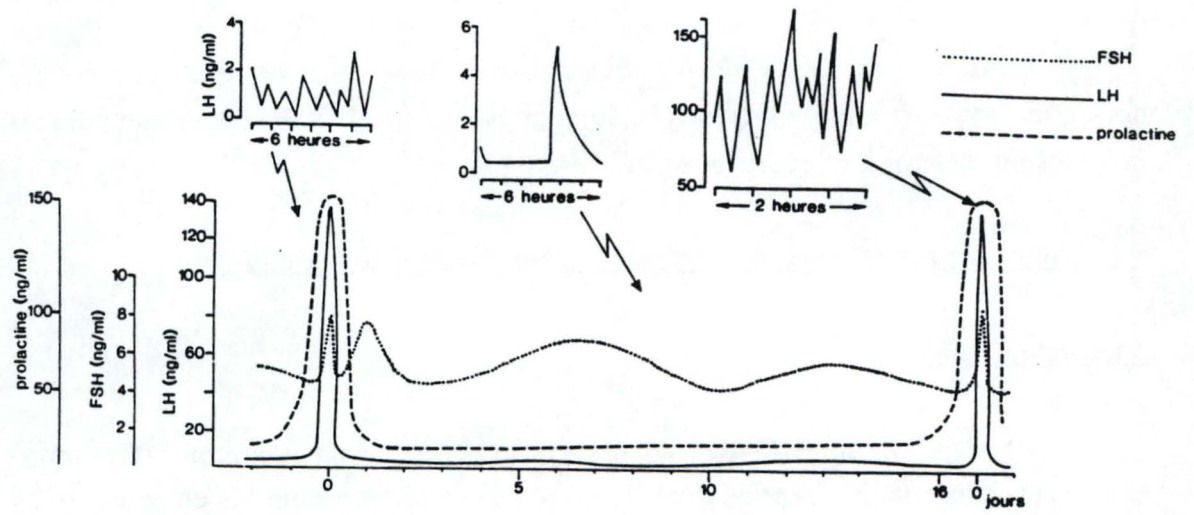
La gonadolibérine (GnRH) est identique chez tous les mammifères (Caldani *et al.*, 1991). C'est un décapeptide dont le poids moléculaire est compris entre 1,2 et 1,4 kDa. Elle a pour cible les cellules gonadotropes de l'hypophyse; sa demi-vie est très courte, de 2 à 4 minutes et elle est catabolisée au niveau du rein (Derivaux et Ectors, 1986).

#### **4.1.2. Mode d'action (figure 6)**

La GnRH est sécrétée par les centres tonique et cyclique de l'hypothalamus dans les capillaires du système porte-hypophysaire et se fixe ensuite aux récepteurs présents à la surface des cellules gonadotropes de l'hypophyse. Suite à cette liaison, l'hormone induit une cascade de réponses cellulaires menant à la biosynthèse et à la sécrétion des gonadotropines hypophysaires (Yen, 1991).

#### **4.1.3. Profil de sécrétion**

La GnRH est émise de façon pulsatile. Sa sécrétion est constante pendant la majeure partie du cycle oestral, excepté en période préovulatoire où elle augmente (Bister, 1991).



*Figure 7: Profils hormonaux des hormones hypophysaires au cours du cycle oestral de la brebis (Driancourt et al., 1991).*

#### 4.1.4. Contrôle de la sécrétion

Le contrôle de la sécrétion de la GnRH est assuré par la GnRH elle-même en un "feed back négatif" très court. D'autre part, les gonadotropines hypophysaires (LH et FSH) jouent un rôle de "feed back négatif" court sur la sécrétion de GnRH, et enfin les hormones ovariennes, notamment la progestérone et les oestrogènes, agissent par un mécanisme de "feed back négatif" long sur les centres de sécrétion de l'hypothalamus (Karsh *et al.*, 1993). Cependant l'oestradiol peut, dans des circonstances précises, induire un "feed back positif" sur le centre cyclique entraînant ainsi au moment de l'oestrus une importante augmentation de la sécrétion de GnRH puis de LH, ce qui déclenche l'ovulation (Karsh *et al.*, 1993; Whitehead, 1990). Cette action nécessite un "environnement" particulier, notamment des taux plasmatiques de progestérone faibles et une émission accrue d'oestradiol.

#### 4.2. Les hormones gonadotropes hypophysaires: la LH et la FSH

Sous l'influence stimulante de la GnRH, l'adénohypophyse sécrète les hormones gonadotropes LH (Luteinizing Hormone) et FSH (Follicle Stimulating Hormone). La concentration de l'hypophyse en gonadotropines est variable suivant les espèces et, dans une même espèce, suivant les races et les individus. L'hypophyse de mouton constitue une source importante de LH et de FSH; en effet, viennent par ordre d'importance quant à la teneur de l'hypophyse en ces hormones : le mouton, le porc, la vache, le cheval (Derivaux et Ectors, 1986). Les proportions relatives de LH et de FSH hypophysaires chez les diverses espèces animales peuvent expliquer les différences constatées quant à la durée de l'oestrus et au moment de l'ovulation.

##### 4.2.1. Structure

La LH ou lutropine est une glycoprotéine dimérique d'un poids moléculaire de 30 kDa; son temps de demi-vie est de 12 à 50 minutes (Derivaux et Ectors, 1986).

Tout comme la LH, la FSH est également un dimère composé de 2 sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ , dont les chaînes polypeptidiques sont associées de manière non covalente (Ronin, 1989). Son poids moléculaire est de 32 kDa et son temps de demi-vie de 3 à 4 heures.

##### 4.2.2. Profil de sécrétion (figure 7)

La LH est sécrétée sous forme de pulses de courte durée dont l'intensité peut atteindre 10 fois le taux basal. La fréquence de décharge est d'environ 1 pulse toutes les

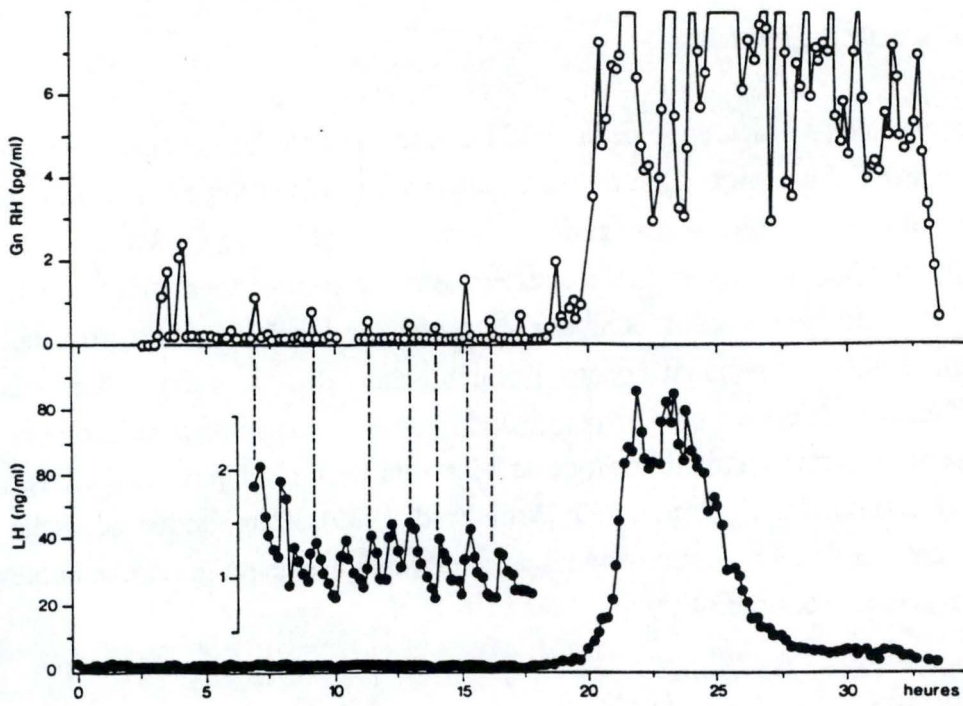


Figure 8: Profils simultanés de sécrétion de la GnRH dans le sang porte hypothalamo-hypophysaire et de LH dans la circulation générale chez une brebis en fin de phase folliculaire et durant le pic préovulatoire (Caldani et al., 1991).

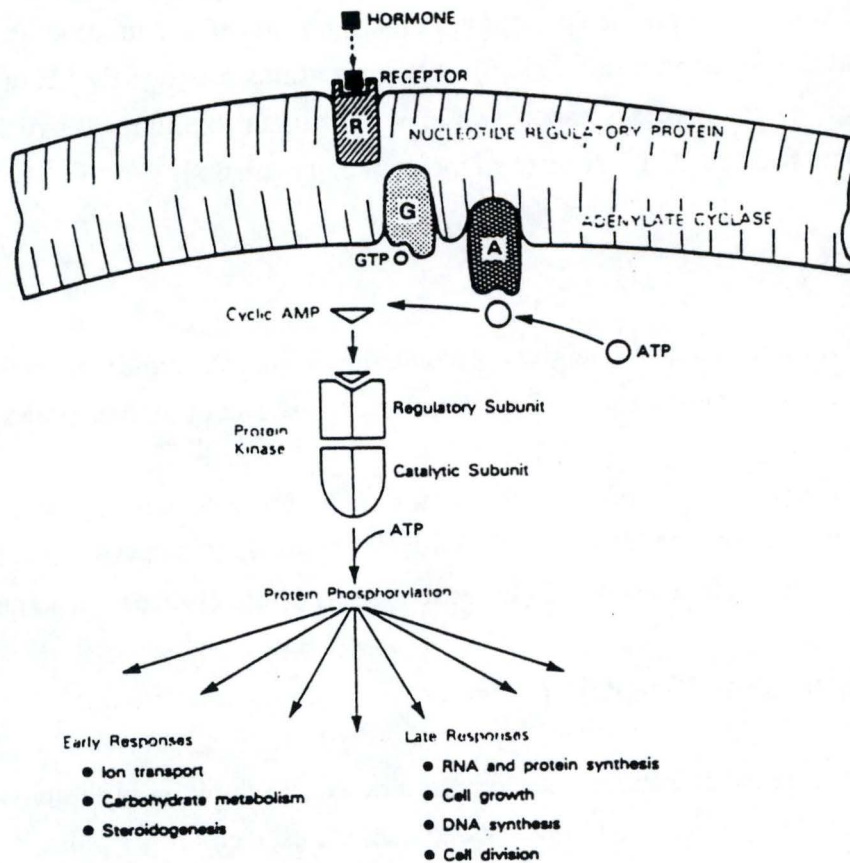


Figure 9: Mode d'action des gonadotropines sur les récepteurs membranaires (Yen et Jaffe, 1991).

4 à 8 heures (Bister et Paquay, 1983). En phase préovulatoire, on observe une nette augmentation du taux de LH, appelée pic préovulatoire, atteignant plus de 100 fois le niveau de base et constitué par la sommation de pulses apparaissant à intervalles de plus en plus réduits (Haresign *et al.*, 1984). Cette décharge dure entre 8 et 20 heures (Mandiki, 1991) et suit le pic de GnRH (figure 8).

Au cours d'un cycle ovulatoire, les taux plasmatiques de FSH présentent 3 vagues majeures d'une périodicité de 5 à 6 jours. Une des vagues coïncide avec les décharges ovulatoires de LH et de GnRH; elle est biphasique, présentant une première élévation simultanée avec les décharges de LH, puis une dépression et une seconde élévation 30 à 40 heures après la première, appelée décharge post-ovulatoire ou "rebound". Deux autres vagues se produisent pendant la phase lutéale; leurs valeurs maximales sont souvent assez proches de celles de la vague périovulatoire en phase folliculaire. Elles présentent parfois également un aspect biphasique (Bister et Paquay, 1983; Haresign *et al.*, 1984).

#### 4.2.3. Mode d'action (figure 9)

Les glycoprotéines hypophysaires circulent dans le sang sous forme libre; leur temps de demi-vie varie en fonction de la teneur en acide sialique (tableau 1). Les récepteurs cellulaires des hormones peptidiques sont situés au niveau de la paroi cellulaire et la spécificité de reconnaissance implique largement la sous-unité  $\beta$  (Ronin, 1989). La liaison de l'hormone à son récepteur induit un changement de conformation et une activation du système membranaire (protéine G et adénylate cyclase) associé à ce site (Catt et Dufau, 1991).

#### 4.2.4. Rôles

La LH et la FSH sont très importantes pour la différenciation de la thèque et de la granulosa du follicule ovarien. Les cellules de la thèque répondent à une stimulation par la LH en sécrétant des androgènes; ces derniers diffusent à travers la membrane basale vers les cellules de la granulosa qui, sous la stimulation de la FSH, utilisent ces androgènes comme substrat pour la synthèse des oestrogènes. Ces étapes font partie de la stéroïdogénèse dont nous reparlerons plus tard.

La LH stimule largement le développement et l'activité du corps jaune qui sécrète la progestérone (P4). Elle joue également un rôle dans la maturation folliculaire et l'expulsion de l'ovocyte (Mc Natty *et al.*, 1981).

|                | FSH          | LH              |
|----------------|--------------|-----------------|
| Acide sialique | 5%           | 2%              |
| Demi-vie       | 3 à 4 heures | 12 à 50 minutes |

*Tableau 1: Temps de demi-vie et teneur en acide sialique des glycoprotéines hypophysaires (Derivaux et Ectors, 1986).*

La FSH a pour rôle principal d'augmenter le métabolisme cellulaire et de favoriser la multiplication cellulaire. Au niveau de l'ovaire, elle assure la croissance des follicules et maintient l'intégrité des cellules de la granulosa. De plus, elle induit la synthèse de récepteurs à la LH au niveau des follicules préantraux (Driancourt *et al.*, 1991). Il faut remarquer enfin la corrélation évidente qui existe entre les 3 vagues de sécrétion de FSH et les 3 vagues de croissance folliculaire (Jacques, 1989) dont nous reparlerons ultérieurement.

#### 4.2.5. Contrôle de la sécrétion

Les sécrétions de LH et de FSH sont assurées par la GnRH; cependant, *in vivo*, ces 2 hormones ne sont pas sécrétées de façon synchrones. Il semble donc évident que des régulations indépendantes interviennent. Il existe aussi quelques arguments expérimentaux en faveur de l'existence d'un facteur FSH-RH (FSH-Releasing Hormone) spécifique de la sécrétion de FSH mais celui-ci n'a pas encore été mis en évidence (Rotten, 1991). A l'heure actuelle, le débat reste encore ouvert afin de déterminer si une hormone unique contrôle à la fois les sécrétions de LH et de FSH ou si 2 entités différentes ont chacune leur cible hypophysaire (Findlay et Clarke, 1987; Clarke, 1989). Le consensus général actuel est néanmoins la présence d'un seul polypeptide hypothalamique régulateur possédant des actions différentes sur les cellules hypophysaires.

Les stéroïdes ovariens ont un effet modulateur dans le processus de sécrétion des gonadotropines hypophysaires. La progestérone (P4) réduit la fréquence des pulses de LH via un "feed back négatif" sur l'hypothalamus provoquant une diminution de la fréquence des pulses de GnRH. La pulsativité de la LH est inversement proportionnelle à la concentration plasmatique en P4 (Karsh et Legan, 1980). Si chaque décharge de GnRH est suivie d'un pulse de LH, elle n'entraîne pas de modification dans la sécrétion de FSH. Cette dernière suit un mode de sécrétion plus régulier et non pulsatile (Bister et Paquay, 1983). La GnRH aurait seulement un rôle "permissif" sur la sécrétion de FSH dont le niveau est contrôlé principalement par des hormones émises par les follicules ovariens, l'inhibine et l'oestradiol (Mann *et al.*, 1991).

En phase lutéale, l'oestradiol (E2) et l'inhibine (INH) sécrétés par les follicules en croissance exercent un "feed back négatif" sur la sécrétion de FSH et par là une inhibition du développement folliculaire. Cette baisse du taux plasmatique de FSH est probablement responsable de l'atrésie des follicules et donc d'une diminution de la sécrétion d'oestradiol par ceux-ci. On observe alors une levée de l'inhibition ovarienne sur les sécrétions de FSH. L'émission de FSH augmente à nouveau provoquant ainsi la

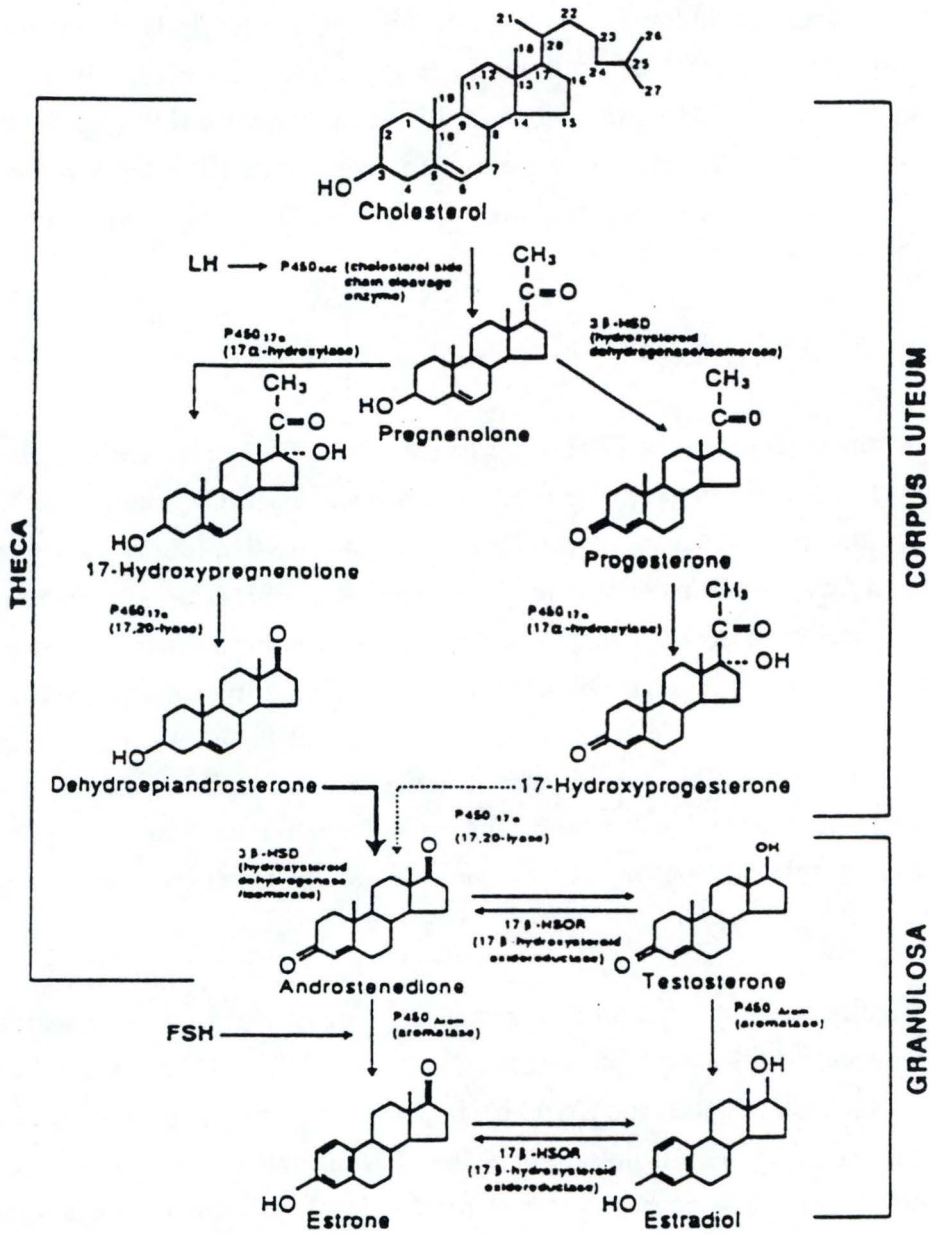


Figure 10: Schéma général de la biosynthèse des stéroïdes sexuels à partir du cholestérol (Wilson et Foster, 1992).

croissance d'une deuxième vague de follicules. Les follicules sécrètent de plus en plus d'inhibine et d'oestradiol inhibant une deuxième fois la sécrétion de FSH et provoquant ainsi l'atrésie des follicules en développement. La baisse du taux d'E<sub>2</sub>, suite à l'atrésie des follicules, permet l'augmentation de l'émission de FSH et le démarrage de la troisième vague de croissance folliculaire au cours de laquelle le taux d'E<sub>2</sub> va à nouveau augmenter. Cette troisième vague se déroule après la lutéolyse au cours de la phase folliculaire du cycle (figure 7). Libéré de l'effet inhibiteur de la P<sub>4</sub>, l'hypothalamus répond à la hausse d'E<sub>2</sub> par un mécanisme de "feed back positif"; la libération de GnRH et LH (en parallèle avec la FSH) devient "explosive", la LH induisant des augmentations d'E<sub>2</sub> et l'E<sub>2</sub>, des augmentations de GnRH et LH; on aboutit ainsi à la décharge ovulatoire provoquant la maturation ovocytaire et l'ovulation (Bister, 1991; Schrick *et al.*, 1993).

L'androstènedione ( $\Delta 4$ ), stéroïde ovarien, exerce également un "feed back négatif" sur les sécrétions de LH. En effet, Scaramuzzi et Baird (1977) ont montré, suite à une expérience d'immunisation contre l'androstènedione, une hausse significative du taux de LH circulante. Il a aussi été montré que cette immunisation augmentait non seulement la pulsativité de la LH, mais aussi la concentration plasmatique de FSH, avec pour conséquence une élévation du nombre de follicules en croissance, de la teneur plasmatique en E<sub>2</sub> et du taux d'ovulation (Bister *et al.*, 1988; Derycke *et al.*, 1988).

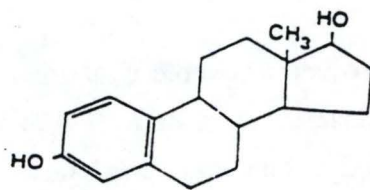
### 4.3. Les hormones stéroïdiennes

Les oestrogènes, progestagènes et androgènes appartiennent au groupe des hormones stéroïdes et leur structure de base est représentée par le noyau stérane ou cycloperhydropentanophénantrène dont le squelette est analogue à celui du cholestérol.

#### 4.3.1. Biosynthèse des stéroïdes sexuels

La synthèse des stéroïdes hormonaux peut s'opérer par différentes voies mais dans un but de simplification, nous n'envisageons que la voie directe. L'étape initiale de cette synthèse est identique quel que soit le stéroïde formé (figure 10).

Diverses étapes intermédiaires conduisent à la formation de la  $\Delta 5$ -prégnénone à partir du cholestérol. Cette conversion inclut 2 hydroxylations en C<sub>20</sub> et C<sub>22</sub> et la coupure de la chaîne en C<sub>20</sub>. Ces étapes sont contrôlées par un complexe enzymatique comportant le cytochrome P450<sub>scc</sub> (cholesterol side chain cleavage). La transformation du prégnénone en P<sub>4</sub> se fait dans les cellules thécales et granulosales; elle implique une oxydation de l'hydroxyle en C<sub>3</sub> et le transfert de la double liaison  $\Delta 5-6$  en  $\Delta 4$ . Ces 2



*Figure 11: Structure de l'oestradiol (Derivaux et Ectors, 1986).*

étapes sont sous le contrôle respectif de la  $3\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase et de la  $\Delta 5, \Delta 4$  isomérase (O'Malley et Strodt, 1991).

La P4 subit ensuite une hydroxylation en C<sub>17</sub> suivie de l'action d'une 17-20  $\alpha$  hydrolase pour former l'androstènedione ( $\Delta 4$ ). Les cellules thécales représentent donc la principale source d'androstènedione folliculaire et le contrôle par la LH, plus que par la FSH, stimule sa production (Yen et Jaffe, 1991).

La formation d'E<sub>2</sub> nécessite l'élimination du C<sub>19</sub> et l'aromatation du premier cycle carboné par un complexe enzymatique nommé aromatasase. La synthèse d'E<sub>2</sub> nécessite une coopération entre les cellules thécales et granulosales ainsi que de la LH et de la FSH. En effet, la LH agit au niveau des cellules thécales en induisant l'aromatation des androgènes qui, dans les cellules granulosales, sont transformés en E<sub>2</sub> par stimulation de la FSH sur l'aromatase (Ryan *et al.*, 1979; cités par Yen et Jaffe, 1991).

#### a) Les oestrogènes

Les oestrogènes naturels sont des stéroïdes à 18 atomes de carbone dont le premier cycle est aromatique. Au nombre de ces oestrogènes, il faut retenir :

- l'oestrone (E<sub>1</sub>) (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>), premier stéroïde hormonal isolé sous forme chimique pure de l'urine de femme enceinte et de jument gravide. Son rôle est peu connu et apparemment peu important;
- 17- $\beta$  oestradiol (E<sub>2</sub>) (C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>) est l'oestrogène ovarien le plus important et est considéré comme la véritable hormone folliculaire. Sa demi-vie plasmatique est d'environ 20 minutes et il est sécrété par les follicules en croissance (figure 11);
- l'oestriol (E<sub>3</sub>) (C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>) ou hydrate de folliculine isolé également à partir d'urine de femme enceinte. Son origine serait davantage placentaire qu'ovarienne. Il constituerait plutôt un produit de dégradation de l'E<sub>2</sub>.

L'E<sub>2</sub> présente de nombreuses actions dans la plupart des tissus de l'organisme. On retiendra principalement une stimulation de l'activité motrice du système reproducteur

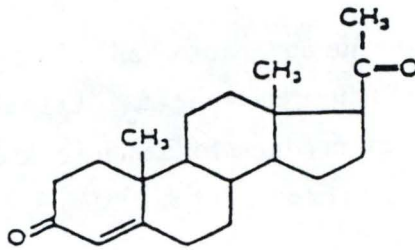


Figure 12: Structure de la progestérone (Debecker, 1984).

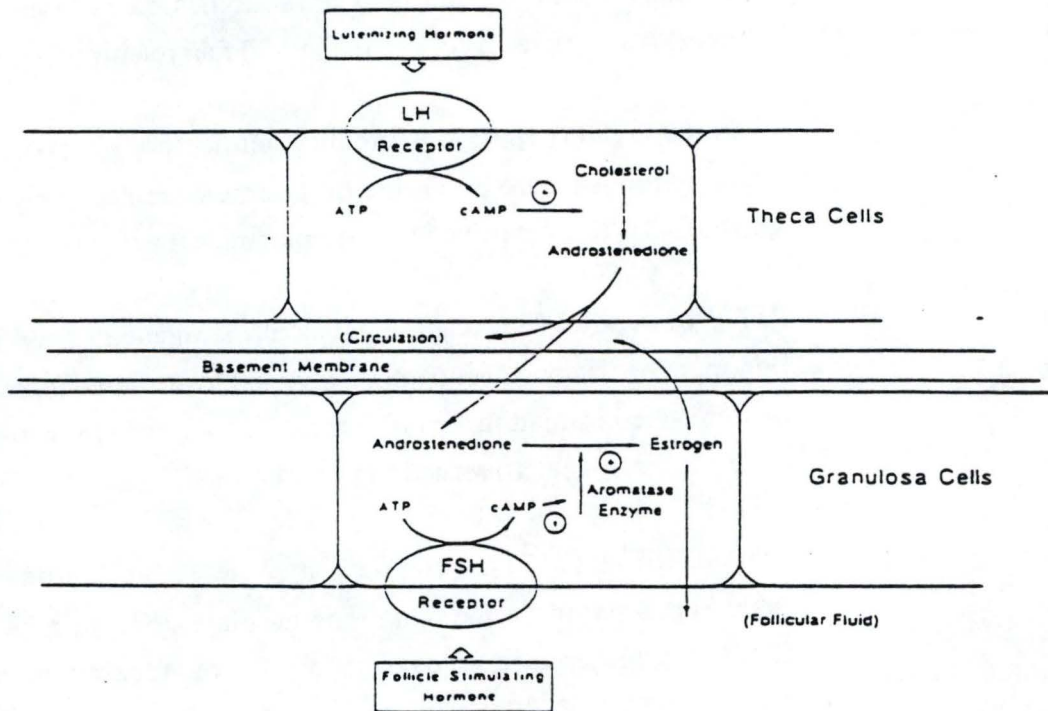


Figure 13: Coopération entre les cellules thécales et granulosaes en vue de la synthèse d'E<sub>2</sub> (Ryan et al., 1979; cités par Yen et Jaffe, 1991).

et une induction de la lutéolyse, rôles qu'elle joue en synergie avec la prostaglandine ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) (Denning-Kendall et Wathes, 1994).

#### b) La progestérone ( $\text{P}_4$ )

Les progestagènes sont principalement représentés par la progestérone qui est le progestagène le plus actif.

La  $\text{P}_4$  présente une structure tétracyclique proche de celle des corticostéroïdes. Elle comprend une chaîne latérale à 2 atomes de carbone fixée en  $\text{C}_{17}$  ainsi qu'un groupement 3-cétonique (figure 12). Sa demi-vie plasmatique est d'environ 30 minutes (Rawn, 1990).

Comme son nom l'indique, c'est une hormone qui de manière générale est destinée à favoriser la gestation. Elle stimule le développement de l'utérus et de la glande mammaire et inhibe les contractions du système reproducteur. Elle inhibe aussi la sécrétion au niveau hypothalamique (GnRH) et hypophysaire (LH). Elle empêche la maturation folliculaire et maintient la sécrétion d' $\text{E}_2$  dans certaines limites (Bister, 1991).

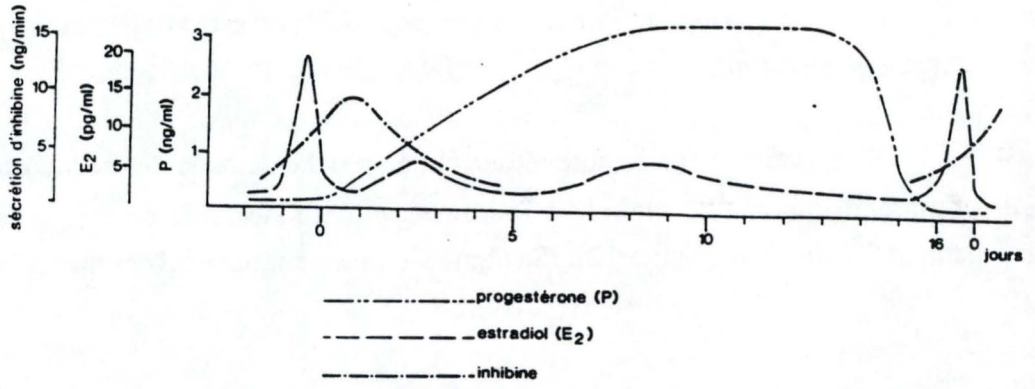
#### c) L'androstènedione ( $\Delta_4$ )

Les androgènes, dont le  $\Delta_4$ -androstènedione ( $\Delta_4$ ) et la testostérone sont les plus connus, sont des intermédiaires de synthèse entre les progestagènes et les oestrogènes. Leur rôle est limité chez la femelle, mais le  $\Delta_4$  joue certainement un rôle dans le phénomène de l'atrésie folliculaire.

#### 4.3.2. Compartimentation de la stéroïdogénèse (figure 13)

La stéroïdogénèse se déroule dans 2 types de cellules stéroïdogènes du follicule ovarien, à savoir les cellules de la thèque interne et les cellules de la granulosa.

Ces cellules diffèrent, entre autre, par leur équipement enzymatique. Les cellules de la thèque permettent la conversion du cholestérol en progestérone. Pour ce faire, elles possèdent des récepteurs à la LH qui stimulent la conversion du cholestérol en  $\Delta_5$ -prégnénolone. Les cellules de la granulosa importent les androgènes thécaux pour synthétiser les oestrogènes. Elles possèdent des récepteurs à la FSH qui jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'activité aromatasase (Robel, 1991).



**Figure 14:** Profils hormonaux des hormones gonadotropes au cours du cycle oestral de la brebis (Driancourt *et al.*, 1991).

#### 4.3.3. Contrôle de la stéroïdogénèse

Le contrôle de la stéroïdogénèse est réalisé par de très nombreux facteurs dont la LH, la FSH, les stéroïdes eux-mêmes et les IGF (Insulin-like Growth Factor) qui feront l'objet d'un chapitre spécial.

La LH favorise la synthèse de P<sub>4</sub> en stimulant l'activité de la 3 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (Goldring *et al.*, 1987). Elle active la 17-20 $\alpha$ -hydrolase responsable de la formation d' $\Delta$ <sub>4</sub> (Bogovich et Richards, 1984) et stimule l'activité de l'aromatase (Webb *et al.*, 1992).

La FSH stimule la synthèse du cytochrome P450<sub>SCC</sub> ainsi que l'aromatation des androgènes en oestrogènes par le complexe aromatase (Goldring *et al.*, 1987).

La P<sub>4</sub> inhibe l'activité de la 17-20 $\alpha$  hydrolase (Armstrong *et al.*, 1987). De plus, en concentration élevée, elle peut aussi inhiber l'effet stimulateur de la FSH sur l'aromatase (Fortune et Vincent, 1983).

L' $\Delta$ <sub>4</sub> sert de substrat au complexe aromatase et augmente l'effet de la FSH sur l'activité de ce complexe enzymatique (Armstrong *et al.*, 1987). Il permet aussi la biosynthèse de la P<sub>4</sub> induite par la FSH en augmentant la production d'AMP<sub>C</sub> (Jia *et al.*, 1985).

L'E<sub>2</sub> limite, en agissant au niveau des étapes précédant la génération d'AMP<sub>C</sub>, la conversion de la  $\Delta$ <sub>5</sub>-prégnénolone en P<sub>4</sub> mais peut aussi augmenter sa propre production en stimulant l'activité aromatasique induite par la FSH (Fortune et Vincent, 1983).

#### 4.3.4. Profils de sécrétion au cours du cycle (figure 14)

Le principal oestrogène sécrété au cours du cycle est le 17 $\beta$ -oestradiol (E<sub>2</sub>), il présente 2 hausses de sécrétion pendant la phase lutéale; la première culminant entre le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour et la seconde entre le 7<sup>ème</sup> et le 9<sup>ème</sup> jour (Bister et Paquay, 1983). En phase folliculaire, les niveaux périphériques d'E<sub>2</sub> augmentent 3 jours avant l'oestrus, c'est-à-dire 3 jours avant la décharge préovulatoire, pour atteindre un maximum la veille de l'oestrus puis diminuent progressivement jusqu'à la première vague de la phase lutéale (Robel, 1991).

Dès sa formation, le corps jaune sécrète de fortes doses de P<sub>4</sub> (du jour 3 au jour 7) dans le plasma périphérique, pour ensuite stabiliser sa sécrétion (de 1 à 3 ng/ml)

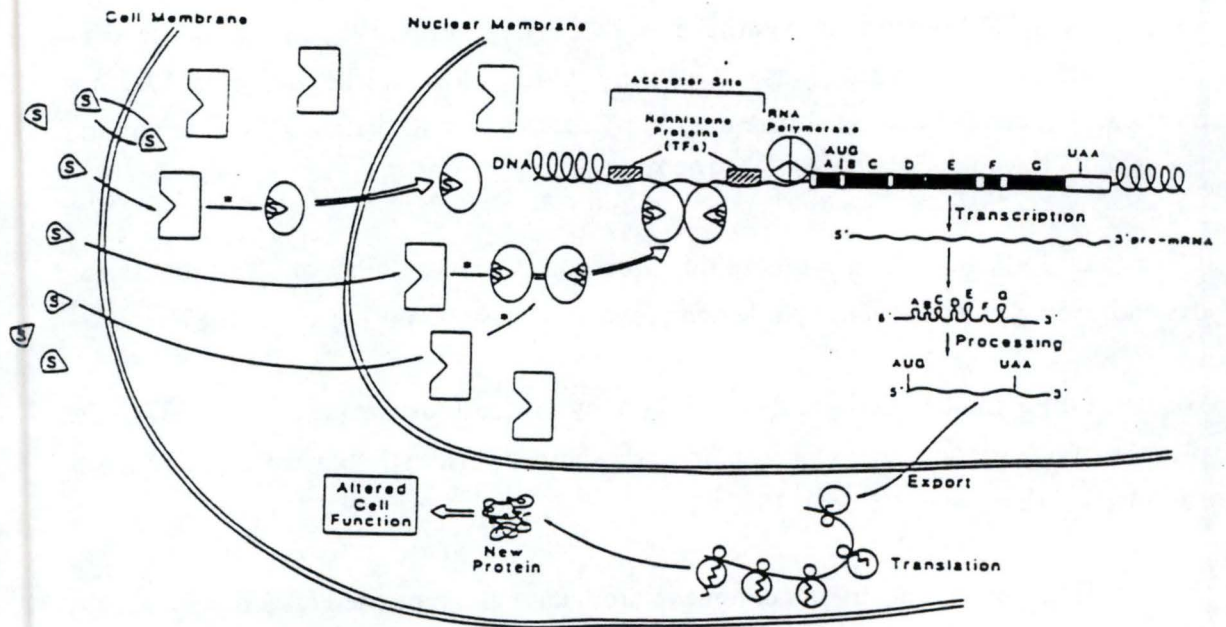


Figure 15: Mode d'action des stéroïdes sexuels (Yen et Jaffe, 1991).

jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour. La phase folliculaire se caractérise par une absence presque totale de P<sub>4</sub> suite à la lutéolyse.

#### 4.3.5. Mode d'action (figure 15)

Les hormones libérées dans la circulation sanguine circulent soit sous forme libre (forme active), soit sous forme liée (réserve). Les formes libres peuvent se lier à leurs récepteurs spécifiques qui sont des protéines intracellulaires solubles. La liaison de l'hormone à son récepteur provoque un changement de conformation du récepteur qui rend son site actif fonctionnel. A ce stade, le complexe hormone-récepteur a la capacité de migrer dans le noyau cellulaire, de se fixer dans un domaine de liaison de l'ADN proche d'un gène régulateur et d'activer ou de supprimer la fonction de ce gène (O'Malley et Strodt, 1991; Yen et Jaffe, 1991).

## 5. Contrôle de la croissance folliculaire terminale

### 5.1. Le recrutement

Les stéroïdes interviennent peu dans le recrutement; en revanche, les gonadotropines y jouent un rôle important.

La LH est impliquée dans le recrutement folliculaire. En effet :

- elle stimule l'apparition de ses propres récepteurs sur les cellules granulosales et thécales (Jia et Hsueh, 1984);
- elle induit la différenciation des cellules thécales tant au niveau morphologique que biochimique (Erickson *et al.*, 1985);
- elle stimule la biosynthèse d'androgènes dans les cellules thécales en favorisant l'expression des enzymes clés de la stéroïdogénèse qui sont la 17  $\alpha$ -hydroxylase et la 17-20 $\alpha$  hydrolase (Yen et Jaffe, 1991).

La FSH est également impliquée dans le recrutement folliculaire, car :

- elle favorise la croissance et la prolifération des cellules granulosales, action démontrée par l'incorporation de thymidine dans l'ADN;
- elle stimule la production de ses propres récepteurs par les cellules granulosales; cette action est favorisée par la présence d'E<sub>2</sub>;
- elle stimule aussi l'acquisition de récepteurs à la LH tant au niveau de la thèque interne que des cellules granulosales (Jia *et al.*, 1985).

Selon Di Zerega et Hodgen (1981), l'inactivation de la FSH par l'administration d'anticorps anti-FSH inhibe toute maturation folliculaire. De plus, en présence d'un niveau basal de LH, la FSH seule peut stimuler le développement et le fonctionnement des cellules granulosales (Picton *et al.*, 1990). L'action de la FSH serait de sensibiliser le follicule à la LH.

En fait, la FSH stimule la croissance et la prolifération des cellules granulosales ainsi que l'induction sur ces mêmes cellules de récepteurs à la LH. Lors de l'acheminement de la phase folliculaire, la fréquence des pulses de LH augmente et mène au recrutement de follicules ainsi qu'à une augmentation progressive de la synthèse d'E<sub>2</sub>; ceci, à condition que les follicules aient été préalablement imprégnés à la FSH pour pouvoir répondre à la LH (Driancourt *et al.*, 1984).

### 5.2. La sélection et la dominance

Les follicules de De Graaf matures et dans une moindre mesure les follicules en croissance constituent la source principale d'E<sub>2</sub> dont le rôle est important aussi bien dans la sélection que dans la dominance (Mann *et al.*, 1991).

En effet, l'E<sub>2</sub>:

- stimule la mitose des cellules granulosales (Fortune et Vincent, 1983);
- agit en synergie avec la LH et la FSH afin de stimuler l'activité aromatasase (Adashi et Hsueh, 1982; cités par Yen et Jaffe, 1991) et l'acquisition des récepteurs à la LH et à la FSH (Louvet et Vaitukaitis, 1976; cités par Yen et Jaffe, 1991);
- favorise l'élargissement de l'antrum ainsi que l'augmentation du nombre de récepteurs aux oestrogènes (Fortune, 1994).

### 5.3. L'atrésie folliculaire

Le mécanisme initiateur de l'atrésie des follicules à antrum est encore inconnu bien qu'une cascade d'événements soit établie telles la réduction du nombre de récepteurs à la LH et à la FSH, la perte de capacité à aromatiser les androgènes et la réduction de la production des hormones stéroïdiennes (Bellin et Ax, 1984; Webb et Gauld, 1984).

## 6. Effets de la saison sur l'activité ovarienne

Pour rappel, l'activité sexuelle de la brebis est de type polyoestrus saisonnier ce qui signifie qu'elle présente une succession de cycles oestriques pendant une saison déterminée.

Comme dit précédemment, nous nous sommes uniquement intéressés à l'anoestrus saisonnier et à l'activité cyclique; celle-ci comprend trois périodes : le début, le milieu et la fin de la saison de reproduction. La fin de la saison de reproduction n'a pu être étudiée cette année mais le sera en février 1995, c'est la raison pour laquelle nous la passerons sous silence.

Nous allons maintenant voir les modifications observées tant au niveau de la stéroïdogénèse que de la croissance folliculaire au cours de l'anoestrus et du début de la saison de reproduction. Pour le milieu de la saison de reproduction, la stéroïdogénèse et la croissance folliculaire ont déjà été évoquées dans les paragraphes précédents.

### 6.1. L'anoestrus

L'anoestrus saisonnier provient d'une adaptation aux variations climatiques caractéristiques de l'endroit où vit la race envisagée. Le mouton se reproduit donc en automne de façon à ce que les agneaux naissent au printemps, lorsque les conditions climatiques sont les plus favorables et la nourriture abondante.

#### 6.1.1. La stéroïdogénèse des follicules

Malgré le peu d'informations existant sur le potentiel de stéroïdogénèse des follicules au cours des différents états physiologiques, l'analyse des sécrétions hormonales montre que l'ovaire n'est pas inactif en anoestrus saisonnier et que les hormones gonadotropes sont sécrétées. Comme le montre l'étude de McNatty et collaborateurs (1985) sur des brebis Romney, la capacité des follicules à synthétiser et à sécréter de l'E<sub>2</sub> ne diffère pas entre l'anoestrus et la saison de reproduction.

L'estimation du potentiel de stéroïdogénèse d'un follicule est réalisée par mesure de la production d'E<sub>2</sub> *in vitro* (Webb et England, 1982). Si cette production atteint un seuil de 500 pg/ml de milieu/heure, le follicule est considéré comme actif (Webb et Gauld, 1984). Selon Jacques (1989), *in vivo*, aucun follicule n'ayant atteint une taille préovulatoire au cours de l'anoestrus léger et profond n'est considéré comme actif d'un point de vue sécrétion d'E<sub>2</sub>. Seuls les follicules préovulatoires prélevés au jour 16 du

cycle produisent *in vitro* un niveau d'E<sub>2</sub> élevé. Toujours selon cet auteur, l'identité morphologique des follicules observée au cours des différents états physiologiques n'est pas associée à une identité fonctionnelle compte tenu de la déficience dans la production d'E<sub>2</sub> en anoestrus léger et profond; ceci va à l'encontre de l'étude de McNatty et collaborateurs (1985). *On entend par anoestrus léger la fin de la période d'anoestrus au cours de laquelle une faible stimulation telle que la présence d'un mâle peut déclencher l'apparition des cycles, et par anoestrus profond le milieu de la période d'anoestrus.*

Les hormones gonadotropes, LH et FSH, ne semblent pas être responsables de cette réduction du potentiel de stéroïdogénèse. En effet, les résultats de Jacques (1989) montrent que la déficience fonctionnelle en terme de production d'E<sub>2</sub> se confirme quelle que soit la stimulation LH ou FSH appliquée *in vitro*. Par contre, l'altération de la maturation folliculaire en anoestrus léger et profond peut être due à une pulsativité inadéquate de LH *in vivo*, ainsi qu'à la présence de formes circulantes de FSH potentiellement moins actives en période de faible activité sexuelle (Jacques, 1989).

L'anoestrus saisonnier se caractérise également par un niveau basal de P<sub>4</sub> (Bister, 1991) puisque aucune ovulation et par conséquent aucun corps jaune ne sont observés.

#### 6.1.2. La sécrétion des gonadotropines

Au cours de l'anoestrus, de nombreuses races, dont les Suffolk, ne présentent pas d'ovulation alors que d'autres, comme les brebis Merinos, présentent des périodes d'anovulation entrecoupées par des périodes d'ovulation. Cette différence peut s'expliquer en partie par la sensibilité des mécanismes de "feed back" négatif et positif de l'E<sub>2</sub> sur la sécrétion de GnRH et de LH, le premier étant défavorable tandis que le second est responsable de l'ovulation (Pearce et Oldham, 1988).

La fréquence des pulses de LH en anoestrus est d'environ 1 pulse toutes les 8 heures. Par contre, en phase lutéale du cycle, elle est estimée à 1 pulse toutes les 4 heures. Le rétrocontrôle négatif de la LH par l'E<sub>2</sub> est renforcé en anoestrus et s'exercerait par une suppression de la fréquence des pulses de GnRH (Karsh *et al.*, 1993).

Pour la FSH, certains auteurs rapportent l'existence de fluctuations identiques à celles observées en phase lutéale (Bister et Paquay, 1983) alors que d'autres parlent de variations saisonnières (McNatty *et al.*, 1985).

D'après les expériences de Montgomery et collaborateurs (1988) réalisées sur des brebis Ile-de-France ovariectomisées, en l'absence de "feed back" ovarien, la saison influence les sécrétions de FSH à long terme. Pour une brebis non ovariectomisée, la relation entre la fréquence des pulses de GnRH et la sécrétion de FSH aurait des conséquences importantes sur une série d'événements amenant tout doucement au début de la saison de reproduction. Une augmentation significative de la sécrétion en FSH pourrait jouer un rôle majeur dans les premières étapes du retour à une activité cyclique des gonades (Montgomery *et al.*, 1988).

En revanche, les résultats de Jacques (1989) n'ont montré aucune différence significative au niveau des concentrations de FSH au cours des différents états physiologiques. L'auteur émet l'hypothèse que cette identité des niveaux de FSH au cours des saisons et en contre-saison permettrait aux follicules de se développer vers une taille préovulatoire.

### 6.1.3. L'influence de la photopériode

Le début de l'activité cyclique se produit en automne, quand la longueur des jours décroît, et l'anoestrus apparaît quand la longueur des jours augmente. Autrement dit, la photopériode est le principal facteur de contrôle de l'anoestrus saisonnier. Elle induirait un changement de la sensibilité de l'axe hypothalamo-hypophysaire aux stéroïdes (Martin *et al.*, 1988).

Diverses expériences montrent que la disparition des phénomènes cycliques provient d'une perte du mécanisme de "feed back" positif entre l'E<sub>2</sub> et la LH aboutissant normalement à la décharge ovulatoire (Legan *et al.*, 1977). En plus, il semble que le "feed back" négatif de l'E<sub>2</sub> sur la LH soit renforcé, car il se concrétise par une diminution de la fréquence des pulses de GnRH (Legan *et al.*, 1985).

Selon une autre théorie, le rétro-contrôle positif de la LH par l'E<sub>2</sub> n'est pas modifié mais ce sont les concentrations en E<sub>2</sub> qui sont trop faibles pour déclencher le "feed back positif"; seul le "feed back négatif" serait alors possible (Haresign *et al.*, 1984).

Des administrations d'E<sub>2</sub> confirment la modification de réactivité au niveau de l'hypothalamus ("feed back positif" diminué ou inversé), mais la réduction du potentiel de stéroïdogénèse conforte aussi la deuxième hypothèse.

Les études de Woodfill et collaborateurs (1994) concernant cette variation de sensibilité hypothalamo-hypophysaire laissent entrevoir un effet des hormones épiphysaires (la mélatonine principalement) et de la prolactine. Ces hormones sont contrôlées par la photopériode tant au point de vue circadien que saisonnier. L'évolution annuelle de la prolactinémie est chez la brebis parallèle à celle de la durée de la luminosité; les taux sont élevés en jours longs et faibles en jours courts. La mélatonine est quant à elle sécrétée pendant l'obscurité.

Les résultats obtenus par Piraux (1990) permettent de conclure à un effet prépondérant de la mélatonine. En effet, l'inhibition de l'émission de la prolactine chez les brebis Texel en anoestrus saisonnier ne permet ni d'avancer la rentrée en cycle, ni d'augmenter la fréquence de la pulsativité de LH. Par contre, la mélatonine est certainement impliquée dans la rentrée en cycle, car une augmentation de sa concentration sanguine provoquée à partir de juin au moyen d'implants, augmente la pulsativité de LH et avance la reprise des cycles de plusieurs semaines.

#### 6.1.4. La croissance folliculaire

La folliculogénèse basale persiste en anoestrus car, il faut six mois pour qu'un follicule passe du stade où il comporte 3 couches de cellules granulosales à une taille préovulatoire. Le follicule qui ovule pendant la saison de reproduction a dû commencer sa croissance pendant la période d'anoestrus (Webb *et al.*, 1992).

Certains auteurs (Fortune, 1994; Webb et Gauld, 1984) ont observé en anoestrus des vagues de croissance folliculaire terminale d'une durée semblable à celle observée au cours du cycle. De même, les nombres moyens de follicules recrutés, sélectionnés et dominants sont voisins de ceux observés en période de reproduction. Les follicules suivent par conséquent le même schéma de développement bien qu'aucun ne parvienne à l'ovulation (Jacques, 1989; Noël *et al.*, 1993).

### 6.2. Le début de la saison de reproduction

#### 6.2.1. Sécrétions des gonadotropines et des stéroïdes

A ce jour peu d'informations sont fournies quant aux capacités stéroïdogéniques des follicules en début de saison de reproduction. Les seules informations disponibles sont les suivantes.

Les études de Woodfill et collaborateurs (1994) concernant cette variation de sensibilité hypothalamo-hypophysaire laissent entrevoir un effet des hormones épiphysaires (la mélatonine principalement) et de la prolactine. Ces hormones sont contrôlées par la photopériode tant au point de vue circadien que saisonnier. L'évolution annuelle de la prolactinémie est chez la brebis parallèle à celle de la durée de la luminosité; les taux sont élevés en jours longs et faibles en jours courts. La mélatonine est quant à elle sécrétée pendant l'obscurité.

Les résultats obtenus par Piraux (1990) permettent de conclure à un effet prépondérant de la mélatonine. En effet, l'inhibition de l'émission de la prolactine chez les brebis Texel en anoestrus saisonnier ne permet ni d'avancer la rentrée en cycle, ni d'augmenter la fréquence de la pulsativité de LH. Par contre, la mélatonine est certainement impliquée dans la rentrée en cycle, car une augmentation de sa concentration sanguine provoquée à partir de juin au moyen d'implants, augmente la pulsativité de LH et avance la reprise des cycles de plusieurs semaines.

#### **6.1.4. La croissance folliculaire**

La folliculogénèse basale persiste en anoestrus car, il faut six mois pour qu'un follicule passe du stade où il comporte 3 couches de cellules granulosales à une taille préovulatoire. Le follicule qui ovule pendant la saison de reproduction a dû commencer sa croissance pendant la période d'anoestrus (Webb *et al.*, 1992).

Certains auteurs (Fortune, 1994; Webb et Gauld, 1984) ont observé en anoestrus des vagues de croissance folliculaire terminale d'une durée semblable à celle observée au cours du cycle. De même, les nombres moyens de follicules recrutés, sélectionnés et dominants sont voisins de ceux observés en période de reproduction. Les follicules suivent par conséquent le même schéma de développement bien qu'aucun ne parvienne à l'ovulation (Jacques, 1989; Noël *et al.*, 1993).

### **6.2. Le début de la saison de reproduction**

#### **6.2.1. Sécrétions des gonadotropines et des stéroïdes**

A ce jour peu d'informations sont fournies quant aux capacités stéroïdogéniques des follicules en début de saison de reproduction. Les seules informations disponibles sont les suivantes.

Chez les brebis Texel (Bister, 1980) et Clun Forest (Walton *et al.*, 1977), le premier pic ovulatoire de LH est en général précédé de 5 à 7 jours par un autre pic semblable; ces 2 pics de sécrétion marqueraient le début de la cyclicité normale.

Excepté l'apparition de pics ovulatoires concomitants à ceux de la LH, la concentration en FSH ne semble pas varier avec le début des cycles.

Les sécrétions d'E<sub>2</sub> augmentent avec les vagues de croissance folliculaire et le taux de P<sub>4</sub> augmente suite à la lutéinisation des follicules ovariens parvenus à l'ovulation.

### 6.2.2. Croissance folliculaire

En début de saison de reproduction, Noël et collaborateurs (1993) ont observé une distribution trimodale classique des paramètres de la croissance folliculaire avec une concordance au niveau des jours d'apparition des follicules recrutés, sélectionnés et dominants par rapport au milieu de la saison de reproduction.

Les études de Jacques (1989), portant sur la croissance folliculaire terminale au cours des différents états physiologiques, ont également permis de montrer l'existence d'une activité ovarienne à différents moments de l'activité cyclique et en anoestrus. Celle-ci est comparable à celle observée au cours de la phase folliculaire du cycle en milieu de saison. De plus, les mécanismes de recrutement, de sélection et de dominance s'exercent avec une même intensité, quel que soit le stade physiologique considéré.

Selon Jacques (1989), les paramètres morphologiques (taille maximale des follicules dominants, vitesse de croissance des follicules) de la croissance folliculaire ne sont pas affectés par le stade considéré.

## CHAPITRE 2 : L'HORMONE DE CROISSANCE (GH)

En 1921, Evans et Long découvraient des substances promouvant la croissance dans une émulsion du lobe antérieur de l'hypophyse chez le rat. Vingt-quatre ans plus tard, une hormone de croissance d'origine bovine fut pour la première fois isolée par Li et Evans. De nos jours, les hormones de croissance (GH) sont reconnues comme des hormones extraordinairement pléiotropes exerçant des effets de facteur de croissance et de différenciation et agissant comme d'importants régulateurs métaboliques (Paladini *et al.*, 1983).

Si actuellement on connaît la structure et les principales fonctions des GH, bien des points restent encore obscurs notamment en ce qui concerne leur mode d'action propre ainsi que celui modifié par d'autres hormones.

Les effets physiologiques de l'hormone de croissance (GH) sont tellement variés qu'il est difficile de les exprimer en une théorie unique pour les différentes espèces animales. La croissance et le développement sont complexes, intégrant des processus qui impliquent, en plus de la GH, tout le système endocrinien et paracrine.

### 1. Localisation

La GH est une protéine qui est principalement synthétisée et sécrétée par les cellules de l'hypophyse antérieure (Miller *et al.*, 1980). Elle est exprimée à partir du gène GH-N localisé dans les cellules somatotropes de l'**adénohypophyse**. Dans une moindre mesure, les cellules somatomammotropes de l'adénohypophyse bovine sécrètent également de la GH parallèlement à de la prolactine (Kineman *et al.*, 1991). Mise à part cette principale forme de GH, citons également l'existence d'une seconde forme hormonale exprimée à partir d'un gène GH-V **placentaire** (Bauman, 1991). *Ce type d'hormone de croissance n'étant exprimé que durant la gestation, nous le taïrons volontairement car il n'interviendra en rien dans nos expériences.*

Chez le mouton, la GH est présente dans l'hypophyse foetale dès le 50<sup>ème</sup> jour après la fécondation. La concentration hypophysaire en GH reste constante jusqu'à 250 jours après la naissance et est comprise entre 40 et 85 UI/g pour diminuer ensuite avec l'âge (Charrier, 1973).

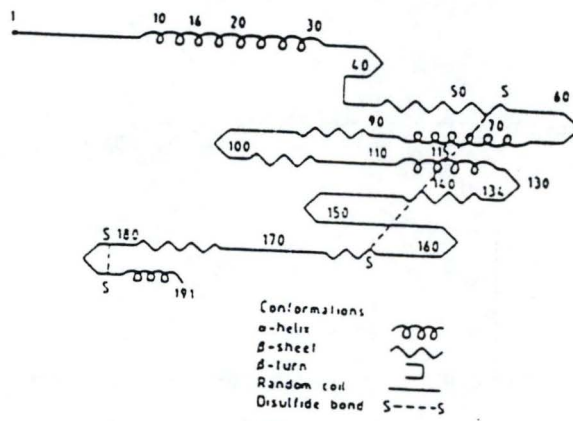


Figure 16: Structure secondaire de la GH bovine (Wilson et Foster, 1992).

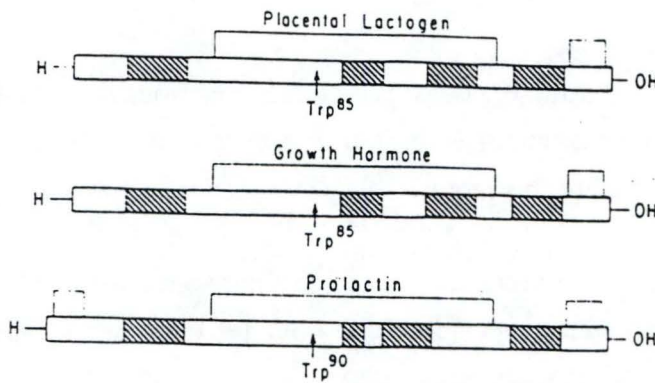


Figure 17: Régions homologues de la GH, PL et PRL (Niall et al., 1971).

Tableau 2: Variantes de la GH humaine dans la circulation sanguine (Bauman, 1991).

| Variant                        | Percent |
|--------------------------------|---------|
| 22 kd                          | 76      |
| 20 kd                          | 16      |
| Acidic GH (desamido-, N-acyl-) | 8       |
| Monomeric                      | 55      |
| Dimeric                        | 27      |
| Tri-, tetra-, and pentameric   | 18      |
| Complexed 22 kd                | 45      |
| Complexed 20 kd                | 25      |

Tableau 3: Distribution des récepteurs à la GH chez les mammifères (Kelly et al., 1993).

|                            |                 |
|----------------------------|-----------------|
| Liver                      | Lung            |
| Adipose tissue             | Pancreas        |
| Lymphatic and immune cells | Brain           |
| Lymphocytes and thymocytes | Cartilage       |
| Intestine                  | Skeletal muscle |
| Heart                      | Corpus luteum   |
| Kidney                     | Testis          |

## **2. Structure** (figure 16)

Tous les membres de la famille GH sont des protéines formées par une simple chaîne polypeptidique d'environ 200 acides aminés avec 2 ou 3 ponts disulfures intrachâînes et des extrémités N- et C- terminales libres, le poids moléculaire étant d'environ 22 kDa chez l'homme, 48 kDa chez le mouton, 45 kDa chez le bovin, 41 kDa chez le porc et 24 kDa chez le rat (Kelly *et al.*, 1993; Newcomer, 1971). La comparaison des séquences hormonales entre différentes espèces montre que la GH bovine (bGH), la GH ovine (oGH), la GH équine (eGH) et la GH porcine (pGH) ont 65% d'homologie (Paladini *et al.*, 1983). De même, la GH, la PL (Placental Lactogen) et la PRL (Prolactine) ont des régions de fortes homologies, suggérant qu'elles forment une famille d'hormones polypeptidiques provenant de la duplication d'un gène ancestral commun (figure 17).

Au sein d'une même espèce, il est fréquent d'observer une hétérogénéité de GH lors de son extraction d'un tissu ou lors de sa mesure dans un fluide biologique. Cette multiplicité de formes pourrait être due à :

- des chemins post-transcriptionnels multiples. En effet chez l'homme, la forme secondaire de GH-N provient d'un épissage alternatif de l' ARN<sub>m</sub> conduisant à une GH de 20kDa; derechef pour la forme tertiaire, provenant de l'épissage de l'exon 3 conduisant à une GH de 17,5kDa. Les autres formes minoritaires de GH sont nommées "acidic GH" (tableau 2) ;
- des modifications post-translationnelles comme la déamination, l'acétylation, la glycosylation et l'oligomérisation ...;
- la fixation sur deux protéines de liaison (Bauman, 1991).

## **3. Mode d'action**

### **3.1. Généralités**

Le récepteur de la GH est présent dans de nombreux tissus (tableau 3) et cellules à l'exception de certains organes (prostate...) où l'expression de son ARN<sub>m</sub> est pratiquement indétectable. Les hépatocytes et les adipocytes sont les cellules dans lesquelles le niveau d'expression est le plus élevé.

Le récepteur est structurellement apparenté à ceux de la prolactine et des cytokines qui constituent la famille des récepteurs hématopoïétiques. Ces récepteurs possèdent une région cytoplasmique variable, une région extracellulaire plus conservée et une seule région transmembranaire hydrophobe (Kelly *et al.*, 1993).

Chez l'homme, la région extracellulaire qui lie l'hormone comporte environ 250 acides aminés, elle contient plusieurs résidus cystéines, largement conservés chez les membres de cette famille, qui peuvent former des ponts disulfures. La région cytoplasmique du récepteur, qui couvre environ 350 acides aminés, contient 10 résidus tyrosine susceptibles d'être phosphorylés. De même, cette région semble posséder des domaines fonctionnellement distincts qui seraient couplés aux différentes réponses biologiques induites par la GH (Le Cam et Legraverend, 1993).

Chez le mouton, le récepteur membranaire hépatique de la GH comprend un domaine extracellulaire de 242 acides aminés, une région transmembranaire hydrophobe de 24 acides aminés et un domaine cytoplasmique de 350 acides aminés. Ce récepteur apparaît au jour 145 de la gestation pour atteindre un niveau maximum une semaine après la naissance (Adams *et al.*, 1990).

Au niveau de l'ovaire bovin, les récepteurs de la GH sont exprimés uniquement dans les grandes cellules lutéales du corps jaune et dans les follicules de diamètre supérieur à 5 mm. Par contre, l'ARN<sub>m</sub> du récepteur de l'hormone de croissance est présent dans l'ovaire entier: stroma, follicules de toute taille et corps jaune (Lucy *et al.*, 1993); idem chez la rate (Carlsson *et al.*, 1993). Aucune information ne semble rapportée à ce jour pour l'ovaire ovin.

### 3.2. Complexe hormone-récepteur

Comme pour les autres hormones polypeptidiques, la première étape de l'action biologique de la GH est la liaison à son récepteur membranaire. Des études cristallographiques réalisées par De Vos et collaborateurs (1992; cités par Le Cam et Legraverend, 1993) ont montré qu'une molécule de hGH se lie à 2 molécules de GH-BP (GH-Binding Protein); cela suggère très fortement que la dimérisation du récepteur est importante pour son internalisation et la transmission du message hormonal.

Dans le processus d'internalisation, le complexe hormone-récepteur n'est pas complètement dissocié par le milieu acide des lysosomes. Dans l'adipocyte, 75% de ces complexes internalisés sont dégradés dans les lysosomes et 25% sont relâchés dans le milieu extracellulaire, le récepteur pouvant alors être recyclé. Le rôle de ces processus

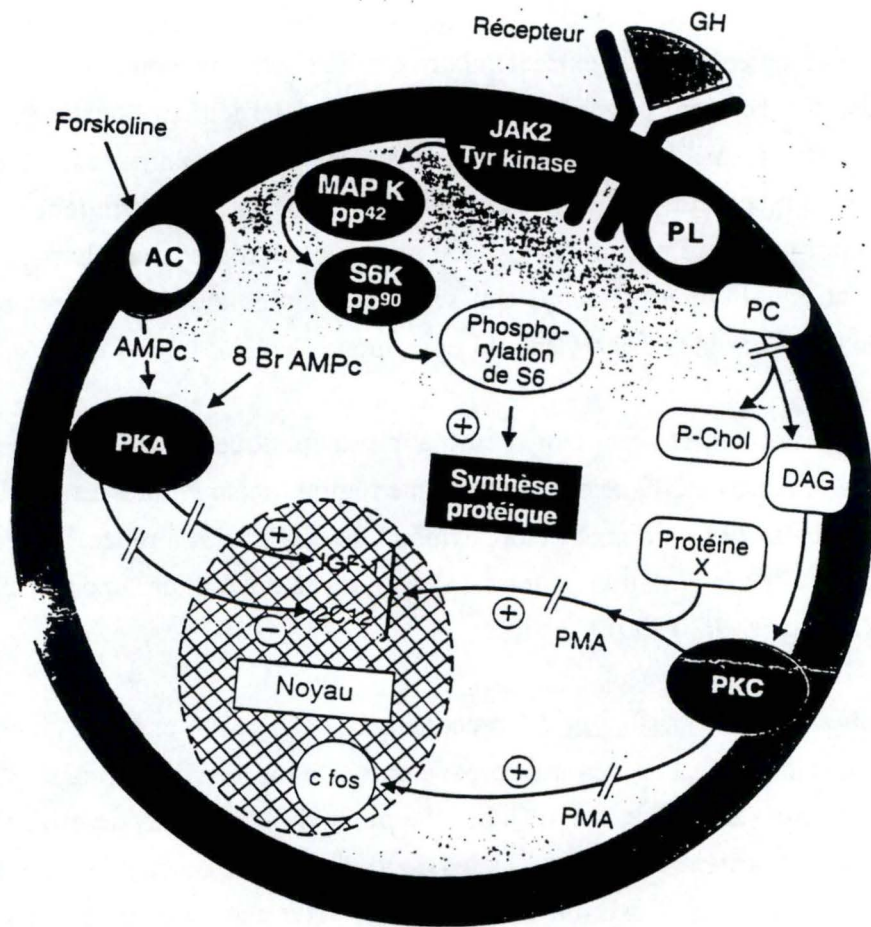


Figure 18: Diagramme schématisant les voies de signalisation de l'hormone de croissance dans les cellule cibles (Lecam et Legraverend, 1993).

d'internalisation et de recyclage dans la transmission du signal hormonal reste hypothétique (Roupas et Herington, 1989).

### 3.3. Voies de signalisation

Comme pour beaucoup d'autres hormones polypeptidiques, la GH exerce des effets de types métabolique et mitogénique, mettant en jeu l'activation de la transcription de nombreux gènes. Il existe à ce jour 2 voies de transduction connues : la première implique l'activation d'une cascade de réactions de phosphorylation et la seconde la génération de messagers intracellulaires de nature lipidique.

#### 3.3.1. Voie des phosphorylations en cascade (figure 18)

La GH est liée à son récepteur; celui-ci est associé à une tyrosine kinase, JAK2, activée par le complexe hormone-récepteur et qui, à la suite de cette activation, phosphoryle le récepteur. JAK2 phosphoryle aussi les MAP kinases, qui font partie des protéines kinases intracellulaires (comme la S6 kinase), impliquées dans les voies de signalisation de nombreux facteurs mitogéniques et de différenciation (Ullrich et Schlessinger, 1990).

L'activation de gènes (IGF-I...) et l'augmentation de la synthèse protéique observées en réponse à la GH, pourraient résulter de cette cascade de kinases conduisant, entre autres, à la phosphorylation de la protéine ribosomiale S6 qui est une étape clé de la synthèse protéique (Le Cam et Legraverend, 1993).

#### 3.3.2. Voie des médiateurs lipidiques

Les molécules d'origine lipidique semblent jouer un rôle dans l'action de la GH; cependant les résultats restent contradictoires et ne permettent pas de dégager un mécanisme univoque. En effet, dans les membranes basolatérales du tubule proximal de rein de chien, la GH active une phospholipase C (PLC) qui hydrolyse des phosphoinositides, libérant le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 3-phosphate (IP3) (Rogers et Hammerman, 1989). Par contre, dans les hépatocytes de rat, cette production de DAG est observée sans augmentation concomitante des inositols phosphate et met en jeu un mécanisme d'hydrolyse de la phosphatidylcholine (PC) (Johnson *et al.*, 1990).

**Tableau 4: Exemples de gènes contrôlés par l'hormone de croissance in vivo dans des cultures de cellules ou des lignées cellulaires établies (Lecam et Legraverend, 1993).**

| GENES                            | TISSU/CELLULE   | EFFET |
|----------------------------------|---|-------|
| <u>Récepteurs</u>                |   |       |
| EGF-R                            | Foie.   | +     |
| GH-R                             | Foie, hépatome,                                       | +     |
|                                  | tissus adipeux,<br>chondrocyte.                       | +     |
| Prolactine-R                     | Foie, hépatocyte                                      | +     |
| Oestrogène-R                     | Foie.   | +     |
| <u>Protéines de liaison</u>      |   |       |
| IGF-BP1                          | Foie.   | -     |
| IGF-BP3                          | Ovaire.   | +     |
| GH-BP                            | Foie.   | +     |
| <u>Hormones</u>                  |   |       |
| Insuline                         | Insulinome.   | +     |
| Somatostatine                    | Hypothalamus.   | +     |
| IGF-I                            | Os, ostéoblaste,                                      | +     |
|                                  | foie, hépatocyte,                                     | +     |
|                                  | adipocyte, pré-adipocyte                              | +     |
|                                  | rein, testicule, hypophyse.                           | +     |
| <u>Enzymes</u>                   |   |       |
| Cyt P-450 2C12                   | Foie, hépatocyte.                                     | +/-   |
| Cyt P-450 C27/25                 | Foie.   | +     |
| Alcool déshydrogénase            | Hépatocyte.   | +     |
| Lipoprotéine lipase              | Pré-adipocyte.  | +     |
| Glutamine synthétase             | Foie.   | +     |
| <u>Facteurs de transcription</u> |   |       |
| c-fos                            | Ostéoblaste, ostéocyte,<br>pré-adipocyte, hépatocyte. | +     |
| c-myc                            | Ostéoblaste.  | +     |
| c-jun                            | Ostéoblaste, pré-adipocyte.                           | +     |
| <u>Protéines diverses</u>        |   |       |
| Serpines (spi)                   | Foie, hépatocyte.                                     | +     |
| Albumine, $\alpha$ 2U-globuline  | Foie.   | +     |
| Collagène                        | Fibroblaste.  | -     |
| Myosine, chaîne lourde           | Muscle.   | +     |
| Vinculine, fibronectine          | Pré-adipocyte.  | +     |

### 3.4. Régulation des récepteurs de la GH

La régulation des récepteurs de la GH est spécifique à chaque tissu et est provoquée par la GH elle-même. En effet chez le rat, une hypophysectomie (dont la conséquence est une perte de production de GH) augmente les niveaux d'ARN<sub>m</sub> du récepteur de GH dans les muscles et les hépatocytes; par contre, dans les adipocytes, le niveau d'ARN<sub>m</sub> du récepteur de GH diminue (Kelly *et al.*, 1993; Le Cam et Legraverend, 1993).

Cette régulation est également influencée par une exposition continue ou intermittente à de la GH exogène (administrée *in vivo*). Au niveau du foie, une exposition chronique à la GH a pour effet d'augmenter le nombre de ses récepteurs. Par contre, une simple administration de GH à des brebis ou des rats hypophysectomisés diminue le nombre de récepteurs (Maiter *et al.*, 1988; Gluckman *et al.*, 1983; Kelly *et al.*, 1993).

Chez des brebis hypophysectomisées, il a été mis en évidence que l'oestradiol augmente le nombre de récepteurs à la GH au niveau du foie (Gluckman *et al.*, 1983).

### 3.5. Régulation de l'expression génique par la GH

La liaison de la GH à son récepteur déclenche des signaux intracellulaires qui se propagent, au moins en partie, jusqu'au noyau où ils modulent l'expression génique.

Dans le tableau 4 sont répertoriés les principaux gènes dont l'expression est affectée par la GH ainsi que les tissus cibles correspondants (Le Cam et Legraverend, 1993).

## 4. Contrôle de la sécrétion

### 4.1. Contrôle par les hormones hypophysaires

La libération de la GH se fait de manière pulsatile et intermittente (Brabant *et al.*, 1992). Chez le mouton, la sécrétion foetale de GH est pulsatile dès le 110<sup>ème</sup> jour de gestation; elle diminue avec l'âge de l'animal (Campion *et al.*, 1989).

La régulation de la sécrétion de GH dépend de nombreux stimuli mais est réalisée principalement par deux peptides hypothalamiques :

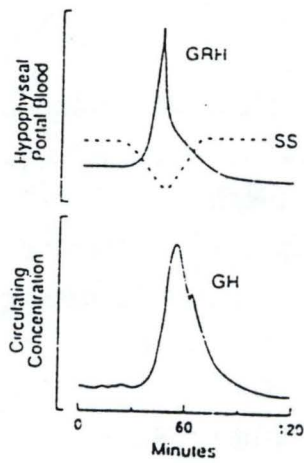


Figure 19 : Profils caractéristiques des sécrétions de GRH et SS en parallèle avec celui de la GH (Yen et Jaffe, 1991).

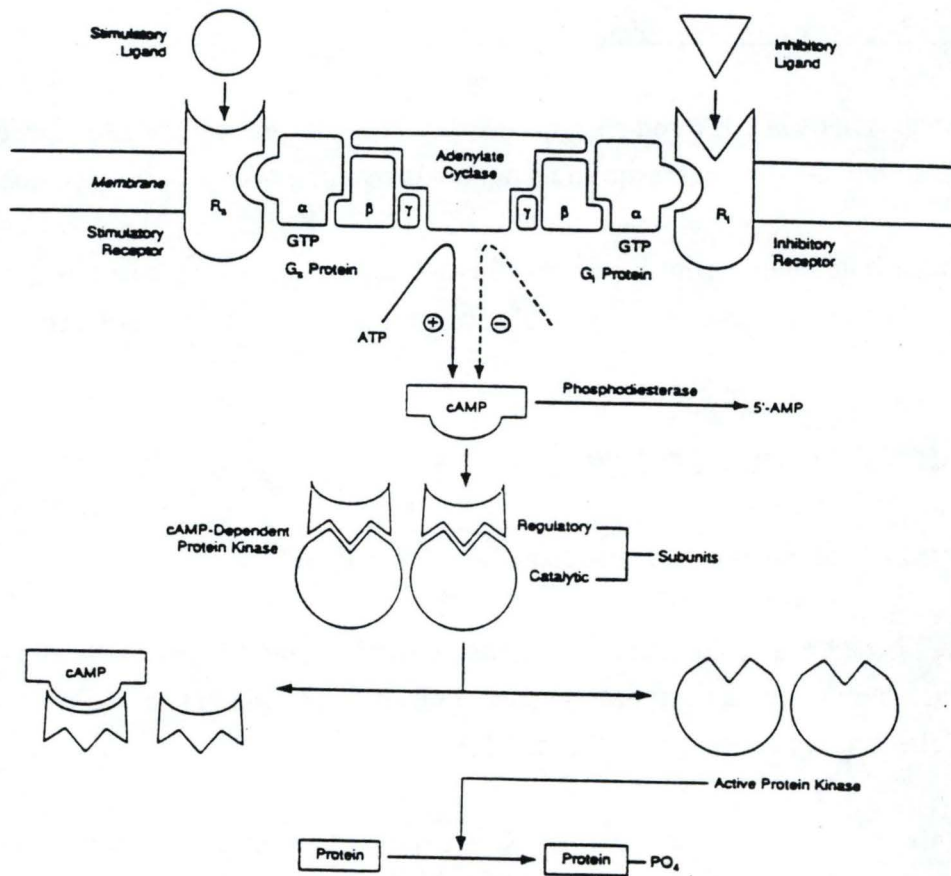


Figure 20: Modèle d'activation de l'adénylate cyclase (Wilson et Foster, 1992).

- la **somatostatine (SS)** qui inhibe et
- la **GH-releasing-hormone (GRH)** qui stimule cette sécrétion.

La GRH est sécrétée de façon épisodique et inverse par rapport à la SS (figure 19). De plus, une rapide diminution de la sécrétion ou de l'action de la SS semble être l'événement primaire induisant la sécrétion épisodique de GRH (Yen, 1991). Les pulses de GH sont une conséquence d'un pulse de GRH accompagné d'une réduction de la libération de SS dans le système porte hypophysaire (Page *et al.*, 1989).

Actuellement, il a été montré chez le rat que la **GRH** agit directement sur l'expression du gène codant pour la GH après liaison à son récepteur sur les cellules somatotropes. La liaison de l'hormone à son site spécifique induit une activation du système membranaire associé à ce site (figure 20). La protéine G couplée au récepteur membranaire se voit ainsi activée et sa sous-unité catalytique  $\alpha$  se détache de cette dernière et migre vers l'adénylate cyclase pour l'activer après fixation; la voie de l'AMP<sub>c</sub> est ainsi activée. La protéine kinase dépendante de l'AMP<sub>c</sub> active alors les facteurs de transcription CREB (Lee, 1991) participant à la transcription du gène codant pour la GH. Ce type d'activation membranaire par la GRH est également responsable de la sécrétion épisodique de GH (Kahn *et al.*, 1992; cités par Wilson et Foster, 1992).

La liaison de la **SS** sur son récepteur induit une inhibition de l'effet de la GRH sur la synthèse et la sécrétion de GH. En effet, la liaison de la SS à son site spécifique induit l'activation d'une protéine G<sub>i</sub> inhibitrice qui empêche l'influx de calcium intracellulaire et qui inhibe la sous-unité catalytique de l'adénylate cyclase (Yen, 1991). Ce type d'activation membranaire par la SS va être responsable de la sécrétion tonique de GH.

La GH est, après synthèse, contenue dans des granules de sécrétion et peut être libérée dans la circulation sanguine par exocytose en fusionnant avec la membrane plasmique, en réponse à un stimulus adéquat qui est l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire suite à la transduction du signal (Yen, 1991).

#### 4.2. Substances et facteurs régulateurs de la sécrétion de GH

Outre les hormones hypophysaires (GRH et SS), l'émission de GH dépend fortement de nombreux facteurs neurogéniques, métaboliques et hormonaux :

- l'insuline, la prolactine, les substances opioïdes, le glucagon, les androgènes, la testostérone sont des facteurs qui stimulent la sécrétion de GH (Wright, 1980);
- une concentration plasmatique élevée en arginine stimule également la sécrétion de GH (Wright, 1980);
- par contre, la Prolactin-Inhibiting-Hormone, l'angiotensine, la progestérone, une concentration plasmatique élevée en glucose sont des facteurs inhibiteurs de cette sécrétion (Tans, 1992);
- les acides gras, en stimulant la sécrétion de SS hypophysaire, ont un effet inhibiteur sur la sécrétion de GH caractérisé par une diminution de la fréquence des pulses (Estienne *et al.*, 1990);
- la GH, elle-même, régule sa propre sécrétion en stimulant la SS au niveau du système nerveux central (Campion *et al.*, 1989);
- les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes stimulent la sécrétion de GH en augmentant l'ARN<sub>m</sub> ;
- les IGF-I et II (Insulin-like Growth Factors) diminuent la sécrétion de GH en inhibant l'action de la GRH sur les cellules somatotropes et en stimulant la décharge hypophysaire de SS (Melmed, 1988);
- l'oestradiol augmente les niveaux plasmatiques de GH en inhibant les sécrétions hypophysaires de SS et les sécrétions tissulaires d'IGF-I (Christman et Halme, 1992);
- le jeûne provoque une augmentation de la concentration en GH (Wright, 1980);
- certains facteurs stressants et l'obscurité (par l'intermédiaire de la mélatonine) sont d'autres facteurs favorables à la synthèse accrue de GH (Wright, 1980).

## 5. Les protéines de liaison

Une fois dans la circulation sanguine, la GH se lie dans 50% des cas à une, voir plusieurs protéines de liaison spécifiques: les GH-BP (GH-Binding Proteins). Plusieurs hypothèses sont actuellement posées quant aux rôles joués par ces BP :

- elles augmentent de quelques minutes la demi-vie de l'hormone de croissance qui varie de 17 à 45 minutes selon les espèces et abaissent sa vitesse d'élimination et de dégradation (Wilson et Foster, 1992);
- elles restreignent les mouvements de la GH notamment au niveau de la filtration glomérulaire où la GH liée à sa protéine de liaison échappe à la filtration et se voit ainsi protégée de son principal site de dégradation;

- elles interviennent au moment de la liaison de l'hormone à son récepteur (Bauman, 1991). Suite à cette liaison, la BP empêcherait l'internalisation du complexe hormone - récepteur et, par le même fait, sa dégradation intracellulaire.

Chez l'homme, la vache et le lapin, la GH-BP est produite par coupure protéolytique de la partie extracellulaire du récepteur de la GH. En effet, on trouve un ARN<sub>m</sub> de 4,5kDa codant pour le récepteur et pas d'ARN<sub>m</sub> codant pour la GH-BP. En revanche, chez le mouton, le rat et la souris, une GH-BP de même type existe, qui est codée par un ARN<sub>m</sub> produit par épissage alternatif du transcrite du gène du récepteur ; ici, il y a donc deux ARN<sub>m</sub> de 4,5 et 1,5kDa codant respectivement pour le récepteur membranaire et la GH-BP. Dans les deux cas, la GH-BP correspond à la partie extracellulaire du récepteur additionnée d'un peptide hydrophile qui remplace les parties transmembranaire et intracellulaire du récepteur (Smith *et al.*, 1989; Adams *et al.*, 1990; Wells *et al.*, 1993).

## 6. Les effets de la GH

L'hormone de croissance porte ce nom du fait qu'elle est indispensable à la croissance harmonieuse de l'organisme et notamment du squelette. En plus de son action sur le **développement de l'organisme**, la GH peut également avoir de nombreuses **actions métaboliques** ainsi qu'un effet sur l'**activité de divers organes**.

La GH peut agir directement sur l'organe ou le tissu cible pour provoquer ses effets propres, mais, dans de nombreuses régions de l'organisme (cartilages, muscles squelettiques, placenta, squelette ... ), les actions de l'hormone sont dues aux IGF. La GH peut donc avoir des effets indirects médiés par les IGF qui agissent alors de façon endocrine ou paracrine sur le tissu cible.

### 6.1. Effets de la GH sur le développement de l'organisme

Au niveau des os, la GH agirait en collaboration avec l'IGF-I pour stimuler la croissance linéaire; de fait, l'hormone de croissance, en agissant directement au niveau de la plaque épiphysaire, stimule la différenciation des préchondrocytes en chondrocytes qui sécrètent alors de l'IGF-I. Ce dernier stimule l'expression clonale et la maturation des chondrocytes (Thorner *et al.*, 1992; cités par Wilson et Foster, 1992).

Accessoirement, elle augmente aussi l'activité des ostéoblastes (synthèse de collagène et de glycoprotéine) et par là, l'ossification (Paquay, 1989).

Dans le foie, la GH augmente le volume des cellules et y active la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Le développement des masses musculaires est peut-être l'action la plus efficace de la GH, principalement par la stimulation de la synthèse protéique. La GH pourrait être impliquée également dans les processus de la puberté; elle interviendrait avec d'autres hormones dans le développement des organes sexuels et des glandes mammaires (Paquay, 1989).

### 6.2. Effets sur le métabolisme protéique

La GH exerce un effet anabolisant en stimulant la pénétration des acides aminés dans la cellule et la synthèse protéique. Il s'ensuit un bilan azoté positif se traduisant par une diminution de l'excrétion urinaire d'urée (Gluckman et Breier, 1987; Salomon *et al.*, 1991).

### 6.3. Effets sur le métabolisme des graisses et des hydrates de carbone

Les effets de l'hormone de croissance sont insulino-semblables dans les tissus n'ayant pas été préexposés à l'hormone et sont inversés après exposition à l'hormone. Ainsi, l'hormone stimule-t-elle le transport de glucose et la synthèse protéique dans le muscle et le cœur de moutons hypophysectomisés, ces tissus devenant ensuite totalement résistants à son action. De la même manière, l'hormone de croissance qui active la lipogenèse dans les adipocytes de rat préalablement incubés en l'absence de l'hormone réduit l'utilisation du glucose et augmente la lipolyse dans les cellules pré-traitées par l'hormone durant 48 heures (Schwartz et Carter-Su, 1988; Smal et De Meyts, 1989). Toutefois, cet effet est sélectif car d'une part, aucune autre hormone (insuline ou glucocorticoïde) ne rend ces tissus réfractaires à leur propre action ni à celle de la GH, et d'autre part, la GH ne crée cet état réfractaire que vis-à-vis d'elle-même et pas vis-à-vis de ces autres hormones (Wright, 1980).

Sur le tissu adipeux, la GH exerce un effet lipolytique avec libération dans le plasma d'acides gras non estérifiés ainsi qu'un accroissement de la céto-genèse. Ces effets s'observent lors d'hypoglycémie, d'inanition ou de malnutrition sévère, suggérant que cette hormone permettrait un ajustement calorique en mobilisant les graisses (Keller et Miles, 1991).

En fonction des circonstances alimentaires, les effets de la GH sur les métabolismes glucidiques et lipidiques varient. Si les apports alimentaires sont insuffisants, le maintien de la glycémie avec libération des lipides de réserves est

prioritaire. Par contre, si les apports alimentaires sont importants, les dépôts de substances corporelles (glycogène, matières grasses) sont favorisés (Paquay, 1989).

L'hormone de croissance influence donc le métabolisme lipidique, glucidique et protéique à travers des effets opposés qui, paradoxalement, peuvent s'exercer sur un même tissu.

#### 6.4. Interactions avec l'insuline (Wright, 1980)

L'insuline, sécrétion interne des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, est une petite protéine soluble. Elle contient 51 acides aminés disposés en 2 chaînes. L'insuline est formée par clivage protéolytique de son précurseur de 84 acides aminés, la pro-insuline, qui n'a qu'une très faible activité biologique. Elle stimule la sécrétion de GH et la glycémie est le facteur le plus important du contrôle de sa sécrétion.

Il y a peu de différences dans la composition en acides aminés des insulines provenant de différentes espèces animales. Ces différences n'affectent pas leur activité biologique caractéristique mais sont responsables du fait que l'insuline provenant d'une espèce peut permettre l'apparition d'anticorps quand on l'injecte à une autre espèce. L'insuline bovine ou ovine peut aussi produire des réactions allergiques chez certains diabétiques, tandis que l'insuline porcine qui ressemble de très près à l'insuline humaine, est beaucoup mieux tolérée.

La sécrétion d'hormone de croissance par l'hypophyse est stimulée par l'hypoglycémie; la sécrétion d'insuline est favorisée par l'hyperglycémie et aussi par l'augmentation de l'acétonémie. Ainsi l'effet de l'une de ces hormones aboutit-il finalement à favoriser la sécrétion de l'autre. Aussitôt après un apport de glucides par voie digestive on observe une hyperglycémie, une augmentation de la sécrétion d'insuline et une diminution de la sécrétion d'hormone de croissance. A elle seule l'insuline peut donc faciliter le stockage de glucides et de lipides. Quelques heures plus tard, quand la glycémie est revenue à son niveau normal, la GH et l'insuline sont présentes à des concentrations pour lesquelles toutes deux facilitent l'anabolisme protéique sans mobiliser les graisses. Plus tard encore, si le sujet reste à jeûn et que la concentration d'insuline diminue tandis que celle de la GH augmente, cette dernière reste seule à agir, stimulant la mobilisation des graisses et la libération d'acides gras disponibles pour l'oxydation, diminuant en même temps l'utilisation du glucose.

### 6.5. Les effets de la GH sur l'activité de divers organes

La GH a aussi un effet bénéfique sur l'activité de divers organes; elle intervient avec d'autres hormones dans les mécanismes de la lactogenèse et de la galactopoïèse (Plaut *et al.*, 1993). Elle augmente ainsi la production laitière notamment en stimulant le comportement alimentaire, en augmentant le débit sanguin mammaire et en agissant sur la répartition préférentielle des nutriments dans la glande mammaire (Delouis et Richard, 1991).

Dans le rein, la GH favorise le développement des néphrons et permet l'hypertrophie du rein restant en cas de néphrectomie unilatérale, elle augmente le débit sanguin rénal, le débit de filtration glomérulaire et la réabsorption de diverses substances (glucose, sulfates, phosphates) dans les tubes rénaux (Paquay, 1989).

### 6.6. Les effets de la GH sur l'ovaire

Actuellement, il est prouvé que la GH est une hormone supplémentaire impliquée dans les mécanismes de régulation et de développement folliculaire. Ses effets se réalisent soit par une action directe de la GH sur l'ovaire après fixation sur son récepteur, soit par une libération accrue des IGF dans le sang. Ces derniers agissent ensuite selon un mode endocrine sur l'ovaire (Monget, 1993).

La concentration en IGF-I dans le fluide folliculaire peut être influencée par la GH. En effet, les expériences de Barecca et collaborateurs (1990) et de Christman et Halme (1992) ont montré qu'un traitement de GH administré *in vivo* et utilisé à des fins de superovulation chez la femme et chez la brebis (Davis *et al.*, 1990) augmente la concentration en IGF-I dans le fluide folliculaire dirigeant ainsi la croissance et la maturation folliculaire.

L'hormone de croissance agit en synergie avec la FSH humaine sur la production d'oestrogènes par les cellules de la granulosa (Lippe et Nakamoto, 1993) et la formation du récepteur à la LH dans les cellules granulosales de rat. De plus, la GH permet à elle seule d'augmenter le taux de progestérone dans les cultures de cellules lutéales humaines (Mason *et al.*, 1990; Lanzone *et al.*, 1992) et ovines (Juengel *et al.*, 1994).

La croissance folliculaire peut également être influencée par la GH. Lorsque celle-ci est injectée quotidiennement à des vaches, elle modifie le recrutement folliculaire en augmentant le nombre de petits follicules. Cette action sur la croissance

folliculaire est liée à une augmentation de la concentration périphérique en IGF-I et en insuline. La dynamique de croissance folliculaire, le nombre de vagues de croissance folliculaire et le taux d'ovulation ne sont pas affectés par le traitement (Gong *et al.*, 1993). Chez la brebis, l'augmentation du nombre de follicules recrutés suite à un traitement de GH peut s'expliquer, en plus d'une augmentation des concentrations périphériques en IGF-I (Cognié, communication personnelle), par une augmentation de la sensibilité des follicules face aux hormones gonadotropes (Christman et Halme, 1992).

#### 6.7. Autres effets de la GH.

Chez l'homme, il a été observé qu'un retard de puberté est associé à une déficience en GH suggérant un rôle dans la différenciation des gonades et l'avancement du cycle menstruel normal.

La GH, comme la PRL, est un facteur immunostimulant; des rats dont l'adénohypophyse a été enlevée ont des glandes thymiques atrophiées et un système immunitaire diminué. De même en présence d'érythropoïétine, la GH stimule l'érythropoïèse (Golde et Bersh, 1977).

Un transfert d'oocytes, fertilisés *in vitro*, chez des brebis receveuses contrôles et des brebis traitées à la GH, montre une plus grande viabilité de ces oocytes chez les brebis traitées; la GH semble donc mieux préparer "l'environnement" de l'oviducte et de l'utérus (Cognié, communication personnelle).

Chez l'enfant et l'adolescent, l'excès de GH (acromégalie) entraîne un gigantisme provoqué par la stimulation constante de la croissance des cartilages épiphysaires. Chez l'adulte, l'acromégalie est caractérisée par un élargissement de tous les os, un épaissement de la peau et du tissu sous-cutané d'où l'agrandissement considérable des mains, des pieds et du massif facial. En plus de ces modifications, on observe des changements métaboliques dont une intolérance aux hydrates de carbones, un hypermétabolisme, une hypersécrétion sudorale, une élévation de la phosphatémie et une hypercalciurie (Wright, 1980). Chez l'adulte, le manque de GH ne se traduit que par une hypersensibilité à l'insuline. Chez l'enfant, sa conséquence est un nanisme harmonieux (nanisme hypophysaire) par retard de la croissance non seulement du squelette mais de tout l'organisme. Il existe deux autres formes de nanisme résultant non pas d'une insuffisance en GH mais d'une incapacité de la GH à générer la synthèse d'IGF-I (syndrome de Laron) ou d'une résistance périphérique à la GH et à l'IGF-I (cas des pygmées) (Wright, 1980).

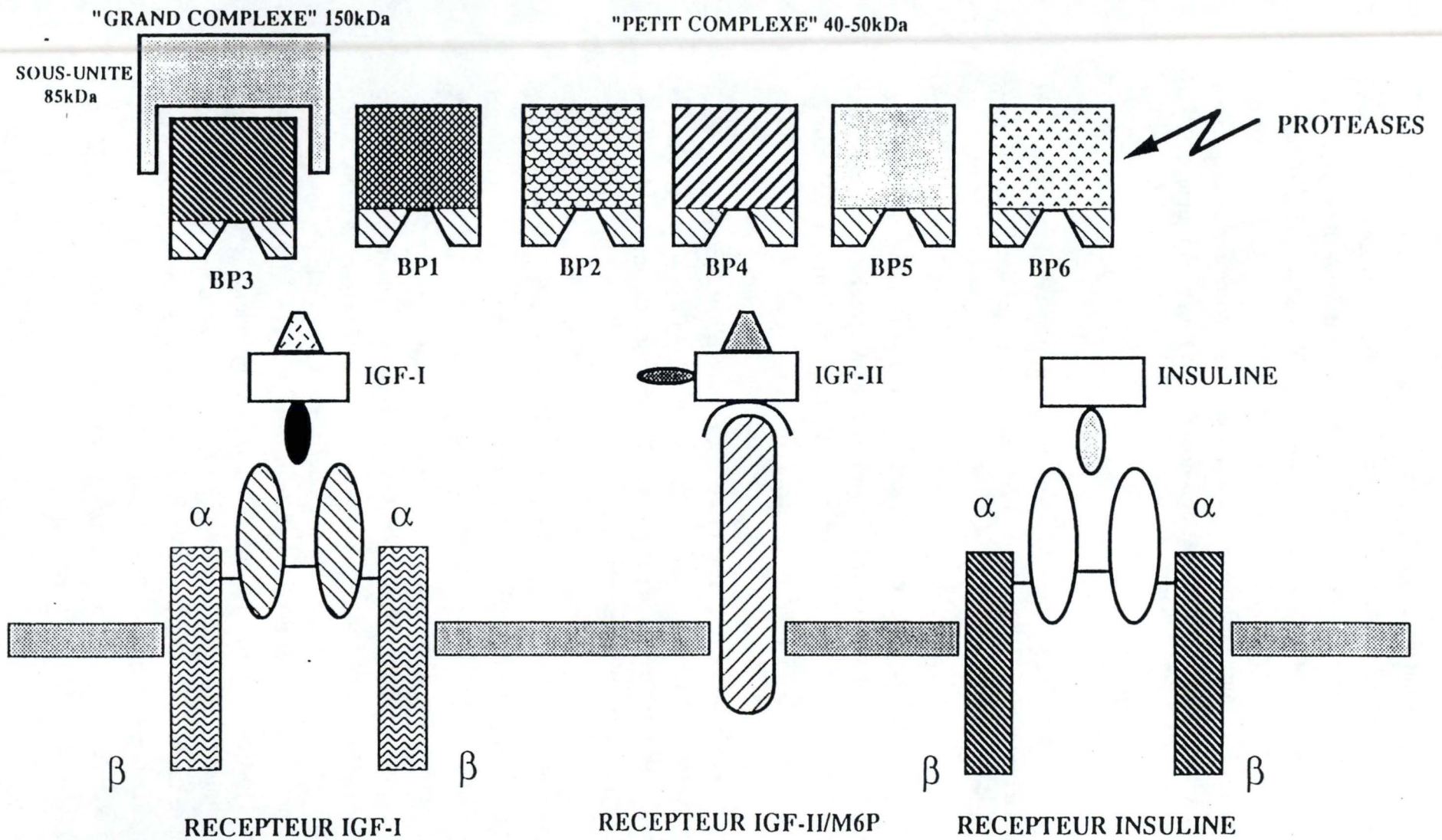


Figure 21: Le système IGF (Monget, 1993).

## CHAPITRE 3 : LE SYSTÈME IGF

A la vue de ce qu'il vient d'être écrit sur l'hormone de croissance, il semble opportun d'approfondir le système des "Insulin like Growth Factors" (IGF). En effet, l'hormone de croissance a, par l'intermédiaire des facteurs de croissance IGF, des effets indirects sur certains tissus.

Le système IGF (figure 21) est en fait un ensemble de facteurs comprenant l'IGF-I et l'IGF-II, leurs protéines de liaison (les IGFBP) et leurs récepteurs respectifs (Giudice, 1992).

### 1. Les IGF

#### 1.1. Structure

Les IGF se présentent sous 2 formes:

- l'IGF-I ou somatomédine C est un peptide monocaténaire alcalin de 7,649 Kda (Rutanen et Pekonen, 1990) et composé de 70 acides aminés (Sara et Hall, 1990).
- l'IGF-II ou Multiplication Stimulating Activity est un peptide monocaténaire neutre de 7,471 Kda (Rutanen et Pekonen, 1990) et composé de 67 acides aminés (Sara et Hall, 1990).

L'homologie de séquence entre les 2 IGF est de 62%. Les IGF sont en fait composés de 4 domaines nommés respectivement A, B, C et D. Les domaines A et B présentent 40% d'homologie et sont séparés par le domaine C, le domaine D se trouvant quant à lui à l'extrémité carboxy-terminale. Ce sont des facteurs de croissance ayant une séquence d'acides aminés et une structure présentant 40% d'homologie avec celle de la pro-insuline; ces composés dérivent vraisemblablement d'un gène ancestral commun (Sara et Hall, 1990).

## 1.2. Lieux de synthèse

C'est dans le foie que l'on retrouve le plus d'ARN<sub>m</sub> de l'IGF-I; celui-ci est donc la source principale des IGF plasmatiques (Pell *et al.*, 1990). Toutefois, ils sont également synthétisés dans de nombreux tissus: le rein, le système nerveux central, le poumon, le testicule (Caldani *et al.*, 1991), les cellules granuleuses de l'ovaire (Christman et Halme, 1992), l'endomètre (Simmen *et al.*, 1993).

Outre dans le sérum, les IGF se retrouvent dans tous les fluides biologiques: la lymphe, le liquide céphalorachidien, les fluides amniotiques, endométrial et folliculaire (Monget, 1993).

Chez l'homme, le rat, le porc, le bovin et le mouton, au cours de la vie foetale, les gènes de l'IGF-I et surtout de l'IGF-II sont exprimés dans la plupart des tissus mais les taux sériques de ces IGF sont faibles (Evain-Brion, 1991; Monget, 1993). Chez ces espèces, les taux sériques d'IGF-I augmentent fortement en fin de gestation dans le sérum foetal et au moment de la naissance; par contre, les taux sériques d'IGF-II sont plus élevés chez le foetus que chez le nouveau-né chez le rat et le mouton. Chez l'homme, le porc et le mouton adultes, on retrouve une concentration d'IGF-II 2 à 4 fois plus importante que celle de l'IGF-I dans le sérum (Donovan *et al.*, 1989 et Gluckman et Butler, 1983).

## 2. Les protéines de liaison

Dans les fluides biologiques, 95% des IGF sont liés à des protéines de liaison spécifiques appelées IGF Binding Proteins (IGFBP); ces IGFBP sont au nombre de 6 (Monget, 1993). Elles sont toutes capables de lier l'IGF-I et l'IGF-II mais ne lient pas l'insuline.

Dans le sérum, 80 à 90% des IGF sont liés à un complexe de 150 Kda appelé "grand complexe", les 20 à 10% restants étant retrouvés dans un complexe de 40 à 50 Kda appelé "petit complexe" (Sara et Hall, 1990).

### 2.1. Structure et synthèse

Chez l'homme, le rat et le porc, 6 IGFBP codées par 6 gènes différents ont été identifiés. Les 6 IGFBP se localisent dans les 2 "complexes" (Baxter et Cowell, 1987), en effet:

- l'IGFBP3 fait partie intégrante du "grand complexe" régulé par la GH;

- les 5 autres IGFBP font partie du "petit complexe" indépendant de la GH.

**IGFBP1** : elle possède un poids moléculaire de 28 à 30 Kda et présente une affinité équivalente pour l'IGF-I et l'IGF-II. Son expression est fortement diminuée *in vivo* et *in vitro* par l'insuline et la GH (Lewitt *et al.*, 1992). Sa séquence en acides aminés présente un motif RGD (Arg-Gly-Asp) près de l'extrémité carboxy-terminale, ce qui expliquerait la capacité de cette protéine de liaison à se fixer aux membranes cellulaires (Sara et Hall, 1990).

Les principaux lieux de synthèse sont le foie, l'endomètre et l'ovaire (Martikainen *et al.*, 1991).

**IGFBP2** : elle possède un poids moléculaire de 31 à 35 Kda et présente une affinité 10 fois plus forte pour l'IGF-II que pour l'IGF-I. Son expression est diminuée par la GH (Mc Cusker *et al.*, 1991). Tout comme pour l'IGFBP1, sa séquence en acides aminés présente un motif RGD (Sara et Hall, 1990).

**IGFBP3** : chez l'homme, c'est la protéine de liaison la plus abondante dans le sérum, elle se présente sous 2 formes de poids moléculaire compris entre 42 et 44 Kda et lie l'IGF-I ainsi que l'IGF-II avec une affinité équivalente (Binoux et Hossenlopp, 1988). Son expression est stimulée par l'IGF-I et la GH (Bale et Conover, 1992; cités par Monget, 1993).

**IGFBP4** : les formes glycosylée et non glycosylée de l'IGFBP4 possèdent un poids moléculaire de 28 et 24 Kda (Cheung *et al.*, 1991).

Cette protéine de liaison est exprimée abondamment dans les follicules ovariens atrophiques (Monget, 1993).

**IGFBP5** : elle possède un poids moléculaire de 29 Kda (Andress et Birnbaum, 1992; cités par Monget, 1993). Comme l'IGFBP4, elle est exprimée dans les follicules ovariens atrophiques.

**IGFBP6** : son poids moléculaire est de 30 à 32 Kda et elle présente une affinité 50 fois plus forte pour l'IGF-II que pour l'IGF-I (Shimasaki *et al.*, 1991).

## 2.2. Le "grand complexe"

Le "grand complexe", de poids moléculaire de 150 Kda, est constitué de 3 sous-unités:

- une glycoprotéine de 85 Kda qui constitue la sous-unité  $\alpha$  et qui lie l'IGFBP3 uniquement en présence d'un IGF;
- la protéine de liaison IGFBP3 qui constitue la sous-unité  $\beta$ ;
- la sous-unité  $\gamma$  composée de l'IGF-I ou de l'IGF-II.

Dans le sérum de l'adulte sain, 80% des IGF-I sont liés à ce complexe, la concentration de ce dernier ne varie presque pas faisant ainsi du transport d'IGF-I sa principale fonction (Sara et Hall, 1990).

Contrairement à l'hormone de croissance, les IGF ne sont pas stockés dans des granules de sécrétion; il est par conséquent possible que ce "grand complexe" de liaison constitue une forme de stockage d'IGF; toutefois, le mode d'action de cette fonction de réserve reste encore inconnu (Holly et Wan, 1989).

### 2.3. Le "petit complexe"

Les 5 autres IGFBP constituent le "petit complexe" de poids moléculaire de 40 à 50 Kda et présentent une plus grande affinité pour les IGF-II que pour les IGF-I (Giudice, 1992).

Vu le faible poids moléculaire de ces protéines de liaison, seul un faible pourcentage d'IGF circulants est porté par ce complexe (Holly et Wan, 1989).

### 2.4. Rôles

Dans les fluides biologiques, les IGFBP jouent un rôle important dans le stockage des IGF en augmentant leur temps de demi-vie qui est, chez la brebis, de 5 minutes pour l'IGF-I libre, de 30 minutes pour l'IGF-I présent dans le "petit complexe" et de 9 heures si l'IGF-I se trouve au sein du "grand complexe" (Stuart *et al.*, 1991 cités par Monget, 1993).

Les IGFBP modulent la distribution des IGF dans les tissus; ainsi, l'IGFBP1, l'IGFBP2 et l'IGFBP4 du "petit complexe" véhiculent les IGF vers les tissus cibles en traversant la barrière endothéliale (Bar *et al.*, 1990); tandis que le "grand complexe", abondant dans le sérum, se retrouve peu dans la lymphe (Binoux et Hossenlopp, 1988).

Les IGFBP exercent un effet inhibiteur sur la croissance et la différenciation des follicules de rat (Bicsak *et al.*, 1991) et de brebis (Monget, 1993); cet effet peut s'expliquer en partie au moins par la séquestration des IGF. Bicsak et collaborateurs (1990) ont montré que les effets inhibiteurs des IGFBP peuvent être reproduits avec des anticorps dirigés contre l'IGF-I.

### 3. Les récepteurs

Les récepteurs aux IGF sont de 2 types: le récepteur de l'IGF-I ou récepteur de type I et le récepteur de l'IGF-II ou récepteur de type II.

#### 3.1. Le récepteur de type I

Ce récepteur est un hétérotétramère composé de 2 sous-unités liantes  $\alpha$  de 130 Kda et de 2 sous-unités  $\beta$  intra-cytosoliques de 95 Kda possédant une activité tyrosine kinase. La transduction du signal par ce récepteur reste mal connue; cependant, il semblerait que la liaison du ligand aux sous-unités  $\alpha$  provoque un signal intracellulaire transmis par autophosphorylation des résidus tyrosine à l'intérieur des sous-unités  $\beta$  (Sara et Hall, 1990). Ce récepteur présente une affinité 2 à 3 fois plus forte pour l'IGF-I que pour l'IGF-II (Garofalo et Barenton, 1992) et l'insuline (Heyner *et al.*, 1993).

Le récepteur de l'IGF-I apparaît très tôt au cours de la croissance folliculaire dans la granulosa. La quantité de récepteurs ne varie pas avec la taille du follicule entre 800  $\mu\text{m}$  et 8 mm de diamètre, elle diminue par contre dans les follicules atrétiques de moins de 2mm de diamètre (Monget *et al.*, 1989).

#### 3.2. Le récepteur de type II

Ce récepteur est une protéine transmembranaire monomérique de 220 Kda. La partie extracellulaire constitue plus de 92% de la molécule et présente des répétitions de séquences riches en cystéines et une séquence de résidus apparentés à la fibronectine (Sara et Hall, 1990).

Quatre-vingts pour cent de ces récepteurs se situent dans l'appareil de Golgi et les vésicules lysosomiales. Le récepteur de type II est identique au récepteur Mannose-6-Phosphate cation-indépendant, d'où l'attribution fréquente de "récepteur IGF-II/M6P" comme nom. Cependant, il n'est pas encore possible d'expliquer la relation physiologique entre l'IGF-II et le mannose-6-phosphate (Morgan *et al.*, 1987).

A la différence du récepteur de type I, le récepteur IGF-II/M6P ne possède pas d'activité tyrosine kinase mais est lié à une protéine Gi-2 $\alpha$  membranaire.

Dans les follicules normaux, le récepteur IGF-II/M6P est présent essentiellement au niveau de la thèque. Par contre, dans les follicules atrétiques, il est surtout retrouvé

dans la granulosa, quelle que soit la taille des follicules; la signification physiologique de ce phénomène est inconnue pour le moment (Teissier *et al.*, 1994).

Enfin, le récepteur de type II a une affinité 1000 fois plus faible pour l'IGF-I que pour l'IGF-II et ne lie pas l'insuline (Heyner *et al.*, 1993).

#### **4. Régulation de l'expression des IGF**

L'hormone de croissance stimule principalement l'expression hépatique de l'IGF-I et dans une moindre mesure celle de l'IGF-II, mais elle stimule également l'expression de l'IGF-I au niveau des reins (Albiston et Herington, 1992), du coeur, des poumons, des tissus osseux et musculaires (Grant *et al.*, 1991), des testicules, des adipocytes, du pancréas (Vikman *et al.*, 1991) et des ovaires (Monget, 1993).

Le jeûne, à savoir une balance énergétique et/ou protéique négative, induit une diminution de l'expression des IGF dans le foie et la plupart des tissus, ainsi qu'une diminution des niveaux plasmatiques d'IGF-I (Straus et Takemoto, 1990).

L'oestradiol stimule aussi l'expression de l'IGF-I dans l'utérus et l'ovaire. A forte dose, il potentialise l'effet stimulant de la GH sur l'expression hépatique d'IGF-I. Une administration chronique d'oestradiol exerce par contre un effet antagoniste (Murphy et Friesen, 1988).

Les glucocorticoïdes inhibent l'expression de l'IGF-I au niveau du foie, du tissu osseux (Luo et Murphy, 1989) et des cellules granulosales (Viveiros et Liptrap, 1994).

#### **5. Rôles des IGF**

Les IGF stimulent la prolifération et la différenciation cellulaire; toutefois, leurs effets sont différents qu'il s'agisse de l'IGF-I ou de l'IGF-II.

##### **5.1. IGF-I**

*In vitro*, l'IGF-I stimule la prolifération des cellules fibroblastiques, des chondrocytes, des cellules nerveuses, des myoblastes et des cellules de la granulosa.

*In vitro*, l'IGF-I stimule la différenciation de très nombreux types cellulaires dont les cellules nerveuses, les cellules musculaires, les cellules de Sertoli et les cellules de la granulosa (Monget, 1993).

*In vivo*, l'IGF-I stimule la croissance de rats déficients en GH et de rats hypophysectomisés; cependant, l'IGF-I n'est pas suffisant pour reproduire l'ensemble des effets de la GH et conduit souvent à une croissance disproportionnée des tissus (Skottner *et al.*, 1989).

## 5.2. IGF-II

*In vivo*, l'IGF-II stimule la sécrétion d'ostéocalcine chez l'agneau (Coxam *et al.*, 1992).

L'étude de souris transgéniques déficientes en IGF-II prouve le rôle déterminant de l'IGF-II dans la croissance foetale (De Chiara *et al.*, 1990).

L'IGF-II est beaucoup moins actif que l'IGF-I sur les cellules de la granulosa. Selon Hartshorne (1988) et Teissier et collaborateurs (1994) l'action de l'IGF-II est médiée par le récepteur de l'IGF-I.

## 6. Rôles des IGF dans l'ovaire

L'ovaire constitue un organe cible pour les IGF mais est également un lieu d'expression élevé des gènes IGF-I et II (Adashi *et al.*, 1992); cette expression par les cellules thécales et/ou granulosaes est spécifique à l'espèce mais est contrôlée par des facteurs communs tels l'oestradiol et la GH (Giudice, 1992).

*In vivo* comme *in vitro*, les IGF présentent une variété d'effets modifiant le développement folliculaire: en effet, ils amplifient la stéroïdogénèse (Talavera et Menon, 1991; Kamada *et al.*, 1992) et la synthèse d'ADN par les cellules granulosaes (Hammond et English, 1987) en début de saison de reproduction; par contre en anoestrus, ils n'amplifient plus la stéroïdogénèse (Khalid *et al.*, 1994). De même, le stade de développement folliculaire influence la réponse à l'IGF-I; en effet, chez la brebis, l'IGF-I stimule la prolifération des cellules de la granulosa de follicules de 1 à 3 mm de diamètre ainsi que la différenciation des cellules de la granulosa de follicules de diamètre supérieur à 5 mm (Monniaux et Pisselet, 1992).

L'IGF-I a également une activité synergique avec la FSH pour augmenter l'activité aromatase et induire les récepteurs à la LH dans les cellules de la granulosa (Adashi *et al.*, 1985). Enfin, l'IGF-I potentialise l'action de la LH sur la sécrétion de progestérone et d'androstènedione (Monniaux et Pisselet, 1992).

Les mécanismes par lesquels les IGF agissent sur la cytodifférenciation et la prolifération des cellules folliculaires restent encore inconnus. De plus, durant la croissance folliculaire chez la brebis, les variations des concentrations en IGF dans le fluide folliculaire ne semblent pas constituer un élément déterminant dans la destinée des follicules (Monget, 1993). Par contre, le type et la quantité de protéines de liaison ainsi que le nombre de récepteurs aux IGF contribuent au développement final du follicule voué à l'ovulation (Hammond *et al.*, 1985).

D'après les expériences de Noël (1994), il semblerait que l'atrésie des follicules sélectionnés et dominants soit due à une perte de sensibilité aux hormones gonadotropes et à l'IGF-I. En effet, suite à la pose d'une éponge de FGA (Fluorogestone Acétate, un progestagène) pendant 14 jours, on observe une augmentation de la proportion d'atrésie parmi les follicules sélectionnés pendant la troisième vague de croissance folliculaire. Ceci est associé à une perte de la sensibilité de ces follicules aux hormones gonadotropes mais également, bien que dans une moindre mesure, à l'IGF-I. De plus, l'injection de PMSG (gonadotropine qui possède des actions comparables à celles de la LH et de la FSH) au moment du retrait de l'éponge de FGA permet de sauver les follicules de l'atrésie et de restaurer la sensibilité des follicules aux gonadotropines et à l'IGF-I. On pourrait donc penser que le ou les facteurs capables d'induire l'atrésie inhibent l'acquisition des récepteurs aux gonadotropines et à l'IGF-I au niveau des cellules folliculaires.

La complexité du système IGF rend difficile l'interprétation du rôle biologique réel de chacun des éléments de ce système dans l'ovaire. Mais il semble évident que l'action coordonnée de la GH et des IGF intervient dans la croissance et la différenciation des follicules.

# **DEUXIEME PARTIE**

**Travail personnel**

## **Matériel et méthodes**



*Photo 1 : Brebis Suffolk*

## **1. Conditions expérimentales**

Les 20 brebis Suffolk (photo 1) utilisées pour les expériences font partie du troupeau du Centre de Recherches Ovines de Faulx-les-Tombes (C.R.O). Selon le moment de l'année et les nécessités expérimentales, les brebis sont laissées en prairie ou placées en bergerie avec des rations alimentaires adaptées à leurs besoins. Les conditions de photopériode naturelle sont toujours respectées. En dehors des périodes expérimentales, les brebis séjournent au Centre de Recherches Ovines et subissent les traitements habituels.

Les manipulations *in vivo* sont effectuées aux Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur, dans une bergerie réservée à cet effet, de manière à pouvoir contrôler les heures de distribution des rations alimentaires, les conditions photopériodiques, les heures des prélèvements sanguins et les heures d'injection de GH recombinante bovine (bGHrec). Chaque brebis reçoit quotidiennement 850 gr de foin et 266 gr d'aliments composés.

## **2. Plans expérimentaux**

### **2.1. Effets de l'alimentation et du nyctémère sur l'émission de GH**

Cet essai préliminaire a été réalisé en octobre-novembre 1993 (soit en pleine saison de reproduction) en vue de déterminer les effets de l'alimentation (heures de distribution des rations alimentaires) et du nyctémère sur l'évolution de la concentration en GH du plasma lors du cycle oestral de la brebis. Pour ce faire, deux lots de 4 brebis Suffolk taries synchronisées par un progestagène (le Fluorogestone Acétate) ont été placées dans des conditions photopériodiques identiques; les rations alimentaires étaient distribuées à un moment de la journée différent pour les deux lots : 9h00 pour le premier groupe et 17h00 pour le second. Le cycle de lumière imposé a été fixé de 7 heures à 18 heures afin de reproduire autant que possible les conditions photopériodiques naturelles.

En phase lutéale, entre deux vagues de croissance folliculaire (jour 5 du cycle), des prises de sang sériées (toutes les 15 minutes pendant 24 heures) ont été effectuées sur chaque brebis et la concentration en GH de chaque échantillon a été déterminée. Cet essai s'est déroulé conformément au protocole expérimental suivant :

- J0 : pose des éponges (40 mg de fluorogestone acétate) sur les 8 brebis;
- J14 : retrait des éponges;
- J22 : moment correspondant au jour 5 du cycle oestral : prises de sang sériées pendant 24 heures sur toutes les brebis.

*Tableau M1 : Caractéristiques des brebis*

|   | <b>Numéros</b> | <b>Poids</b> | <b>Date de naissance</b> |
|---|----------------|--------------|--------------------------|
| <b>Groupe recevant<br/>l'alimentation<br/>à 9 heures</b>  | 205            | 57           | 15/04/1985               |
|   | 411            | 66           | 14/03/1989               |
|   | 714            | 40           | 24/02/1992               |
|   | 762            | 37           | 20/04/1992               |
| <b>Groupe recevant<br/>l'alimentation<br/>à 17 heures</b> | 365            | 61           | 09/04/1988               |
|   | 479            | 54           | 22/03/1987               |
|   | 638            | 62           | 06/01/1992               |
|   | 782            | 48           | 12/04/1992               |

*Tableau M2 : Calendrier expérimental*

| Traitements                      | Groupes de brebis impliquées | Essai 1<br>Anoestrus | Essai 2<br>Début saison | Essai 3<br>Milieu saison |
|----------------------------------|------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------|
| Pose des éponges                 | A, B, C et D                 | 27/4/94              | 1/7/94                  | 25/9/94                  |
| Retrait des éponges              | A, B, C et D                 | 11/5/94              | 17/7/94                 | 9/10/94                  |
| Injection de GH                  | A et B                       | 31/5/94 au 15/6/94   | 19/7/94 au 04/8/94      | 13/10/94 au 29/10/94     |
| Prises de sang quotidienne       | A, B, C et D                 | 31/5/94 au 15/6/94   | 19/7/94 au 04/8/94      | 13/10/94 au 29/10/94     |
| Prises de sang sériées (Jour 9)  | A et C                       | 8/6/94               | 27/7/94                 | 21/10/94                 |
| Endoscopies                      | B et D                       | 12/6/94 au 16/6/94   | 31/7/94 au 3/8/94       | 25/10/94 au 28/10/94     |
| Prises de sang sériées (Jour 16) | A et C                       | 15/6/94              | 3/8/94                  | 28/10/94                 |
| Endoscopies (Jour 17+1)          | B et D                       | 17/6/94              | 5/8/94                  | 30/10/94                 |

Les caractéristiques des brebis utilisées pour cet essai préliminaire figurent dans le tableau M1.

2.2. Incidence de l'état physiologique sur les profils de sécrétion naturelle de GH et sur la réactivité des follicules durant un traitement de GH administré in vivo

L'expérience a débuté en avril 1994, avec 20 brebis Suffolk adultes, et se terminera en mars 1995. Sur base des résultats obtenus antérieurement au laboratoire, l'essai portant sur l'anoestrus a lieu dans le courant du mois de juin, celui concernant le début de saison de reproduction a lieu dans le courant des mois de juillet et août contre septembre et octobre pour le milieu de la saison de reproduction. Lors de chaque période, les brebis sont placées dans des conditions photopériodiques similaires aux conditions photopériodiques naturelles (en anoestrus, la phase d'obscurité débute à 22h40 et se termine à 5h40; en début de saison de reproduction, elle débute à 22h00 pour se terminer à 6h00; en milieu de saison de reproduction, cette phase débute à 17h40 et se termine à 7h40).

Le calendrier expérimental est résumé dans le tableau M2. Les brebis sont divisées en 4 lots:

- les **brebis du lot A** servent de témoins et sont réservées à l'étude des sécrétions hormonales;
- les **brebis du lot B** servent de témoins et sont réservées à l'étude des croissances folliculaires;
- les **brebis du lot C** reçoivent le traitement de bGHrec et sont réservées à l'étude des sécrétions hormonales;
- les **brebis du lot D** reçoivent le traitement de bGHrec et sont réservées à l'étude des croissances folliculaires.

Afin d'établir les meilleures comparaisons possibles entre les différentes brebis, il a été nécessaire de synchroniser tous les cycles au début de chaque essai. Toutes les analyses sont effectuées durant le cycle suivant la synchronisation, laquelle est obtenue au moyen d'un progestagène : le Fluorogestone Acétate (FGA).

Lors de chaque période étudiée, 10 brebis sont stimulées par un traitement de bGHrec, les 10 autres, non traitées, servant de témoin. Les injections quotidiennes (intramusculaires) de bGHrec débutent trois jours après le retrait du progestagène pour se poursuivre jusqu'en fin de cycle. La dose injectée est de 3 mg de bGHrec administrée deux fois par jour à 9 heures en ce qui concerne la première injection et à 17 heures pour ce qui est de la seconde.

Eu égard aux résultats obtenus lors de l'expérience préliminaire, nous avons fixé l'heure de distribution des rations alimentaires à 17 heures pour les deux groupes de brebis.

### 2.2.1. Analyse des sécrétions hormonales au cours des différents états physiologiques sur des brebis traitées *in vivo* à la GH et sur des brebis témoins.

L'étude des différents profils de sécrétions hormonales a porté sur 10 brebis : 5 traitées par des injections quotidiennes de bGHrec (lot C) et 5 témoins (lot A). Les 10 autres brebis ont été réservées pour l'étude des mécanismes de la croissance et de la maturation folliculaire.

Les sécrétions endocriniennes ont été établies à partir de prélèvements sanguins. Au cours du cycle suivant la synchronisation, la pulsativité des profils endocriniens (GH et LH) a été déterminée à partir des échantillons sanguins prélevés toutes les 15 minutes pendant 12 heures en phase lutéale (jour 9) et pendant 24 heures en phase folliculaire (jour 16). Durant le reste du cycle, des prises de sang quotidiennes réalisées entre 8h00 et 9h00 nous ont permis de tracer les profils moyens de sécrétion de GH, LH, FSH, P<sub>4</sub> et E<sub>2</sub>. Ces prélèvements sanguins ont toujours été effectués dans les mêmes conditions.

### 2.2.2. Analyse des croissances folliculaires et des taux d'ovulation au cours des différents états physiologiques sur des brebis traitées *in vivo* à la GH et sur des brebis témoins.

Pour l'étude de la maturation folliculaire et de l'ovulation, 10 brebis (5 traitées par des injections quotidiennes de bGHrec, lot D, et 5 témoins, lot B) synchronisées ont été soumises à des endoscopies quotidiennes lors de la phase folliculaire du cycle (jours 13, 14, 15 et 16). Ceci nous a permis d'observer la croissance et la maturation folliculaires en début et milieu de saison de reproduction. Au jour 17 du cycle, le taux d'ovulation a été déterminé par le même procédé d'endoscopie. En anoestrus, les endoscopies ont été réalisées aux jours 13, 14, 15 et 16 du cycle suivant la synchronisation.

Grâce à cette technique, nous avons pu mettre en évidence l'incidence de l'état physiologique et d'un traitement à la bGHrec sur la croissance folliculaire et sur les taux d'ovulation.



*Photo 2 : Prise de sang au niveau de la jugulaire*

### **3. Méthodes utilisées**

#### **3.1. Techniques et traitements utilisés in vivo**

##### **3.1.1. Synchronisation des cycles**

La synchronisation par le **progestagène** se fait via la pose d'éponges de polyuréthane imprégnées de 40 mg d'un dérivé de la progestérone, la Fluorogestone Acétate (FGA) commercialisée par Intervet, AKZO, sous le nom de Chronogest®. L'éponge, insérée à l'extrémité d'un tube en PVC, est introduite jusqu'au fond du vagin et mise en place grâce à un mandrin coulissant dans le tube. Avant chaque pose d'éponge, le tube en PVC est soigneusement nettoyé dans une solution désinfectante. Le retrait des éponges se fait le matin du 14<sup>ème</sup> jour qui suit leur pose; l'opération se pratique en prenant à la sortie de la vulve la ficelle attachée à l'éponge et en y exerçant une légère traction vers le bas.

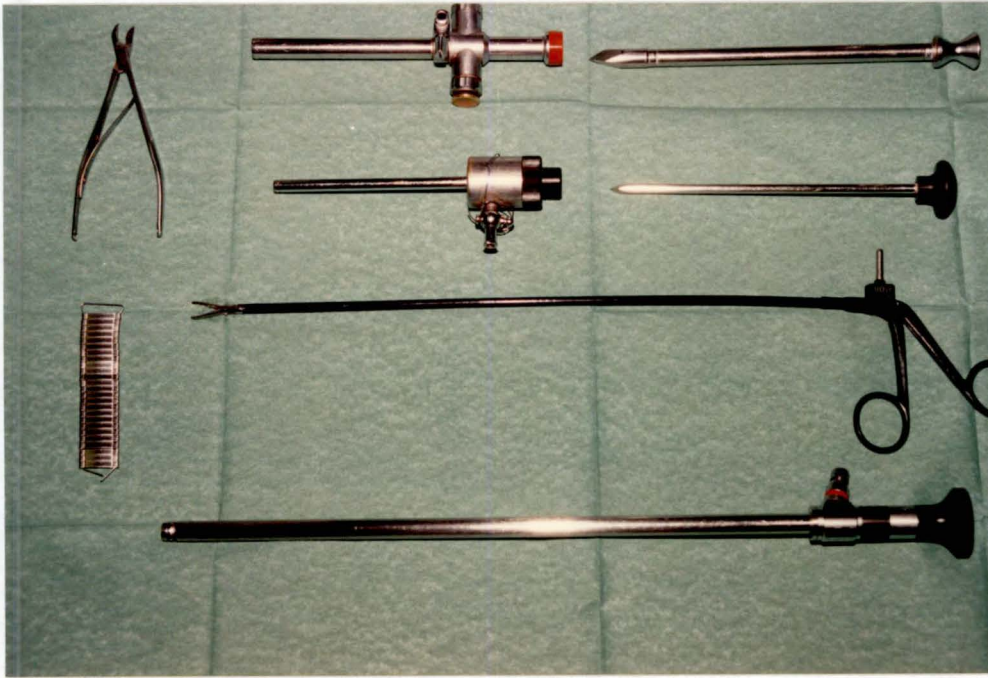
##### **3.1.2. Injection de bGHrec**

Le traitement consiste en une injection intramusculaire de 3 mg d'hormone de croissance recombinante bovine (bGHrec; Eli Lilly, Indianapolis; lot n°015B143). La bGHrec est dissoute dans du liquide physiologique (liquide de Ringer ajusté à un pH de 9,6) pour obtenir une concentration de 1 mg/ml. La solution est répartie et stockée par doses de 3 ml dans des seringues et maintenue à 4°C jusqu'au moment de l'injection.

##### **3.1.3. Prises de sang** (photo 2)

Les prélèvements sanguins sont effectués au niveau de la veine jugulaire, le sang étant recueilli dans des tubes héparinés de manière à éviter la coagulation. Immédiatement après, le sang est centrifugé à 3.000 tours par minute pendant 15 minutes afin de séparer les éléments figurés du plasma. Ensuite, le plasma est stocké dans des tubes de polystyrène et congelé à - 20°C jusqu'au moment de l'analyse.

Lors des prises de sang sériées, nous utilisons des tubes sous vide Venoject® contenant de l'héparine-lithium. Ces tubes sont munis d'aiguilles fines 22G x 1 1/2, afin de ne pas abîmer le tissu de la jugulaire. A la fin de chaque série, une crème anti-inflammatoire (Hirudoïd®) est appliquée sur le cou de l'animal.



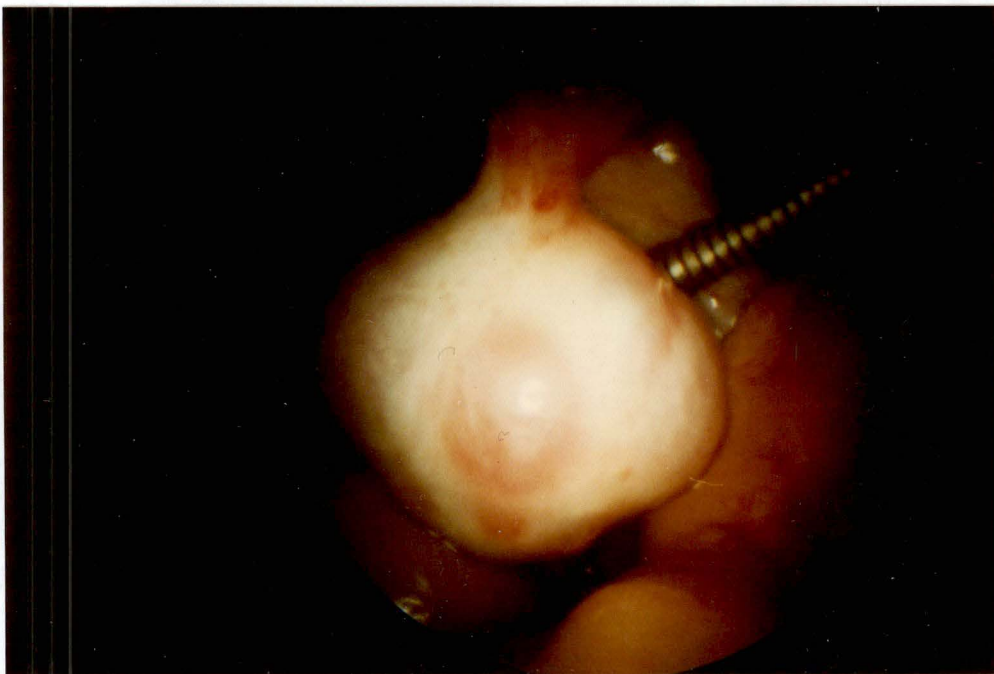
*Photo 3 : Matériel d'endoscopie*



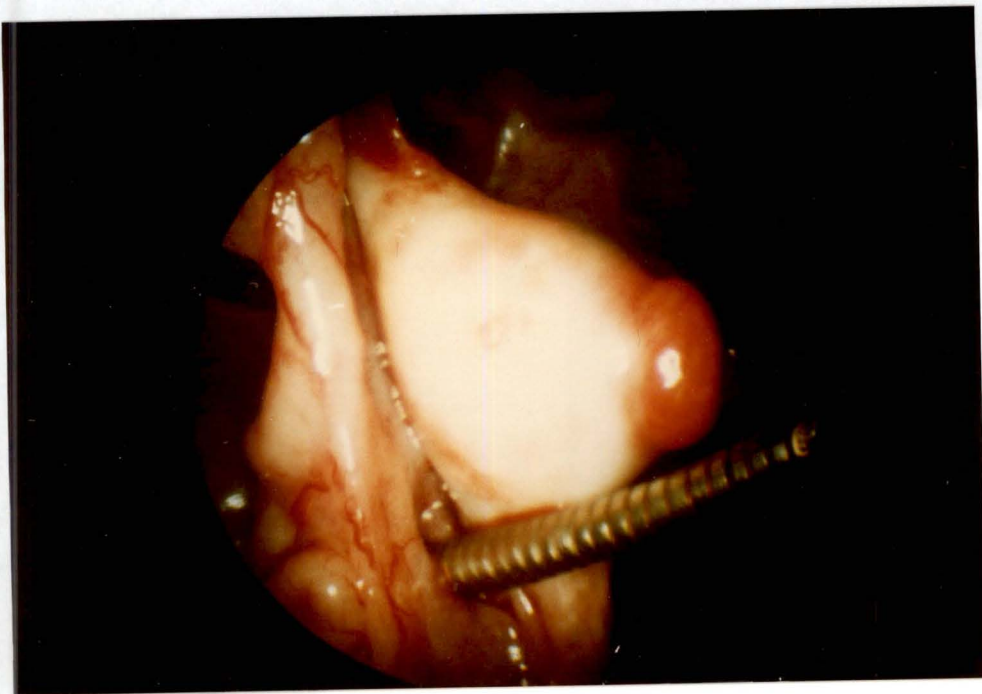
*Photo 4 : Mise en place de l'endoscope et du palpeur gradué*



*Photo 5 : Vue par endoscopie de petits follicules présents sur l'ovaire*



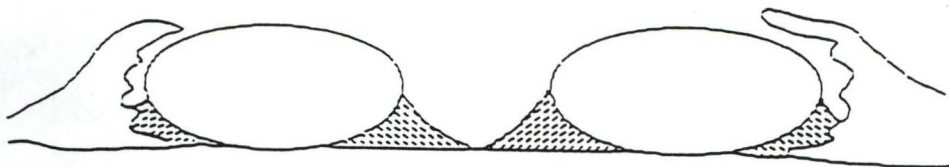
*Photo 6 : Vue par endoscopie d'un follicule préovulatoire*



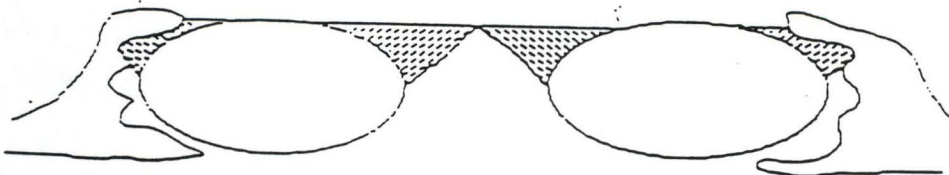
*Photo 7 : Présence d'un corps jaune sur l'ovaire*

|                | Left | Right |
|----------------|------|-------|
| CL.            |      |       |
| LARGEST F.     |      |       |
| SECOND         |      |       |
| THIRD or OTHER |      |       |

Outer Side



Inner Side



Observations

*Figure M1 : Représentation de la carte ovarienne*

### 3.1.4. Endoscopies (photos 3,4,5,6 et 7)

L'endoscopie est l'examen d'un organe interne à l'aide d'une sonde optique. L'ovaire est un organe aisé à observer par cette technique, mais une pratique fréquente est nécessaire pour pouvoir interpréter correctement les résultats. Le mode opératoire peut se résumer comme suit. La brebis est placée sur une table inclinable; elle est immobilisée en décubitus dorsal et l'arrière-train est soulevé un peu plus haut que la tête de façon à faciliter l'observation des ovaires grâce au tassement des viscères contre le diaphragme. La paroi abdominale est rasée et désinfectée. Deux anesthésies locales à la xylocaïne sont pratiquées aux endroits prévus pour la pose de l'endoscope et du palpeur, c'est-à-dire à 10 cm de part et d'autre de la ligne médiane et à une quinzaine de cm de la naissance du pis, en évitant soigneusement la veine mammaire. Les instruments introduits après perforation au trocart, sont un endoscope Wolf muni d'une fibre de verre souple qui le relie à une source lumineuse de 150 Watts et un palpeur gradué permettant la manipulation des ovaires et la mesure de la taille des follicules. De l'air filtré est insufflé par un petit compresseur, afin de soulever la paroi abdominale et le péritoine. Le tractus génital est ainsi livré à l'oeil de l'observateur. Une observation rapide permet de déterminer le type d'ovaire (gauche ou droit) et sa position (externe ou interne). Ensuite le nombre, la position et la taille des follicules sont annotés sur une carte ovarienne (figure M1). A la fin de l'observation des ovaires, les instruments sont retirés et désinfectés à l'alcool. Les incisions sont désinfectées avec une poudre antiseptique, le Spitalen, et refermées par une agrafe de Michel.

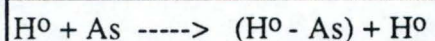
## 3.2. Dosages hormonaux

### 3.2.1. Principe du dosage radioimmunologique

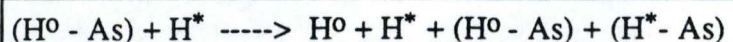
La détermination des concentrations hormonales dans le plasma est réalisée par le dosage radioimmunologique (RIA) en appliquant les techniques décrites par Bister (1980).

Le principe du dosage RIA est basé sur la compétition entre une quantité connue d'hormone marquée ( $H^*$ ) et une quantité variable d'hormone froide se trouvant dans l'échantillon à analyser, vis-à-vis d'un antiserum (As) qui leur est spécifique.

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



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



L'hormone se trouve donc sous deux formes:

- forme libre:  $H^0$  et  $H^*$ ;
- forme liée à l'anticorps:  $(H^0 - As)$  et  $(H^* - As)$ .

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

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

### 3.2.2. Calcul des résultats

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

$$A = A_0 \frac{C_m}{C_m + C_f} + BG$$

avec :

- A : radioactivité de la fraction liée (en cpm) pour une certaine concentration d'hormone froide;
- $A_0$  : radioactivité maximale (en cpm) de la fraction liée;
- BG : radioactivité non spécifique (Back Ground), en l'absence d'As;
- $C_m$  : concentration en hormone marquée;
- $C_f$  : concentration en hormone froide.

Cette équation est ajustée aux données expérimentales de la courbe standard et les valeurs mesurées (en cpm), sont transformées en concentrations hormonales.

### 3.2.3. Solutions utilisées

Tampon Wide. Un tampon phosphate 0,6M est préparé à partir de 7,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et de 77,9 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  par litre d' $\text{H}_2\text{O}$  distillée. A partir de cette solution stock 0,6M, le tampon Wide 0,06M est préparé par dilution 10 x. Le pH est ajusté à 7,55 si nécessaire.

Tampon BSA (Serum Albumine Bovine). Le tampon BSA est réalisé à partir de tampon Wide 0,06M, pH 7,55 auquel on ajoute 1 g d'albumine sérique bovine (BSA), fraction V, par litre.

ARGG (Anti-Rabbit-Gamma-Globulin). Le second anticorps destiné à précipiter le complexe antisérum-hormone est préparé par dilution de plasma de bélier immunisé contre les gamma-globulines de lapin (anti-rabbit-gamma-globulin). En fonction du taux d'ARGG contenu dans le plasma de notre bélier immunisé, la préparation est réalisée de la façon suivante : à 5 ml de plasma de bélier immunisé, on ajoute 110 ml de tampon BSA, 6 g de polyéthylène glycol (PEG6000 : VCB 8727) et 0,5 g de cellulose microcristalline (Merck 2331).

Dextran Charcoal. Cette solution est préparée de la façon suivante : 650 mg de Charcoal Norit A Serva et 65 mg de Dextran T70 Pharmacia sont dissouts dans 300 ml de tampon Wide.

### 3.2.4. Dosages des gonadotropines

#### *a. Dosage de la LH*

On réalise un dosage homologue où la compétition vis-à-vis de l'antisérum se fait entre LH froide et LH marquée à l' $\text{I}^{125}$ , toutes deux d'origine ovine.

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

La courbe standard est réalisée en utilisant la LH à des concentrations croissantes de 0 à 100 ng/ml. Les dilutions sont faites dans le tampon BSA.

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

*Figure M2: Mode opératoire du dosage de la LH*

- 50 µl de plasma ou standard
- 50 µl de AsLH
- vortexer, attendre 4 heures à T° ambiante
- 50 µl de LH\*, vortexer puis garder 1 nuit à T° ambiante
- 250 µl d'ARGG, vortexer, attendre 4 heures à T° ambiante
- centrifuger 15 minutes à 3000 g
- décanter
- passer 1 minute au compteur gamma

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

Le dosage (figure M2) est réalisé dans des tubes en cristal de polystyrène d'une contenance de 3 ml. Cinquante µl d'hormone froide de concentration connue pour l'établissement de la courbe standard ou 50 µl de plasma pour les échantillons à analyser, sont déposés dans les tubes et 50 µl d'antisérum y sont introduits. Le mélange est homogénéisé au vortex. La réaction antigène-anticorps s'équilibre durant un premier temps d'incubation fixé à 4 heures. Cette incubation, comme les suivantes, se fait à température ambiante. Cinquante µl d'hormone marquée sont ensuite ajoutés dans chaque tube. Une nouvelle homogénéisation au vortex est réalisée. Une nuit d'incubation permet au nouvel équilibre de s'établir. L'hormone marquée entre en compétition avec l'hormone froide préalablement fixée sur les anticorps. Finalement, 250 µl d'immunosorbant (ARGG) sont additionnés et le tout est incubé pendant 4 heures. La séparation de la fraction liée et de la fraction libre est possible par centrifugation pendant 15 minutes à 3.000 rpm. Le surnageant est éliminé au moyen d'une trompe à vide reliée à une pipette pasteur. De plus, chaque dosage est accompagné d'une estimation de l'activité résiduelle due à la fixation aspécifique de la LH\* sur l'ARGG (Back Ground : BG). Cette analyse est réalisée comme celle des échantillons mais le plasma et l'antisérum sont remplacés par du tampon. Nous ajoutons également au comptage un tube ne contenant que 50 µl d'H\* de façon à mesurer l'activité totale (Total Count : TC).

La mesure de la radioactivité est effectuée par un analyseur gamma à passeur d'échantillons LKB Wallac-1277 GammaMaster dans la fenêtre de comptage programmée pour l'I<sup>125</sup>. Le temps de comptage est fixé à 1 minute, ce qui, en fonction du nombre de coups enregistrés par minute (cpm), donne une précision de comptage suffisante (erreur < 5%). Les résultats s'inscrivent sur une imprimante Citizen 120 D et sont stockés sur un microordinateur Macintosh Classic.

La sensibilité du dosage est de 0,07 ng/ml. Les coefficients de variation sont respectivement de 7,5% et 10,5% pour la sensibilité intra- et interdosage.

*b. Dosage de la FSH*

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

La courbe standard est réalisée en utilisant l'oFSH à des concentrations croissantes de 0 à 50 ng/ml. Les dilutions sont faites dans le tampon BSA.

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

Pour l'obtention de la FSH marquée, l'oFSH (NIAMDD-oFSH-I-1), diluée à raison de 0,2mg/ml est employée pour le marquage à l'Iode<sup>125</sup> par oxydation à la chloramine T. La méthode de marquage est la même que celle décrite pour la LH. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 20.000 cpm/50 µl.

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

La sensibilité du dosage est de 0,08 ng/ml. Les coefficients de variation sont respectivement de 5,5% et 10,5% pour la sensibilité intra- et interdosage.

**3.2.5. Dosage de l'hormone de croissance (GH)**

La GH ovine purifiée (NIDDK-oGH-I-4) et l'antisérum spécifique (NIDDK-anti-oGH-I-4) sont fournis par le NIDDK.

La courbe standard est réalisée en utilisant l'oGH à des concentrations croissantes de 0 à 750 ng/ml. Les dilutions sont faites dans le tampon BSA.

L'antisérum GH est dilué selon les conseils du NIDDK de manière à obtenir une dilution finale de 1/100.000 dans les tubes.

Pour l'obtention de la GH marquée, l'oGH (NIDDK-oGH-I-4), diluée à raison de 0,2mg/ml est employée pour le marquage à l'Iode<sup>125</sup> par oxydation à la chloramine T.

La méthode de marquage est la même que celle décrite pour la LH. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 20.000 cpm/50 µl.

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

La sensibilité du dosage est de 0,07 ng/ml. Les coefficients de variation sont respectivement de 5,5% et 10,5% pour la sensibilité intra- et interdosage.

### 3.2.6. Dosages des stéroïdes

Les concentrations en stéroïdes dans le plasma sont également déterminées par un dosage radioimmunologique où la compétition vis-à-vis de l'antisérum se fait entre hormone froide et hormone marquée au H<sup>3</sup>.

#### *a. Dosage de l'oestradiol (E<sub>2</sub>)*

Les standards utilisés sont préparés par pesée précise et par dilution d'oestradiol cristalline (Merck 8964) dans de l'éthanol P.A. La courbe standard basée sur des concentrations croissantes de 0 à 2000 pg d'E<sub>2</sub>/ml est préparée à partir d'une solution stock de concentration égale à 10.000 pg/ml.

L'oestradiol tritié, [2,4,6,7-H<sup>3</sup>] E<sub>2</sub> (Amersham TRK-322) a une activité spécifique de 88 Ci/mme (3,26 TBq/mme) et se trouve à la concentration radioactive de 1 mCi/ml de toluène. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 7.000 cpm/100 µl dans du tampon Wide.

L'antisérum (As) provient du "laboratoire d'hormonologie" du Centre d'Economie Rurale (C.E.R.) de Marloie. Il a été obtenu par immunisation de lapins contre l'E<sub>17β</sub> couplé à l'albumine sérique bovine (E<sub>17β</sub>-6CMO-BSA). L'antisérum reçu sous forme lyophilisée doit être reconstitué grâce à l'ajout de 10 ml d'H<sub>2</sub>O.

La manipulation débute par une purification partielle de l'oestradiol contenue dans le plasma grâce à une extraction. On introduit 200 µl de plasma et 2 ml de diéthyléther P.A. dans des tubes en verre de 10 cm de hauteur et 1 cm de diamètre. Le mélange des 2 solutions est important; il est donc nécessaire de passer les tubes au vortex pendant 2 minutes après les avoir préalablement bouchés. Les tubes sont ensuite placés au congélateur à -20°C pendant 1 heure ou plus (la phase aqueuse doit être gelée). La

*Figure M3 : Mode opératoire du dosage de l'E2*

1. Extraction. ( en tubes de verre de 10 cm)

- 200 µl de plasma ou standard (en double : plasmas  
en triple: standards)
- 2000 µl de diéthyl éther P.A.
- Vortexer 2 minutes
- Placer les tubes au congélateur à - 20°C, plus ou moins 1 heure ( la phase aqueuse doit être gelée).
- Transvaser la totalité du surnageant dans un autre tube de verre
- Evaporer à sec dans l'étuve sous vide à 40°C

2. Fixation

- Reprendre l'extrait sec par 50 µl de Wide
- 100 µl de  $^3\text{H}$  E17 B ( $\pm$  7000 Cpm)
- 50 µl d'As E17 B (marloie)
- Vortexer et laisser une nuit au frigo

3. Séparation

- 500 µl de Dextran-Charcoal à 3°C, agiter
- Incuber 10 minutes à 3°C
- Centrifuger à 0°C et à 2000 g pendant 10 minutes

4. Comptage

- 250 µl de surnageant
- 2,5 ml de liquide scintillant, agiter
- Passer au compteur B

totalité du surnageant est transvasée dans un autre tube de verre et évaporée à sec dans une étuve sous vide à 40°C.

Le dosage proprement dit se réalise de la façon résumée dans la figure M3.

Afin d'absorber la phase libre et ainsi de la séparer de la phase liée à l'antisérum, on utilise une solution de Dextran-Charcoal.

Le comptage se réalise sur 250 µl de surnageant (phase liée) mélangés à 2,5 ml d'Ecoscint A (liquide scintillant produit par la firme National Diagnostics), dans une minifiole de polyéthylène et comptés dans un compteur à scintillation (Beckman LS 1801) durant 4 minutes. Le pourcentage d'erreur du comptage des échantillons est inférieur à 1%.

La sensibilité du dosage est de 0,56 pg/ml. Les coefficients de variation sont respectivement de 8% et 11% pour la sensibilité intra- et interdosage.

#### *b. Dosage de la progestérone (P<sub>4</sub>)*

Les standards utilisés ont été préparés par pesée précise et par dilution de progestérone cristalline (Merck 24614) dans de l'hexane P.A. La courbe standard basée sur des concentrations croissantes de 0 à 10 ng de P<sub>4</sub>/ml est préparée à partir d'une solution de concentration égale à 10 ng/ml.

La progestérone tritiée [1,2,6,7-H<sup>3</sup>] P<sub>4</sub> (Amersham TRK-413) a une activité spécifique de 80 Ci/mmole (2,96 TBq/mmol) et une concentration initiale de 1 mCi/ml de toluène. L'hormone marquée est portée à une dilution finale de 7.000 cpm/100 µl dans du tampon Wide.

L'antisérum (As) provient du "laboratoire d'hormonologie" du C.E.R. de Marloie. Il a été obtenu par immunisation de lapins contre de la P<sub>4</sub>-3CMO-BSA.

La manipulation débute par une purification partielle de la progestérone contenue dans le milieu ou le plasma grâce à une extraction à l'hexane. On introduit 200 µl de plasma et 2 ml d'hexane dans des tubes en verre de 10 cm de hauteur et de 1 cm de diamètre. Les tubes bouchés sont mélangés au vortex pendant 2 minutes et 1 ml de surnageant est prélevé dans des tubes RIA en verre et évaporés à sec dans une étuve sous vide à 40°C.

*Figure M4 : Mode opératoire du dosage de P4*

1. Extraction ( en tubes de verre de 10 cm )

- 200  $\mu$ l de plasma ou standard ( en double: plasmas  
en triple: standards
- 2 ml d'Hexane P.A.
- Vortexer 2 minutes
- Laisser reposer afin que les deux phases soient bien séparées
- Prélever 1 ml de surnageant
- Evaporer à sec à l'étuve sous vide à 40° C ou à température ambiante

2. Fixation

- 50  $\mu$ l de tampon Wide
- 100  $\mu$ l de P4 tritiée ( $\pm$  7000 Cpm)
- 50  $\mu$ l d'AsP4 (Marloie)
- Vortexer et incuber une nuit à 3°C

3. Séparation

- 500  $\mu$ l de Dextran-Charcoal à 3°C
- Agiter
- Incuber 10 minutes à 3°C
- Centrifuger 10 minutes à 0°C et à 2000 g

4. Comptage

- 250  $\mu$ l de surnageant
- 2,5 ml de liquide scintillant (écosint) dans minifioles
- Agiter
- Comptage au compteur  $\beta$

Le dosage proprement dit (figure M4) est réalisé de la même façon que celui de l'oestradiol.

La sensibilité du dosage est de 0,03 ng/ml. Les coefficients de variation sont respectivement de 5% et 8,5% pour la sensibilité intra- et interdosage.

### 3.3. Analyses statistiques

Lors de nos expériences, une analyse de la variance à 2 critères de classification (heure de distribution des rations alimentaires et brebis) nous a permis de comparer les différents résultats obtenus pour le premier groupe alimenté à 9 heures et pour le second groupe alimenté à 17 heures. La même analyse statistique a été réalisée lors de la seconde expérience afin de comparer les résultats entre le groupe de brebis témoins et le groupe de brebis traitées à la bGHrec.

### 3.4. Calcul des moyennes lissées

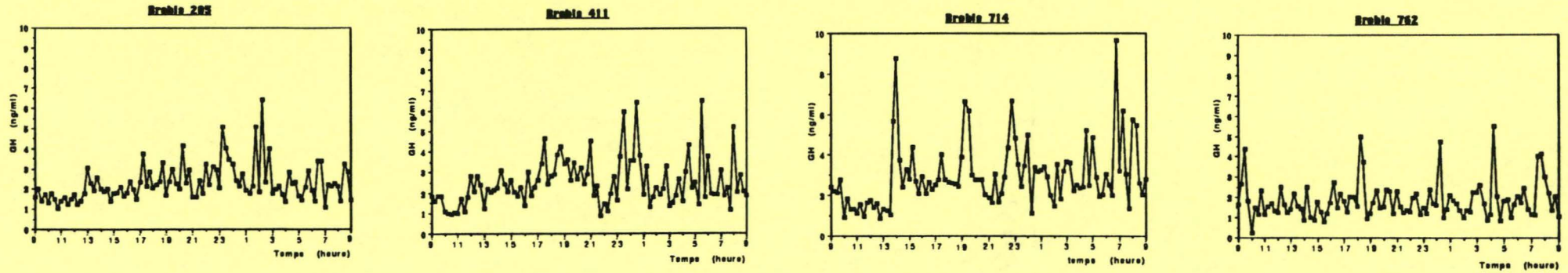
Afin d'établir un profil de sécrétion global d'une hormone et non plus un profil de sécrétion pulsatile, nous avons calculé les moyennes lissées, et tracé différents profils de sécrétion en fonction d'une variation quotidienne (de jour en jour) ou temporelle (d'heure en heure).

Chaque valeur quotidienne est calculée sur base d'une moyenne des valeurs obtenues entre le jour qui précède et le jour qui suit la période analysée.

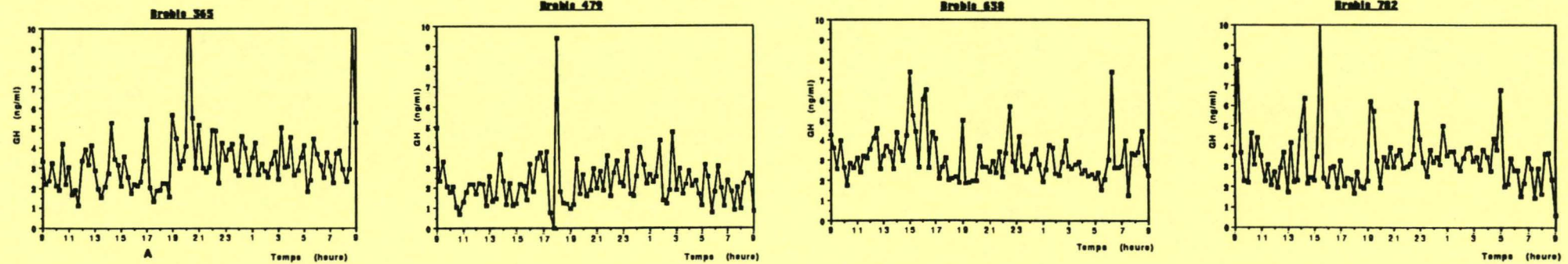
Chaque valeur variant d'heure en heure est calculée sur base d'une moyenne des valeurs obtenues entre l'heure qui précède et l'heure qui suit la période analysée.

## **Résultats et discussions**

### Groupe de brebis alimentées à 9 heures



### Groupe de brebis alimentées à 17 heures



*Figure E1 : Evolution des profils de sécrétion de la GH de chaque animal des groupes I et II. L'heure de distribution de ration alimentaire est fixée à 9 heures pour le groupe I et 17 heures pour le groupe II. La phase d'obscurité commence à 18 heures pour se terminer à 6 heures.*

# I: EFFETS DE L'ALIMENTATION ET DU NYCTHÉMÈRE SUR L'ÉVOLUTION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE GH: ESSAI PRÉLIMINAIRE

## 1. Rappel des objectifs et protocole expérimental

Un essai préliminaire est réalisé en vue de déterminer les effets de l'alimentation (heure de distribution des aliments) et du nycthémère sur l'évolution de la concentration en GH du plasma lors du cycle oestral de la brebis Suffolk. Pour ce faire, deux lots de 4 brebis Suffolk taries et dont les cycles ont été synchronisés, sont placées dans des conditions photopériodiques identiques mais reçoivent leur nourriture quotidienne à deux moments différents de la journée (9 heures pour le premier groupe et 17 heures pour le second). En fonction des conditions photopériodiques naturelles, le cycle de lumière imposé débute à 7 heures pour se terminer à 18 heures; ces conditions nycthémerales sont identiques pour chaque animal.

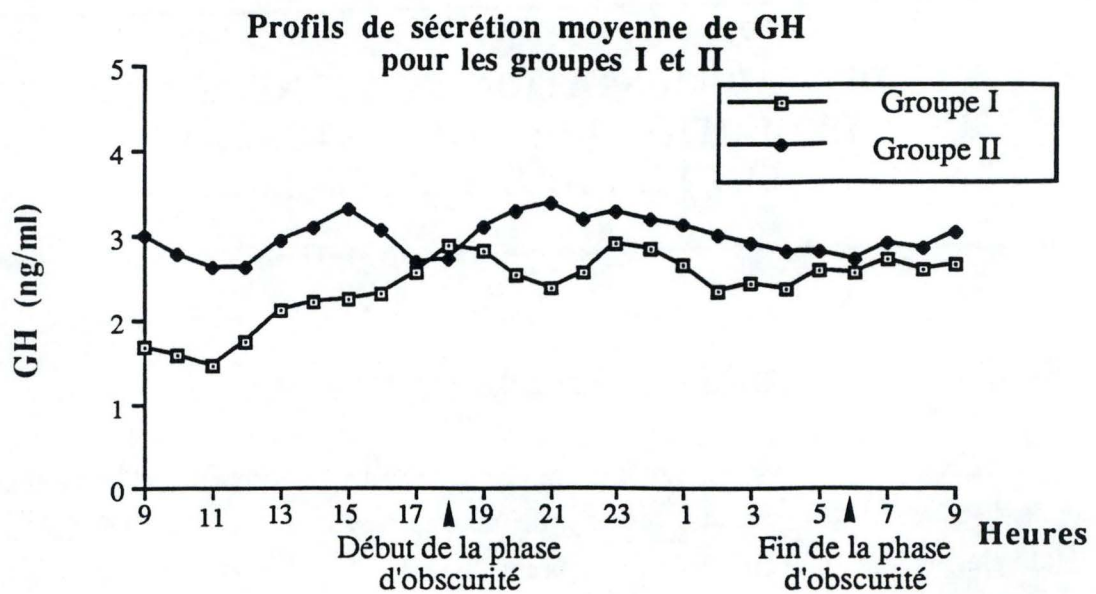
En phase lutéale du cycle, entre deux vagues de croissance folliculaire (jour 5), des prises de sang sériées (toutes les 15 minutes pendant 24 heures) ont été effectuées sur chaque brebis et la concentration en GH de chaque échantillon a été déterminée.

Cette expérience débute en octobre 1993 et se termine en novembre 1993. Le protocole expérimental se déroule comme suit :

- J0 : pose des éponges (40 mg de fluorogestone acétate) aux 8 brebis;
- J14 : retrait des éponges;
- J22 : moment correspondant au jour 5 du cycle oestral, prises de sang sériées pendant 24 heures sur toutes les brebis.

## 2. Résultats

La figure E1 illustre, pour chaque brebis, les profils de sécrétion de la GH en fonction des heures de distribution des rations alimentaires et du nycthémère. Il ressort de l'examen des tracés qu'il existe une grande variabilité au niveau des sécrétions de GH entre les brebis recevant leur ration alimentaire à la même heure. De manière à pouvoir mettre en évidence l'influence exercée par les deux facteurs étudiés sur les sécrétions de GH, nous avons établi des courbes lissées pour les deux groupes de brebis.



*Figure E2 : Evolution des sécrétions moyennes lissées de GH durant 24 heures pour le groupe de brebis alimentées à 9 heures (groupe I) et pour le groupe alimenté à 17 heures (groupe II).*

|          | Concentration moyenne de GH par brebis (ng/ml) |           | Fréquence des pulses de GH par brebis pendant 7 heures |           | Amplitude des pulses de GH par brebis (ng/ml) |           | Moyenne des taux maximums de GH atteints par brebis (ng/ml) |           |
|----------|--|-----------|--|-----------|---|-----------|---|-----------|
|          | Jour   | Nuit      | Jour   | Nuit      | Jour  | Nuit      | Jour  | Nuit      |
| Groupe 1 | 2,1 ± 0,4                                      | 2,6 ± 0,2 | 2,8 ± 0,9  | 5,0 ± 0,8 | 3,2 ± 1,9                                     | 3,2 ± 1,4 | 4,4 ± 1,9   | 4,2 ± 1,4 |
| Groupe 2 | 2,9 ± 0,3                                      | 3,1 ± 0,2 | 5,5 ± 1,3  | 5,2 ± 1,7 | 3,6 ± 2,0                                     | 3,2 ± 2,0 | 5,0 ± 2,6   | 4,8 ± 2,0 |

*Tableau E1 : Comparaison des sécrétions de GH durant le jour et la nuit pour le groupe de brebis alimentées à 9 heures (groupe I) et pour le groupe alimenté à 17 heures (groupe II)*

La figure E2 représente, pour chacun des 2 groupes, les sécrétions moyennes de GH et non plus les sécrétions pulsatiles, chaque point du tracé ayant été calculé sur base d'une moyenne de 48 valeurs.

La courbe relative au **groupe I**, soit celui recevant sa ration alimentaire à 9 heures, montre que les sécrétions moyennes de GH sont plus faibles après le repas. Les concentrations moyennes observées pendant les deux heures suivant la distribution d'aliments ( $1,7 \pm 0,1$  ng/ml) sont, en effet, significativement moins élevées ( $P < 0,05$ ) que celles observées pendant les deux heures précédentes ( $2,7 \pm 0,1$  ng/ml).

Une évolution des profils de sécrétion de la GH se manifeste aussi, au sein de ce même groupe, durant le nyctémère. L'analyse des effets du jour et de la nuit a été opérée entre 11 heures et 17 heures le jour ( $2,1 \pm 0,4$  ng/ml), et entre 22 heures et 4 heures la nuit ( $2,6 \pm 0,2$  ng/ml), c'est-à-dire à des moments où les effets inhibiteurs de l'alimentation ont disparu. Les résultats obtenus figurent dans le tableau E1. Ils font apparaître que la fréquence des pulses (significatif,  $P < 0,05$ ) et les concentrations moyennes (non significatif) augmentent en phase d'obscurité, mais que l'amplitude des pulses et la moyenne des taux maximums ne diffèrent pas entre le jour et la nuit.

En conclusion, au sein du groupe des brebis dont l'alimentation a lieu à 9 heures, l'ingestion d'aliments se traduit par une diminution significative ( $P < 0,05$ ) des sécrétions de GH durant plusieurs heures. D'autre part, au cours du nyctémère, les sécrétions ont tendance à augmenter durant la nuit.

L'examen de la courbe relative au **groupe II**, soit celui recevant sa ration alimentaire à 17 heures, fait apparaître que les concentrations moyennes de GH observées pendant les deux heures suivant la distribution d'aliments ( $2,8 \pm 0,2$  ng/ml) ne sont que faiblement moins élevées (non significatif) que celles observées pendant les deux heures précédentes ( $3,0 \pm 0,3$  ng/ml).

Les données relatives à l'évolution des sécrétions moyennes de GH figurant dans le tableau E1 ne révèlent aucune différence significative entre les taux moyens obtenus le jour et ceux obtenus la nuit, le niveau moyen de GH passant de  $2,9 \pm 0,3$  ng/ml le jour (de 11 heures à 17 heures) à  $3,1 \pm 0,2$  ng/ml durant la nuit (de 22 heures à 4 heures). Il n'y a pas non plus de différence significative au niveau de l'amplitude et de la fréquence des pulses, et de la moyenne des taux maximums obtenus entre les deux phases.

Il s'ensuit que ni l'alimentation, ni les conditions nycthémerales ne modifient significativement les sécrétions de l'hormone de croissance au sein de ce groupe de brebis dont la nourriture est distribuée à 17 heures.

### **3. Discussion**

#### **3.1. Effets de l'alimentation**

Les effets de l'alimentation sur les concentrations plasmatiques de GH ont fait l'objet de plusieurs travaux dont quelques-uns sont cités ci-après. Le repas a un effet inhibiteur sur les sécrétions de l'hormone de croissance chez l'homme (Wilson et Foster, 1992; Vance *et al.*, 1992), la vache (Elasser *et al.*, 1989) et la brebis (Driver et Forbes, 1981; Estienne *et al.*, 1989; Hua *et al.*, 1993). Cet effet inhibiteur peut se maintenir jusqu'à 4 heures après l'ingestion d'aliments (Bassett, 1974). Nos résultats sont en accord avec ces observations pour le **groupe de brebis dont l'alimentation a lieu à 9heures**. Nos résultats indiquent, en effet, que les sécrétions moyennes de GH présentent une diminution après le repas.

Plusieurs composants alimentaires peuvent être responsables de la diminution des concentrations plasmatiques en GH observée après ingestion des aliments.

Un des premiers facteurs qui peut être évoqué est celui d'une augmentation de la concentration plasmatique en acides gras volatils (Bassett, 1974). Chez les ruminants, en effet, la plupart des apports énergétiques s'effectuent par l'intermédiaire des acides gras volatils produits par la microflore présente dans le rumen et absorbés sur place. Directement liée à l'ingestion des aliments, cette production sera d'autant plus intense que l'aliment est énergétique. Eu égard au fait que le taux sanguin d'acides gras volatils est plus élevé après un repas qu'avant (Focant, 1986), l'augmentation des concentrations plasmatiques en acides gras peut expliquer en partie la régression des taux de concentration de GH qui est constatée après l'ingestion d'aliments.

L'effet inhibiteur des acides gras libres sur les sécrétions de GH est mis en évidence par Estienne et collaborateurs (1989). Administrés à des brebis, ils engendrent une diminution de la fréquence des pulses de GH et une suppression de la stimulation de la sécrétion de cette dernière par la GRH. Dans ce cas, il est possible que la diminution du taux plasmatique de GH qui est observée consécutivement à l'administration exogène de lipides soit la conséquence d'une augmentation de la fréquence des décharges hypothalamiques de somatostatine.

Par ailleurs, ainsi que l'ont montré Elasser et collaborateurs (1989), le rapport protéines/énergie de la ration alimentaire peut être responsable des modifications du profil de sécrétion de l'hormone de croissance. Une alimentation riche en protéines a pour effet d'augmenter le nombre de pulses de sécrétion (Estienne *et al.*, 1990).

D'autres composants alimentaires pourraient également intervenir dans la régulation de la synthèse et de la sécrétion de GH. Les effets inhibiteurs de l'alimentation pourraient être dus à un changement de concentration d'autres métabolites circulants, ainsi qu'à l'évolution des concentrations plasmatiques d'autres hormones (insuline...) influencées par l'alimentation (Estienne *et al.*, 1990). En effet, aussitôt après un apport de glucides par voie digestive, on observe une hyperglycémie, une augmentation de la sécrétion d'insuline et une diminution de la sécrétion d'hormone de croissance. Quelques heures plus tard, quand la glycémie est revenue à son niveau normal, la GH et l'insuline sont présentes à des concentrations par lesquelles toutes deux facilitent l'anabolisme protéique sans mobiliser les graisses. Plus tard encore, si le sujet reste à jeun et que la concentration d'insuline diminue tandis que celle de la GH augmente, cette dernière reste seule à agir, stimulant la mobilisation des graisses et la libération d'acides gras disponibles pour l'oxydation, diminuant en même temps l'utilisation du glucose (Wright, 1980).

En tout état de cause, aujourd'hui, il n'est pas possible de dresser d'une manière exhaustive la liste des substances qui interviennent dans le mécanisme de modulation des sécrétions de l'hormone de croissance, et il est manifeste que leur mode d'action s'inscrit dans un système complexe qui n'est encore que partiellement connu. D'autant plus que selon son profil de sécrétion (c'est-à-dire selon sa concentration moyenne), la fréquence et l'amplitude des pulses de sécrétion, la GH peut jouer différents rôles dans l'utilisation des aliments eux-mêmes (Vance *et al.*, 1992).

Il faut également garder à l'esprit qu'une diminution des concentrations plasmatiques s'observe non seulement après alimentation, mais également avant la distribution des aliments. Il s'agit, dans ce cas, d'une réponse conditionnée par l'attente d'aliments (Bassett, 1974). C'est ce qui semble s'être produit au début de notre essai.

Comparativement au premier groupe, le second groupe de brebis, soit celui dont l'alimentation est assurée à 17 heures, présente des valeurs analogues en ce qui concerne les concentrations plasmatiques de GH avant et après alimentation. Cette observation est évoquée plus en détail ci-après.

### 3.2. Effets du nycthémère

De manière à éliminer autant que possible l'effet des repas, l'analyse des effets du nycthémère a été opérée pour partie en phase de lumière, soit entre 11 heures et 17 heures, et pour partie en phase d'obscurité, soit entre 22 heures et 4 heures.

Pour le **premier groupe de brebis**, les sécrétions moyennes et la fréquence des pulses de GH sont plus faibles le jour que la nuit, mais la différence n'est significative que pour la fréquence des pulses. En ce qui concerne le **second groupe de brebis**, le taux moyen de GH est légèrement plus élevé en période d'obscurité (non significatif) mais la fréquence des pulses est semblable de jour comme de nuit.

D'après Wilson et Foster (1992), l'obscurité serait un facteur stimulant les sécrétions de GH par une augmentation de l'amplitude et de la fréquence des pulses de sécrétion. Chez l'homme, les différentes phases de sommeil influencent le profil de sécrétion. Ainsi, des concentrations élevées de GH peuvent être observées durant les premières heures de sommeil.

Bien que les tests statistiques comparant les effets du nycthémère (la phase de lumière allant de 11 heures à 17 heures et la phase d'obscurité de 22 heures et 4 heures) sur les sécrétions de GH ne soient que partiellement significatifs, ils semblent indiquer qu'une augmentation des sécrétions et de la fréquence des pulses de GH se manifeste durant la nuit dans le groupe de brebis dont l'alimentation est assurée à 9 heures. Cette différence pourrait être la conséquence de l'effet stimulateur de l'obscurité sur les sécrétions de GH.

Cependant, si les rations alimentaires sont distribuées une heure avant de placer les animaux en condition d'obscurité, les sécrétions de GH ne sont pas plus importantes durant la nuit. Ceci montre que, par son effet inhibiteur sur la sécrétion de GH, l'alimentation distribuée avant de placer les animaux en condition d'obscurité pourrait masquer l'effet stimulateur de l'obscurité.

La mélatonine, facteur stimulateur des sécrétions de GH, est une substance libérée en plus grande quantité durant la nuit. En diminuant la synthèse hypothalamique de somatostatine, elle pourrait être un facteur régulant les sécrétions plus importantes de GH durant la nuit (John *et al.*, 1990). En revanche, selon McKeown et collaborateurs (1975; cités par John *et al.*, 1990), la mélatonine aurait un effet stimulant sur les sécrétions de GH durant les périodes de lumière, c'est-à-dire pendant le jour uniquement. Pour Norman et Litwack (1987), la mélatonine serait un facteur inhibant les sécrétions de

GH. Il est donc peu probable que cette hormone soit responsable des sécrétions importantes de GH durant la nuit. D'autres facteurs interviennent probablement dans la régulation de la sécrétion nyctémérale de GH, mais ces facteurs restent encore inconnus.

#### **4. Conclusions**

Cette étude nous a permis de démontrer que la distribution d'aliments en période de lumière provoque une diminution des sécrétions de l'hormone de croissance. Inversement, l'obscurité paraît être un facteur stimulateur. Si l'apport alimentaire est réalisé une heure avant l'installation de l'obscurité, aucune évolution précise de l'émission de GH n'est observée. L'effet inhibiteur de l'alimentation est soit inexistant, soit masqué par un effet stimulateur de l'obscurité.

En fonction de ce constat et afin d'éviter que les effets de l'alimentation et du nyctémère ne viennent influencer nos résultats ultérieurs, il a été décidé de nourrir les brebis à 17 heures et de fixer les heures des prélèvements sanguins en début de journée.

## II: INFLUENCE D'UN TRAITEMENT A LA GH ET DE L'ÉTAT PHYSIOLOGIQUE SUR LA CROISSANCE FOLLICULAIRE ET SUR LES PROFILS DE SÉCRÉTION DE DIFFÉRENTES HORMONES

### 1. Rappel des objectifs et protocole expérimental

Le premier but de cette expérience est d'étudier l'évolution naturelle des sécrétions de la GH chez la brebis Suffolk en fonction du moment de la saison (début et milieu de la saison de reproduction ainsi que l'anoestrus). Nous avons également caractérisé l'effet d'un traitement à la bGHrec administré *in vivo* lors des mêmes périodes sur la dynamique de la croissance folliculaire et sur l'évolution des sécrétions hormonales (GH, LH, FSH, P4 et E2).

Pour obtenir une comparaison optimale entre les différentes brebis, il est nécessaire qu'au début de chaque essai, leurs cycles oestriques soient synchronisés. Pour ce faire, des éponges intravaginales sont utilisées. Toutes les analyses sont effectuées durant le cycle suivant la synchronisation.

Lors de chaque période étudiée, 10 brebis sont stimulées par un traitement à la bGHrec et 10 autres, non traitées, servent de témoins. Les injections quotidiennes (intramusculaires) de bGHrec débutent trois jours après le retrait de l'éponge et se poursuivent pendant 17 jours. On administre 6 mg de bGHrec à raison de 3 mg deux fois par jour (la première injection à 9 heures et la seconde à 17 heures).

En fonction des résultats obtenus lors de l'expérience préliminaire, nous avons fixé, pour les deux groupes de brebis, l'heure de distribution des repas à 17 heures.

#### 1.1. Etude des sécrétions hormonales

L'évolution des sécrétions endocrines est établie à partir de prélèvements sanguins réalisés sur 10 brebis, 5 témoins et 5 traitées à la bGHrec. En début et milieu de saison de reproduction, durant le cycle suivant la synchronisation, la pulsativité des sécrétions de GH et de LH est déterminée à partir d'échantillons sanguins prélevés toutes les 15 minutes pendant 12 heures au jour 9 (phase lutéale) et pendant 24 heures au jour 16 (phase folliculaire). En conditions normales, 12 heures de prises de sang

sériées suffisent pour étudier l'évolution pulsatile d'une hormone; c'est pourquoi les prises de sang sériées au jour 9 sont effectuées pendant ce laps de temps. La durée des prises de sang est portée à 24 heures au jour 16 afin de pouvoir cerner le pic préovulatoire de LH dont la durée moyenne est estimée à 12 heures. Durant l'entière du cycle, des prises de sang quotidiennes réalisées toutes les 15 minutes entre 8 heures et 9 heures, permettent de tracer les profils moyens de sécrétion de la GH et de la LH. Pour l'analyse des résultats, nous avons estimé le taux plasmatique moyen, le taux plasmatique de base, et, lors des prises de sang sériées, le nombre et l'amplitude des pulses en conformité avec les considérations de Gauthier et Berbibier (1982).

Les profils moyens de sécrétion de la FSH et des stéroïdes ovariens (P<sub>4</sub> et E<sub>2</sub>) sont tracés à partir des prélèvements sanguins quotidiens réalisés à 8 heures.

En anoestrus, l'évolution des sécrétions hormonales est également établie après synchronisation des animaux, le jour 1 commençant 54 heures après le retrait des éponges. Les prélèvements sanguins sont ensuite effectués dans les mêmes conditions qu'en début et milieu de saison de reproduction.

### 1.2. Etude des croissances folliculaires

L'étude des croissances folliculaires est réalisée par la technique d'endoscopie. Sachant qu'il existe trois vagues de croissance folliculaire par cycle oestral chez la brebis, nous réalisons des endoscopies sur les 10 brebis non utilisées pour l'étude des sécrétions hormonales (5 témoins et 5 traitées à la bGHrec) durant la troisième vague. Lors de chaque endoscopie, les paramètres que nous envisageons sont :

- le nombre de **follicules recrutés**, c'est-à-dire le nombre de follicules qui grandissent au-delà de 2 mm durant au moins deux jours consécutifs;
- le nombre de **follicules sélectionnés**, c'est-à-dire le nombre de follicules qui atteignent une taille de 4 mm;
- le nombre de **follicules dominants**, c'est-à-dire le nombre de gros follicules qui atteignent une taille minimale de 5 mm;
- le **taux d'ovulation**, soit le nombre d'ovulations observées divisé par le nombre de brebis ayant ovulé;
- le **pourcentage d'atrésie due à la sélection**, soit le pourcentage de follicules recrutés qui subissent l'atrésie alors que les autres deviennent sélectionnés;
- le **pourcentage d'atrésie due à la dominance**, soit le pourcentage de follicules sélectionnés qui subissent l'atrésie alors que les autres deviennent dominants.

En anoestrus, sachant que les vagues de croissance folliculaire se présentent au même rythme que lors de la saison, les endoscopies sont réalisées sur la troisième vague c'est-à-dire aux jours 13, 14, 15 et 16 suivant la synchronisation.

## **2. Méthode de présentation des résultats pour la GH et pour la LH**

Rappelons que les profils de sécrétion de la GH et de la LH sont étudiés de plusieurs façons :

- nous réalisons des prises de sang toutes les 15 minutes entre 8 heures et 9 heures pendant la durée d'un cycle complet (17 jours);
- nous étudions en plus la pulsativité des ces hormones au jour 9 et au jour 16 grâce à des prises de sang sériées réalisées toutes les 15 minutes pendant 12 heures au jour 9 et pendant 24 heures au jour 16.

Nous disposons donc d'un ensemble de résultats que nous présenterons de la façon suivante, et ce, pour chacune des périodes étudiées :

- le tableau récapitulatif concernant les différentes caractéristiques des profils de sécrétion;
- un profil individuel pour une brebis témoin (brebis 10) servant d'exemple représentatif;
- le profil obtenu grâce aux moyennes lissées pour le groupe témoin et pour le groupe traité. En effet, si nous considérons les profils individuels de sécrétion de GH, ils présentent une variabilité élevée et une pulsativité irrégulière. Nous établissons des courbes lissées afin de mettre en évidence une évolution moyenne de sécrétion de la GH pour chacun des groupes étudiés.

Chez le mouton, le milieu de saison de reproduction est la période la plus étudiée et sert souvent de référence; nous commencerons donc par décrire les résultats de cette période.

*Tableau R1 : Caractéristiques de la sécrétion de GH en milieu de saison de reproduction.*

|   | Taux de base<br>ng/ml    | Moyenne totale<br>ng/ml   | Nombre de<br>pulses<br>(12 heures/brebis) |
|---|--------------------------|---------------------------|---|
| <b>17 jours</b><br>- Groupe témoin<br>- Groupe traité | 7,6 ± 1,6<br>9,5 ± 2,8   | 16,5 ± 9,9<br>24,0 ± 11,8 | /<br>/                                    |
| <b>Jour 9</b><br>- Groupe témoin<br>- Groupe traité   | 12,0 ± 2,2<br>26,4 ± 4,2 | 17,3 ± 5,6<br>44,9 ± 29,3 | 1,4 ± 1,5<br>2,2 ± 4,9                    |
| <b>Jour 16</b><br>- Groupe témoin<br>- Groupe traité  | 12,3 ± 1,0<br>17,8 ± 2,2 | 18,8 ± 8,4<br>28,0 ± 13,2 | 3,8 ± 3,1<br>2,2 ± 2,4                    |

### **3. Résultats obtenus en milieu de saison de reproduction**

#### **3.1. Evolution des concentrations plasmatiques et de la pulsativité de la GH**

Le tableau R1 reprend les résultats concernant l'étude des sécrétions moyennes et pulsatiles de la GH sur cinq brebis témoins et cinq brebis traitées à la bGHrec. La figure R1 donne diverses évolutions des concentrations plasmatiques de GH.

##### **3.1.1. Analyse des sécrétions de GH durant 17 jours**

Chez toutes les brebis, les sécrétions de GH fluctuent fortement d'une prise de sang à l'autre. La figure R1a illustre à titre d'exemple le profil de sécrétion individuel pour la brebis 10 et confirme l'irrégularité de l'émission de GH.

Les moyennes lissées des deux groupes de brebis obtenues à partir des prélèvements sanguins effectués entre 8 et 9 heures (c'est-à-dire 15 heures après la dernière injection de bGHrec) sont différentes d'un groupe à l'autre durant les 17 jours (figure R1b). Pour les 2 groupes, on constate une augmentation de la concentration en GH en fin de phase folliculaire jusqu'au jour de l'ovulation.

La courbe lissée des moyennes du **groupe témoin** varie peu au cours des 17 jours. Le taux plasmatique moyen et le taux de base sont respectivement de  $16,5 \pm 9,9$  ng/ml et  $7,6 \pm 1,6$  ng/ml (tableau R1).

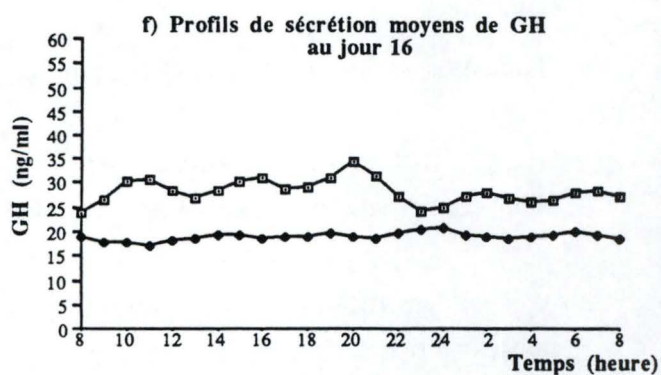
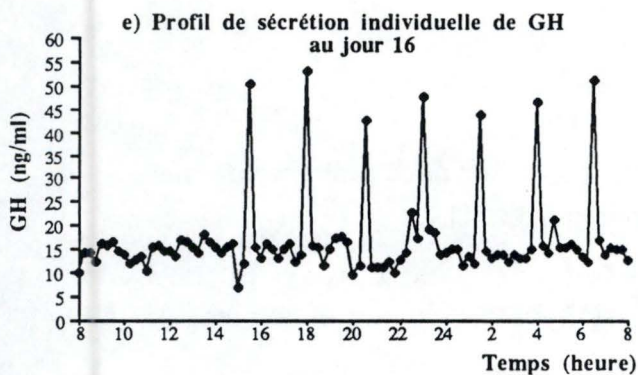
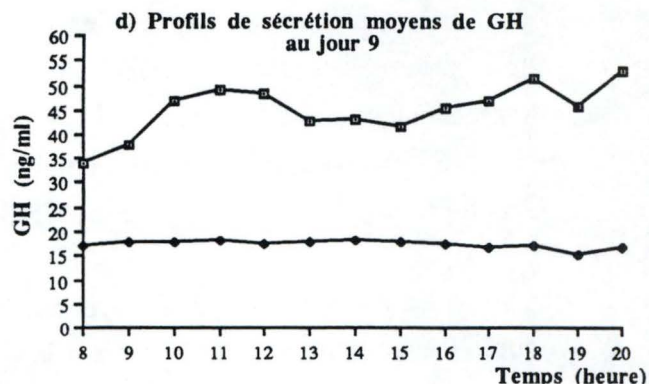
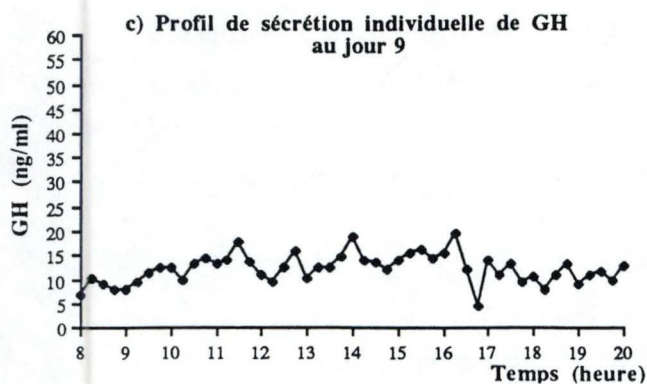
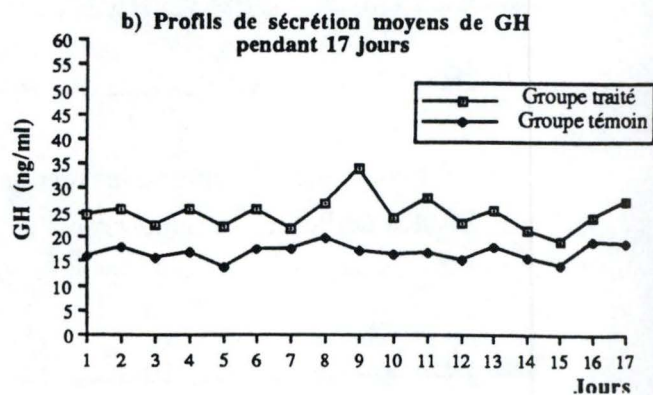
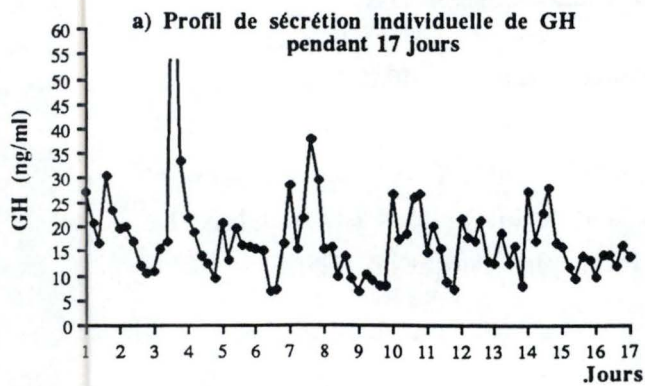
Pour le **groupe traité**, la courbe lissée des moyennes est significativement supérieure ( $P < 0,05$ ) à celle du groupe témoin de même que le taux plasmatique moyen ( $24,0 \pm 11,8$  ng/ml) ( $P < 0,05$ ) et le taux de base ( $9,5 \pm 2,8$  ng/ml).

##### **3.1.2. Analyse des sécrétions de GH durant 12 heures au jour 9**

Les sécrétions individuelles de GH obtenues pour la brebis de référence (figure R1c) confirment la pulsativité et l'irrégularité de l'émission de GH.

Les moyennes lissées des 2 groupes de brebis sont différentes durant les 12 heures de prises de sang (figure R1d).

Pour le **groupe de brebis témoins** (figure R1d), l'analyse de la courbe lissée calculée à partir des différentes valeurs individuelles montre que les sécrétions sont stables durant les 12 heures. Le taux plasmatique moyen et le taux de base sont



*Figure R1 : Evolution des profils de sécrétions individuelles et lissées de la GH pendant 17 jours (a et b), pendant 12 heures au jour 9 (c et d) et pendant 24 heures au jour 16 (e et f) du cycle en milieu de saison de reproduction.*

respectivement de  $17,3 \pm 5,6$  ng/ml et  $12,0 \pm 2,2$  ng/ml.

Pour le **groupe de brebis traitées**, l'analyse de la courbe lissée révèle des fluctuations importantes au cours des 12 heures. Le tableau R1 laisse apparaître des taux plasmatiques moyens ( $44,9 \pm 29,3$  ng/ml) et basaux ( $26,4 \pm 4,2$  ng/ml) significativement supérieurs ( $P < 0,05$ ) à ceux des brebis témoins. Par contre, la fréquence des pulses de sécrétion ne semble pas varier d'un groupe à l'autre.

Il apparaît donc de façon manifeste (figure R1d) que la bGHrec injectée quotidiennement *in vivo* collabore à l'obtention d'une concentration plasmatique moyenne de GH significativement ( $P < 0,05$ ) plus élevée que celle du groupe témoin. Après la première injection faite à 9 heures, les taux plasmatiques de GH augmentent pour atteindre un maximum 2 heures après l'injection; ces taux diminuent ensuite faiblement jusqu'à 15 heures. A partir de 16 heures, la concentration plasmatique augmente à nouveau pour atteindre un maximum 3 heures après la seconde injection de bGHrec.

### 3.1.3. Analyse des sécrétions de GH pendant 24 heures au jour 16

La figure R1e confirme le caractère pulsatile du profil de sécrétion individuel de la GH pour la brebis 10; chez cette brebis on note une pulsativité régulière. Les 4 autres brebis témoins présentent également un profil de sécrétion pulsatile mais irrégulier.

Les moyennes lissées des 2 groupes de brebis sont différentes d'un groupe à l'autre durant les 24 heures de prises de sang (figure R1f).

La courbe lissée (figure R1f) montre que les sécrétions moyennes de GH du **groupe témoin** calculées à partir des différentes valeurs individuelles varient peu au cours des 24 heures de prises de sang. Le taux plasmatique moyen et le taux de base sont respectivement de  $18,8 \pm 8,4$  ng/ml et  $12,3 \pm 1,0$  ng/ml.

Pour le **groupe traité**, l'analyse de la courbe lissée révèle des fluctuations au cours des 24 heures. Le tableau R1 laisse apparaître des taux plasmatiques moyens ( $28,0 \pm 13,2$  ng/ml) et basaux ( $17,8 \pm 2,2$  ng/ml) significativement supérieurs ( $P < 0,05$ ) à ceux des brebis témoins. La fréquence des pulses de sécrétion ne semble pas varier d'un groupe à l'autre.

**Tableau R2: Caractéristiques des différents paramètres morphologiques de la croissance folliculaire terminale en milieu de saison de reproduction pour les groupes de brebis témoins et traitées.**

|  | Gr. de brebis témoins | Gr. de brebis traitées |
|--|-----------------------|------------------------|
| Nombre de follicules recrutés                  | 7,2 ± 1,6             | 9,8 ± 2,6              |
| Pourcentage d'atrésie due à la sélection       | 56%                   | 60%                    |
| Nombre de follicules sélectionnés              | 3,2 ± 1,1             | 4,0 ± 0,6              |
| Pourcentage d'atrésie due à la dominance       | 56%                   | 45%                    |
| Nombre de follicules dominants                 | 1,4 ± 0,5             | 2,2 ± 0,4              |
| Tailles moyennes des follicules dominants (mm) | 4,9 ± 0,5             | 5,0 ± 0,7              |
| Taux d'ovulation                               | 1,2 ± 0,4             | 2,2 ± 0,4              |

**Tableau R3 : Caractéristiques de la sécrétion de LH en milieu de saison de reproduction.**

|  | Taux de base<br>ng/ml  | Moyenne totale<br>ng/ml | Nombre de<br>pulses<br>(12 heure/brebis) |
|--|------------------------|-------------------------|--|
| <b>Durant 17 jours</b><br>- groupe témoin<br>- groupe traité   | 0,7 ± 0,1<br>0,7 ± 0,1 | 1,2 ± 1,5<br>0,9 ± 0,2  | /<br>/                                   |
| <b>Durant le jour 9</b><br>- groupe témoin<br>- groupe traité  | 0,8 ± 0,1<br>0,8 ± 0,1 | 1,0 ± 0,1<br>1,0 ± 0,3  | 0,4 ± 0,9<br>1,2 ± 1,3                   |
| <b>Durant le jour 16</b><br>- groupe témoin<br>- groupe traité | 1,1 ± 0,2<br>0,9 ± 0,2 | 6,5 ± 19,0<br>2,8 ± 3,5 | 1,6 ± 3,0<br>2,8 ± 3,9                   |

### 3.1.4. Conclusions

Si nous considérons les profils individuels de sécrétion de GH, nous obtenons une variabilité élevée et une pulsativité irrégulière qui confirme les résultats obtenus lors de l'essai préliminaire. Malgré cette variabilité à court terme, la sécrétion de GH est marquée par une grande stabilité en milieu de saison de reproduction, tant au cours d'une même journée que d'un jour à l'autre, sauf en fin de cycle où on observe une augmentation de la concentration moyenne.

Un traitement de bGHrec provoque une augmentation nette des concentrations plasmatiques de GH. Cette augmentation prouve, que lors des dosage RIA, l'hormone de croissance exogène (bGHrec), en plus de l'hormone native (GH), est bien dosée. L'effet du traitement se poursuit durant au moins 15 heures. Ceci explique les différences obtenues entre les groupes traité et témoin durant tout le cycle, à partir d'analyses effectuées 15 heures après la précédente injection. La concentration moyenne augmente aussi en fin de cycle.

Par contre, un traitement à la bGHrec ne semble pas modifier la pulsativité de l'émission de GH.

### 3.2. Effets d'un traitement de bGHrec sur la croissance folliculaire terminale

Le tableau R2 présente différentes caractéristiques de la croissance folliculaire terminale pour le groupe de brebis témoins et pour le groupe de brebis traitées à la bGHrec.

Pour le **groupe témoin** les nombres moyens de follicules recrutés, sélectionnés et dominants sont respectivement de  $7,2 \pm 1,6$ ;  $3,2 \pm 1,1$  et  $1,4 \pm 0,5$ . Le pourcentage d'atrésie des follicules recrutés (56%) est identique au pourcentage d'atrésie des follicules sélectionnés (56%). La plupart des follicules dominants arrivent à l'ovulation (TO :  $1,2 \pm 0,4$ ).

Chez le **groupe traité**, les valeurs moyennes sont de  $9,8 \pm 2,6$  pour le nombre de follicules recrutés,  $4,0 \pm 0,6$  pour le nombre de follicules sélectionnés et  $2,2 \pm 0,4$  pour le nombre de follicules dominants. Ces valeurs sont supérieures, à celles observées pour le groupe témoin. Par opposition au groupe de brebis témoins, le pourcentage d'atrésie des follicules recrutés (60%) est supérieur au pourcentage d'atrésie des follicules sélectionnés (45%), ce qui entraîne finalement un nombre de follicules dominants supérieur à celui des témoins.

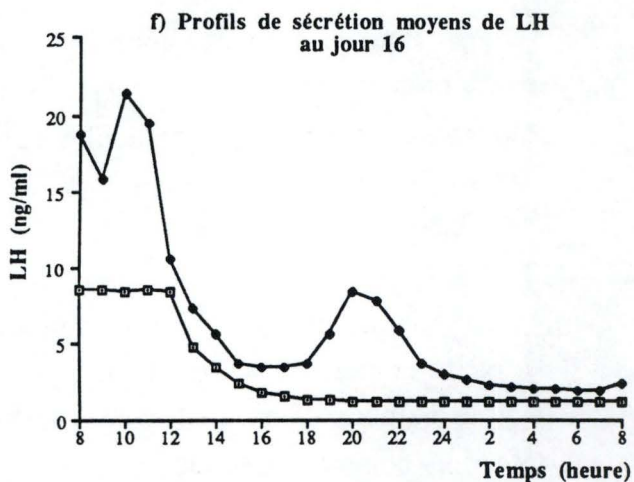
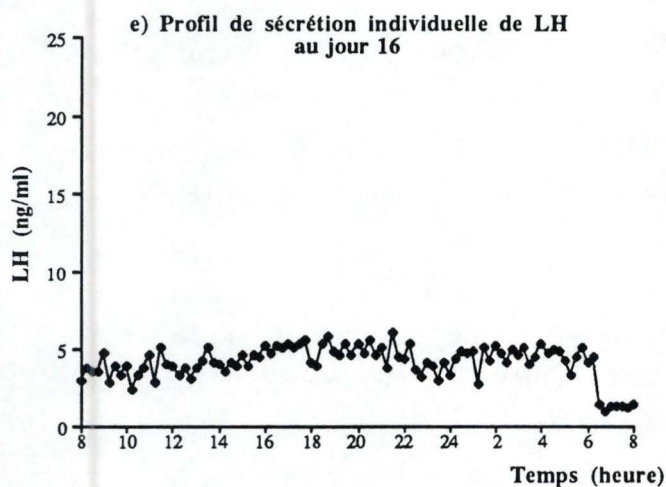
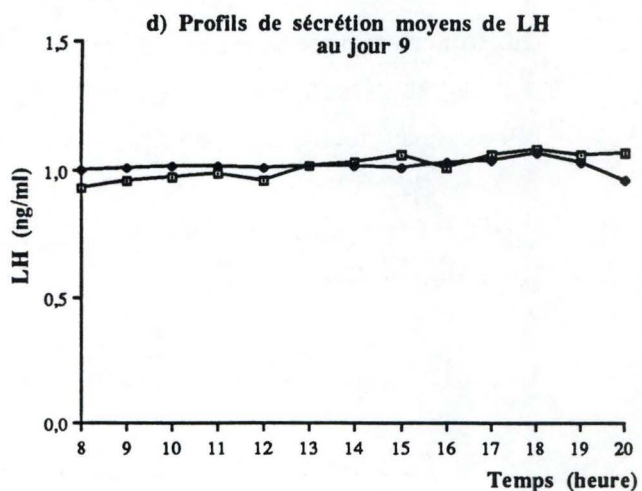
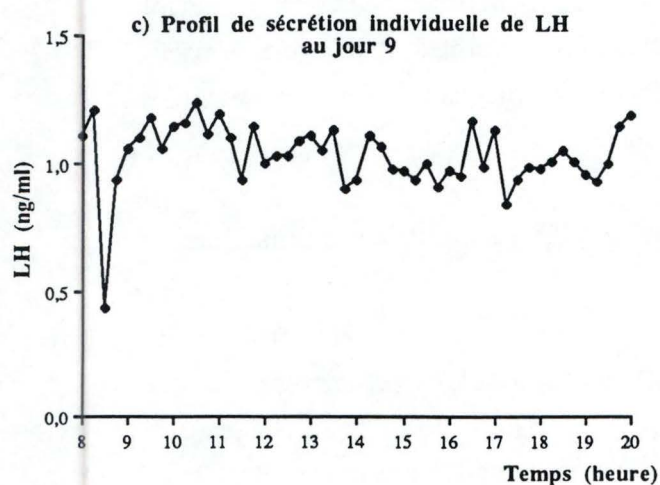
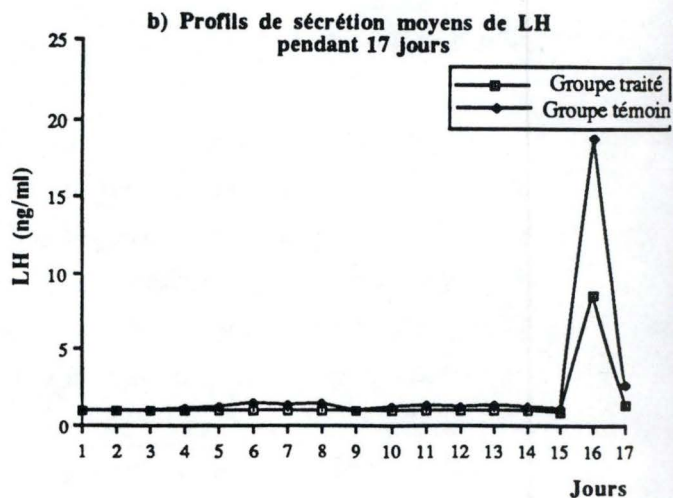
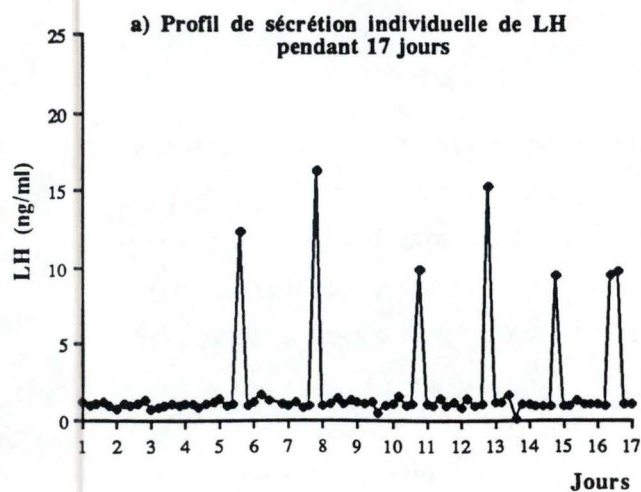


Figure R2 : Evolution des profils de sécrétions individuelles et lissées de la LH pendant 17 jours (a et b), pendant 12 heures au jour 9 (c et d) et pendant 24 heures au jour 16 (e et f) du cycle en milieu de saison de reproduction.

Un traitement de bGHrec paraît améliorer la croissance folliculaire terminale, surtout au niveau du recrutement. Ce traitement permet aussi de mener tous les follicules dominants à l'ovulation. De plus, le taux d'ovulation ( $2,2 \pm 0,4$ ) est significativement supérieur ( $P < 0,05$ ) à celui des brebis témoins ( $1,2 \pm 0,4$ ). A noter aussi que le traitement provoque l'apparition quotidienne d'un grand nombre de petits follicules de diamètre inférieur ou égal à 1 mm qui ne se maintiennent qu'un jour; ils ne correspondent donc pas au critère de follicule recruté mais leur présence mérite d'être signalée car un tel phénomène n'est pas observé au sein du groupe témoin.

### 3.3. Evolution des concentrations plasmatiques et de la pulsativité de la LH

Le tableau R3 reprend les résultats concernant les sécrétions moyennes et pulsatiles de la LH sur cinq brebis témoins et cinq brebis traitées à la bGHrec. La figure R2 illustre l'évolution des profils individuels et moyens des sécrétions de la LH pour les deux groupes de brebis.

#### 3.3.1. Analyse des sécrétions de LH pendant 17 jours

La figure R2a illustre le profil de sécrétion individuel de la LH pour la brebis 10. Les valeurs fluctuent d'un prélèvement à l'autre pendant les 17 jours. Mais lorsqu'on observe les moyennes lissées de sécrétion pour les groupes témoin et traité (figure R2b) on ne constate pas de variation des niveaux de LH durant les 17 jours sauf au jour 16, suite à la présence du pic préovulatoire de LH chez plusieurs animaux.

Le tableau R3 montre que les taux plasmatiques moyens ( $0,9 \pm 0,2$  ng/ml) et basaux ( $0,7 \pm 0,1$  ng/ml) du groupe traité sont proches de ceux du groupe témoin ( $1,2 \pm 1,5$  ng/ml et  $0,7 \pm 0,1$  ng/ml).

#### 3.3.2. Analyse des sécrétions de LH pendant le jour 9

Les sécrétions individuelles de LH obtenues pour la brebis de référence (figure R2c) confirment la pulsativité et l'irrégularité de l'émission de LH. Les sécrétions moyennes calculées pour toutes les brebis des groupes témoin et traité sur une période de 12 heures varient très peu (figure R2d). Les taux plasmatiques moyens et basaux sont semblables pour les 2 groupes (tableau R3). La fréquence d'émission de LH est plus grande pour le groupe traité (non significatif).

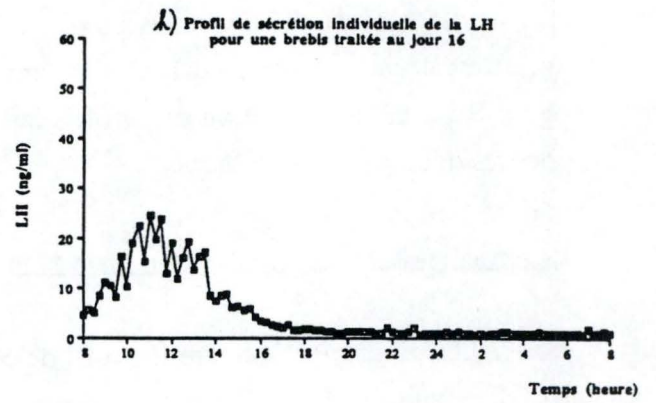
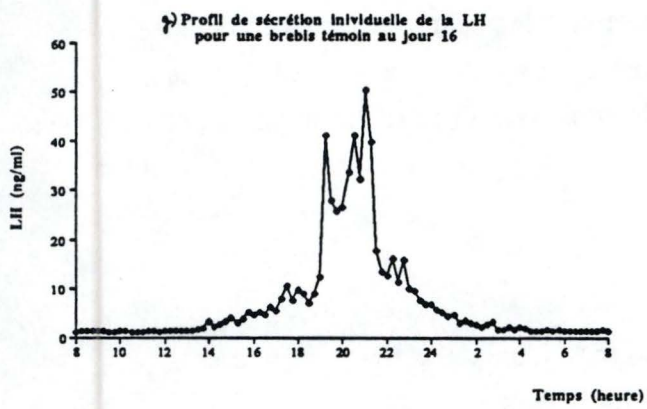


Figure R2 bis : Evolution des sécrétions individuelles de LH pendant 24 heures au jour 16 du cycle chez une brebis témoin et un brebis traitée.

### **3.3.3. Analyse des sécrétions de LH pendant le jour 16**

En cours de journée, les sécrétions individuelles de LH obtenues pour la brebis de référence (figure R2e) confirment la pulsativité et l'irrégularité de l'émission de LH. Les sécrétions moyennes calculées pour toutes les brebis des groupes témoin et traité sur une période de 24 heures varient (figure R2f) et elles sont plus importantes pour le groupe témoin. Pour chaque groupe, 2 brebis seulement présentent le pic préovulatoire de LH. Les figures R2g et R2h montrent respectivement les profils individuels de sécrétion pour l'une des brebis témoins (brebis 6) et l'une des brebis traitées (brebis 1); ces 2 brebis présentent le pic préovulatoire de LH pendant la période analysée.

L'analyse du tableau R3 montre que pour les 2 groupes, les taux basaux sont semblables. Par contre, le taux plasmatique moyen pour le groupe témoin ( $6,5 \pm 19,0$  ng/ml) est supérieur (non significatif) à celui du groupe traité ( $2,8 \pm 3,5$  ng/ml) et l'écart-type est important car une des brebis témoins présente des concentrations importantes de LH durant le pic préovulatoire.

La fréquence d'émission de LH est plus grande (non significatif) pour le groupe traité.

### **3.3.4. Conclusions**

L'examen des trois profils individuels de sécrétion de LH montre que celle-ci évolue de façon pulsatile, avec l'apparition, à des intervalles de temps irréguliers d'un pulse de sécrétion.

Dans chaque groupe, deux brebis seulement sur les cinq présentent le pic préovulatoire de LH. Les autres brebis ont déjà présenté ou, plus probablement, vont présenter le pic préovulatoire de LH, puisque les endoscopies réalisées quelques jours plus tard pour mesurer le taux d'ovulation ont montré qu'elles avaient toutes ovulé.

Les sécrétions moyennes lissées de LH varient peu au cours d'une même journée et d'un jour à l'autre sauf au jour 16, jour du pic préovulatoire de LH.

Un traitement de bGHrec ne modifie pas significativement les sécrétions plasmatiques de la LH ni son émission pulsatile.

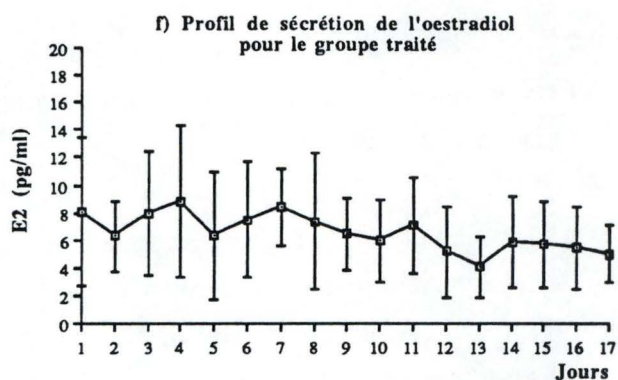
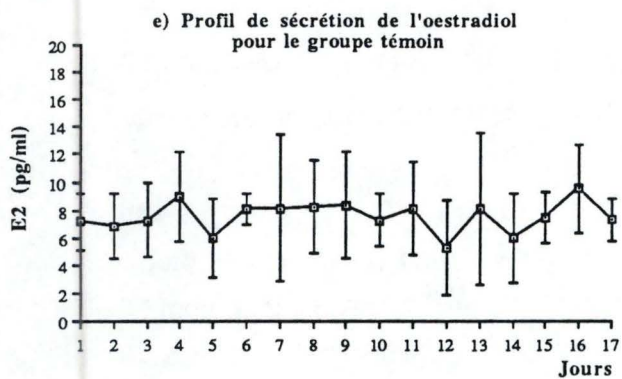
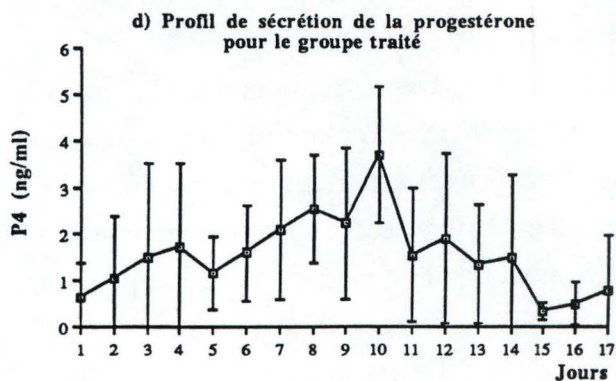
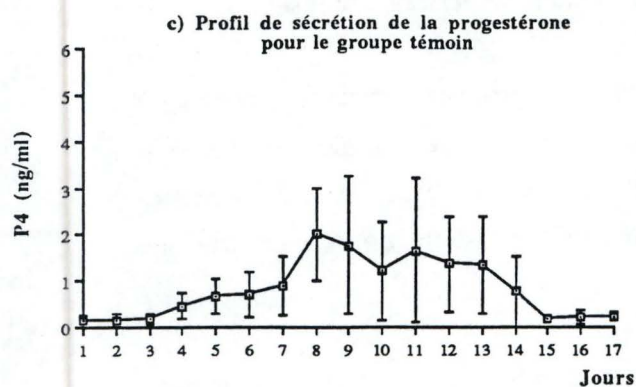
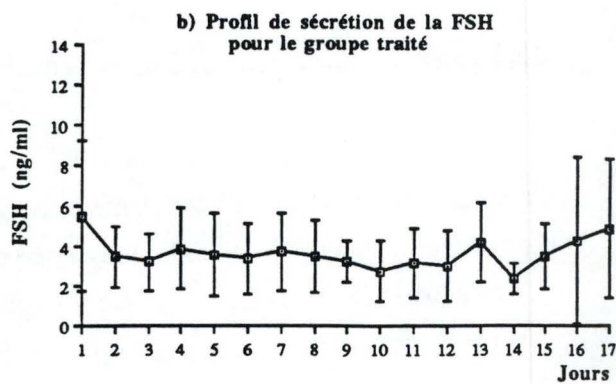
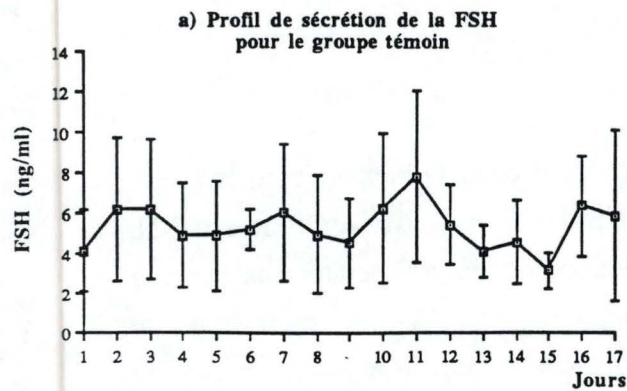


Figure R3 : Profils de sécrétion de la FSH, de la progestérone et de l'oestradiol pendant 17 jours pour les groupes de brebis témoins (a, c, e) et traitées (b, d, f) étudiées en milieu de saison de reproduction.

### 3.4. Evolution des sécrétions de la FSH et des stéroïdes sexuels

Rappelons que pour la FSH et les stéroïdes sexuels, les profils de sécrétions moyens sont établis à partir des prélèvements quotidiens effectués à 8 heures. La figure R3 montre les évolutions moyennes observées; il n'y a pas de graphe individuel pour la FSH et les stéroïdes sexuels afin ne pas surcharger ce graphique.

#### 3.4.1. La FSH

Les niveaux plasmatiques moyens de FSH du **groupe témoin** (figure R3a) montrent une évolution sous forme de trois vagues au cours du cycle oestral. Les deux premières ont lieu pendant la phase lutéale; la première du jour 4 au jour 9 et la deuxième du jour 9 au jour 13. La troisième vague commence pendant la phase folliculaire (jour 15) pour se terminer au jour 17. Les concentrations plasmatiques moyennes fluctuent autour d'une valeur moyenne de  $5,3 \pm 2,8$  ng/ml. Nous observons cependant une très grande variabilité individuelle au niveau de l'amplitude des fluctuations et de leur durée, ce qui explique les grands écarts-type.

Cette importante variabilité individuelle se retrouve chez le **groupe traité** (figure R3b) qui présente une moyenne de sécrétion inférieure ( $3,6 \pm 2,1$  ng/ml ) à celle du groupe témoin mais la différence est non significative. Au sein de ce groupe traité, nous n'avons pas pu mettre en évidence de fluctuations de la FSH sous forme de vagues. En effet, l'analyse individuelle des profils de sécrétion de la FSH montre que sur 5 brebis traitées, 4 ne présentent pas les 2 vagues caractéristiques de la phase lutéale. La sécrétion est quasi constante du jour 2 au jour 12 de la phase lutéale; par contre, elle augmente sensiblement à partir du jour 14 de la phase folliculaire.

En conclusion, un traitement de bGHrec administré quotidiennement semble modifier le profil de sécrétion de la FSH en diminuant les concentrations plasmatiques moyennes et en supprimant les vagues de sécrétion, du moins celles de la phase lutéale.

#### 3.4.2. La progestérone

Pour chaque brebis, l'émission de P4 se caractérise par des concentrations plus élevées en phase lutéale qu'en phase folliculaire.

En milieu de saison de reproduction, nous obtenons, **au sein du groupe témoin** (figure R3c), des concentrations plasmatiques moyennes de  $0,8 \pm 1,2$  ng/ml. Ces concentrations sont plus élevées en phase lutéale, ce qui est caractéristique de la présence

de corps jaune; elles diminuent ensuite durant la phase folliculaire, phase au cours de laquelle le(s) corps jaune(s) régresse(nt).

Les concentrations plasmatiques moyennes de P<sub>4</sub> sont, pour le **groupe traité** (figure R3d), de  $1,5 \pm 2,1$  ng/ml, c'est-à-dire supérieures au groupe témoin mais de manière non significative. Le profil de sécrétion est, quant à lui, comparable à celui observé pour le groupe témoin.

#### 3.4.3. L'oestradiol

Pour chaque brebis, l'émission des oestrogènes se présente sous formes d'ondes avec, en fonction de la brebis, de un à trois maxima de concentration plasmatique au cours des 17 jours du cycle.

Les sécrétions d'E<sub>2</sub> fluctuent autour d'une moyenne de  $7,5 \pm 3,0$  pg/ml pour le **groupe témoin** (figure R3e). Nous observons une grande variabilité individuelle au niveau de l'amplitude des fluctuations et de leur durée.

Cette variabilité individuelle se retrouve chez le **groupe traité** (figure R3f) où les sécrétions plasmatiques moyennes d'E<sub>2</sub> fluctuent autour d'une valeur moyenne de  $6,6 \pm 3,6$  pg/ml.

#### 3.4.4. Conclusion

Le milieu de la saison de reproduction est marqué, chez les brebis témoins, par une émission de FSH sous forme de vagues. Le traitement à la bGHrec supprime les vagues de la phase lutéale et diminue les concentrations plasmatiques moyennes.

Pour les deux groupes, les profils de P<sub>4</sub> indiquent que les brebis sont en cycle régulier; en effet, la phase lutéale présente une durée normale, et la lutéolyse se produit dans les deux groupes le 14<sup>ème</sup> jour.

Quant aux sécrétions d'E<sub>2</sub>, elles fluctuent irrégulièrement. Les profils de sécrétion sont semblables.

*Tableau R4 : Caractéristiques de la sécrétion de GH en anoestrus.*

|   | Taux de base<br>ng/ml  | Moyenne totale<br>ng/ml    | Nombre de<br>pulses<br>(12 heures/brebis) |
|---|------------------------|----------------------------|---|
| <b>17 jours</b><br>- Groupe témoin<br>- Groupe traité | 5,5 ± 1,3<br>6,8 ± 1,2 | 10,4 ± 4,6<br>13,3 ± 16,8  | /<br>/                                    |
| <b>Jour 9</b><br>- Groupe témoin<br>- Groupe traité   | 4,1 ± 1,1<br>9,9 ± 6,6 | 6,9 ± 3,4<br>29,3 ± 55,0   | 1,8 ± 1,6<br>2,0 ± 1,2                    |
| <b>Jour 16</b><br>- Groupe témoin<br>- Groupe traité  | 4,8 ± 1,5<br>9,9 ± 1,8 | 13,6 ± 22,4<br>22,4 ± 13,1 | 2,2 ± 0,8<br>2,8 ± 0,6                    |

## **4. Résultats obtenus en anoestrus**

### **4.1. Evolution des concentrations plasmatiques et de la pulsativité de la GH**

Le tableau R4 reprend les résultats concernant l'étude des sécrétions moyennes et pulsatiles de la GH sur cinq brebis témoins et cinq brebis traitées à la bGHrec. La figure R4 donne diverses évolutions des concentrations plasmatiques.

#### **4.1.1. Analyse des sécrétions de GH durant 17 jours**

Chez toutes les brebis, les sécrétions de GH fluctuent d'une prise de sang à l'autre. La figure R4a illustre à titre d'exemple le profil de sécrétion de la brebis 10, où les 5 points correspondant aux 5 prises de sang réalisées quotidiennement entre 8 et 9 heures sont représentés. Elle montre que la sécrétion est régulière, qu'il ne semble pas exister de vague périodique au cours des jours.

Les moyennes lissées des deux groupes de brebis obtenues à partir des prélèvements sanguins effectués entre 8 et 9 heures diffèrent peu durant les 17 jours (figure R4b). Pour le groupe traité, on constate une augmentation de la concentration moyenne de GH en fin de phase folliculaire jusqu'au jour de l'ovulation, le même cas de figure est observé en milieu de saison mais pour les 2 groupes (figure R1b).

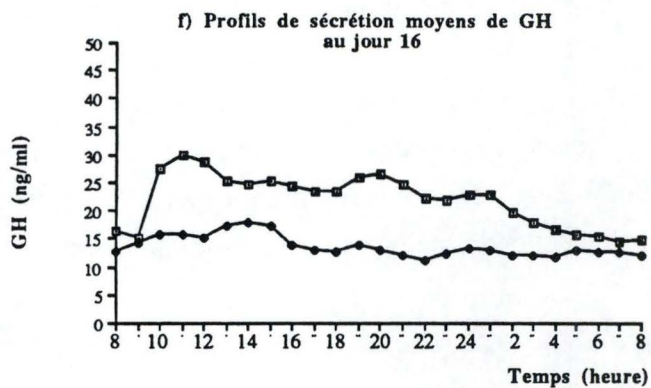
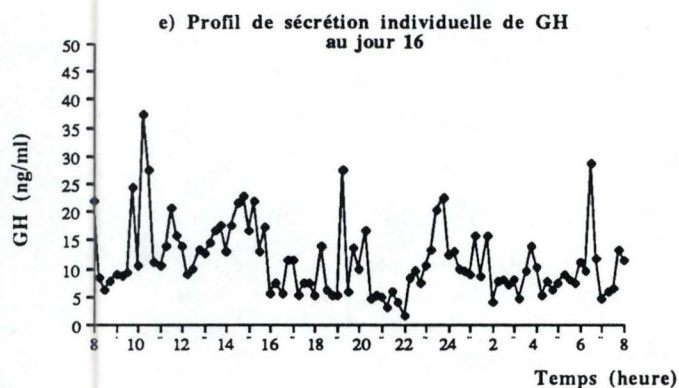
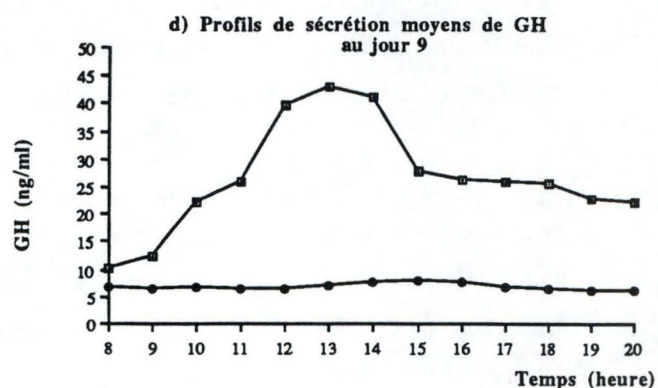
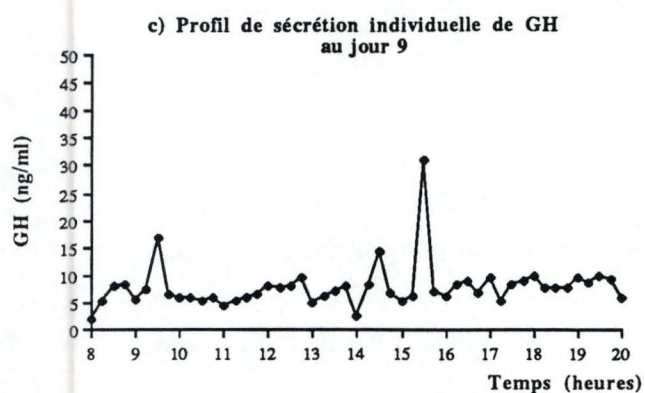
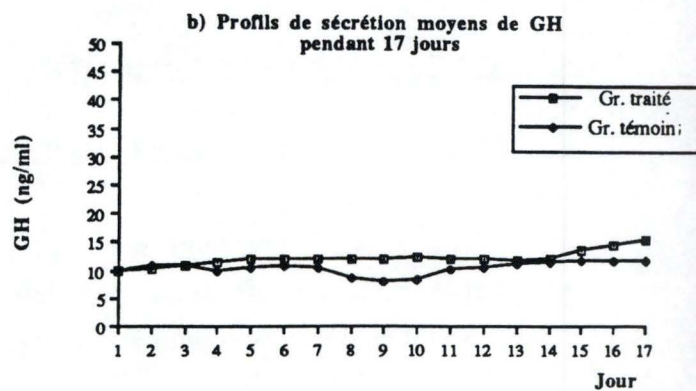
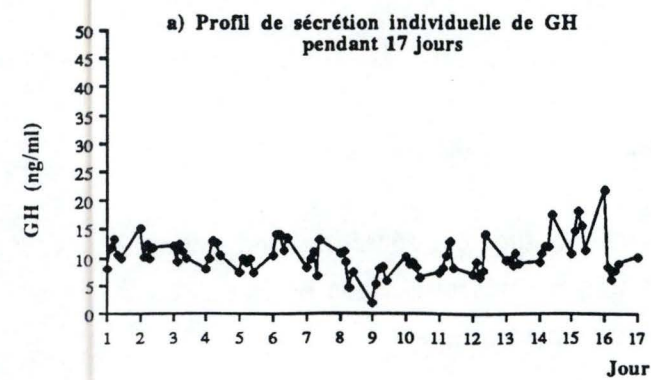
La courbe lissée des moyennes du groupe témoin varie peu au cours des 17 jours. Le taux plasmatique moyen et le taux de base sont respectivement de  $10,4 \pm 4,6$  ng/ml et  $5,5 \pm 1,3$  ng/ml (tableau R4). Ces valeurs sont inférieures à celles observées pour le même groupe en milieu de saison (tableau R1).

Pour le groupe traité, la courbe lissée des moyennes varie peu au cours des 17 jours. Les valeurs des taux plasmatiques moyens ( $13,3 \pm 16,8$  ng/ml) et basaux ( $6,8 \pm 1,2$  ng/ml) sont légèrement supérieures à celles du groupe témoin mais inférieures aux valeurs du même groupe en milieu de saison (tableau R1).

#### **4.1.2. Analyse des sécrétions de GH durant 12 heures au jour 9**

Les sécrétions individuelles de GH obtenues pour la brebis de référence (figure R4c) confirme que l'émission de GH se fait sous une forme pulsatile et irrégulière.

Les moyennes lissées des 2 groupes de brebis sont différentes d'un groupe à l'autre durant les 12 heures de prises de sang.



**Figure R4** : Evolution des profils de sécrétions individuelles et lissées de la GH pendant 17 jours (a et b), pendant 12 heures au jour 9 (c et d) et pendant 24 heures au jour 16 (e et f) en anoestrus.

Pour le **groupe de brebis témoin** (figure R4d), l'analyse de la courbe lissée calculée à partir des différentes valeurs individuelles montre que les sécrétions sont stables durant les 12 heures. Le taux plasmatique moyen et le taux de base sont respectivement de  $6,9 \pm 3,4$  ng/ml et  $4,1 \pm 1,1$  ng/ml; ces valeurs sont significativement inférieures ( $P < 0,05$ ) à celles du même groupe en milieu de saison (tableau R1).

Pour le **groupe de brebis traitées**, l'analyse de la courbe lissée révèle des fluctuations au cours des 12 heures. Le tableau R4 laisse apparaître des taux plasmatiques moyens ( $29,3 \pm 55,0$  ng/ml) et basaux ( $9,9 \pm 6,6$  ng/ml) significativement supérieurs ( $P < 0,05$ ) à ceux des brebis témoins; ces valeurs sont significativement inférieures ( $P < 0,05$ ) à celles du même groupe en milieu de saison (tableau R1). Par contre, la fréquence des pulses de sécrétion ne varie pas d'un groupe à l'autre.

Après la première injection réalisée à 9 heures, les taux de GH plasmatiques augmentent fortement pour atteindre un maximum 4 heures après l'injection; ces taux diminuent ensuite. Par contre, après la seconde injection quotidienne (à 17 heures), aucune augmentation temporaire des niveaux de GH n'est observée. Ces résultats confirment ceux de l'expérience préliminaire où nous avons mis en évidence une diminution des sécrétions de GH après un repas. Au cours de cette expérience, le repas distribué juste après la seconde injection de bGHrec peut être évoqué pour expliquer l'absence d'augmentation des niveaux de GH plasmatiques observée.

#### 4.1.3. Analyse des sécrétions de GH pendant 24 heures au jour 16

La figure R4e confirme le caractère pulsatile et irrégulier du profil de sécrétion individuel de la GH. La pulsativité de la sécrétion semble nettement plus élevée au jour 16 par rapport au jour 9 chez la brebis 10, mais rien ne permet d'expliquer ce phénomène puisque la brebis 10 n'est pas en cycle. Ceci est d'ailleurs variable d'un animal à l'autre.

Les moyennes lissées des 2 groupes de brebis sont différentes d'un groupe à l'autre durant les 24 heures de prises de sang (figure R4f).

La courbe lissée (figure R4f) montre que les sécrétions moyennes de GH du **groupe témoin** calculées à partir des différentes valeurs individuelles varient peu au cours des 24 heures de prises de sang. Le taux plasmatique moyen et le taux de base sont respectivement de  $13,6 \pm 22,4$  ng/ml et  $4,8 \pm 1,5$  ng/ml (tableau R4). Ces valeurs sont significativement inférieures ( $P < 0,05$ ) à celles du même groupe en milieu de saison (tableau R1)

Pour le **groupe de brebis traitées**, l'analyse de la courbe lissée révèle des fluctuations au cours des 24 heures. Le tableau R4 laisse apparaître des taux plasmatiques moyens ( $22,4 \pm 13,1$  ng/ml) et basaux ( $9,9 \pm 1,8$  ng/ml) significativement supérieurs ( $P < 0,05$ ) à ceux du groupe témoin. Ces valeurs sont proches de celles observées pour le même groupe en milieu de saison (tableau R1) sauf pour le taux de base qui est significativement inférieur ( $P < 0,05$ ). Comme le montre la figure R4f, la première injection quotidienne de bGHrec provoque une forte augmentation des sécrétions plasmatiques moyennes de la GH suivie d'une diminution après quelques heures. Une moindre augmentation semble se manifester après la seconde injection (17 heures). Comme lors de l'expérience précédente, le taux plasmatique de GH atteint un maximum 2 heures après l'injection .

La fréquence des pulses de sécrétion ne semble pas varier d'un groupe à l'autre

#### 4.1.4. Conclusions

Si nous considérons les profils de sécrétion de GH des différents individus, nous obtenons, comme en milieu de saison de reproduction, une variabilité élevée et une pulsativité irrégulière qui confirment les résultats obtenus lors de l'essai préliminaire. Malgré cette variabilité à court terme, la sécrétion moyenne de GH est marquée par une grande stabilité en anoestrus comme en milieu de saison, tant au cours d'une même journée que d'un jour à l'autre.

En anoestrus, l'effet du traitement à la bGHrec se poursuit durant 7 à 9 heures contre 15 heures au moins en milieu de saison de reproduction. Ceci explique les faibles différences obtenues entre les groupes traité et témoin durant tout le cycle, à partir d'analyses effectuées 15 heures après la dernière injection.

Le traitement à la bGHrec ne semble pas modifier non plus, comme en milieu de saison, la pulsativité d'émission de GH.

#### 4.2. Effets d'un traitement de bGHrec sur la croissance folliculaire terminale

Le tableau R5 présente différentes caractéristiques de la croissance folliculaire terminale pour le groupe de brebis témoins et pour le groupe de brebis traitées à la bGHrec lors de la vague de croissance folliculaire se produisant 13 à 16 jours après synchronisation en période d'anoestrus.

**Tableau R5 : Caractéristiques des différents paramètres morphologiques de la croissance folliculaire terminale en anoestrus pour les groupes de brebis témoins et traitées.**

|  | Gr. de brebis témoins | Gr. de brebis traitées |
|--|-----------------------|------------------------|
| Nombre de follicules recrutés                  | 8,6 ± 1,5             | 11,6 ± 2,5             |
| Pourcentage d'atrésie due à la sélection       | 53%                   | 39%                    |
| Nombre de follicules sélectionnés              | 4,0 ± 1,6             | 7,0 ± 3,1              |
| Pourcentage d'atrésie due à la dominance       | 30%                   | 35%                    |
| Nombre de follicules dominants                 | 2,8 ± 1,1             | 4,0 ± 1,2              |
| Tailles moyennes des follicules dominants (mm) | 5,2 ± 0,4             | 5,2 ± 0,5              |
| Taux d'ovulation                               | 0,0 ± 0,0             | 0,0 ± 0,0              |

**Tableau R6 : Caractéristiques de la sécrétion de LH en anoestrus.**

|  | Taux de base<br>ng/ml  | Moyenne totale<br>ng/ml | Nombre de<br>pulses<br>(12 heure/brebis) |
|--|------------------------|-------------------------|--|
| <b>Durant 17 jours</b><br>- groupe témoin<br>- groupe traité   | 0,7 ± 0,4<br>0,5 ± 0,3 | 0,8 ± 0,3<br>0,6 ± 0,3  | /<br>/                                   |
| <b>Durant le jour 9</b><br>- groupe témoin<br>- groupe traité  | 0,5 ± 0,0<br>0,4 ± 0,0 | 0,6 ± 0,4<br>0,6 ± 0,6  | 0,7 ± 0,8<br>0,3 ± 0,7                   |
| <b>Durant le jour 16</b><br>- groupe témoin<br>- groupe traité | 0,4 ± 0,2<br>0,4 ± 0,2 | 0,7 ± 0,7<br>0,6 ± 0,3  | 1,2 ± 0,4<br>2,2 ± 1,3                   |

Pour le **groupe témoin**, les nombres moyens de follicules recrutés, sélectionnés et dominants sont respectivement de  $8,6 \pm 1,5$ ;  $4,0 \pm 1,6$  et  $2,8 \pm 1,1$ . Le pourcentage d'atrésie des follicules recrutés (53%) est significativement supérieur ( $P < 0,05$ ) au pourcentage d'atrésie des follicules sélectionnés (30%).

Chez le **groupe traité**, les valeurs moyennes sont de  $11,6 \pm 2,5$  pour le nombre de follicules recrutés,  $7,0 \pm 3,1$  pour le nombre de follicules sélectionnés et  $4,0 \pm 1,2$  pour le nombre de follicules dominants. Ces valeurs sont supérieures à celles observées pour le groupe témoin mais de manière non significative. Comme pour le groupe de brebis témoins, le pourcentage d'atrésie des follicules recrutés (39%) est supérieur au pourcentage d'atrésie des follicules sélectionnés (35%).

Comme en milieu de saison, il y a confirmation qu'un traitement à la bGHrec améliore la croissance folliculaire terminale par rapport au groupe non traité. Toutefois il n'y a pas d'ovulation en anoestrus.

#### 4.3. Evolution des concentrations plasmatiques et de la pulsativité de la LH

Le tableau R6 reprend les résultats concernant les sécrétions moyennes et pulsatiles de la LH sur cinq brebis témoins et cinq brebis traitées à la bGHrec. La figure R5 illustre l'évolution des profils individuels et moyens des sécrétions de la LH pour les deux groupes de brebis.

##### 4.3.1. Analyse des sécrétions de LH pendant 17 jours

La figure R5a illustre le profil de sécrétion individuel de la LH pour la brebis 10 pendant les 17 jours. Les valeurs fluctuent d'un prélèvement à l'autre. Mais lorsqu'on observe les moyennes lissées de sécrétion pour les groupes témoin et traité (figure R5b), on ne constate pas de variation significative des niveaux de LH durant les 17 jours, y compris au jour 16, contrairement au milieu de saison où il y avait le pic préovulatoire de LH (figure R2b).

La figure R5b et le tableau R6 montrent que les taux plasmatiques moyens ( $0,6 \pm 0,3$  ng/ml) et basaux ( $0,5 \pm 0,3$  ng/ml) du groupe traité sont légèrement inférieurs (mais de manière non significative) à ceux obtenus pour le groupe témoin ( $0,8 \pm 0,3$  ng/ml et  $0,7 \pm 0,4$  ng/ml) et à ceux des 2 groupes en milieu de saison (tableau R3).

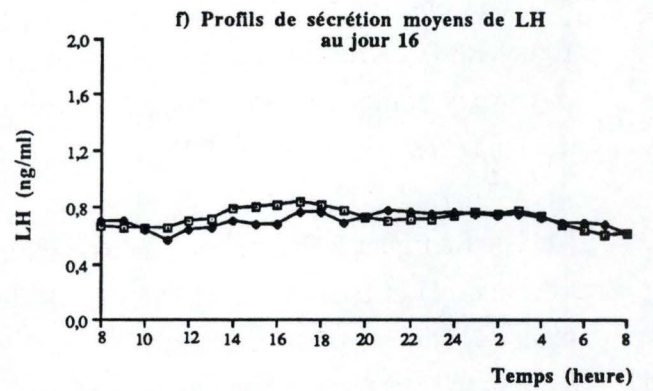
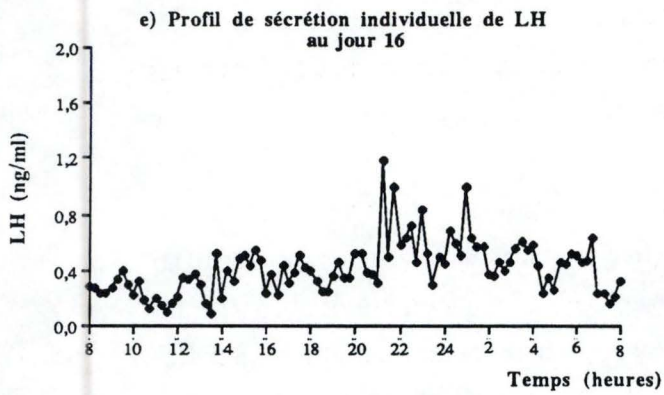
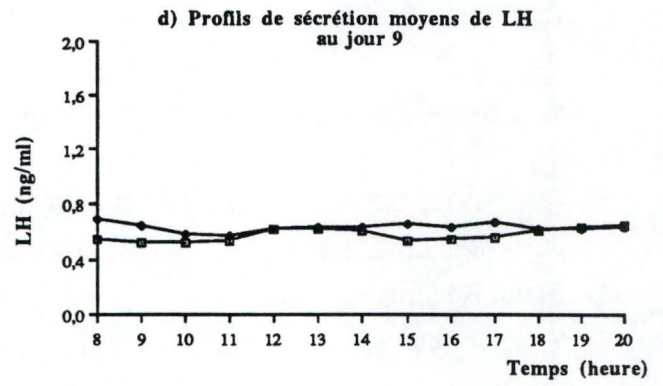
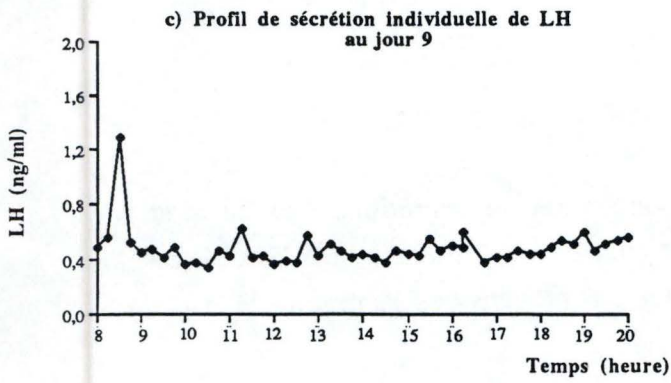
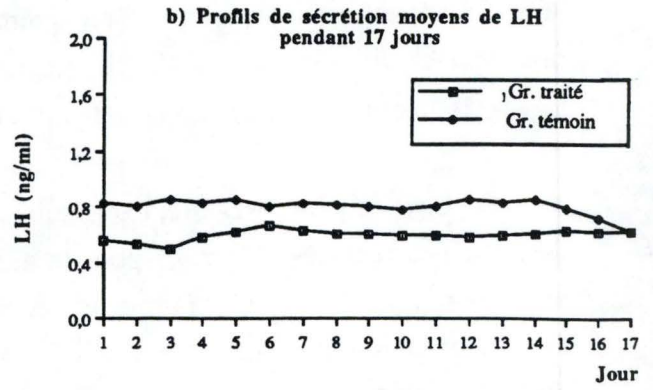
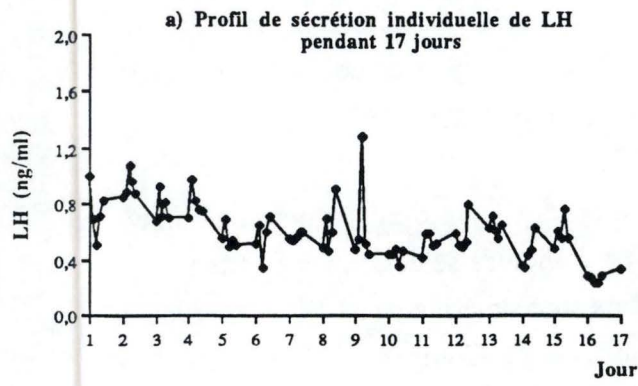


Figure R5 : Evolution des profils de sécrétions individuelles et lissées de la LH pendant 17 jours (a et b), pendant 12 heures au jour 9 (c et d) et pendant 24 heures au jour 16 (e et f) en anoestrus.

#### **4.3.2. Analyse des sécrétions de LH pendant le jour 9**

Les sécrétions individuelles de LH obtenues pour la brebis de référence (figure R5c) confirment la pulsativité et l'irrégularité de l'émission de LH. Malgré cette pulsativité irrégulière, les sécrétions moyennes calculées pour toutes les brebis des groupes témoin et traité sur une période de 12 heures (figure R5d) varient très peu tout comme en milieu de saison (figure R2d). Les taux plasmatiques moyens et basaux sont semblables pour les 2 groupes (tableau R6) mais inférieurs aux valeurs des 2 groupes en milieu de saison (tableau R3).

La fréquence d'émission n'est pas significativement différente.

#### **4.3.3. Analyse des sécrétions de LH pendant le jour 16**

Les sécrétions individuelles de LH obtenues pour la brebis de référence (figure R5e) confirment la pulsativité et l'irrégularité de l'émission de LH. Les sécrétions moyennes calculées pour toutes les brebis des groupes traité et témoin sur une période de 24 heures (figure R5f) varient très peu; toutefois il n'y a pas de pic préovulatoire de LH contrairement au milieu de saison de reproduction. Les taux plasmatiques moyens et basaux sont semblables pour les 2 groupes (tableau R6) mais inférieurs aux valeurs des 2 groupes en milieu de saison.

La fréquence d'émission n'est pas significativement différente d'un groupe à l'autre.

#### **4.3.4. Conclusions**

L'examen des trois profils individuels de sécrétion de LH montre que celle-ci évolue de façon pulsatile, avec l'apparition, à des intervalles de temps irréguliers d'un pulse de sécrétion. Il n'y a pas de pic préovulatoire.

Les sécrétions moyennes lissées de LH varient peu au cours d'une même journée et d'un jour à l'autre.

Un traitement de bGHrec ne modifie ni la pulsativité d'émission, ni les sécrétions plasmatiques de la LH si ce n'est par une légère diminution des moyennes obtenues au cours des 17 jours.

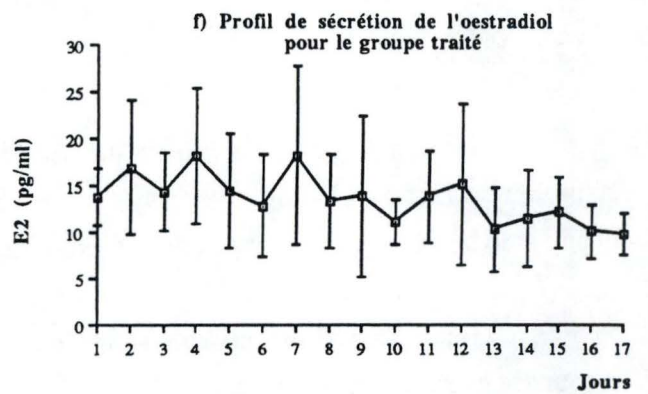
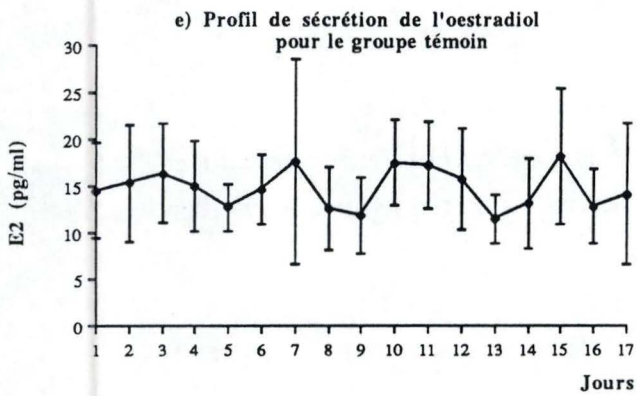
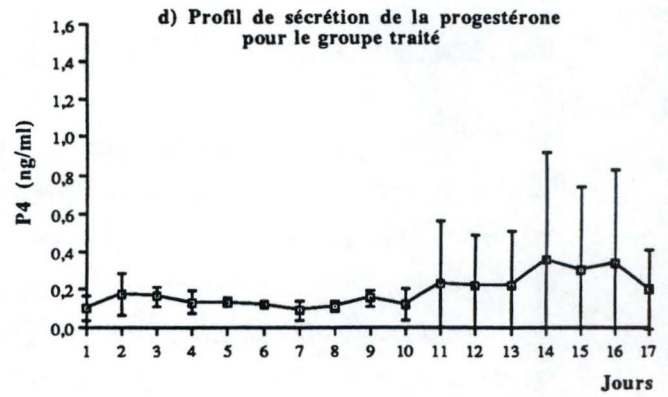
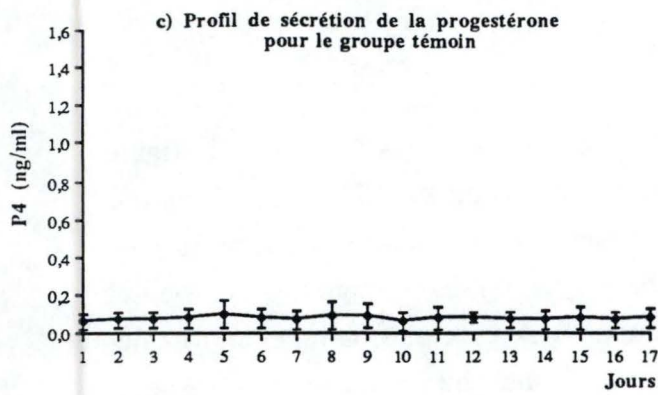
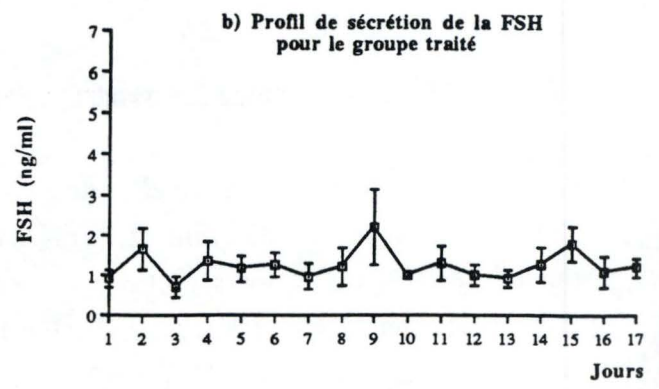
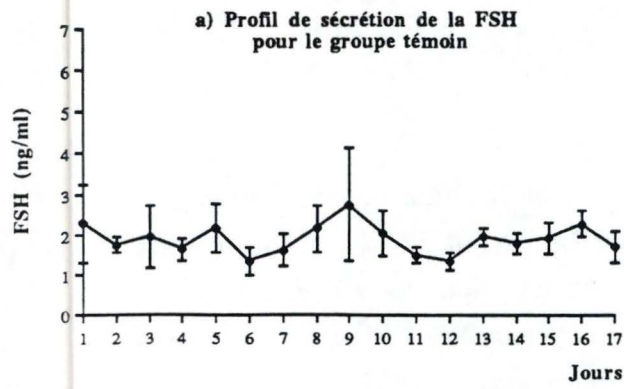


Figure R6 : Profils de sécrétion de la FSH, de la progestérone et de l'oestradiol pendant 17 jours pour les groupes de brebis témoins (a, c, e) et traitées (b, d, f) étudiées en anoestrus.

#### 4.4. Evolution des sécrétions de la FSH et des stéroïdes sexuels

Rappelons que pour la FSH et les stéroïdes sexuels, les profils de sécrétion moyens sont établis à partir des prélèvements quotidiens effectués à 8 heures. La figure R6 montre les évolutions moyennes observées; il n'y a pas de graphe individuel pour la FSH et les stéroïdes sexuels afin ne pas surcharger ce graphique.

##### 4.4.1. La FSH

Pour le **groupe de brebis témoins** (figure R6a), les sécrétions moyennes de FSH fluctuent irrégulièrement au cours de la période d'observation sans montrer d'évolution précise. Pour les 17 jours, les niveaux moyens évoluent autour d'une valeur de  $1,9 \pm 1,1$  ng/ml. En milieu de saison, cette valeur est de  $5,3 \pm 2,8$  ng/ml et les sécrétions moyennes fluctuent sous forme de 3 vagues.

Les valeurs moyennes de FSH du **groupe de brebis traitées** (figure R6b) évoluent aussi de façon irrégulière durant toute la période analysée, mais elles sont significativement inférieures ( $P < 0,05$ ) ( $1,2 \pm 0,8$  ng/ml,  $P < 0,05$ ) à celles obtenues pour le groupe témoin et pour le groupe traité en milieu de saison de reproduction ( $3,6 \pm 2,1$  ng/ml).

##### 4.4.2. La progestérone

En anoestrus, nous observons pour le **groupe témoin** (figure R6c) des taux très faibles de  $P_4$  ( $0,1 \pm 0,1$  ng/ml) caractéristiques de l'absence de corps jaunes chez les brebis.

Pour le **groupe de brebis traitées** (figure R6d) à la bGHrec, les concentrations de  $P_4$  restent faibles (de l'ordre de  $0,2 \pm 0,2$  ng/ml) sauf pour la brebis 4 qui présente une augmentation progressive des concentrations de  $P_4$  à partir du 10<sup>ème</sup> jour. Cette augmentation est responsable de l'évolution de la courbe et des écarts-type élevés. Comme pour le groupe témoin, les valeurs sont évidemment nettement inférieures à celles observées en milieu de saison ( $1,5 \pm 2,1$  ng/ml).

##### 4.4.3. L'oestradiol

Tout comme en milieu de saison, pour chacune des brebis, l'émission des oestrogènes se présente sous formes d'ondes avec, en fonction de la brebis, de un à trois maxima de concentration plasmatique au cours des 17 jours étudiés. Nous observons

une très grande variabilité individuelle au niveau de l'amplitude des fluctuations et de leur durée.

Pour le **groupe témoin** (figure R6e), les taux moyens évoluent plus ou moins régulièrement autour d'une moyenne de  $13,9 \pm 4,4$  pg/ml contre  $7,5 \pm 3,0$  pg/ml en milieu de saison.

Il en va de même pour le **groupe traité** (figure R6f), où la moyenne de sécrétion est du même ordre ( $13,0 \pm 4,8$  pg/ml). En milieu de saison, la moyenne de sécrétion est de  $6,6 \pm 3,6$  pg/ml.

#### **4.4.4. Conclusion**

Conformément à diverses observations faites au laboratoire, les émissions de FSH et d'oestradiol fluctuent de manière irrégulière en anoestrus. Leur évolution n'est pas influencée par le traitement de bGHrec mais celui-ci diminue significativement les sécrétions moyennes de FSH.

En accord avec l'absence de corps jaune en anoestrus, la concentration plasmatique de P<sub>4</sub> est très faible et stable chez le groupe témoin. Dans le groupe traité à la bGHrec, on note une augmentation importante et temporaire des concentrations de P<sub>4</sub> chez une brebis, ce qui pourrait peut-être signaler l'existence d'un cycle court.

*Tableau R7 : Caractéristiques de la sécrétion de GH en début de saison de reproduction.*

|   | Taux de base<br>ng/ml   | Moyenne totale<br>ng/ml   | Nombre de<br>pulses<br>(12 heures/brebis) |
|---|-------------------------|---------------------------|---|
| <b>17 jours</b><br>- Groupe témoin<br>- Groupe traité | 5,5 ± 1,2<br>5,4 ± 1,3  | 13,4 ± 5,4<br>14,2 ± 6,5  | /<br>/                                    |
| <b>Jour 9</b><br>- Groupe témoin<br>- Groupe traité   | 9,3 ± 1,5<br>18,6 ± 3,8 | 12,9 ± 3,8<br>30,9 ± 13,2 | 1,8 ± 1,5<br>2,4 ± 1,1                    |
| <b>Jour 16</b><br>- Groupe témoin<br>- Groupe traité  | 9,5 ± 2,6<br>13,7 ± 4,4 | 18,2 ± 8,9<br>26,9 ± 10,9 | 2,3 ± 1,7<br>1,4 ± 2,3                    |

## **5. Résultats obtenus au début de la saison de reproduction**

### **5.1. Evolution des concentrations plasmatiques et de la pulsativité de la GH**

Le tableau R7 reprend les résultats concernant l'étude des sécrétions moyennes et pulsatives de la GH sur cinq brebis témoins et cinq brebis traitées à la bGHrec. La figure R7 donne diverses évolutions des concentrations plasmatiques de GH.

#### **5.1.1. Analyse des sécrétions de GH durant 17 jours**

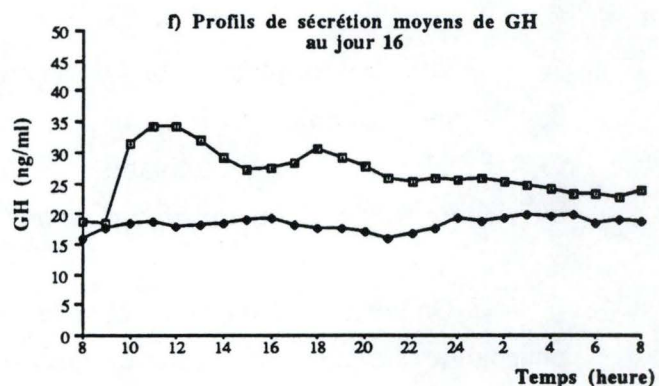
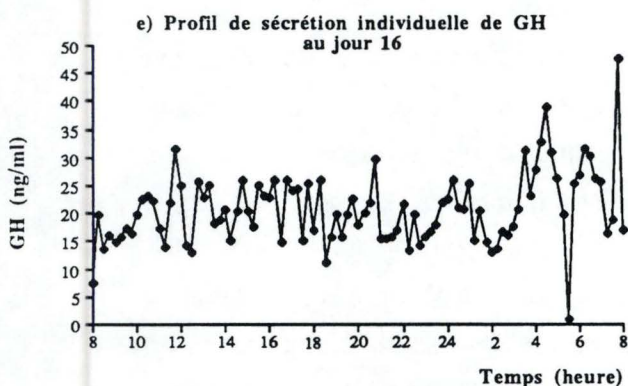
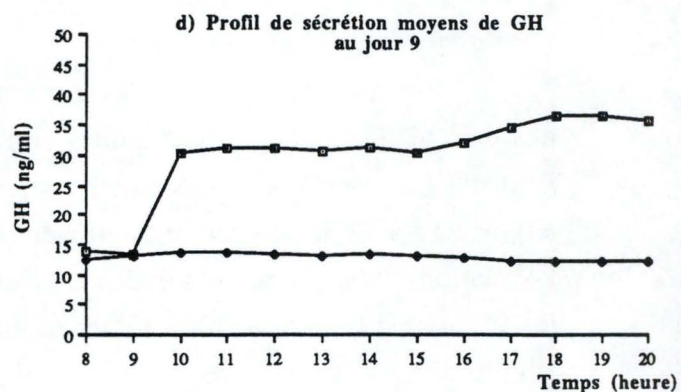
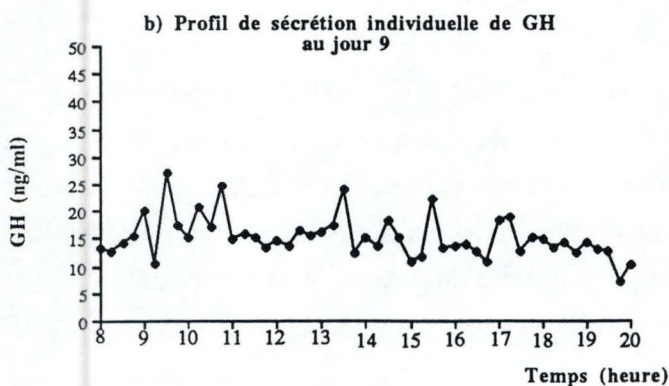
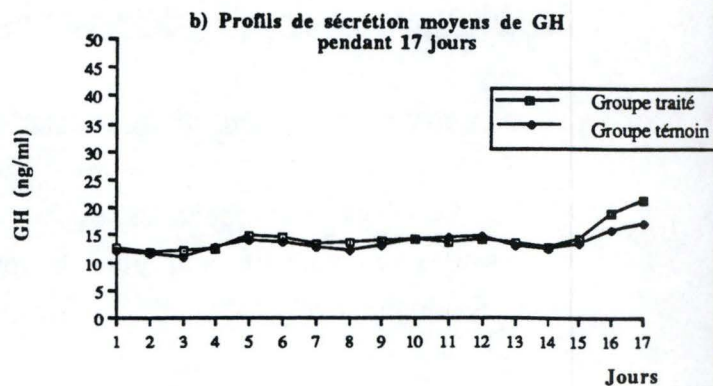
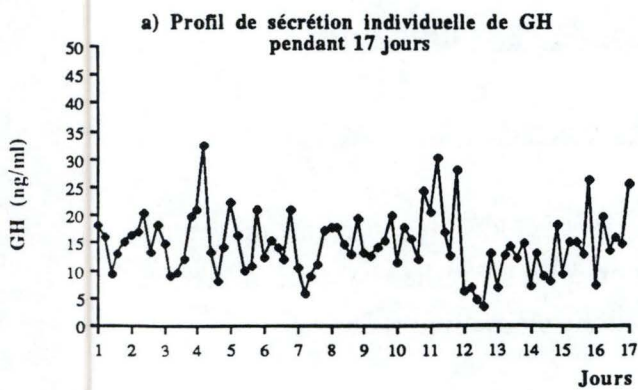
Chez toutes les brebis, les sécrétions de GH fluctuent fortement d'une prise de sang à l'autre. La figure R7a illustre à titre d'exemple le profil de sécrétion individuel pour la brebis 10 et confirme l'irrégularité de l'émission de GH.

Les moyennes lissées des 2 groupes de brebis (figure R7b) obtenues à partir des prélèvements sanguins effectués entre 8 et 9 heures diffèrent peu d'un groupe à l'autre. Pour les 2 groupes (mais surtout pour le groupe traité), on constate une augmentation de la concentration moyenne en fin de phase folliculaire jusqu'au jour de l'ovulation. Nous avons observé une augmentation similaire en milieu de saison pour les 2 groupes (figure R1b) alors qu'en anoestrus seul le groupe traité présente cette augmentation (figure R4b).

La courbe lissée des moyennes du **groupe témoin** varie peu au cours des 17 jours. Le taux plasmatique moyen et le taux de base sont respectivement de  $13,4 \pm 5,4$  ng/ml et  $5,5 \pm 1,2$  ng/ml (tableau R7). Ces valeurs sont inférieures à celles du même groupe en milieu de saison (tableau R1).

Pour le **groupe traité** aussi, la courbe lissée des moyennes varie peu au cours des 17 jours. Les valeurs des taux plasmatiques moyens ( $14,2 \pm 6,5$  ng/ml) et basaux ( $5,4 \pm 1,3$  ng/ml) sont semblables à celles du groupe témoin (tableau R7) mais inférieures à celles du même groupe en milieu de saison (tableau R1).

On notera que sur l'ensemble de la période, les valeurs observées pour les taux plasmatiques moyens et basaux de GH sont chez les brebis témoins comparables en anoestrus (tableau R4) et en début de saison de reproduction (tableau R7). Par contre, en milieu de saison, ces valeurs sont plus élevées (tableau R1).



*Figure R7 : Evolution des profils de sécrétions individuelles et lissées de la GH pendant 17 jours (a et b), pendant 12 heures au jour 9 (c et d) et pendant 24 heures au jour 16 (e et f) du cycle en début de saison de reproduction.*

### 5.1.2. Analyse des sécrétions de GH pendant 12 heures au jour 9

Au cours de la journée, les sécrétions individuelles de GH se présentent sous forme pulsatile et intermittente comme l'illustre le profil de la brebis 10 (figure R7c).

Les moyennes lissées des 2 groupes de brebis sont différentes d'un groupe à l'autre durant les 12 heures de prises de sang (figure R7d)

L'analyse de la courbe lissée du **groupe témoin** laisse apparaître des moyennes variant très peu d'heure en heure. Le taux plasmatique moyen et le taux de base sont respectivement de  $12,9 \pm 3,8$  ng/ml et  $9,3 \pm 1,5$  ng/ml (tableau R7). Ces valeurs sont supérieures pour le même groupe en milieu de saison (tableau R1).

Pour le **groupe de brebis traitées**, l'analyse de la courbe lissée révèle des fluctuations importantes au cours des 12 heures. Comme le montre la figure R7d, une injection de bGHrec à 9 heures provoque une nette augmentation de la concentration plasmatique de l'hormone de croissance qui subsiste jusqu'à 17 heures. Un second traitement administré à cette heure provoque une nouvelle augmentation moins prononcée. Le tableau R7 laisse apparaître des taux plasmatiques moyens ( $30,9 \pm 13,2$  ng/ml) et basaux ( $18,6 \pm 3,8$  ng/ml) significativement supérieurs ( $P < 0,05$ ) à ceux du groupe témoin mais inférieurs pour le même groupe en milieu de saison (tableau R1).

La fréquence d'émission de la GH ne semble pas modifiée par le traitement à la bGHrec.

### 5.1.3. Analyse des sécrétions de GH pendant 24 heures au jour 16

Comme au jour 9, les sécrétions individuelles de GH (figure R7e) se présentent sous une forme pulsatile et intermittente.

Les moyennes lissées des 2 groupes de brebis sont différentes d'un groupe à l'autre durant les 24 heures de prises de sang (figure R7f).

La courbe lissée (figure R7f) montre que les sécrétions moyennes de GH du **groupe témoin** varient peu au cours des 24 heures de prises de sang. Le taux plasmatique moyen et le taux de base sont respectivement de  $18,2 \pm 8,9$  ng/ml et  $9,5 \pm 2,6$  ng/ml (tableau R7). Ces valeurs sont comparables à celles observées pour le même groupe en milieu de saison (tableau R1).

Pour le groupe de **brebis traitées**, l'analyse de la courbe lissée révèle des fluctuations au cours des 24 heures. L'administration de bGHrec à 9 heures provoque une forte augmentation des niveaux de GH (figure R7f). Après la seconde injection (17 heures), l'augmentation observée est moindre. Ces concentrations diminuent ensuite, mais 15 heures après le traitement, elles restent sensiblement plus élevées que celles du groupe témoin (ce qui est confirmé par la figure R7b) alors que ce n'était pas le cas les 15 jours précédents. Autrement dit, du jour 1 au jour 15, les effets de l'injection de GH ont disparu après 15 heures, mais pas au jour 16 et 17. En milieu de saison, l'effet de la GH est d'au moins 15 heures contre 8 heures pour l'anoestrus.

La fréquence d'émission ne semble pas être modifiée par le traitement à la bGHrec.

#### 5.1.4. Conclusions

Comme en anoestrus et au milieu de la saison de reproduction, les profils de sécrétion de la GH présentent une variabilité individuelle élevée et une pulsativité irrégulière. Par contre, les moyennes lissées de cette même hormone évoluent très peu au cours d'une même journée. Durant le cycle oestral, les profils de sécrétion ne montrent pas de variations bien nettes si ce n'est une augmentation en fin de phase folliculaire; augmentation également observée en milieu de saison.

Les profils de sécrétion réalisés aux jours 9 et 16 du cycle oestral montrent que l'hormone de croissance administrée *in vivo* augmente fortement les concentrations plasmatiques de la GH durant les heures qui suivent l'administration du traitement. Les injections de GH réalisées à 9 heures augmentent nettement les taux alors que cette augmentation est plus modeste après la seconde injection quotidienne fixée à 17 heures. Ces effets s'atténuent mais sont encore présents après 15 heures au jour 16 alors que les jours précédents ces effets ont disparu après 15 heures.

Tout comme en milieu de saison et en anoestrus, un traitement à la bGHrec ne semble pas modifier la pulsativité d'émission de la GH.

*Tableau R8: Caractéristiques des différents paramètres morphologiques de la croissance folliculaire terminale en début de saison de reproduction pour les groupes de brebis témoins et traitées.*

|   | <b>Gr. de brebis témoins</b> | <b>Gr. de brebis traitées</b> |
|---|------------------------------|-------------------------------|
| <b>Nombre de follicules recrutés</b>                  | 8,8 ± 3,0                    | 13,2 ± 5,0                    |
| <b>Pourcentage d'atrésie due à la sélection</b>       | 52%                          | 45%                           |
| <b>Nombre de follicules sélectionnés</b>              | 4,2 ± 2,6                    | 7,2 ± 1,5                     |
| <b>Pourcentage d'atrésie due à la dominance</b>       | 47%                          | 58%                           |
| <b>Nombre de follicules dominants</b>                 | 2,2 ± 1,1                    | 3,0 ± 2,0                     |
| <b>Tailles moyennes des follicules dominants (mm)</b> | 5,7 ± 0,5                    | 5,2 ± 0,5                     |
| <b>Taux d'ovulation</b>                               | 1,0 ± 0,0                    | 1,7 ± 0,6                     |

## 5.2. Effets d'un traitement de bGHrec sur la croissance folliculaire et sur les taux d'ovulation

Le tableau R8 présente différentes caractéristiques de la croissance folliculaire terminale pour les groupes de brebis témoins et traitées à la bGHrec lors de la troisième vague de croissance folliculaire du cycle oestral en début de saison de reproduction.

Les nombres de follicules recrutés, sélectionnés et dominants sont respectivement pour le **groupe témoin** de  $8,8 \pm 3,0$ ;  $4,2 \pm 2,6$  et  $2,2 \pm 1,1$ . Ces valeurs sont au moins aussi importantes qu'en milieu de saison. Les pourcentages d'atrésie due à la sélection et à la dominance sont proches l'un de l'autre : ils sont respectivement de 52% et 47%. Nous constatons que sur  $2,2 \pm 1,1$  follicules dominants, seulement  $1,0 \pm 0,0$  aboutit à l'ovulation, ce qui correspond à un pourcentage d'atrésie de 54%. En milieu de saison, le taux d'ovulation est supérieur ( $1,2 \pm 1,5$ ). Parmi les cinq brebis constituant ce groupe, une n'a pas ovulé, même durant les quelques jours suivant le moment présumé de l'ovulation.

Pour le **groupe de brebis traitées**, les nombres moyens de follicules recrutés, sélectionnés et dominants sont supérieurs à ceux observés chez le groupe témoin mais de façon non significative. Le pourcentage d'atrésie des follicules recrutés (45%) est plus faible que celui d'atrésie des follicules sélectionnés (58%). Parmi les  $3,0 \pm 2,0$  follicules dominants,  $1,7 \pm 0,6$  parviennent à l'ovulation, ce qui correspond à un pourcentage d'atrésie de 40%. Le taux d'ovulation est plus important que pour le groupe témoin. Parmi les cinq brebis traitées, deux n'ont pas ovulé. Les valeurs observées en milieu de saison pour le même groupe sont au moins aussi importantes et avec un taux d'ovulation significativement supérieur ( $2,2 \pm 0,4$ ) ( $P < 0,05$ ).

Les injections quotidiennes de bGHrec paraissent, comme en milieu de saison et en anoestrus, augmenter la croissance folliculaire terminale. En effet, le nombre de follicules recrutés est plus élevé et la sélection qui s'opère sur eux entraîne moins d'atrésie. Par contre, le pourcentage d'atrésie due à la dominance est plus important. Le nombre de follicules dominants qui parviennent à l'ovulation est plus élevé mais le traitement ne les conduit pas tous à l'ovulation contrairement au milieu de saison.

On remarque que, excepté pour le taux d'ovulation, les valeurs relatives à la croissance folliculaire terminale sont proches en anoestrus (tableau R5) et en début de saison de reproduction (tableau R8). En milieu de saison, c'est principalement le taux d'ovulation élevé qui se distingue de celui des 2 autres périodes.

*Tableau R9 : Caractéristiques de la sécrétion de LH en début de saison de reproduction.*

|  | Taux de base<br>ng/ml  | Moyenne totale<br>ng/ml | Nombre de<br>pulses<br>(12 heure/brebis) |
|--|------------------------|-------------------------|--|
| <b>Durant 17 jours</b><br>- groupe témoin<br>- groupe traité   | 0,2 ± 0,0<br>0,2 ± 0,0 | 0,9 ± 0,8<br>0,9 ± 0,6  | /<br>/                                   |
| <b>Durant le jour 9</b><br>- groupe témoin<br>- groupe traité  | 0,2 ± 0,1<br>0,3 ± 0,1 | 0,7 ± 0,5<br>0,6 ± 0,6  | 1,5 ± 1,9<br>1,0 ± 0,7                   |
| <b>Durant le jour 16</b><br>- groupe témoin<br>- groupe traité | 0,6 ± 0,2<br>0,3 ± 0,1 | 1,0 ± 0,5<br>0,7 ± 0,3  | 1,3 ± 1,0<br>2,2 ± 1,6                   |

### 5.3. Evolution des sécrétions moyennes et pulsatiles de la LH

Le tableau R9 reprend les résultats concernant les taux plasmatiques moyens et basaux de la LH sur cinq brebis témoins et cinq brebis traitées à la bGHrec.

La figure R8 illustre l'évolution des profils de sécrétion individuels et moyens de la LH pour les deux groupes, témoin et traité.

#### 5.3.1. Evolution des sécrétions de LH pendant 17 jours

La figure R8a illustre le profil de sécrétion de la LH pour la brebis 10; ce profil fluctue irrégulièrement d'une prise de sang à l'autre.

Bien que les sécrétions individuelles soient irrégulières, les moyennes lissées de sécrétion des groupes témoin et traité varient peu au cours de la période étudiée (figure R8b). On n'observe donc pas de pic préovulatoire.

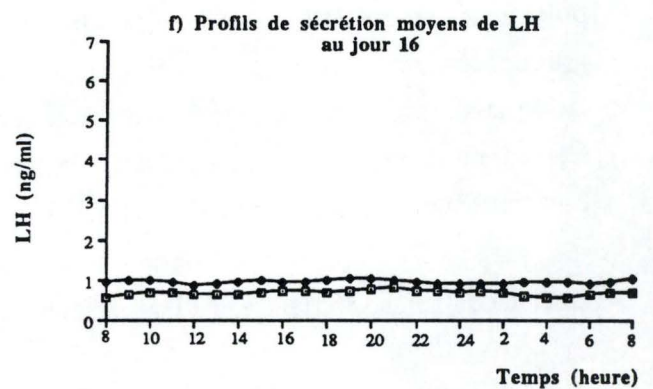
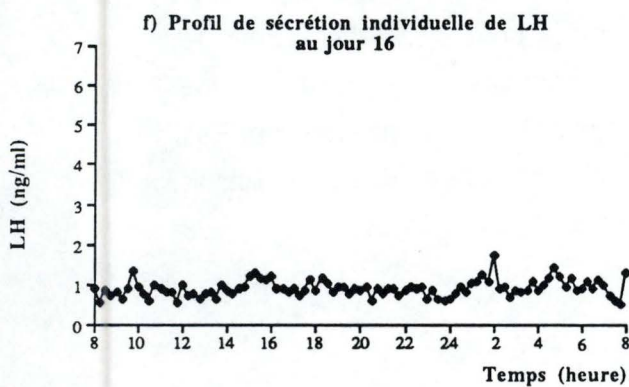
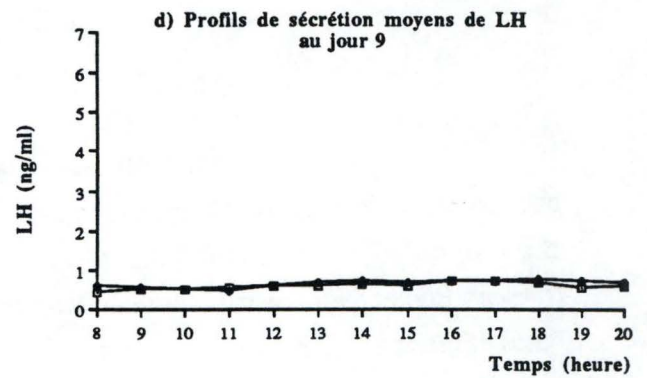
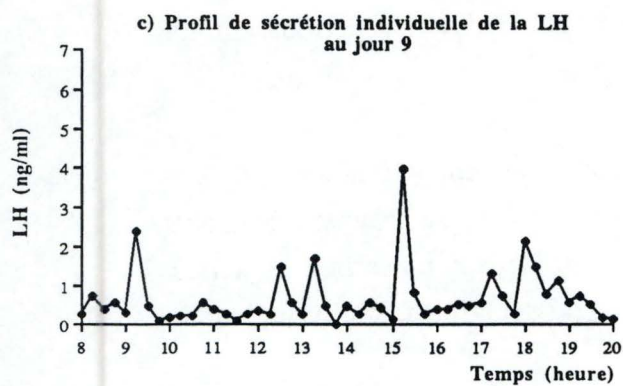
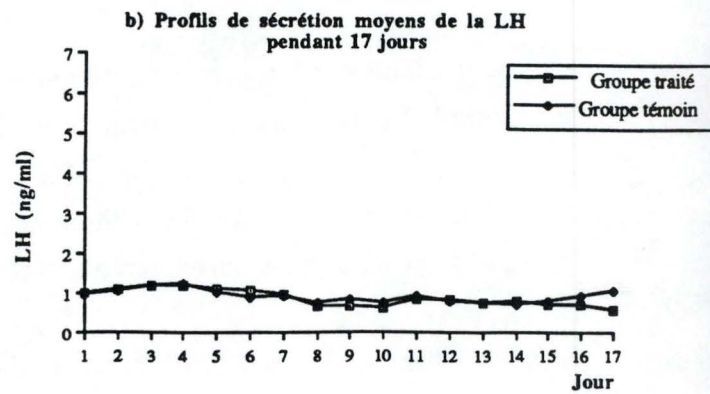
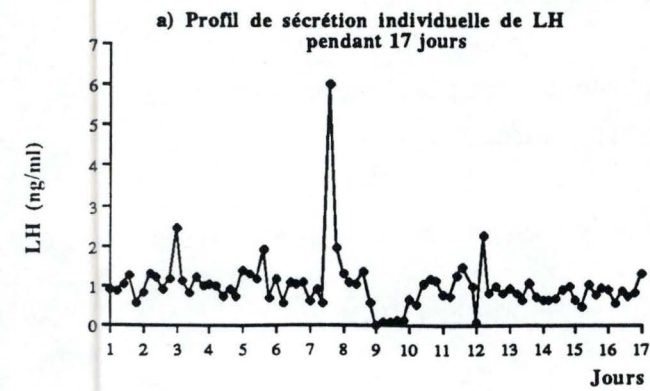
Le tableau R9 montre que les taux plasmatiques moyens ( $0,9 \pm 0,8$  ng/ml) et basaux ( $0,2 \pm 0,0$  ng/ml) du groupe traité sont équivalents à ceux du groupe témoin ( $0,9 \pm 0,6$  ng/ml et  $0,2 \pm 0,0$  ng/ml). On remarque que par rapport au milieu de saison (tableau R3) et à l'anoestrus (tableau R6), les valeurs paraissent plus faibles pour le taux basal et comparables pour les autres paramètres.

#### 5.3.2. Evolution des sécrétions de LH pendant le jour 9

Les sécrétions individuelles de LH obtenues pour la brebis de référence (figure R8c) confirment la pulsatilité et l'irrégularité de l'émission de LH. Malgré cette pulsatilité irrégulière, les sécrétions moyennes calculées pour toutes les brebis des groupes témoin et traité sur une période de 12 heures varient très peu (figure R8d). Les taux plasmatiques moyens et basaux sont semblables pour les 2 groupes (tableau R9). Ces valeurs sont inférieures à celles observées pour les 2 groupes en milieu de saison. La fréquence d'émission de LH n'est pas différente d'un groupe à l'autre.

#### 5.3.3. Evolution des sécrétions de LH pendant le jour 16

En cours de journée, les sécrétions individuelles de LH obtenues pour la brebis de référence (figure R8e) confirment la pulsatilité et l'irrégularité de l'émission de LH. Les sécrétions moyennes calculées pour toutes les brebis des groupes témoin et traité sur une période de 24 heures varient peu (figure R8f). Les taux plasmatiques moyens ( $1,0 \pm 0,5$



**Figure R8 :** Evolution des profils de sécrétions individuelles et lissées de la LH pendant 17 jours (a et b), pendant 12 heures au jour 9 (c et d) et pendant 24 heures au jour 16 (e et f) du cycle en début de saison de reproduction.

ng/ml) et basaux ( $0,6 \pm 0,2$  ng/ml) du groupe témoin sont supérieurs à ceux du groupe traité ( $0,7 \pm 0,3$  ng/ml et  $0,3 \pm 0,1$  ng/ml) (tableau R9). Ces valeurs sont inférieures à celles observées pour les 2 groupes en milieu de saison (tableau R3).

Au jour 16, aucune brebis ne présente le pic préovulatoire de LH. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène. Selon une première, les 10 brebis ont déjà présenté ou vont présenter le pic préovulatoire de LH. Une seconde hypothèse serait d'admettre que les 10 brebis réservées à l'étude de l'évolution des différents profils endocriniens soient encore en anoestrus. Cette dernière hypothèse paraît la plus probable étant donné que, parmi ces 10 brebis, une seule a présenté un profil de sécrétion de P<sub>4</sub> caractéristique de la présence d'un corps jaune. Cependant, parmi les 10 autres brebis réservées à l'étude de l'évolution des croissances folliculaires, 7 ont ovulé.

Le traitement ne semble pas modifier significativement la pulsativité d'émission de la LH.

#### 5.3.4. Conclusions

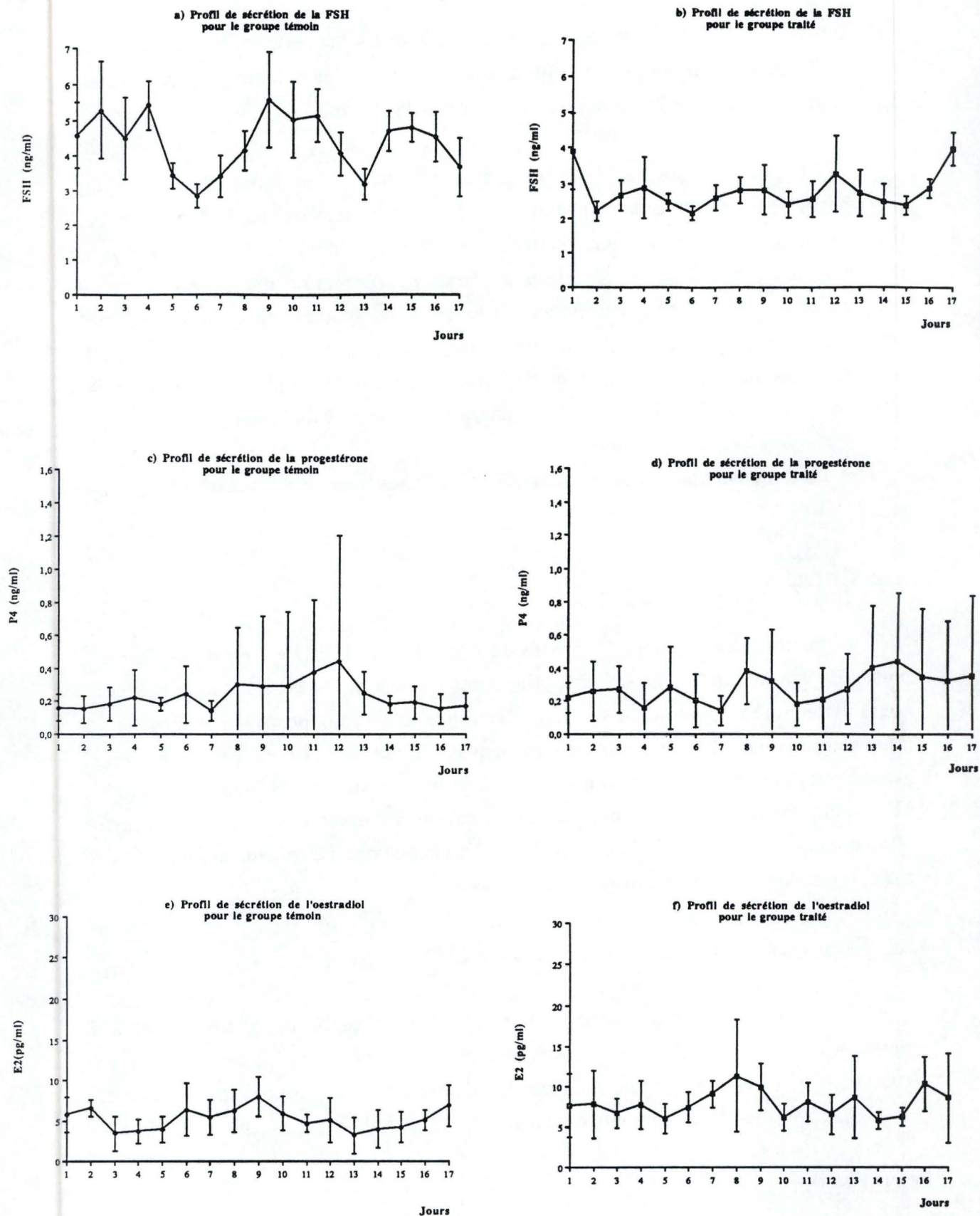
Au cours des différentes phases du cycle étudié, la LH est émise de façon pulsatile. Malgré cette émission irrégulière, les moyennes lissées ne varient pas au cours d'une même journée et durant l'entièreté du cycle oestral. Aucun pic préovulatoire n'est observé. Les taux moyens et basaux de LH obtenus au sein des groupes témoin et traité sont proches. Un traitement de bGHrec administré quotidiennement n'engendre pas de modification au niveau des concentrations plasmatiques moyennes de la LH ni à celui de leur évolution. Le traitement ne modifie pas non plus la pulsativité d'émission de l'hormone.

#### 5.4. Evolution des sécrétions de FSH et des stéroïdes sexuels

Rappelons que pour la FSH et les stéroïdes sexuels, les profils moyens de sécrétion sont établis à partir des prélèvements quotidiens effectués à 8 heures. La figure R9 montre les évolutions moyennes observées; il n'y aura pas de graphe individuel pour la FSH et les stéroïdes sexuels afin ne pas surcharger ce travail de graphique.

##### 5.4.1. La FSH

Les niveaux plasmatiques moyens de FSH du **groupe témoin** (figure R9a) montrent une évolution sous forme de trois vagues au cours du cycle oestral comme en milieu de saison. Les deux premières ont lieu pendant la phase lutéale et durent de 5 à



**Figure R9 :** Profils de sécrétion de la FSH, de la progestérone et de l'oestradiol pendant 17 jours pour les groupes de brebis témoins (a, c, e) et traitées (b, d, f) étudiées en début de saison de reproduction.

7 jours chacune. La troisième vague commence pendant la phase folliculaire (jour 13) pour se terminer au jour 17. Les concentrations plasmatiques moyennes sont de  $4,4 \pm 1,7$  ng/ml contre  $5,3 \pm 2,8$  ng/ml en milieu de saison.

Le **groupe de brebis traitées** (figure R9b) présente une moyenne de sécrétion inférieure ( $2,8 \pm 1,2$  ng/ml) à celle du groupe témoin et la différence est significative ( $P < 0,05$ ). Au sein de ce groupe, nous n'avons pas pu mettre en évidence de fluctuations de la FSH sous forme de vagues. Toutefois, la concentration plasmatique moyenne augmente en fin de phase folliculaire. En milieu de saison, la moyenne de sécrétion est aussi inférieure ( $3,6 \pm 2,1$  ng/ml) et il n'y a pas les deux premières vagues de la phase folliculaire.

Un traitement de bGHrec administré quotidiennement modifie le profil de sécrétion de la FSH en diminuant les concentrations plasmatiques moyennes et en supprimant les trois vagues de sécrétion. En milieu de saison, les 2 premières vagues seulement sont supprimées pour quatre brebis sur cinq.

#### 5.4.2. La progestérone

En début de saison de reproduction, nous obtenons, **au sein du groupe témoin** (figure R9c), des concentrations plasmatiques moyennes de  $0,3 \pm 0,3$  ng/ml. Ces concentrations restent faibles durant l'entièreté du cycle sauf pour la brebis 10 dont les sécrétions moyennes augmentent à partir du 8<sup>ème</sup> jour. En milieu de saison, les concentrations plasmatiques moyennes sont de  $0,8 \pm 1,2$  ng/ml et le profil de sécrétion indique que les brebis sont en cycle régulier (figure R3c).

Les concentrations moyennes de P<sub>4</sub> sont, pour le **groupe traité** (figure R9d), de  $0,2 \pm 0,3$  ng/ml. Comme pour le groupe témoin, ces concentrations restent faibles durant l'entièreté du cycle sauf pour la brebis 4 qui présente une augmentation des taux de P<sub>4</sub> à partir du 4<sup>ème</sup> jour du cycle. En milieu de saison, les concentrations plasmatiques sont de  $1,5 \pm 2,1$  ng/ml et le profil de sécrétion est caractéristique d'un cycle régulier (figure R3d).

#### 5.4.3. L'oestradiol

Les sécrétions d'E<sub>2</sub> fluctuent autour d'une moyenne de  $5,2 \pm 2,4$  pg/ml pour le **groupe témoin** (figure R9e). Nous observons une très grande variabilité individuelle au niveau de l'amplitude des fluctuations et de leur durée. En milieu de saison, la moyenne est supérieure ( $7,5 \pm 3,0$  pg/ml)

Cette variabilité individuelle importante se retrouve chez le **groupe de brebis traitées** (figure R9f) où les sécrétions plasmatiques moyennes d'E<sub>2</sub> présentent une moyenne de sécrétion supérieure ( $7,9 \pm 3,5$  pg/ml) à celle du groupe témoin. En milieu de saison, la moyenne est plus faible ( $6,6 \pm 3,6$  pg/ml).

#### 5.4.4. Conclusions

Par rapport à l'anoestrus, le début de la saison de reproduction est marqué, chez les brebis témoins par une émission de FSH sous forme de vagues. Le traitement à la bGHrec supprime ou atténue ces vagues et diminue les concentrations plasmatiques tout comme en milieu de saison.

Pour les deux groupes, les profils de progestérone (P<sub>4</sub>) indiquent que 4 brebis ne sont pas encore en cycle régulier. Tout au plus peut-on noter que des corps jaunes de courte durée apparaissent chez une brebis de chaque groupe.

Contrairement à ce qui est observé en milieu de saison et en anoestrus, un traitement à la bGHrec semble favoriser la production d'E<sub>2</sub>.

## **6. Discussion**

### **6.1. Effets de l'expérimentation sur la croissance folliculaire et les profils endocriniens**

Nous savons par la littérature qu'une situation perturbant le bien-être de l'animal peut influencer les sécrétions hormonales ou encore le taux d'ovulation.

Chez les brebis, le stress associé au changement d'habitat réduit la fréquence des pulses de LH (Rawlings et Cook, 1991). Une température ambiante élevée ainsi que des endoscopies répétées altèrent l'émission de GnRH et retardent ou bloquent l'ovulation (Przekop *et al.*, 1984). Par contre Jacques (1989) ne détecte aucune modification du taux d'ovulation et de la durée du cycle oestral lorsque des endoscopies sont réalisées quotidiennement pendant 17 jours chez des brebis Texel et ce, par rapport à des brebis n'ayant qu'une endoscopie le jour de l'ovulation. Chez les brebis Merino, les expériences de Adams et collaborateurs (1993) ont montré que des prises de sang répétées augmentaient les concentrations plasmatiques de LH et FSH durant tout le cycle oestral si elles étaient réalisées dans des conditions stressantes.

Afin d'éviter tous ces facteurs stressants et sachant que le système endocrinien s'adapte très vite à ces facteurs, les brebis sont rentrées en bergerie 14 jours avant le début de chaque expérience; les prises de sang ainsi que les endoscopies ont toujours été effectuées par les mêmes expérimentateurs et dans des conditions photopériodiques et de températures calquées aux conditions extérieures.

Pour preuve de situations non stressantes, nos profils endocriniens de LH, FSH, P<sub>4</sub> et E<sub>2</sub> sont conformes aux résultats de Noël (1994) obtenus à partir d'expériences réalisées en conditions naturelles lors de chaque état physiologique retenu.

### **6.2. Evolution des sécrétions naturelles de GH**

#### **6.2.1. Effets du nyctémère et de l'alimentation**

La littérature renseigne que l'alimentation a un effet inhibiteur sur la pulsativité et les sécrétions moyennes de la GH chez la brebis (Driver et Forbes, 1981; Estienne *et al.*, 1989; Hua *et al.*, 1993); notre expérience préliminaire confirme cet effet inhibiteur.

Le nyctémère influence également l'émission de GH. En effet, il est bien connu que chez l'homme, la pulsativité d'émission et la concentration moyenne de GH sont plus élevées durant la nuit (Baxter et Cowell, 1987; Wilson et Foster, 1992). Ceci

est confirmé lors de notre expérience préliminaire. En effet, pour le groupe alimenté à 9 heures et placé en phase d'obscurité à 18 heures, la fréquence des pulses (significatif,  $P < 0,05$ ) et les concentrations moyennes augmentent en phase d'obscurité; l'amplitude des pulses et la moyenne des taux maximums ne diffèrent pas entre le jour et la nuit. Lorsque, comme c'est le cas pour le deuxième groupe de l'expérience préliminaire, les aliments sont distribués peu avant le début de l'obscurité, les effets des deux facteurs précités s'annulent et l'émission de GH reste relativement stable.

### 6.2.2. Evolution pendant le cycle

Le cycle de référence de la brebis est celui du milieu de la saison de reproduction. Etant donné le temps de demi-vie relativement court de la GH et son mode de sécrétion pulsatile, une étude complète de son profil de sécrétion plasmatique demande un nombre d'échantillons sanguins très élevé. C'est la raison pour laquelle les profils de sécrétion de l'hormone de croissance ne sont généralement analysés que sur une période de quelques heures. Rares sont les auteurs qui ont étudié l'évolution de cette hormone durant l'entièreté du cycle oestral.

Quelques éléments de la littérature renseignent toutefois que chez certaines espèces, les sécrétions moyennes de GH varient au cours des deux phases du cycle oestral, alors qu'elles restent constantes pour d'autres espèces. C'est ainsi que chez la vache, les sécrétions moyennes et pulsatiles de GH ne varient pas entre la phase lutéale et la phase folliculaire (Gong *et al.*, 1993). En revanche, chez le rat et la femme, une augmentation des sécrétions de GH en fin de cycle est observée (McIntosh *et al.*, 1988; Ovesen *et al.*, 1992). De même que chez la brebis, Petters et collaborateurs (1989) ont mis en évidence des niveaux de GH significativement supérieurs durant le 17<sup>ème</sup> jour du cycle par rapport au premier jour. En accord avec les résultats obtenus par Petters et collaborateurs (1989), le taux plasmatique moyen que nous avons obtenu reste constant durant la plupart du cycle pour augmenter légèrement en fin de phase folliculaire. La pulsatilité de la GH n'est, quant à elle, pas significativement différente entre la phase lutéale et la phase folliculaire du cycle.

La GH, comme beaucoup d'autres hormones polypeptidiques est produite par l'hypophyse. Celle-ci est constituée d'une population de cellules capables de modifier leur synthèse en présence des stéroïdes appropriés provenant des gonades (Frohman *et al.*, 1992). Chez les bovins, les proportions de cellules somatotropes et somatomammotropes produisant de la GH ne varient pas au cours des différentes phases du cycle oestral sauf lors d'un traitement à l'E<sub>2</sub> pendant lequel la proportion de cellules somatomammotropes est supérieure à celle des cellules somatotropes (Kineman *et al.*,

1991). Ces proportions pourraient aussi varier chez la brebis qui présente, en milieu de saison de reproduction, une légère augmentation des sécrétions de GH avant l'oestrus.

### 6.2.3. Evolution en fonction de la saison

Les concentrations plasmatiques de GH, en plus de varier au cours des différentes phases du cycle oestral, peuvent aussi évoluer en cours d'année. Notre propre recherche constitue à notre connaissance, la première description complète de l'évolution des sécrétions de l'hormone de croissance pendant la durée d'un cycle oestral chez la brebis se trouvant dans les différents états physiologiques saisonniers.

Les sécrétions basales et moyennes de l'hormone de croissance sont les plus élevées au milieu de la saison de reproduction. Elles sont les plus faibles en anoestrus et remontent en début de saison de reproduction mais sans atteindre les valeurs du milieu de saison. La pulsativité par contre ne semble pas être modifiée par la saison.

Parmi les différentes variables saisonnières, la photopériode est un facteur pouvant intervenir dans la régulation des sécrétions de la GH. Une augmentation de la durée de la phase d'obscurité en milieu de saison de reproduction pourrait être en partie responsable des sécrétions de GH plus élevées durant cette période. Bocquier et collaborateurs (unpublished) ont étudié les effets de variations photopériodiques sur les sécrétions de GH à partir de deux groupes de brebis soumis à deux photopériodes différentes (soit longue, soit courte). Il ressort de cette étude que les sécrétions basales, les sécrétions moyennes, l'amplitude et la fréquence des pulses de GH ne varient pas d'un groupe à l'autre. Quant à notre propre expérimentation, elle montre que les sécrétions de l'hormone de croissance augmentent lorsque les brebis sont soumises à des conditions d'obscurité plus longues, c'est-à-dire en milieu et début de saison de reproduction. On ne peut donc pas exclure les variations photopériodiques comme variable influençant à long terme les mécanismes de régulation de la sécrétion de la GH.

Tout ce qui vient d'être dit jusqu'à présent prouve que les résultats obtenus pour les brebis témoins sont en accord avec la littérature, et confirme tous les travaux déjà réalisés au sein du laboratoire. Forts de ces constatations, nous pouvons maintenant nous intéresser au groupe de brebis soumis au traitement de bGHrec.

### 6.3. Effets d'un traitement à la bGHrec sur les concentrations plasmatiques de GH

Quel que soit l'état physiologique étudié, une injection de bGHrec augmente temporairement les concentrations plasmatiques moyennes de l'hormone de croissance sans modifier la pulsativité d'émission de l'hormone. L'effet du traitement se fait sentir pendant une période variable durant chacune des phases étudiées.

En milieu de saison, le traitement de bGHrec provoque une augmentation nette des concentrations plasmatiques de GH durant l'entièreté du cycle. L'effet du traitement se poursuit au moins durant 15 heures.

En anoestrus, l'effet du traitement ne dure que 7 à 9 heures, ceci explique les faibles différences obtenues entre les groupes traité et témoin durant l'entièreté du cycle.

En début de saison, du jour 1 jusqu'au début de la phase folliculaire, l'effet du traitement de bGHrec dure moins de 15 heures. Par contre, en fin de phase folliculaire, cet effet se maintient au moins 15 heures.

Il est intéressant de constater, ici, l'effet de la saison sur la "disparition" de l'hormone de croissance. Il semblerait que plus on avance dans la saison et plus la dégradation de l'hormone de croissance est lente. Toutefois, pour le début de saison, cette dégradation se ferait moins sentir en fin de phase folliculaire.

A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle observation est faite.

### 6.4. Effets d'un traitement à la bGHrec sur les croissances folliculaires et les taux d'ovulation

En milieu de saison, le traitement à la bGHrec a deux effets principaux : un taux d'ovulation ( $2,2 \pm 0,4$ ) significativement supérieur ( $P < 0,05$ ) à celui des brebis témoins ( $1,2 \pm 0,4$ ) et l'apparition quotidienne d'un nombre important de petits follicules de diamètre inférieur à 2 mm. En plus, nous observons chez les brebis traitées une croissance folliculaire terminale caractérisée par un plus grand nombre de follicules recrutés, sélectionnés et dominants.

Aussi bien en début de saison de reproduction qu'en anoestrus, nous observons chez les brebis traitées à la bGHrec une croissance folliculaire terminale également caractérisée par un plus grand nombre de follicules recrutés, sélectionnés et dominants. Si la plupart de ces follicules s'atrévient et ne parviennent pas à l'ovulation, un effet

favorable de la bGHrec est néanmoins observable sur le taux d'ovulation en début de saison de reproduction; celui-ci est de  $1,7 \pm 0,6$  contre  $1,0 \pm 0,0$  pour le groupe témoin. En anoestrus, le traitement ne permet pas d'induire des ovulations.

Les effets de la GH sur les croissances folliculaires et les taux d'ovulation ont été étudiés par divers auteurs et les résultats publiés sont parfois contradictoires par rapport aux nôtres.

Selon Gong et collaborateurs (1993), une simple injection de GH (320 mg) durant le cycle oestral de la vache augmente de façon significative le nombre de follicules recrutés alors que la sélection, la dominance folliculaire et les taux d'ovulation des animaux traités ne sont pas modifiés. Cognié et collaborateurs (communication orale) confirment ces observations en administrant de la GH recombinante porcine à des brebis pendant la phase folliculaire du cycle oestral. Suite à ce traitement, le nombre de follicules recrutés augmente alors que la réponse ovulatoire ne varie pas. Par contre, la truie présente une augmentation du taux d'ovulation suite à un traitement quotidien de GH durant l'entièreté du cycle (Kirkwood *et al.*, 1988). Chez les bovins, un traitement de GH suivi d'une injection de PMSG (gonadotropine possédant des actions comparables à celles de la LH et de la FSH) (Gong *et al.*, 1993) ou de FSH (Gray *et al.*, 1993) augmente significativement le taux d'ovulation.

## 6.5. Effets d'un traitement à la bGHrec sur les sécrétions hormonales

### 6.5.1. La LH

En milieu de saison de reproduction, le traitement à la bGHrec ne modifie pas les niveaux de LH au cours des 17 jours du cycle; le taux plasmatique moyen ( $0,9 \pm 0,2$  ng/ml) et le taux de base ( $0,7 \pm 0,1$  ng/ml) sont comparables à ceux du groupe témoin ( $1,2 \pm 1,5$  ng/ml et  $0,7 \pm 0,1$  ng/ml). De même, le traitement ne modifie pas significativement la pulsativité d'émission de l'hormone.

Les mêmes observations peuvent être faites pour le début de saison et l'anoestrus.

D'après la littérature, lorsqu'un traitement de GH est administré à des vaches, les concentrations plasmatiques moyennes de LH ne sont pas modifiées durant l'entièreté du cycle (Gong *et al.*, 1991).

### 6.5.2. La FSH

En milieu de saison de reproduction, le traitement à la bGHrec supprime les deux vagues d'émission de FSH normalement observées en phase lutéale et diminue les concentrations plasmatiques moyennes ( $3,6 \pm 2,1$  ng/ml contre  $5,3 \pm 2,8$  ng/ml pour le groupe témoin).

En anoestrus et au début de la saison, le traitement diminue significativement ( $P < 0,05$ ) les sécrétions moyennes de FSH et les émissions fluctuent de manière irrégulière.

Nos résultats ne sont pas en accord avec la littérature. En effet, Gong et collaborateurs (1991) n'observent pas de modifications des concentrations plasmatiques en FSH après un traitement à la GH chez des vaches. Le mécanisme par lequel la GH inhiberait les sécrétions plasmatiques de FSH reste inconnu.

### 6.5.3. La P<sub>4</sub>

En milieu de saison, le traitement à la bGHrec augmente (non significatif) les concentrations plasmatiques de P<sub>4</sub> ( $1,5 \pm 2,1$  ng/ml contre  $0,8 \pm 1,2$  ng/ml). Le profil de sécrétion est comparable à celui du groupe témoin, à savoir des concentrations élevées durant la phase lutéale et des concentrations plus basses en phase folliculaire.

En anoestrus, on observe des taux très faibles  $0,2 \pm 0,2$  ng/ml (caractéristiques de l'absence de corps jaunes) et comparables à ceux des brebis témoins ( $0,1 \pm 0,1$  ng/ml). Seule une brebis pourrait présenter un corps jaune de courte durée. Les valeurs obtenues sont inférieures à celles du milieu de saison.

En début de saison, nous obtenons après traitement des concentrations en P<sub>4</sub> similaires ( $0,2 \pm 0,3$  ng/ml) au groupe témoin ( $0,3 \pm 0,3$  ng/ml) et similaires à celles de l'anoestrus. Cela est dû au fait que quatre brebis ne sont pas encore en cycle régulier. Tout au plus peut-on noter qu'un corps jaune de courte durée apparaît. Il en est de même pour le groupe témoin.

La littérature confirme les résultats obtenus pour le milieu de saison; en effet, chez la vache, l'administration de bGHrec augmente *in vivo* la concentration plasmatique de P<sub>4</sub> (Gallo et Block, 1991). Par contre, selon Barreca et collaborateurs (1990) un traitement de GH chez la femme n'augmente pas la concentration plasmatique moyenne. Les résultats obtenus à partir de cellules cultivées et stimulées *in vitro* à la GH montrent

que les sécrétions de P<sub>4</sub> augmentent lorsque les cellules granulosales cultivées sont d'origine ovine (Juengel *et al.*, 1994), porcine (Hsu *et al.*, 1987; cités par Gong *et al.*, 1991) ou qu'elles proviennent de souris (Hutchinson *et al.*, 1988; cités par Gong *et al.*, 1988). Par contre, les résultats de Gong et collaborateurs (1994) montrent qu'un traitement *in vivo* à la bGHrec chez les brebis Suffolk n'augmente pas *in vitro* la sécrétion de P<sub>4</sub> des follicules ovariens.

#### 6.5.4. L'E<sub>2</sub>

En milieu de saison, le traitement à la bGHrec ne modifie pas significativement les concentrations plasmatiques moyennes d'E<sub>2</sub> ( $6,6 \pm 3,6$  pg/ml contre  $7,5 \pm 3,0$  pg/ml), ni le profil d'émission.

En anoestrus, les valeurs sont significativement supérieures ( $P < 0,05$ ) à celles du milieu de saison et ne sont pas non plus modifiées par le traitement.

En début de saison, le traitement augmente non significativement les concentrations plasmatiques d'E<sub>2</sub> ( $7,9 \pm 3,5$  pg/ml contre  $5,2 \pm 2,4$  pg/ml). Ces valeurs restent inférieures à celles de l'anoestrus mais comparables à celles du milieu de saison.

Selon la littérature, les résultats obtenus à partir de cellules cultivées et stimulées *in vitro* à la GH montrent, tout comme pour P<sub>4</sub>, que les sécrétions d'E<sub>2</sub> augmentent lorsque les cellules granulosales cultivées sont d'origine ovine (Juengel *et al.*, 1994), porcine (Hsu *et al.*, 1987; cités par Gong *et al.*, 1991) ou qu'elles proviennent de souris (Hutchinson *et al.*, 1988; cités par Gong *et al.*, 1988). Par contre, tout comme pour la P<sub>4</sub>, les résultats de Gong et collaborateurs (1994) montrent qu'un traitement *in vivo* à la bGHrec chez les brebis Suffolk n'augmente pas *in vitro* la sécrétion d'E<sub>2</sub> des follicules ovariens.

## **Conclusions et perspectives**

## 7. CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons assigné un double but à notre travail :

- étudier l'évolution naturelle des profils de sécrétion de la GH, des gonadotropines hypophysaires (LH et FSH) et des stéroïdes ovariens (P4 et E2) au cours des différents états physiologiques de la brebis Suffolk;
- étudier les effets d'un traitement de GH recombinante bovine administré *in vivo* sur les mécanismes de la croissance folliculaire terminale et sur l'évolution des sécrétions hormonales au cours des différents états physiologiques.

De plus, afin de minimiser les incidences de l'environnement sur nos résultats, nous avons réalisé un test préliminaire afin de mettre en évidence les effets de l'alimentation et du nyctémère sur l'émission de GH. Ce test a montré que l'alimentation diminue les sécrétions de GH et que l'obscurité les augmente. Si l'apport alimentaire a lieu une heure avant l'instauration de l'obscurité, aucune évolution précise de l'émission de GH n'est observée.

### 7.1. Emission naturelle de la GH, des hormones hypophysaires et des stéroïdes ovariens

L'évolution des profils de sécrétion des hormones hypophysaires et des stéroïdes ovariens que nous avons obtenus au cours des différents états physiologiques confirment les résultats de la littérature.

Les profils individuels de sécrétion de la GH, obtenus grâce à des prises de sang sériées réalisées toutes les 15 minutes durant 12 ou 24 heures, montrent une variabilité élevée et une pulsatilité irrégulière. Malgré ces fluctuations à court terme, les concentrations plasmatiques moyennes de l'hormone de croissance ne varient que très peu dans le temps.

En milieu et début de saison de reproduction, les profils de sécrétion ne montrent pas de variations bien nettes, si ce n'est qu'une augmentation en fin de phase folliculaire. En période d'anoestrus, les concentrations moyennes restent stables tant au cours d'une journée que d'un jour à l'autre.

Les résultats confirment les hypothèses avancées lors de l'essai préliminaire à savoir que la distribution de la ration alimentaire à 17 heures permet d'obtenir un profil peu variable de sécrétion de la GH au cours du nyctémère.

### 7.2. Les effets de l'administration de GH

Afin de mettre en évidence les effets de l'hormone de croissance sur la maturation folliculaire et sur l'évolution des profils hormonaux, nous avons administré de l'hormone de croissance recombinante bovine à raison de deux injections de 3 mg par jour pendant 17 jours à des brebis. La première injection était faite à 9 heures et la seconde, à 17 heures.

Ces injections provoquent une augmentation des concentrations plasmatiques moyennes de la GH pendant au moins 15 heures en milieu de saison, pendant 8 heures en anoestrus et, au moins pendant 15 heures en fin de phase folliculaire en début de saison, moins en phase lutéale. Ces résultats montrent que la vitesse de dégradation de la GH change selon l'état physiologique.

Le traitement a également pour effet, au cours des 3 périodes, de modifier la croissance folliculaire terminale en augmentant le recrutement, la sélection et la dominance et d'améliorer le taux d'ovulation en milieu et au début de saison de reproduction, avec en plus, l'apparition d'un grand nombre de petits follicules de diamètre inférieur à 2 mm en milieu de saison.

Les profils hormonaux des animaux témoins montrent les évolutions classiques pendant les cycles oestriques et selon la saison.

Au cours des trois états physiologiques étudiés, l'injection quotidienne de bGHrec ne provoque pas de modification au niveau des concentrations plasmatiques moyennes de la LH. Par contre, ce traitement diminue les concentrations plasmatiques moyennes de FSH lors des 3 périodes avec en plus une suppression de l'émission par vagues en début et milieu de saison de reproduction.

L'étude de l'évolution de stéroïdes ovariens montre que, suite aux injections quotidiennes de bGHrec, la **progestérone** augmente en milieu de saison reproduction et l'**oestradiol** en début saison. En anoestrus, aucun effet du traitement n'a été mis en évidence.

## 8. Perspectives

Poursuivre les expériences, entamées cette année, en fin de saison de reproduction et donc étudier les effets d'un traitement à la bGHrec administré *in vivo* sur les concentrations plasmatiques en GH, sur les mécanismes de la croissance folliculaire terminale et sur l'évolution des profils de sécrétion des différentes hormones (LH, FSH, P4, E2). Pour les quatre périodes retenues, il semble indispensable d'analyser l'évolution des profils de sécrétion de l'insuline et des IGF suite à un apport exogène d'hormone de croissance.

Après avoir étudié les effets d'un traitement de GH administré *in vivo* sur la croissance folliculaire et sur l'évolution de différents profils de sécrétion hormonales, il serait intéressant d'étudier les effets d'une stimulation à la GH sur la stéroïdogénèse et la réactivité aux hormones gonadotropes de follicules ovariens placés dans un système de culture *in vitro*. Pour ce faire, lors des quatre phases physiologiques différentes, des follicules prélevés sur des brebis traitées *in vivo* à la GH et des follicules stimulés directement *in vitro* seront placés en culture. Suite aux traitements, les différents paramètres à analyser seraient :

- la stéroïdogénèse et la réactivité des follicules aux hormones gonadotropes;
- l'évolution quantitative, par la technique d'autoradiographie, des récepteurs à la GH, LH, FSH et aux IGF;
- l'analyse du contenu du fluide folliculaire en IGF et en hormone de croissance.

Enfin, après un avoir mis en évidence un effet favorable de l'hormone de croissance sur l'ovulation, il serait intéressant de mettre au point une technique de fécondation et développement embryonnaire *in vitro* afin de déterminer le(s) rôle(s) de la GH sur la maturation ovocytaire ainsi que sur la viabilité et le développement de l'embryon.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

- Adams N.R., Atkinson S., Martin G.B., Briegel J.R., Boukhliq R. & Sanders M.R.** (1993). frequent blood sampling changes the plasma concentration of LH and FSH and the ovulation rate in Merino ewes. *J. Reprod. Fert.* **99**, 689-694.
- Adams T.E., Baker L., Fiddes R.J. & Brandon M.R.** (1990). The sheep growth hormone receptor : molecular cloning and ontogeny of mRNA expression in the liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* **73**, 135-145.
- Adashi E.Y., Resnick C.E., Ricarelli E., Hurwitz A., Kokia E., Tedeschi C., Botero L., Hernandez E.R., Rosenfeld R.G., Carlsson-Skwirut C. & Francis G.L.** (1992). Granulosa cell-derived insulin-like growth factor (IGF) binding proteins are inhibitory to IGF-I hormonal action. *J. Clin. Invest.* **90**, 1593-1599.
- Adashi E.Y., Resnick C.E., Svoboda M.E. & Van Wyck J.J.** (1985). Somatomedin-C enhances induction of luteinizing hormone receptors by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* **116**, 2369-2375.
- Albiston A.L. & Herington A.C.** (1992). Tissue distribution and regulation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 messenger ribonucleic acid (mRNA) in the rat : comparison with IGF-I mRNA expression. *Endocrinology* **130**, 497-502.
- Armstrong D.T., Daniel S.A.J. & Gore-Longton R.E.** (1987). Intra-ovarian actions of steroids in regulation of follicular steroid biosynthesis. In : "Endocrinology and physiology of Reproduction", (Eds.) Leung P.C.K., Armstrong D.T., Ruf K.B., Moger W.H. & Friesen M.G., p. 177-195, Plenum Press, New York.
- Bar R.S., Clemmons D.R., Boes M., Busby W.H., Booth B.A., Dake B.L. & Sandra A.** (1990). Transcapillary permeability and subendothelial distribution of endothelial and amniotic fluid insulin-like growth factor binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* **127**, 1078-1086.
- Barreca A., Minuto F., Volpe A., Cecchelli E., Cella F., Del Monte P., Artini P. & Giordano G.** (1990). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding protein in the follicular fluids of growth hormone treated patients. *Clinical Endocrinology*. **32**, 497-505.
- Basset J.M.** (1974). Early changes in plasma insulin and growth hormone levels after feeding in lambs and adult sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* **27**, 157-166.
- Bauman D.E.** (1991). Bovine somatotropin : Review of an emerging animal technology. *J. Dairy Sci.* **12**(75), 3432-3451.
- Baxter R.C. & Cowell C.T.** (1987). Diurnal rhythm of growth hormone-independent binding protein for insulin-like growth factors in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **65**, 432-440.
- Bellin M.E. & Ax R.L.** (1984). Chondroitin sulfate : an indicator of atresia in bovine follicles. *Endocrinology* **114**, 428-434.
- Bick T., Hochberg Z., Amit T., Isaksson O.G.P. & Jansson J.O.** (1992). Role of pulsatility and continuity of growth hormone (GH) administration in the regulation of hepatic GH-receptor and circulating GH-binding protein and insulin-like growth factor-I. *Endocrinology*. **1**, 423-429.

- Bicsak T.A., Ling N. & DePaolo L.V.** (1991). Ovarian intrabursal administration of insulin-like growth factor-binding protein inhibits follicle rupture in gonadotropin-treated immature female rats. *Biol. Reprod.* **44**, 599-603.
- Bicsak T.A., Shimonaka M., Malkowski M. & Ling N.** (1990). Insulin growth factor-binding protein (IGF-BP) inhibition of granulosa cell function : Effect on cycle adenosine 3', 5'-monophosphate, desoxyribonucleic acid synthesis, and comparison with the effect of an IGF-I antibody. *Endocrinology* **126**, 2184-2189.
- Binoux M. & Hossenlopp P.** (1988). Insulin-like growth factor (IGF) and IGF -binding proteins : comparison of human serum and lymph. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**, 509-514.
- Bister J.L.** (1980). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences : Influence de la photopériode sur la physiologie de la reproduction de la brebis Texel. FUNDP, Namur.
- Bister J.L.** (1991). Cours de 1<sup>ère</sup> licence en Biologie : Physiologie Animale. FUNDP, Namur.
- Bister J.L., Derycke G., Jacques E. & Paquay R.** (1988). Effects of immunization against  $\Delta$ 4-androstenedione on the ovarian follicular dynamics and ovulation rate in ewes. *Réunion extraordinaire de l'Association Française des Pharmacologistes, la Société Belge de Physiologie et de Pharmacologie et la Société Suisse de Pharmacologie et de Toxicologie*. Lausanne, 23-26 mars, **111**.
- Bister J.L. & Paquay R.** (1983). Fluctuations in the plasma levels of the Follicle-Stimulating-Hormone during oestrus cycle, anoestrus, gestation and lactation in the ewe : evidence for an endogenous rhythm of FSH release. *Theriogenology* **25**, 53-70.
- Bocquier F., Kann G. & Theriez M.** Relationships between secretory patterns of GH, PRL and body reserves on milk yield in dairy ewes under different photoperiod and food controlled conditions. Unpublished.
- Bogovitch K. & Richard J.S.** (1984) Androgen synthesis during follicular development : evidence that rat granulosa cell 17-ketoseroid reductase is independant of hormonal regulation. *Biol. Reprod.* **31**, 122-131.
- Brabant G., Prank K. & Schofl C.** (1992). Pulsatile patterns in hormone secretion. *Trends Endocrinol. Metab.* **3**, 183-190.
- Caldani M., Caraty A., Pelletier J., Thiéry J.C. & Tillet Y.** (1991). La libération pulsatile de LH et son contrôle. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds) " La reproduction chez les mammifères et l'homme". INRA Ellipses, 71-87.
- Campion D.R., Hausmann G.J. & Martin R.J.** (1989). Animal growth regulation. *Plenum Press -New York & London.* **7**, 237-255.
- Carlsson B., Nilsson A., Isaksson O.G., Billing H.** (1993). Growth hormone-receptor messenger RNA in the rat ovary : regulation localization. *Mol. Cell. Endocrinol.* **95** (1-2), 59-66.

- Catt K.J. & Dufau M.L.** (1991) Gonatropic hormones : biosynthesis, receptors and action. In : Yen S.S.C. & Jaffe R.B. (Eds) "Reproductive Endocrinology" W.B. Sanders Company, 105-155.
- Charrier J.** (1973). Evolution foetale et postnatale du contenu en hormone de croissance de l'hypophyse ovine. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 13(2), 155-163.
- Chemineau P., Chupin D., Cognié Y. & Thimonier J.** (1991). Maîtrise de la reproduction chez les mammifères domestiques. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds) "La reproduction chez les mammifères et l'homme." *INRA, Ellipses*, 655-676.
- Cheung P.T., Smith E.P., Shimasaki S., Ling N. & Chernauek S.D.** (1991). Characterization of an insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-4) produced by the B 104 rat neuronal cell line : chemical and biological properties and differential synthesis by sublines. *Endocrinology* 129, 1006-1015.
- Christman G.M. & Halme J.K.** (1992). Growth hormone : revisited. *Fertility and Sterility.* 1(57), 12-14.
- Clarke I.J.** (1989). The GnRH/gonadotropin axis in the ewe, cow and sow. *Domest. Anim. Endocr.* 6, 1-14.
- Cognié Y.** (1988). Nouvelles méthodes utilisées pour améliorer les performances de reproduction chez les ovins. *Prod. Anim.* 1 (2), 83-92.
- Cognié Y., Poulin N., Guérin Y. & Martinat N.** Administration of exogenous growth hormone in early follicular phase enhances embryo production in sheep. Communication orale.
- Coxam V., Davicco M-J., Pastoureau P., Delmas P.D. & Barlet J-P.** (1992). Insulin-like growth factor-II increases plasma osteocalcin concentration in newborn lambs. *Bone Miner* 177, 177-186.
- Davis S.R., Smith J.F. & Gluckman P.D.** (1990). Effects of growth hormone injections on ovulation rate in ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* 2, 173-178.
- Debecker F.** (1984). Hormonologie vétérinaire. Lexique, Intervet.
- DeChiara T.M., Efstradiadis A. & Robertson E.J.** (1990). A growth-deficiency phenotypes in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor-II gene disrupted by targeting. *Nature* 345, 78-80.
- Delouis C. & Richard P.** (1991) La lactation. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds) "La reproduction chez les mammifères et l'homme." *INRA, Ellipses*, 487.
- Denning-Kendall P.A. & Wathes D.C.** (1994). Acute effects of prostaglandin F<sub>2</sub>  $\alpha$ , luteinizing hormone, and estradiol on second messenger systems and on the secretion of oxytocin and progesterone from granulosa and early luteal cells of the ewe. *Biol. Reprod.* 50, 765-773.
- Derivaux J. & Ectors F.** (1986). Reproduction chez les animaux domestiques. CABAY, Louvain-la-Neuve, 55-71 et 131-175.

- Derycke G., Bister J.L. & Paquay R.** (1988). Effects of immunization against  $\Delta$ 4-androstenedione on hormonal levels in ewes. *Réunion extraordinaire de l'Association Française des Pharmacologistes, la Société Belge de Physiologie et de Pharmacologie et la Société Suisse de Pharmacologie et de Toxicologie*. Lausanne, 23-26 mars, 112.
- Di Zerega G.H. & Hodgen G.D.** (1981). Folliculogenesis in the primate ovarian cycle. *Endocr. Rev.* 2, 27-49.
- Donovan S.M., Oh Y., Pham H. & Rosenfeld R.G.** (1989). Ontogeny of serum insulin-like growth factor binding proteins in the rat. *Endocrinology* 125, 2621-2627.
- Driancourt M.A., Fry R.C., Clarke I.J. & Cahill L.P.** (1987). Follicular growth and regression during the 8 days after hypophysectomy in sheep. *J. Reprod. Fert.* 79, 635-641.
- Driancourt M.A., Gibson W.R. & Cahill L.P.** (1984). Follicular dynamics throughout the estrous cycle in sheep. A review. *Reprod. Nutr. Dev.* 25 (IA), 1-15.
- Driancourt M.A., Goujeon A., Royère D., Thibault Ch.** (1991). La fonction ovarienne. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds.) "La reproduction chez les mammifères et l'homme". INRA Ellipses. 273-298.
- Driver P.M. & Forbes J.M.** (1981). Feeding and growth hormone after cerebroventricular carbachol in sheep. 12 (1), 99-101.
- Erickson G.F., Magoffin, D.A., Dyer, C.A. & Hofeditz, C.** (1985). The ovarian androgen producing cells a review of structure function relationship. *Endocr. Rev.* 6, 371-399.
- Elsasser T.H., Rumsey T.S. & Hammond A.C.** (1989). Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-I in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 67, 128-141.
- Estienne M.J., Schillo K.K., Green M.A. & Boling J.A.** (1989). Free fatty acids suppress growth hormone but not luteinizing hormone secretion in sheep. *Endocrinology.* 1 (125), 85-91.
- Estienne M.J., Schillo K.K., Hileman S.M., Green M.A., Hayes S.H. & Boling J.A.** (1990). Effects of free fatty acids on luteinizing hormone and growth hormone secretion in ovariectomized lambs. *Endocrinology.* 4(126), 1934-1940.
- Evain-Brion D.** (1991). Les facteurs de croissance et leurs récepteurs. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds) "La reproduction chez les mammifères et l'homme." INRA, Ellipses, 159.
- Findlay J.K. & Clarke I.J.** (1987). Regulation of the secretion of FSH in domestic ruminants. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 34, 27-37.
- Focant M.** (1986). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences Agronomiques. Contribution à l'étude du comportement alimentaire des petits ruminants : rôle des acides gras volatils.

- Fortune J.E.** (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* **50**, 225-232.
- Fortune J.E. & Vincent S.E.** (1983). Progesterone inhibits the induction of aromatase activity in rat granulosa cells in vitro. *J. Reprod. Fert.* **29**, 1078-1089.
- Frohman L.A., Downs T.R. & Chomecynski P.** (1992). Regulation of growth hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology.* **4**(13), 344-405.
- Fry R.C., Clarke I.J. & Cahill L.P.** (1987). Changes in gonadotropin concentrations are not necessarily involved in ovarian compensation after unilateral ovariectomy in sheep. *J. Reprod. Fert.* **79**, 45-48.
- Garofalo R.S. & Barenton B.** (1992). Functional and immunological distinction between insulin-like growth factor-I receptor subtypes in KB cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 11470-11475.
- Gauthier D. & Berbibier P.** (1982). The influence of nutritional levels and shade structure in testicular growth and hourly variation of plasma LH and testosterone levels in young croole bulls in tropical environment. *Reprod. Nutr. Develop.* **22**, 793-801.
- Ginther O.J., Knopp L. & Kastelic J.P.** (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fert.* **87**, 223-230.
- Giudice L.C.** (1992). Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocrine Reviews* **13**(4), 641-669.
- Gluckman P.D. & Breier B.H.** (1987). Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *J. Dairy Sci.* **70**, 442.
- Gluckman P.D. & Butler J.H.** (1983). Parturition-related changes insulin-like growth factors-I and - II in the perinatal lamb. *J. Endocrinol.* **99**, 223-232.
- Gluckman P.D., Butler J.H. & Elliott T.B.** (1983). The ontogeny of somatotrophic binding sites in ovine hepatic membranes. *Endocrinology* **112**, 1607-1612.
- Golde D.W. & Bersch N.** (1977). Growth hormone : Species - specific stimulation of erythropoiesis *in vitro*. *Science.* **196**, 1112-1113.
- Goldring N.B., Durica J.M., Lifka J., Hedin L., Ratoosh S.L., Miller W.L., Orly J. & Richards J.S.** (1987). Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid : evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitution expression in corpora lutea. *Endocrinology* **120**, 1942-1950.
- Gong J.G., Bramley T.A. & Webb R.** (1991). The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers : follicular populations and peripheral hormones. *Biology of Reproduction.* **45**, 941-949.
- Gong J.G., Bramley T.A. & Webb R.** (1993). The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. *J. Reprod. Fert.* **97**, 247-254.

- Gong J.G., Bramley T.A. & Webb R.** (1994). Treatment of ewes with r BST *in vivo* increases the secretion of insulin-like growth factor-I by ovarian follicles *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* **14**, 48.
- Gong J.G., Bramley T.A., Wilmut Y. & Webb R.** (1993). Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. *Biology of Reproduction.* **48**, 1141-1149.
- Grant A.L., Helferich W.G., Kramer S.A., Merkel R.A. & Bergen W.G.** (1991). Administration of growth hormone to pigs alters the relative amount of insulin-like growth factor-I mRNA in liver and skeletal muscle. *J. Endocrinol.* **130**, 331-338.
- Gray B., Stringfellow D., Riddell M., Riddell K., Davenport G. & Wright J.** (1993). The effect of treatment with bovine somatotropin (BST) on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology* **39**, 227.
- Greendwald G.S. & Terranova P.F.** (1988). Follicular selection and its control. In Eds. Knobil E. & Neils J. (Eds.) "The physiology of Reproduction", Raven Press Ltd New York, 387-445.
- Guillermo F. & Block E.** (1991). Effects of recombinant bovine somatotropin on hypophyseal ovarian functions of lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* **71**, 343-353.
- Hammond J.M., Barano J.L.S., Skaleris D., Knigh A.B., Romanus J.A. & Rechler M.M.** (1985). Production of insulin-like growth factors by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* **117**, 2553-2555.
- Hammond J.M., & English H.F.** (1987). Regulation of desoxyribonucleic acid synthesis in cultured porcine granulosa cells by growth factors and hormones. *Endocrinology* **120**, 1039-1046.
- Haresign W., McLeod G.J., Webster G.M. and Worthy K.** (1984). Endocrine basis of seasonal anoestrus in sheep (Eds.) Ellendorff & Elsaesser.
- Hartshorne G.M.** (1988). Effects of growth factors on the differentiation of granulosa cells. *Research in Reproduction* **20**, 1-2.
- Heyner S., Shah N., Smith R.M., Watson A.J. & Schultz G.A.** (1993). The role of growth factors in embryo production. *Theriogenology* **39**, 151-161.
- Holly J.M.P. & Wan J.A.H.** (1989). Insulin-like growth factors; autocrine, paracrine or endocrine ? New perspectives of the somatomedin hypothesis in the light of recent developments. *Journal of Endocrinology* **122**, 611-618.
- Homburg R., West C., Torresani T. & Jacob H.S.** (1990). Cotreatment with human growth hormone and gonadotropins for induction of ovulation : a controlled clinical trial. *Fertility and Sterility.* **2**, 254-259.
- Hua K.M., Ord R., Kirk S., Li Q.J., Hodgkinson S.C., Spencer G.S.G., Molan P.C. & Bass J.J.** (1993). Regulation of plasma and tissue levels of insulin-like growth factor-I by nutrition and treatment with growth hormone in sheep. *Journal of Endocrinology.* **136**, 217-224.

- Ireland J.J. & Roche J.F.** (1987) Hypothesis regarding development dominant follicles during a bovine estrus cycle. In *Follicular growth and ovulation rate in farm animals* pp. 1-18 (Eds.) J.F. Roche & D. O'Callagan. Martinus Nijhoff, The Hague.
- Jacques E.** (1989) Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences : Contrôle de la croissance terminale et de la maturation des follicules ovariens de la brebis. FUNDP, Namur.
- Jia X.C., & Hsueh A.J.W.** (1984). Homologous regulations of hormone receptors : luteinizing hormone increases its own receptors in cultured granulosa cells. *Endocrinology* **115**, 2433-2439.
- Jia X.C., Kessel B., Welsh T;H. & Hsueh A.J.W.** (1985). Androgen inhibition of follicle stimulating hormone stimulated luteinizing hormone receptor formation in cultured granulosa cells. *Endocrinology* **117**, 13-22.
- John T.M., Iiswanthan M., George J.C. & Scanes C.G.** (1990). Influence of chronic melatonin implantation on circulating levels of catecholamines, growth hormone, thyroid hormones, glucose and free fatty acids in the pigeon. *General and comparative endocrinology*. **79**, 226-232.
- Johnson R.M., Napier M.A., Cronin M.J. & King K.L.** (1990). Growth hormone stimulates the formation of sn-1,2-diacylglycerol in rat hepatocytes. *Endocrinology* **127**(5), 2099-2103.
- Juengel J.L., Nett T.M., Tandeski T.R., Eckery D.C., Sawyer H.R. & Niswender G.D.** (1994). Effects of luteinizing hormone (LH) and growth hormone (GH) on luteal development in the ewe. *Biol. Reprod.* **50**, Suppl 1 SSR, 125.
- Junqueira L.C., Carneiro J. & Long J.A.** (1986). *Basic Histology*. 3rd edition. Piccin Nuova Libreria. S.p.A., Italie.
- Kamada S., Kubota T., Taguchi M., Wen-Rong H., Sakamoto S. & Aso T.** (1992). Effect of insulin-like Growth Factor-II on proliferation and differentiation of ovian granulosa cells. *Horm. Res.* **37**, 141-149.
- Karsh F.J., Dahl G.E., Evans N.P., Manning J.M., Mayfield K.P., Moenter S.M. & Foster D.L.** (1993). Seasonal changes in gonadotropin - Releasing hormone secretion in the ewe : alteration in response to the negative feedback action of estradiol. *Biol. Reprod.* **49**, 1377-1383.
- Karsh F.J. & Legan S.J.** (1980). Importance of E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> in regulating LH secretion and oestrus behavior during the sheep oestrus cycle. *Biol. Reprod.* **23**, 404-413.
- Keller U. & Miles J.M.** (1991). Growth hormone and lipids. *Horm. Res.* **36** (suppl.1), 36-40.
- Kelly P.A., Ali S., Rosakis M., Goujon L, Nagano M., Pellegrini I, Gould D., Djiane J., Edery M., Finidori J. & Postel-Vinay M.C.** (1993). The Growth Hormone/prolactin Receptor Family. *Recent progress in hormone research.* **48**, 123-164.

- Khalid M., Haresign W. & Luck M.R.** (1994). Response of ovine granulosa cells to IGF-I in a serum - and insulin - free culture is affected by season. *J. Reprod. Fert. Abstract Series* 13, 78.
- Kineman R.D., Henricks D.M., Faught WJ. & Frawley L.S.** (1991). Fluctuation in the proportions of growth hormone - and prolactin - secreting cells during the bovine estrous cycle. *Endocrinology*. 3(129), 121-1225.
- Kirkwood R.N., Thacker P.A., Gooneratne A.D., Guedo B.L. & Laarveld B.** (1988). The influence of exogenous growth hormone on ovulation rate in gilts. *Can. J. Anim. Sci.* 68, 1097-1103.
- Lanzone A., Di Simone N., Castellani R., Fulghesu A.M., Caruso A. & Mancuso S.** (1992). Human growth hormone enhances progesterone production by human luteal cells *in vitro* : evidence of a synergistic effect with human chorionic gonadotropin. *Fertility and Sterility*. 1(57), 92-96.
- Le Cam A. & Legraverend C.** (1993). Mode d'action de l'hormone de croissance. *Médecine/Sciences* 9, 1352-61.
- Lee K.A.W.** (1991). Transcriptional regulation by cAMP. *Current opinion in cell biology*. 3, 953-95.
- Legan S.J., L'Anson H., Fitzgerald B.P. & Fitzovich D.** (1985). Does the seasonal increase in estradiol negative feed-back prevent luteinizing hormone surges in anoestrus ewes by suppressing hypothalamic gonadotropin-releasing-hormone pulse frequency ? *Biol. Reprod.* 33, 117-131.
- Legan S.J., Karsh F.J. & Foster D.L.** (1977). The endocrine control of seasonal reproductive function in the ewe : a marked change in response to the negative feedback action of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 101, 818-824.
- Lewitt M.S., Saunders H. & Baxter R.C.** (1992). Regulation of rat insulin-like growth factor-binding protein-1 : the effect of insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinology* 131, 2357-2364.
- Lippe B.M. & Nakamoto J.M.** (1993). Conventional and nonconventional uses of growth hormone. *Recent progress in hormone research*. 48, 179-235.
- Lucy M.C., Collier R.J., Kitchell M.L., Dibner J.J., Hauser S.D. & Krivi G.G.** (1993). Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biol. Reprod.* 48, 1219-1227.
- Luo J.M. & Murphy L.J.** (1989). Dexamethasone inhibits growth hormone induction of insulin-like growth factor-I (IGF-I) mRNA in hypophysectomized rats and reduces IGF-I mRNA abundance in the intact rat. *Endocrinology* 125, 165-171.
- McCusker R.H., Busby W.H., Dehoff M.H., Camacho-Hubner C. & Clemmons D.R.** (1991). Insulin-like growth factor (IGF) binding to cell monolayers is directly modulated by the addition of IGF-binding proteins. *Endocrinology* 129, 939-949.

- McIntosh R.P., McIntosh J.E.A. & Lazarus L.** (1988). A comparison of the dynamics of secretion of human growth hormone and LH pulses. *J. Endoc.* **118**, 339-345.
- McNatty K.P., Gibb M., Dobson C. & Thurley D.C.** (1981). Evidence that changes in luteinizing hormone secretion regulate the growth of the preovulatory follicle in the ewe. *Endocrinology* **90**, 375-389.
- McNatty K.P., Hudson N.L., Gibb M., Ball K., Henderson K.M., Heat D.A., Lun S. & Kieboom L.E.** (1985). FSH influences follicles viability, estradiol biosynthesis and ovulation rate in Romney ewes. *J. Reprod. Fert.* **75**, 121-131.
- McNeilly A.S., Jonassen J.A. & Fraser H.M.** (1986). Suppression of follicular development after chronic LHRH administration in the ewe. *J. Reprod. Fert.* **76**, 481-490.
- Maiter D., Underwood L.E., Maes M., Davenport M.L. & Ketelslegers J.M.** (1988). Different effects of intermittent and continuous growth hormone (GH) administration on serum somatomedin C insulin-like growth factor I and liver GH receptors in hypophysectomized rats. *Endocrinology* **123**, 1053-1059.
- Malpaux B., Wayne N.L. & Karsh F.J.** (1988). Termination of breeding season in the Suffolk ewe. Involvement of a endogenous rhythm of reproduction. *Biol. Reprod.* **39**, 254-263.
- Mandiki S.N.M.** (1991) Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences : Allaitement et reprise de l'activité reproductrice chez la brebis Texel. FUNDP, Namur.
- Mann G.E., McNeilly A.S. & Baird D.T.** (1991) Hormone production *in vivo* and *in vitro* from follicles at different stages of the estrous cycle in the sheep. *Endocrinology* **132**, 225-234.
- Mariana J-C., Monniaux D., Driancourt M-A. & Mauléon P.** (1991). Folliculogenesis. In : Cupps P.T. (Eds.) "Reproduction in domestic animals", Academic Press, San Diego, 119-171.
- Martikainen H., Tapanainen J., Rönberg L., Kauppila A., Selenius P. & Seppälä M.** (1991). Insulin-like Growth Factor Binding Protein-1 and ovarian stimulation. *Human Reproduction* **6**,(9), 1220-1222.
- Martin G.B., Price C.A., Thiery J.C. & Webb R.** (1988). Interactions between inhibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotropin secretion in the ewe. *J. Reprod. Fert.* **82**, 319-328.
- Mason H.D., Martikainen H., Beard R.W., Anyaoku V. & Franks S.** (1990). Direct gonadotropic effect of growth hormone on oestradiol production by human granulosa cells *in vitro*. *J. Endocrinol.* **126**, R1-4.
- Melmed S.** (1988). Pituitary growth factors. *Neuroendocrine Perspective* **6**, 27-46 Springer - Verlag, New York.
- Miller W.L., Martial J.A. & Baxter J.D.** (1980). Molecular cloning of DNA complementary to bovine growth hormone mRNA. *The journal of biological chemistry* **255** (16), 7521-7524.

- Monget P.** (1993). Thèse présentée en vue de l'obtention d'un grade de Docteur en Sciences. Le système IGF dans l'ovaire de brebis. Université de Paris VI.
- Monget P., Monniaux D. & Durand P.** (1989). Localization, characterization and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology* **125**, 2486-2493.
- Monniaux D. & Pisselet C.** (1992). Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone "in vitro". *Biol. Reprod.* **46**, 109-119.
- Montgomery G.W., Scott I.C. & Johnstone P.D.** (1988). Seasonal changes in ovulation rate in Coopworth ewes maintained at different liveweights. *An. Reprod. Sc.* **17**, 197-205.
- Morgan D.O., Edman J.C., Standring D.N., Fried V.A., Smith M.C., Roth R.A. & Rutter W.J.** (1987). Insulin-like growth factor-II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature* **329**, 301-307.
- Murphy L.J. & Friesen H.G.** (1988). Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-like growth factor-I gene expression in the ovariectomized hypophysectomized rat. *Endocrinology* **122**, 325-332.
- Newcomer W.S.** (1971). The hypophysis and epiphysis. pp 470-478. In "Textbook of veterinary physiology". Breazile J.E. Ed. Lea & Febiger.
- Niall H.D., Hogan M.L., Sauer R., Roseblum I.Y. & Greenwood F.C.** (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones : evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **68**(4), 866-869.
- Noël B.** (1994). Thèse présentée en vue de l'obtention d'un grade de Docteur en Sciences : Contrôle et maîtrise de la stéroïdogénèse et de la croissance folliculaire terminale chez la brebis suffolk. FUNDP Namur.
- Noël B., Bister J.L. & Paquay R.** (1993). Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J. Reprod. Fert.* **99** (2), 695-700.
- Norman A.W. & Litwack G.** (1987). Hormones. *Academic Press London.* 50-99 and 516-563.
- O'Malley B.W. & Strodt C.A.** (1991). Steroid hormones : Metabolism and mechanism of action. In : Yen S.S.C. & Jaffe R.B. (Eds.) "Reproductive Endocrinology", Saunders Company, 156-180.
- Ovesen P., Moller J., Christiansen J.S., Jorgenson J.O.L. & Orskov H.** (1992). Growth hormone secretory capacity and serum insulin-like growth factor I levels in primary infertile, anovulatory women with regular menses. *Fertil. Steril.* **57**, 97-101.
- Page M.D., Dieguez C. & Scanlon M.F.** (1989). Neuroregulation of growth hormone secretion. Biotechnology in growth regulation.

- Paladini A.J., Pena C. & Poskus E.** (1983). Molecular biology of growth hormone. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*. 1(15), 25-56.
- Paquay R.** (1989). Physiologie spéciale 2 : Physiologie du système endocrinien - Physiologie du système digestif, cours FUNDP, Namur.
- Pearce D.T. & Oldham C.M.** (1988). Ovulation in the Merino ewe in the breeding and anoestrous seasons. *Aust. J. Biol. Sci.* 41, 23-26.
- Peeters R., Buys N., Pauwels I., Khun E.R., Decuypere E., Siau O. & Van Isterdael J.** (1989). Relationship between the thyroidal and gonadal axes during the estrous cycle of ewes of different breeds and ages. *Reprod. Nutr. Dev.* 29, 237-245.
- Pell J.M., Elcock C., Harding R.L., Morrel D.J., Simmonds A.D. & Wallis M.** (1990). Growth, body composition, hormonal and metabolic status in lambs treated long-term with growth hormone. *British Journal of Nutrition* 63, 431-445.
- Picton H.M., Tsonis C.G. & McNeilly A.S.** (1990). The antagonistic effect of exogenous LH pulses on FSH stimulated preovulatory follicle growth in ewes chronically treated with a gonadotropin releasing hormone agonist. *Endocrinology* 127, 273-283.
- Piroux C.** (1990). Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences : Etude de la prolactine durant les différentes phases de l'activité sexuelle chez la brebis Texel. FUNDP, Namur.
- Plaut K., Ikeda M. & Vonderhaar B.K.** (1993). Role of growth hormone and insulin-like growth factor-I in mammary development. *Endocrinology* 133 (4), 1843-8.
- Poretsky L. & Kalin M.F.** (1987). The gonadotropic function of insulin. *Endocr. Rev.* 8, 132-41.
- Przekop F., Wolinska-Witort E., Mateusiak K., Sadowski B. & Domanski E.** (1984). The effect of prolonged stress on the oestrous cycles and prolactin secretion in sheep. *Animal Reproduction Science* 7, 333-342.
- Rawlings N.C. & Cook S.J.** (1991) The effects of acclimation to confinement on gonadotrophin and cortisol secretion during the estrous cycle of the ewe. *Canadian Journal of Animal Science*. 71, 327-332.
- Rawn J.D.** (1990). Traité de biochimie, chap 19 : Biosynthèse et transport des lipides membranaires et formation de la famille des stérols. pp 566-570. De Boeck Université.
- Robel P.** (1991). La stéroïdogénèse : les enzymes et la régulation de leur expression génomique. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds.) "La reproduction chez les mammifères et l'homme". INRA Ellipses, 127-134.

- Rogers S.A. & Hammerman M.R.** (1989). Growth hormone activates phospholipase C in proximal tubular basolateral membranes from canine kidney. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **86**, 6363-6366.
- Ronin C.** (1989) Les récepteurs des gonadotropines. *Annales d'endocrinologie* (Paris) **50**, 388-398.
- Rotten D.** (1991) Régulation de la synthèse et de la sécrétion de FSH. Dans Thibault C. & Levasseur M.C. (Eds) "La reproduction chez les mammifères et l'homme." *INRA, Ellipses*, 89-111.
- Roupas P. & Herington A.C.** (1989). Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **61**, 1-12.
- Rutanen E.-M. & Pekonen F.** (1990). Insulin-like Growth Factors and their binding proteins. *Acta Endocrinologica* **123**, 7-13.
- Salomon F., Cueno R. & Sonksen P.H.** (1991). Growth hormone and protein metabolism. *Horm. Res.* **36** (suppl. 1), 41.
- Sara V.R. & Hall K.** (1990). Insulin-like Growth Factors and their binding proteins. *Physiological Reviews* **70**(3), 591-606.
- Scaramuzzi R.J., Adams N.R., Baird D.T., Campbell B.K., Downing J.A., Findlay J.K., Henderson K.M., Martin G.B., McNatty K.P., McNeilly A.S. & Tsonis C.G.** (1993). A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.*, **5**, 459-78.
- Scaramuzzi R.J. & Baird D.T.** (1977). Pulsatile release of luteinizing hormone and secretion of ovarian steroids in sheep during anoestrus. *Endocrinology* **101**, 1801-806.
- Scaramuzzi R.J. & Radford H.M.** (1983). Factors regulating ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil.* **69**, 353-367.
- Schrick F.N., Surface R.A., Pritchard J.Y., Dailey R.A., Townsend E.C. & Inskeo E.K.** (1993). Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol. Reprod.* **49**, 1133-1140.
- Schwartz J. & Carter-Su C.** (1988). Effect of growth hormone on glucose metabolism and glucose transport in 3T3-F 442 A cells : dependence on cell differentiation. *Endocrinology* **122**, 2247-2256.
- Shimasaki S., Shimonaka M. & Ling N.** (1991). Isolation and molecular cloning of insulin-like growth factor-binding protein-6. *Mol. Endocrinol.* **5**, 938-948.
- Simmen R.C.M., KO Y. & Simmen F.A.** (1993). Insulin-like growth factors and blastocyst development. *Theriogenology* **39**, 163-175.
- Skottner A., Clark R.G., Fryklund L. & Robinson I.C.A.F.** (1989). Growth responses in a mutant Dwarf rat to human growth hormone and recombinant human insulin like growth factor-I. *Endocrinology* **124**, 2519-2526.

- Smal J. & De Meyts P.** (1989). Sphingosine, an inhibitor of protein kinase C, suppresses the insulin-like effects of growth hormone in rat adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4705-4709.
- Smith W.C., Kuniyoshi J. & Talamantes F.** (1989). Mouse serum growth hormone (GH) binding protein has GH receptor extracellular and substituted transmembrane domains. *Mol. Endocrinol.* **3**, 984-990.
- Straus D.S. & Takemoto C.D.** (1990). Effect of dietary protein deprivation on insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, IGF binding protein-2, and serum albumin gene expression in the rat. *Endocrinology* **127**, 1849-1860.
- Talavera F. & Menon K.M.** (1991). Studies on rat luteal cell response to Insulin-like Growth Factor-I (IGF) : identification of a specific cell membrane receptor for IGF-I in the luteinized rat ovary. *Endocrinology* **129**, 1340-1346.
- Tans C.** (1992). Mémoire présenté en vue de l'obtention d'un grade de licencié en Sciences biologiques : Endocytose de l'hormone de croissance par le foie. Effet d'anticorps potentialisateurs. FUNDP Namur.
- Teissier M.P., Monget P., Monniaux D. & Durand P.** (1994). Changes in insulin-like growth factor-II/Mannose-6-phosphate receptor during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Biol. Reprod.* **50**, 111-119.
- Tsonis C.G., Cahill L.P., Carson R.S. & Findlay J.K.** (1984). Identification at the onset of luteolysis of follicles capable of ovulation in the ewe. *J. Reprod. Fert.* **70**, 609-619.
- Turnbull K.E., Braden A.W.H. & Mattner P.E.** (1977). The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci* **30**, 229-241.
- Ullrich A. & Schlessinger J.** (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* **61**, 203-212.
- Vance M.L., Hartman M.L. & Thorner M.O.** (1992). Growth hormone and nutrition. *Horm. Res.* **38**, (suppl.1), 85-88.
- Vikman K., Isgaard J. & Edén S.** (1991). Growth hormone regulation of insulin-like growth factor-I mRNA in a rat adipose tissue and isolated rat adipocytes. *J. Endocrinol.* **131**, 139-145.
- Viveiros M.M. & Liptrap R.M.** (1994). Glucocorticoid influence on granulosa cell IGF-I and steroid hormone synthesis. *J. Reprod. Fert.* Abstract Series **13**, 80.
- Walton J.S., McNeilly J.R., McNeilly A.S. & Cunnigham F.J.** (1977). Changes in concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin and progesterone in the plasma of ewes during the transition from anoestrus to breeding activity. *Endocrinology* **75**, 127-136.
- Webb R., Baxter G., McBride D., Ritchie M. & Spingbett A.G.** (1992). Mechanism controlling ovulation rate in ewes in relation to seasonal anoestrus. *J. Reprod. Fert.* **94**, 143-151.

- Webb R. & England B.G.** (1982). relationship between LH receptor concentrations in thecal and granulosa cells *in vivo* and *in vitro* steroid secretion by ovine follicles during the preovulatory periode. *J. Reprod. Fert.* **66**, 169-180.
- Webb R. & Gauld I.K.** (1984). Final maturation of the preovulatory follicle in the ewe. In : "Période péri-ovulatoire". (Eds.) Sarat-Baroux J. & Thibault Ch., Masson, pp 21-31.
- Webb R., Gong J.G. & Bramley T.A.** (1994). Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. *Theriogenology.* **41**, 25-30.
- Wells J.A., Cunningham B.C., Fuh G., Lowman H.B., Bass S.H., Mulkerrin M.G., Ultsch M. & de Vos A.B.** (1993). The molecular basis for growth hormone-receptor interactions. *Recent Progress in Hormone research.* **48**, 253-275.
- Wilson J.D. & Foster D.W.** (1992). Williams textbook of Endocrinology. 8th Edition. W.B. Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich, Inc.
- Whitehead S.A.** (1990). A gonadotropin surge attenuating factor ? *J. Endocrinol.* **126**, 1-4.
- Woodfill C.J.I., Wayne N.L., Moenter S.M. & Karsh F.J.** (1994). Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rythm in sheep : identification of season-specific time cues. *Biol. Reprod.* **50**, 965-976.
- Wright S.** (1980). Physiologie appliquée à la médecine. Médecine-Sciences. deuxième édition française. Flammarion.
- Yen S.C.C.** (1991). The hypothalamic control of pituitary hormone secretion. In : Yen S.S.C. and Jaffe R.M.D. (Eds) "Reproductive Endocrinology", Saunders Company, 65-104.
- Yen S.C.C. & Jaffe R.B.** (1991). Reproductive Endocrinology. Third Edition. W.B. Saunders Company.
-